



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

LA EVOLUCIÓN DE SIGNA EN LEPIDOPTERA, SU CORRELACIÓN
CON LAS CUBIERTAS DE LOS ESPERMATÓFOROS
Y SUS PATRONES FILOGENÉTICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

BIÓL. VÍCTOR MANUEL SÁNCHEZ MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS RAFAEL CORDERO MACEDO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE DEL 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Agradezco a CONACYT y DGEP por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría, a PAPIIT IN208806-2 (UNAM) por el financiamiento, y la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me ha dado durante todos estos años de estudios.

En especial quiero dar las gracias a mi asesor el Dr. Carlos Cordero por todas sus enseñanzas, tiempo, consejos, paciencia, amistad y sobre todo por aceptarme como su alumno durante todos estos años.

A mi comité tutorial la Dra. Marcela Osorio y el M. en C. Enrique González por el apoyo y comentarios en la realización de este trabajo.

A mi jurado, el Dr. Alejandro Córdoba y el Dr. Raúl Cueva, por su revisión y comentarios que permitieron mejorar este trabajo.

Agradecimientos personales

A la Dra. Blanca Hernández por su ayuda y consejos en el análisis filogenético de este trabajo.

Al Dr. Luis Mendoza, por su ayuda en las colectas.

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la UNAM/Universidad Autónoma de Tlaxcala y en especial a la Dra. Leticia Nicolás por su apoyo y amabilidad al permitirme usar el criostato.

A mis padres Víctor Sánchez y Guadalupe Martínez que siempre me han apoyado en todas mis decisiones, por sus consejos y cuidados. A ellos les dedico en especial este trabajo, gracias por todo lo que me han dado.

A mi hermana Pilar Sánchez, que quiero y admiro por su dedicación y entrega en todo lo que hace.

A mis perros Rocky y Menelao, por su cariño incondicional en todo momento.

A mis mejores amigos que siempre han estado cuando los he necesitado: Inti, Carlos, Luis (Rudo), Joseph y Sinue, gracias por su amistad la cual espero perdure para siempre.

A Alma Mendoza, por su amistad y consejos en momentos difíciles. Te lo agradezco muchísimo, siempre serás mi amiga.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Ecología de la Conducta de Artrópodos, por su amistad, consejos y apoyo, gracias a ellos la maestría también fue divertida.

Celia Oliver, Haydeé Peralta, Ivette Galicia, Isadora Andrade, Jorge Canales, Lizeth Abundis, Miguel Moreno, Nubia Caballero y Vivian Méndez.

A Yamel Nacif, gracias por tu cariño y comprensión durante estos dos años, se que solo es el principio de una vida juntos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
Predicciones.....	8
OBJETIVOS.....	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
Objetivo 1: Predicción 1 y 2.....	9
Especies de estudio.....	9
Sitios de colecta.....	9
Técnica de corte y medición de los espermatozoides.....	10
Objetivo 2: Predicción 3.....	11
Obtención de datos sobre los <i>signa</i>	11
Construcción del superárbol.....	12
Mapeo de las características de los <i>signa</i>	14
RESULTADOS.....	18
1. Los <i>signa</i> en <i>Heliconius</i> y <i>Eueides</i>	18
2. Predicciones acerca del grosor de las cubiertas de los espermatozoides.....	21
Predicción 1: Dentro del género <i>Heliconius</i> las cubiertas de los espermatozoides de las especies poliándricas serán más gruesas que las de las especies monándricas.....	21
Predicción 2: Dentro del género <i>Eueides</i> se espera que (2a) las cubiertas de los espermatozoides de las especies monándricas sean más gruesas que las de las poliándricas; o bien que (2b) en las especies poliándricas los <i>signa</i> sean más grandes y/o más “punzo-cortantes” (es decir, puntiagudos, afilados, aserrados, etc.) que los de las especies monándricas.....	22
3. Predicción 3: Los <i>signa</i> presentarán el patrón de evolución divergente típico de las características sujetas a coevolución sexual.....	23
DISCUSIÓN.....	30
LITERATURA CITADA.....	36

Resumen

La poliandria es muy común en los lepidópteros y puede tener beneficios para las hembras, ya que de los eyaculados pueden obtener nutrientes, sustancias que estimulan la ovogénesis y la oviposición, así como sustancias defensivas. Por otro lado, en los lepidópteros existe una relación inversa entre la duración del periodo post-cópula en que las hembras no son sexualmente receptivas y la cantidad de espermátforo remanente en el *corpus bursae* (estructura femenina en forma de saco en la cual el espermátforo es depositado durante la cópula). Como las hembras pueden utilizar todas las sustancias del eyaculado antes de haber agotado el esperma de apareamientos previos, la selección podría favorecer adaptaciones masculinas que disminuyan las tasas de digestión de los espermátforos, tales como la producción de cubiertas de espermátforos gruesas y duras, incrementando el periodo refractario (periodo de no receptividad sexual de las hembras) más allá del óptimo de las hembras. A su vez, estas adaptaciones masculinas favorecerían adaptaciones femeninas que permitan una más rápida apertura y digestión de los espermátforos, tales como los *signa* (estructuras esclerotizadas en forma de bandas o espinas localizadas dentro del *corpus bursae*), que sirven para romper los espermátforos y que están presentes en muchos grupos de Lepidoptera. Este proceso de adaptación y contra-adaptación entre los sexos podría repetirse múltiples veces dando origen a una coevolución entre los *signa* y las características de la cubierta de los espermátforos. Dos géneros interesantes para evaluar esta hipótesis son *Heliconius* y *Eueides* (Nymphalidae), ya que ambos presentan especies con patrones de apareamiento contrastantes (monándricos y poliándricos), pero difieren en que en todas las especies de *Eueides* existen *signa*, mientras que en *Heliconius* las especies poliándricas tienen *signa* y las monándricas no. En este trabajo se evaluaron tres predicciones desprendidas de la hipótesis general de coevolución sexual. La **Predicción 1** es que dentro del género *Heliconius* las cubiertas de los espermátforos de las especies poliándricas serán gruesas que las de las especies monándricas. Utilizando cortes histológicos de los espermátforos de varias especies de *Heliconius* se pudo corroborar que las especies poliándricas tienen cubiertas más gruesas que las de las especies monándricas. La **Predicción 2** se aplica a *Eueides* y tiene dos versiones: (a) en las especies monándricas las cubiertas de los espermátforos serán más gruesas que las de las especies poliándricas, o (b) en las especies poliándricas los *signa* serán más grandes y/o más “filosos” (es decir, puntiagudos, afilados, aserrados, etc.) que los de las especies monándricas. Los resultados apoyan la predicción (a), ya que las cubiertas de espermátforos son más gruesas en las especies monándricas que en las poliándricas, lo cual puede interpretarse en el sentido de que los machos están ganando la carrera coevolutiva a las hembras forzándolas a ser monándricas. La **Predicción 3** es que los *signa* presentarán el patrón de evolución divergente típico de características que evolucionan como resultado de la coevolución sexual. Al “mapear” cuatro características de los *signa* (presencia/ausencia, forma, número y posición de los *signa*) en un “superárbol” filogenético se encontró evidencia de que los *signa* evolucionan de manera divergente. En conclusión, los resultados de este trabajo apoyan la hipótesis de que los *signa* han evolucionado como resultado de la coevolución sexual.

Abstract

Polyandry is common in the Lepidoptera and it can have benefits for females because they can obtain male resource donations transferred in the ejaculate, like nutrients and defensive substances. On the other hand, in many Lepidoptera there is an inverse relationship between the length of the female's refractory period and the amount of spermatophore remaining in her corpus bursae (a sac-like structure in which a spermatophore is deposited during copulation). Since females may be selected to remate before exhausting the sperm of their previous mate, selection should favor male adaptations, such as the production of thick/hard spermatophore envelopes, which decreases the rate of spermatophore digestion and increase the refractory period (*i.e.*, the post-mating period during which females are not sexually receptive) beyond the females' optimum. This male adaptation, in turn, should select for female adaptations, such as the *signa* (*i.e.*, sclerotized structures in form of bands or spines located on the inner wall of the female's corpus bursae) present in several groups of Lepidoptera, that permit a more rapid tearing and digestion of spermatophores. This process of ongoing adaptation and counteradaptation between the sexes could result in a process of antagonistic coevolution between *signa* and spermatophores envelopes. Two interesting genera to evaluate this hypothesis are *Heliconius* and *Eueides* (Nymphalidae) because in the two genera there are species with contrasting mating systems (monandrous and polyandrous), and in *Heliconius* there are species with and without *signa*, whereas in *Eueides* all species have *signa*.

We tested three predictions of this "sexual coevolution hypothesis". First, since within *Heliconius* monandrous species lack *signa* and polyandrous species have them, it was expected that the spermatophore envelopes of polyandrous species were thicker/harder than those of the monandrous species. Using histological sections of the spermatophores we found that, as expected, polyandrous species has thicker envelopes than monandrous species. Second, since in *Eueides* both monandrous and polyandrous species have *signa*, we expected one of two things: (a) in monandrous species the spermatophore envelopes will be thicker than those of polyandrous species, or (b) in polyandrous species the *signa* will be bigger and/or sharper (that is to say, pointed, sharp, serrated, etc.) than in monandrous species. We found evidence in support of prediction (a). For this reason we suggest that males are one step ahead in the coevolutionary race and induce females to be monandrous. Third, *signa* will present the pattern of divergent evolution typical of characteristics evolved by sexual coevolution. Using a phylogenetic hypothesis, four characteristics of *signa* (presence/absence, form, number and position of *signa*) were mapped and evidence supporting divergent evolution was found. In conclusion, we found evidence supporting three predictions of hypothesis that *signa* have evolved by sexual coevolution.

INTRODUCCIÓN

La coevolución se define como la evolución recíproca entre dos participantes los cuales pueden ser miembros de especies distintas (por ejemplo, depredadores y presas o mutualistas), en cuyo caso hablamos de coevolución interespecifica, o miembros de una misma especie (por ejemplo, hembras y machos, padres e hijos o machos compitiendo por el acceso a parejas), denominado coevolución intraespecifica. Los participantes se pueden ver o no beneficiados con esta interacción (interacciones mutualistas o antagonistas). Actualmente los estudios sobre la coevolución abarcan una gran variedad de temas que van por ejemplo, desde los enfocados a los polinizadores y plantas, depredadores y presas (incluida la evolución del mimetismo), los parásitos y sus hospederos hasta las diferencias (y concordancias) de intereses de hembras y machos durante las diferentes fases del proceso reproductivo, por tan solo mencionar algunas. La gran variedad de temas que abarca el proceso coevolutivo permite entender cómo se establecen las interacciones biológicas entre las especies que posteriormente darán lugar a procesos de especiación y de organización de la biodiversidad del planeta (Thompson, 1999, 2003). Actualmente el tema de la coevolución ha tenido un gran auge sobre todo en el campo de estudio de la selección sexual, donde se ha visto que muchas características de los machos y las hembras, en especial características propias de la reproducción en los animales podrían ser el producto de la coevolución sexual (Rice, 2000; Arnqvist y Rowe, 2002; Cordero y Eberhard, 2003, 2005; Chapman, *et al.* 2003; Hosken y Stockley 2004; Arnqvist y Rowe 2005; Córdoba, 2005; Eberhard, 2006). Esta dinámica coevolutiva entre machos y hembras podría ser el caso del trabajo que se describe a continuación.

En muchos lepidópteros poliándricos (y posiblemente en al menos una especie monándrica; ver caso de *Callophrys xami* en Caballero [2004] y Abundis [2006]) existe una relación positiva entre la duración del periodo postcopulatorio en que las hembras no están sexualmente receptivas (= periodo refractario) y el grado de distensión del *corpus bursae* (estructura femenina en forma de bolsa en donde los machos depositan un eyaculado constituido por un espermátforo y otras sustancias adicionales durante la cópula). El grado de distensión del *corpus bursae* está determinado por la cantidad de eyaculado que contiene (Figura 1) (Sugawara, 1979; He y Tsubaki, 1991; Karlsson, 1995, 1996; Torres-Vila *et al.*

1997; Wedell y Cook 1999; Wedell, 2001, 2005). Debido a que un incremento en la duración del periodo refractario disminuye la intensidad de la competencia espermática (Arnqvist y Nilsson, 2000; Wedell, 2001; Cordero, 2005), se espera que la selección sexual favorezca a los machos que prolongan dicho periodo más allá de la duración óptima desde el punto de vista de las hembras (Drummond, 1984; Cordero, 2005); (la competencia espermática en un sentido estricto se puede definir como la competencia entre espermatozoides de diferentes machos por la fertilización de los óvulos de una hembra, Parker, 1970). Una de las adaptaciones que permitirían a los machos incrementar el periodo refractario es la evolución de espermatozoides difíciles de digerir (por ejemplo, espermatozoides con cubiertas gruesas y duras) y que consecuentemente disminuyan la tasa a la que las hembras pueden digerir éstos y mantenga el *corpus bursae* distendido una mayor cantidad de tiempo (Cordero, 2005).

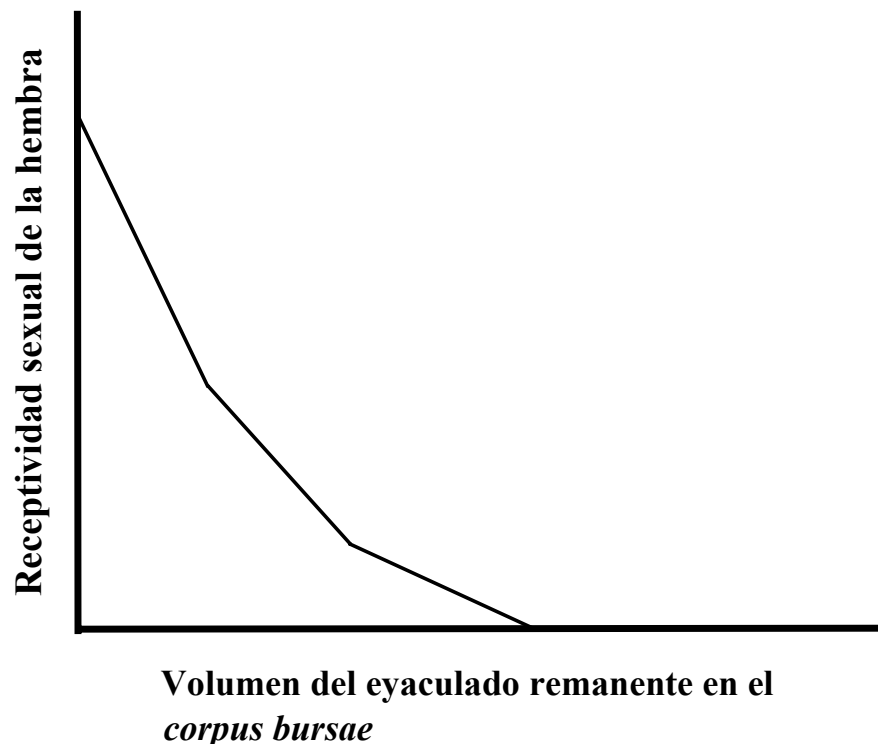


Figura 1. Relación inversa entre el volumen del eyaculado remanente en el *corpus bursae* y la receptividad sexual en las hembras de Lepidoptera. A mayor volumen de eyaculado dentro del *corpus bursae* menos receptivas son las hembras y a menor volumen más receptivas.

En respuesta a la evolución de estas adaptaciones masculinas, se espera que la selección favorezca en las hembras la evolución de contra-adaptaciones que les permita reestablecer tasas óptimas de digestión del espermátforo y de recuperación de la receptividad sexual para así volverse a aparear con otros machos y obtener alguna de las múltiples ventajas de la poliandria como la obtención de nutrientes, sustancias que estimulen la ovogénesis y la oviposición o sustancias defensivas a través del eyaculado (Vahed, 1998; Arnqvist y Nilsson, 2000; Wedell, Wiklund y Cook, 2002; Cordero, 2005). Un posible ejemplo de estas contra-adaptaciones femeninas son los *signa* (Cordero, 2005); estructuras con forma de diente, espina, peine, sierra o gancho, fuertemente esclerotizadas, que se encuentran en la pared interior del *corpus bursae* de las hembras de varios grupos lepidópteros (Hinton, 1964; Scoble, 1992; Powell, 2003; Sánchez, 2004) y que ayudan a abrir los espermátforos rasgándolos o perforándolos (Hinton, 1964; Rogers y Welles, 1984; Cheong, Lee y Park, 1990; Tschudi-Rein y Benz, 1990; Caballero, 2004; Galicia, 2006). Hinton (1964) menciona que cuando un *signum* (singular de *signa*) está presente casi siempre hay músculos insertados en su base (lo cual ha sido comprobado en estudios posteriores: Ferro y Akre, 1975; Drummond, 1984; Rogers y Welles, 1984; Tschudi-Rein y Benz, 1990), por lo que la apertura de los espermátforos por los *signa* puede ser mediada a través de contracciones musculares del abdomen de las hembras que dan lugar a perforaciones o rasgaduras en las cubiertas de los espermátforos facilitando así su digestión.

Este proceso de adaptación y contra-adaptación entre los sexos podría repetirse múltiples veces dando origen a una coevolución antagonista (Holland y Rice, 1998) entre los *signa* y muchas de las características de la cubierta de los espermátforos, como podrían ser el grosor de la cubierta o el contenido de quitina y *signa* más eficientes (Cordero, 2005). Además, se espera que las diferencias de intereses que existen entre machos y hembras se intensifiquen a medida que aumenta el grado de poliandria (Cunningham y Birkhead, 1998; Rice, 2000). Cordero (2005) también considera la posibilidad de que la coevolución sexual entre los *signa* y las cubiertas de los espermátforos sea resultado de la elección femenina y no de una coevolución antagonista, y discute la gran dificultad para evaluar la importancia

relativa de ambos tipos de selección en el proceso de coevolución sexual (para una discusión más amplia de este último punto ver también Cordero y Eberhard, 2003).

La hipótesis general de que la evolución de los *signa* y las cubiertas de los espermátóforos son resultado de la coevolución sexual (Cordero 2005), que se pretende evaluar en este trabajo, predice una secuencia de aparición y asociación entre la poliandria, la presencia de *signa* y las cubiertas de espermátóforos gruesas y difíciles de romper (Sánchez, 2004; Cordero, 2005; Figura 2). La primera parte de esta hipótesis (asociación entre la poliandria y la presencia de *signa* y la monandria y su ausencia) ya fue evaluada; los datos de una muestra de 20 géneros muestran una tendencia de que los géneros monándricos carezcan de *signa* mientras que los géneros poliándricos los presenten (Sánchez, 2004), además esta tendencia también fue encontrada en un análisis de evolución correlacionada que utilizó una hipótesis filogenética para probarlo en una muestra de 37 géneros (Sánchez, Hernández y Cordero, en preparación). Desafortunadamente, la amplia revisión de la literatura realizada por Sánchez (2004) mostró que, a pesar de que se encontró información sobre la presencia/ausencia y características de los *signa* para más de 1,000 especies de mariposas e información sobre el patrón de apareamiento de 81 especies, la información encontrada sobre de las cubiertas de los espermátóforos fue sumamente escasa. Esta hipótesis de forma más general también predice una divergencia evolutiva en los *signa*, como es típico de las características sujetas a coevolución sexual, (Eberhard, 1996; 2006; Holland y Rice, 1998; Chapman *et al.*, 2003; Hosken y Stockley, 2004; Sánchez, 2004; Cordero, 2005).

La divergencia en características de las hembras y los machos que están bajo una dinámica coevolutiva es probable cuando machos y hembras no llegan a una solución estable a los problemas que se imponen unos a otros (Eberhard, 2006). Las posibilidades de encontrar una solución estable al conflicto sexual disminuyen a medida que se incrementa el nivel de poliandria, ya que la poliandria es directamente proporcional a la magnitud de las diferencias de intereses reproductivos de hembras y machos (Hosken y Stockley, 2004). En el caso de los *signa* tenemos que estas estructuras podrían estar evolucionando divergentemente en distintas poblaciones/especies si los machos de distintas poblaciones/especies colocan mayor o menor cantidad de quitina en distintos lugares de la cubierta del espermátóforo, esto haría que no existiera una forma o tamaño ideal para

romper o perforar la cubierta de todos los espermátóforos. La divergencia de los *signa* también podría deberse a que las presiones de selección responsables de la coevolución sexual de dichas estructuras podrían variar en magnitud y naturaleza en distintas poblaciones/especies debido a que, por ejemplo, diferencias en la densidad poblacional que pueden afectar la intensidad de la competencia espermática, o a diferencias en la forma y el tamaño del *corpus bursae* en distintas poblaciones/especies, las cuales podrían producir distintos resultados para la coevolución sexual (Eberhard, 1985, 2006).

Para evaluar la divergencia de los *signa* predicha por la hipótesis de la coevolución sexual se necesita hacer un análisis comparativo basado una hipótesis filogenética (Emlen, *et al.*, 2005). Desafortunadamente, no se cuenta con filogenias completas para los Lepidoptera. Una solución para este problema es la construcción de un superárbol a partir de las filogenias existentes de grupos particulares (Bininda-Emonds, 2004; Eulenstein *et al.* 2004). En este trabajo se pondrá a prueba la predicción de que los *signa* han evolucionado divergentemente mediante un análisis de este tipo.

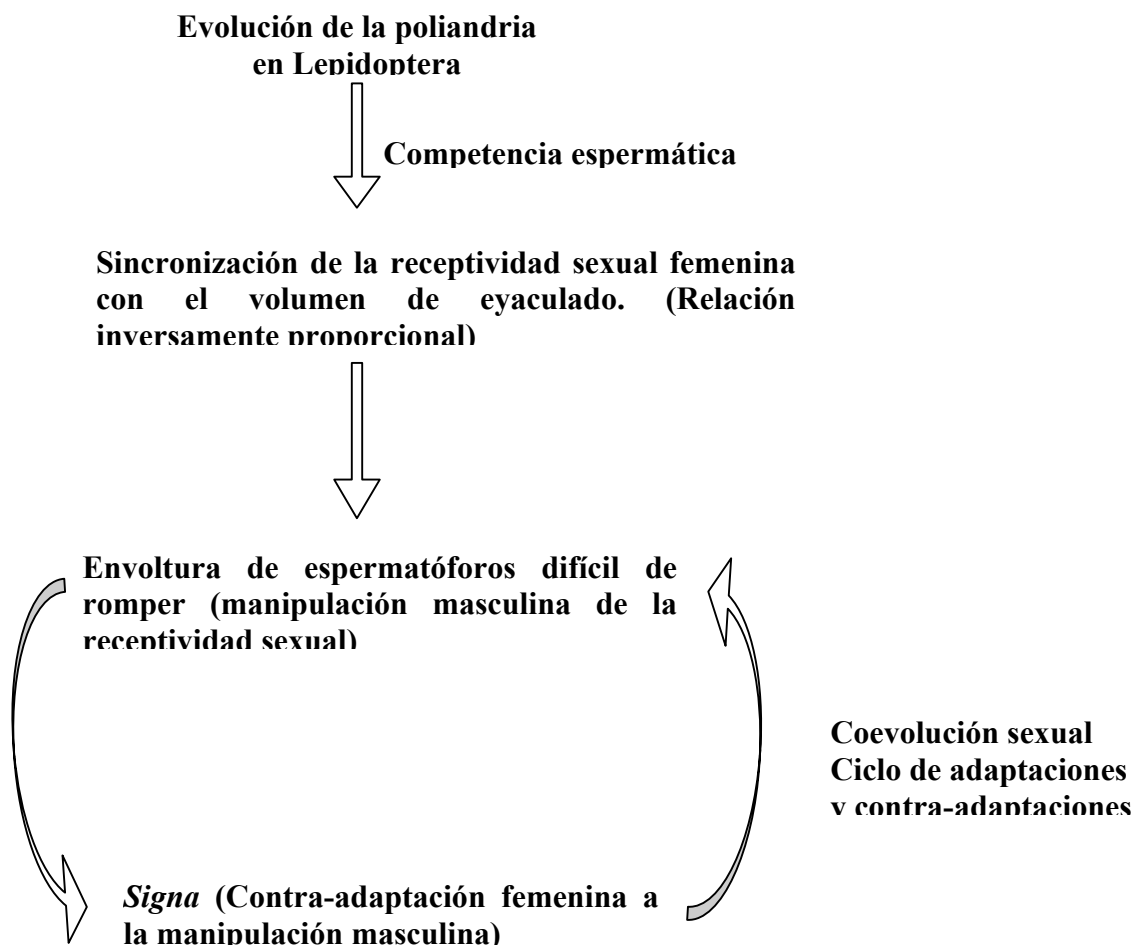


Figura 2. Hipótesis general de la coevolución sexual entre los *signa* y las cubiertas de los espermatozoides (Cordero, 2005). Se pueden ver los pasos previos que se necesitan para que la coevolución entre las características de los *signa* y las características de cubiertas de los espermatozoides se pueda dar.

Los géneros *Heliconius* y *Eueides* son particularmente interesantes para evaluar la hipótesis antes mencionada, ya que cada uno de estos géneros incluye especies monándricas y poliándricas; además de que en *Heliconius* hay especies con *signa* y especies que carecen de él (Sánchez, 2004), mientras que en *Eueides* todas las especies presentan *signa*. Por otra parte, en el caso de *Heliconius* el sistema de apareamiento monándrico está asociado con la ausencia de los *signa* y el poliándrico con la presencia de los mismos como se espera de acuerdo con la hipótesis de coevolución sexual (Sánchez, 2004; Sánchez, Hernández y Cordero, en preparación). En este trabajo se han evaluado las

siguientes predicciones específicas derivadas de la hipótesis de la coevolución sexual de los *signa* planteada anteriormente utilizando varias especies de *Heliconius* y *Eueides*:

Predicción 1. Dado que dentro del género *Heliconius* las especies monándricas, con una sola excepción, carecen de *signa* y las especies poliándricas los presentan (Sánchez 2004), se espera que las cubiertas de los espermátóforos de las especies poliándricas sean gruesas, en comparación con las de las especies monándricas donde se espera que los espermátóforos tengan cubiertas delgadas.

Predicción 2. Dado que en el género *Eueides* tanto las especies monándricas como las poliándricas presentan *signa*, se espera una de dos alternativas:

2a. En las especies monándricas las cubiertas de los espermátóforos serán más gruesas que las de las especies poliándricas (esta predicción supone que en las especies monándricas los machos van “un paso adelante” de las hembras en la carrera coevolutiva, ya que la monandria es el resultado de *signa* menos efectivos).

2b. En las especies poliándricas los *signa* serán más grandes y/o más “punzo-cortantes” (es decir, puntiagudos, afilados, aserrados, etc.) que los de las especies monándricas (esta predicción supone que en las hembras de especies poliándricas van “un paso adelante” que los machos en la carrera coevolutiva, donde la poliandria es el resultado de *signa* más efectivos).

Predicción 3. Los *signa* de los lepidópteros presentarán el patrón de divergencia típico de las características sujetas a coevolución sexual (Eberhard, 1996; 2006; Holland y Rice, 1998; Chapman *et al.*, 2003; Hosken y Stockley, 2004; Sánchez, 2004; Cordero, 2005).

OBJETIVOS

- 1) Poner a prueba las predicciones 1 y 2 mediante la comparación de las características de las cubiertas de los espermatóforos y de los *signa* en especies monándricas y poliándricas, con y sin *signa* respectivamente de los géneros *Heliconius* y *Eueides*.
- 2) Poner a prueba la predicción 3 mapeando en una filogenia general de Lepidoptera las siguientes características de los *signa*: presencia/ausencia, forma, número y posición relativa dentro del *corpus bursae* y así determinar si hay evolución divergente sobre los *signa*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Objetivo 1: Predicción 1 y 2

Especies de estudio

Heliconius charitonia, *H. erato*, *H. hortense* y *H. ismenius* (Lepidoptera: Nymphalidae) habitan en gran parte del territorio mexicano así como Centro y Sudamérica y en el caso de *H. charitonia* hasta el sur de los Estados Unidos; estas especies se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 2000 metros de altura, encontrándose frecuentemente en los márgenes de los bosques y áreas con vegetación secundaria (DeVries, 1987; Luis-Martínez, *et al.*, 2003). Las plantas hospederas de las larvas incluyen una amplia variedad de especies de la familia Passifloraceae (Gilbert, 1991). Como es típico de todas las especies de *Heliconius* con apareamiento pupal, *H. charitonia*, *H. erato* y *H. hortense* son monándricas (Gilbert, 1991, Mendoza, 2005), a diferencia de *H. ismenius* que es poliándrica y no tiene apareamiento pupal.

Eueides aliphera, *E. isabella* y *E. lybia*, (Lepidoptera: Nymphalidae) son similares a *Heliconius* pero de menor tamaño, con un cuerpo y antenas más pequeñas. Este género se encuentra distribuido desde México hasta Sudamérica (DeVries, 1987). Las especies estudiadas van desde el nivel del mar hasta los 1500 metros de altura, encontrándose frecuentemente en los márgenes de los bosques y áreas de vegetación secundaria (DeVries, 1987; Luis-Martínez *et al.*, 2003). Las plantas hospederas de las larvas incluyen una amplia variedad de especies de Passifloraceae y Turneraceae (DeVries, 1987). Las larvas son similares a las de *Heliconius*, solo que las de *Eueides* son más coloridas y se alimentan solo de hojas maduras. En este género no se presenta el apareamiento pupal.

Sitios de colecta

Los sitios de colecta para *H. charitonia*, *H. erato*, *H. hortense* y *H. ismenius*, incluyeron los estados de San Luis Potosí y Veracruz. Los lugares de colecta son los siguientes: Parque Francisco Javier Clavijero, Xalapa, Veracruz (19°31'25" N, 96°28'41" W; Julio-Diciembre 2005); Jardín Botánico del Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz (19°30' N, 96°57' W; Julio-Diciembre 2005); Teocelo, Veracruz (19°22'4" N, 96°55'58" W; Julio-Diciembre 2005); Palmira Viejo, San Luis Potosí (21°41'25.60"N, 99°0'21.48"W; Febrero 2006). Las colectas de *E. aliphera*, *E. isabella* y *E. lybia* se realizaron en el estado de Veracruz. Los sitios de colecta específicos fueron: Parque Francisco Javier Clavijero, Xalapa, Veracruz (19°31'25" N, 96°28'41" W; Julio-Diciembre 2005); Jardín Botánico del Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz (19°30' N, 96°57' W; Julio-Diciembre 2005); Teocelo, Veracruz (19°22'4" N, 96°55'58" W; Julio-Diciembre 2005).

Técnica de corte y medición de los espermátóforos

Se midió el grosor de las cubiertas de los espermátóforos en diferentes áreas del espermátóforo desde el *colum* hasta el extremo opuesto (ver Figura 3), en una muestra de hembras de tres especies monándricas y una especie poliándrica del género *Heliconius*. Los abdómenes de las hembras recién colectadas fueron separados del resto del cuerpo con unas tijeras. Posteriormente, los abdómenes se colocaron en tubos eppendorf con alcohol al 70% para su preservación durante el transporte al laboratorio. Las alas de las mariposas se conservaron en bolsas de papel glassine para su determinación en el laboratorio de las especies colectadas. En las bolsas se colocaron los datos de la localidad de colecta, el nombre de la especie y la hora de colecta. En el laboratorio los abdómenes fueron retirados del alcohol, guardados nuevamente en tubos eppendorf debidamente etiquetados y colocados en un congelador (Revco) a -20°C hasta su disección y extracción del *corpus bursae* para la búsqueda de espermátóforos bajo el microscopio estereoscópico marca Olympus® modelo SZH10. Durante la disección también se permitió corroborar el patrón de apareamiento de las hembras mediante el conteo de espermátóforos y restos de espermátóforos (Drummond, 1984; Cordero, 2000).

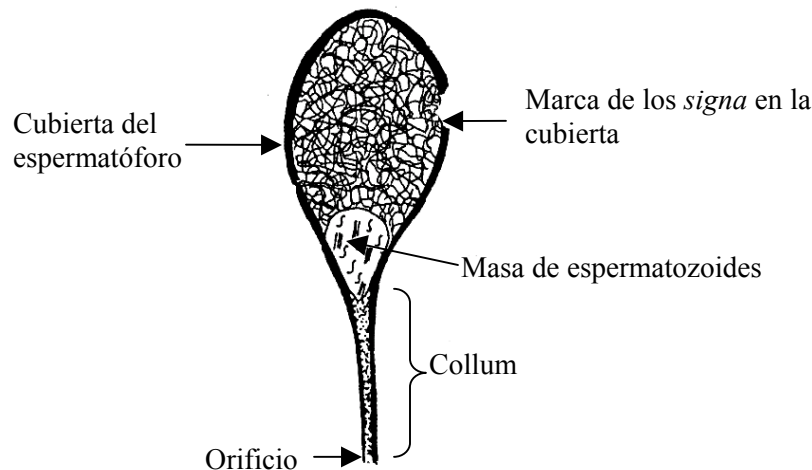


Figura 3. Esquema de un espermátóforo de *Pieris brassicae* (Pieridae) (Tomado de Tschudi-Rein y Benz, 1990).

El grosor de la cubierta de los espermátóforos fue medido solamente en los espermátóforos que se encontraron más conservados, es decir, que no estuvieran colapsados y con eyaculado dentro de ellos. Como resultado aun mantenían distendido el *corpus bursae* de la hembra, por lo que no se utilizaron todos los espermátóforos de todos los ejemplares colectados (ver Cuadro 2). El procedimiento para la realización de los cortes fue el siguiente: el *corpus bursae* diseccionado se colocó

en un tubo eppendorf con una solución al 30% de azúcar, hasta que la muestra había descendido de la columna de agua por la saturación de los tejidos con la solución, esto se realizó para dar a la muestra “crioprotección” ya que los cortes se realizaron a temperatura de - 24° C. Ésto evitó que los tejidos se expandieran y rompieran durante la congelación. Una vez que la muestra alcanzó la saturación y descendió (aproximadamente 24 horas después), el *corpus bursae* se retiró de la solución con azúcar y se transfirió a una solución al 10% de formaldehído durante 72 horas. Lo cual permitió que el tejido adquiriera más rigidez evitando que al realizar los cortes éstos se desgarraran. Los cortes se realizaron en un criostato marca Leica® modelo CM1850. La muestra se colocó en una solución de montaje (Tissue-Tek O.C.T.) a una temperatura de -24°C hasta su congelación para posteriormente realizar cortes secuenciales de 40µ de grosor. Los cortes de cada muestra (p. ej. un *corpus bursae* con su espermátforo dentro), fueron colocados secuencialmente en portaobjetos que habían sido previamente gelatinizados para adherencia de los cortes.

Los cortes se secaron a temperatura ambiente (24 -26°C) por un periodo de 4 días. Posteriormente se tiñeron con azul de metileno al 1% agregando una gota del colorante a la muestra, dejándola reposar por 1 minuto y enjuagando después la muestra con agua corriente.

Bajo un microscopio óptico marca Olympus® modelo BX51 se tomaron fotografías digitales de las preparaciones con un aumento 40X del objetivo, de las cuales se midió el grosor de las cubiertas de los espermátforos con ayuda del programa Image Tool®, “cargando” en el programa previamente a la medición de la imágenes una referencia de escala, la cual fue un porta objetos con una escala de un milímetro fotografiada también digitalmente bajo el mismo microscopio y objetivo que los cortes.

Las mediciones de la cubierta de los espermátforos se realizaron en cuatro puntos periféricos del corte histológico (a manera de los cuatro puntos cardinales), en las preparaciones donde no se tenían cortes completos de muestra para medir en cuatro puntos, se midieron en las zonas más completas.

Objetivo 2: Predicción 3

Obtención de datos sobre los *signa*

En esta predicción se estimó el nivel de homoplasia de la presencia, número, posición y forma de los *signa*, mediante un análisis comparativo que tomó en cuenta el grado de parentesco evolutivo existente entre los distintos taxones estudiados (es decir, las relaciones filogenéticas). Para la obtención de datos sobre las características de los *signa* se revisaron todos los volúmenes de las

revistas más importantes sobre Lepidoptera (Journal of the Lepidopterist's Society, Journal of Research on the Lepidoptera, Bullentin of the Allyn Museum, SHILAP Revista de Lepidopterología, Tropical Lepidoptera y Holartic Lepidoptera), así como artículos de otras revistas de ámbito entomológico en general pero que no fueron revisadas en su totalidad debido a que no se tuvieron colecciones completas disponibles o a que no se especializan en lepidópteros (p. ej., Annals of the Entomological Society of America y Zootaxa); la fuente principal de información fueron artículos donde se describen nuevos taxones y revisiones taxonómicas. Con los datos obtenidos se construyó una base de datos sobre la presencia/ausencia, forma (ver categorías abajo), posición relativa (ver abajo) y número de *signa*.

Construcción del superárbol

Para poder estimar el grado de homoplasia de los diferentes aspectos de los *signa* se construyó un “superárbol” filogenético a partir de filogenias parciales (Baum, 1992; Ragan, 1992). Este método ya ha sido utilizado para evaluar hipótesis evolutivas en otros grupos taxonómicos (para un resumen ver Bininda-Emonds, 2004). Esto fue necesario ya que, mientras la información recopilada acerca de los *signa* abarcó una amplia gama de grupos taxonómicos (la base de datos contiene información de 1,243 especies comprendidas en 349 géneros, 40 familias y 18 superfamilias), no existen hipótesis filogenéticas lo suficientemente amplias y detalladas que incluyan, si no todos, al menos una buena proporción de los grupos de los cuales se obtuvo información. En la construcción del superárbol para Lepidoptera se trató de incluir la mayor cantidad de grupos y que estos representaran desde los menos hasta los más derivados, sin embargo la información que se tenía de los *signa* muy pocas veces concordaba con la información filogenética, lo cual disminuyó la muestra útil para el análisis; Por otro lado, se trató de eliminar las críticas en la construcción de un superárbol (Bininda-Emonds, 2004), como son la utilización de filogenias basadas en los mismo caracteres mapeados, la replicación de datos al tomar distintas filogenias hechas por ejemplo de las mismas secuencias moleculares, etc. reduciendo aun más la cantidad de taxones analizados.

Dadas estas consideraciones, el superárbol fue construido a partir de nueve filogenias parciales “fuente” (Geiger, 1980; Nijhout, 1991; Regier, *et al.* 1998; Brower, 2000; Abraham, *et al.* 2001; Powell, 2003; Kaila, 2004; Mitchell, Mister y Regier, 2005; Wahlberg, *et al.* 2005) y abarcó la siguiente fracción de los taxones sobre los cuales encontramos información: 60 géneros, 12 subfamilias, 5 familias comprendidos en 13 superfamilias y un grupo externo (en total se analizaron 78 unidades taxonómicas operacionales [=OTUS]). Las filogenias “fuente” se localizaron mediante

la búsqueda de literatura en varias bases de datos (Bione, Biosis, Blackwell Synergy, CSA Illumina, Science direct, 1995-2005). Los criterios para decidir qué filogenias “fuente” utilizar fueron (a) que la reconstrucción filogenética se hubiera hecho con caracteres moleculares (en los casos en que también se utilizaron caracteres morfológicos, únicamente se consideraron las filogenias que no incluyeran a los *signa* entre los caracteres utilizados para la reconstrucción, evitando con esto la replicación de los datos; Nunn y Barton, 2001), y (b) que las filogenias utilizadas no estuvieran basadas en las mismas secuencias moleculares, con el fin de evitar la replicación de los datos (Pisan y Wilkinson 2002, Bininda-Emonds, 2004). Cada uno de las filogenias “fuente” se transformó en un matriz binaria de 0 y 1s, y posteriormente se combinaron en una matriz general llamada también matriz de representación con parsimonia o MRP (Baum, 1992; Ragan, 1992). En la MRP se representó la estructura jerárquica de los árboles, donde cada nodo de cada uno de los árboles fuente fue representado por una matriz binaria, en donde los taxones terminales en el clado delimitado por ese nodo se representaron con 1 y todos los otros taxones se representan con 0 y así de forma descendente en el árbol hasta la “raíz”. Los taxones que no estaban presentes en un árbol individual fuente se representaron como “falta de datos” codificados en la matriz con “?” (Ragan; 1992) (Figura 4). El árbol fue enraizado con un grupo externo codificado para todos los demás taxones como 0 (Ragan, 1992). La MRP fue analizada por el método de parsimonia con una búsqueda heurística con el programa PAUP® * 4.0 (Swofford, 1999). Finalmente, se calculó el árbol de consenso estricto.

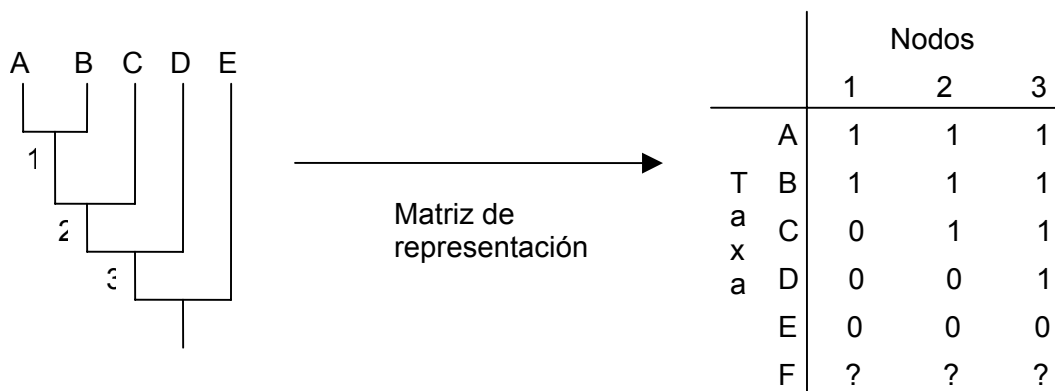


Figura 4. Método utilizado para transformar una filogenia en una matriz binaria de 0 y 1. Se muestra la correspondencia entre un árbol y su matriz de representación.

Actualmente existen distintos métodos para la construcción de Superárboles (Bininda-Emonds, 2004) aunque el más utilizado es la matriz de representación con parsimonia (MRP). Este método desarrollado por Baum (1992) y Ragan (1992), ha sido usado más como una alternativa para combinar datos en el ensamblaje de Superárboles, principalmente porque el método utiliza la topología de los árboles fuente más que los datos originales por lo que puede utilizar árboles derivados de diferentes tipos de datos [p. ej. secuencias moleculares, caracteres morfológicos, ecológicos, etc. (Bininda-Emonds y Bryant, 1998)], esto hace que el método de MRP se pueda utilizar en la construcción de un superárbol para Lepidoptera ya que muchas de las filogenias están basadas en caracteres morfológicos y en caracteres moleculares.

Mapeo de las características de los *signa*

Una vez obtenido el “superárbol” filogenético, se “mapearon” las características de los *signa* en la filogenia (presencia/ausencia, número, posición y forma). Las características fueron “mapeadas” y analizadas con el programa MacClade® (Maddison y Maddison, 2001). Los estados posibles de cada uno de los caracteres de los *signa* estudiados fueron los siguientes:

- (a) **Presencia/ausencia de *signa*.** Carácter con tres posibles estados: (1) “sin *signa*”; (2) “con uno o varios *signa*”, y (3) “puede o no presentar *signa*” (Figura 5).
- (b) **Número de *signa*.** Carácter con ocho posibles valores: (0); (1); (2); (0 y 2); (1 y 2); (2 y 4); (0, 1, 2, 3 y 4), y (muchos más que cuatro) (Figura 6).
- (c) **Posición relativa de los *signa* dentro del *corpus bursae*.** Carácter con ocho posibles estados (Figura 7): (1) “sin *signa*”; (2) “próxima”—los *signa* están próximos al *ductus bursae*; (3) “media”—los *signa* están justo a la mitad del *corpus bursae*; (4) “distal”—los *signa* se encuentran en el extremo opuesto al *ductus bursae*; (5) “próxima media”—los *signa* están situados tanto en la porción cercana al *ductus bursae* como a la mitad del *corpus bursae*; (6) “media distal”—los *signa* se encuentran en la porción media y en la distal del *corpus bursae*; (7) “Todo el largo”—los *signa* están a lo largo de todo el *corpus bursae*, y (8) “todas las anteriores”—los *signa* pueden ubicarse en cualquiera de las posiciones anteriores.
- (d) **Forma del *signum*.** Carácter con siete posibles estados de acuerdo a su aspecto: (1) “sin *signa*”; (2) “espinas”; (3) “púa”; (4) “mancha”; (5) “placa”; (6) “escudo”, y (7) “todas las anteriores”. La descripción de cada estado se presenta en el Cuadro 1 y se ejemplifica en la Figura 8.

Las categorías utilizadas de forma del *signum* no sesgan los datos a favor de la predicción al agrupar las formas en más de las que se podrían pensar, sino todo lo contrario: Estas categorías agrupan una amplia variedad de formas que podrían subdividirse en grupos más específicos, sin embargo y por motivos prácticos se decidió tan solo contemplar siete categorías de forma, mucho más generales. Esto facilitó el manejo de la información. Cada una de las categorías empleadas en este estudio se ven ejemplificadas en la Figura 8 y descritas en el Cuadro 1, donde también se puede apreciar la amplia variedad de formas dentro de cada una de las categorías, confirmando la falta de sesgo en las categorías empleadas.

Cuadro 1. Descripción detallada de cada uno de los siete estados del carácter “**Forma de los *signa***” utilizados en la evaluación de la predicción de que los *signa* evolucionan de manera divergente en los Lepidoptera.

Categoría	Descripción
Espinass	Pequeñas espinas que cubren del 10% al 100% de la pared interior del <i>corpus bursae</i> . Las espinas no sobresalen ni se proyectan hacia el espacio interior del <i>corpus bursae</i> .
Cuernos	Estructuras largas con forma de cuernos o espinas, que pueden tener una o más puntas, estas puntas pueden ser redondeadas o afiladas, además que se proyectan al interior del <i>corpus bursae</i> .
Manchas	Parecidas a pequeñas manchas esclerotizadas con o sin espinas diminutas, en ocasiones los autores las definen como manchas esclerotizadas.
Laminas	La base es una lámina esclerotizada que puede variar de forma (círculos, rectángulos, estrellas, etc.). Los autores las definen como placas o láminas de espinas pequeñas. Las espinas no se proyectan hacia el interior del <i>corpus bursae</i> .
Placas	La base es una lámina o placa fuertemente esclerotizada que cubre más de la mitad del <i>corpus bursae</i> y que tiene varias espinas o cuernos de distintos tamaños que se proyectan al interior del <i>corpus bursae</i> (más de la mitad).

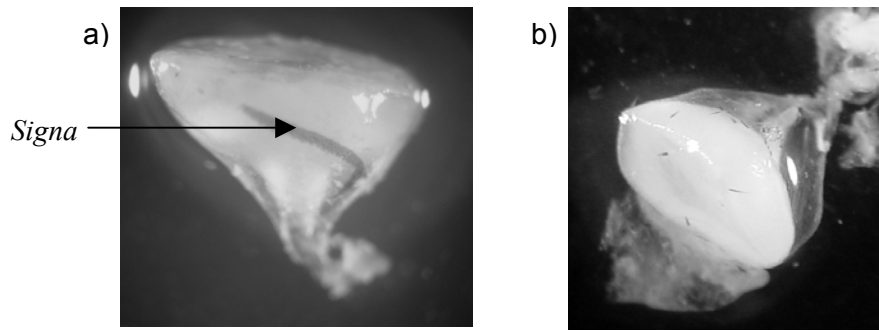


Figura 5. Ejemplos de especies con *signa* presentes *H. ismenius* (a) o ausentes *H. hortense* (b).

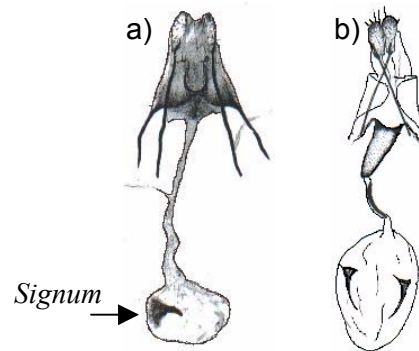


Figura 6. Ejemplos de especies con diferente número de *signa*. (a) *Coleophora microaldella* con un *signum* (Tomado de Baldizzone, 1997) y (b) *Stenoptilia pallistriga* con dos *signa* (Tomado de Gielis, 1995).

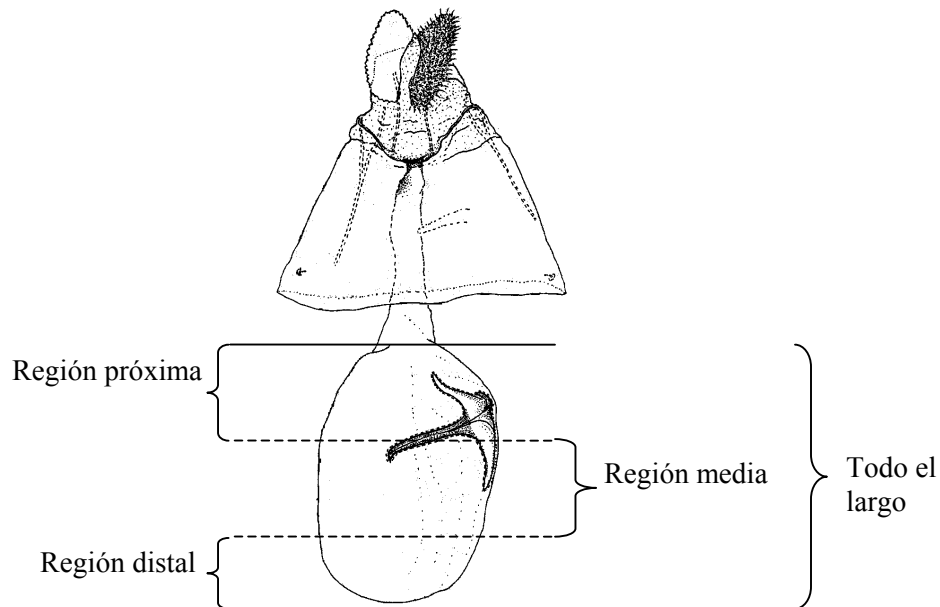


Figura 7. Esquema del *corpus bursae* de una hembra de *Argyrotaenia coconinana* (Tomado de Brown y Cramer, 1999) donde se ilustran las “regiones” en donde se pueden ubicar los *signa* y que definen los siete posibles estados del carácter “Posición relativa de los *signa*” (el octavo estado corresponde a la situación en que no existen *signa*). Nótese que algunos estados del carácter consideran que un mismo *signum* podría abarcar más de una región o que pudiera haber dos o más *signa* y que cada uno de ellos pudiera estar localizado en diferentes regiones.

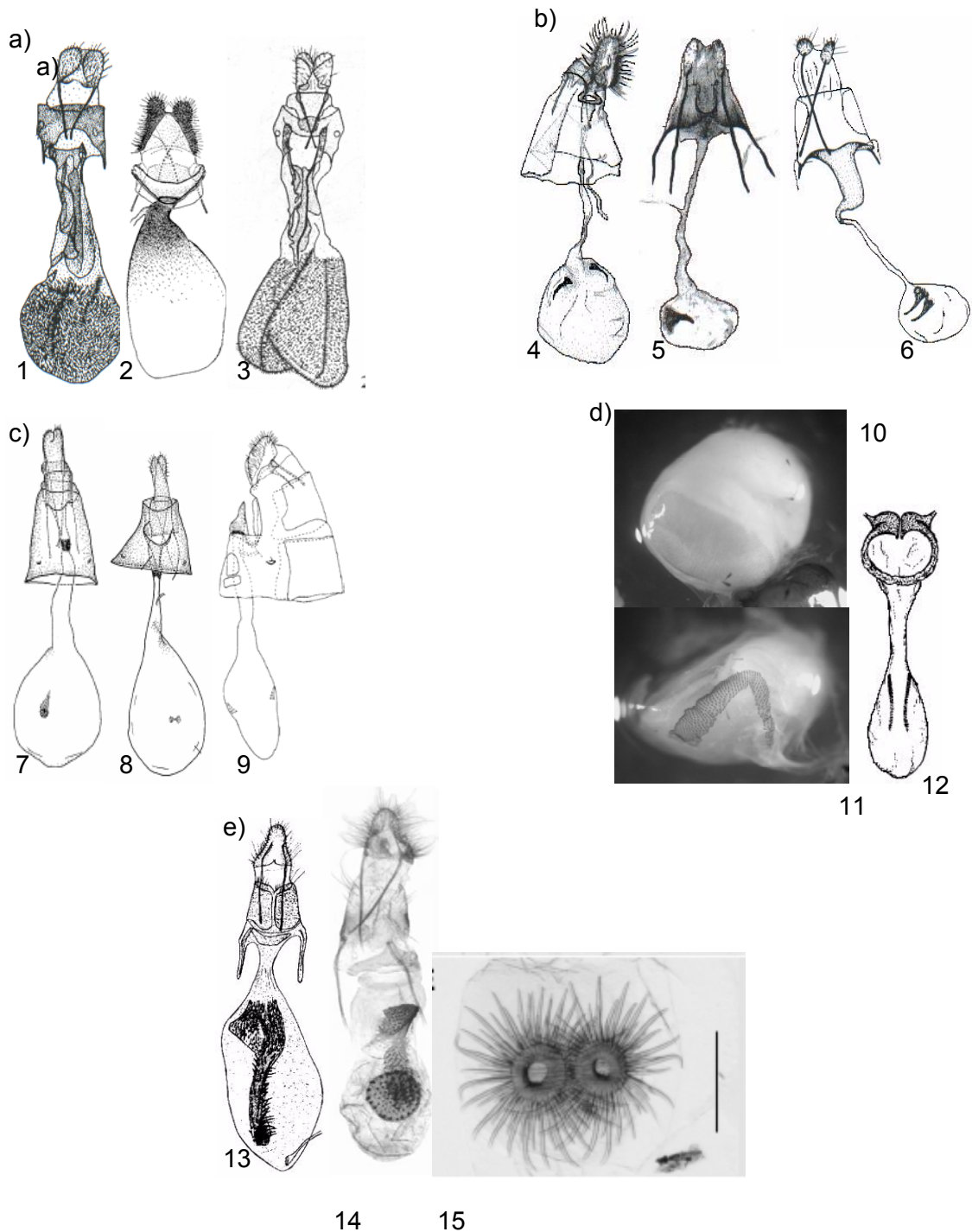


Figura 8. Formas del *signum* consideradas para la clasificación: **a) Espinas**, 1. *Coleophora sahariana* (Tomado de Li y Zheng, 1996), 2. *Eliachna chiliana* (Tomado de Brown y McPherson, 2001) 3. *Dichomeris cuspid* (Tomado de Li y Zheng, 1996); **b) Cuernos**, 4. *Accintapubes albifasciata* (Tomado de Solis y Styler, 2003), 5. *Coleophora microalbella* (Tomado de Baldizzone, 1997) 6. *Postplatyptilia triangulocosta* (Tomado de Gielis, 1996) **c) Manchas**, 7. *Eucosmomorpha albersana* (Tomado de Miller, 2001), 8. *E. neartic* (Tomado de Miller, 2001) 9. *Howarthia cheni* (Tomado de Hsu, *et al.* 2004) **d) Laminas**, 10. *Eueides aliphera*, 11. *Eueides lybia*, 12. *Calisto micrommta* (Tomado de Jonson y Quinter, 1986) y **e) Placas**, 13. *Zamagiria dixolophella* (Tomado de Iruegas, *et al.* 2002), 14. *Passadenoides montanus* (Tomado de Ferris, 2004) 15. *Tegeticula antitética* (Tomado de Pellmyr y Segraves, 2003) Aquí se puede apreciar la diversidad de formas existentes aun dentro de cada una de las categorías.

Con el árbol de consenso se “mapearon” individualmente cada una de las características de los *signa* antes mencionadas y se calculó el índice de homoplasia. Este índice representa el cambio evolutivo paralelo que hace que dos organismos presenten un mismo carácter, siendo que cada uno de ellos lo ha adquirido independientemente. El índice indica en que medida la similitud no es debida al parentesco y sus valores van de 0→1 donde valores de 0.5-1 indican que las características no son producto de un ancestro común, sino debidas a reversiones, paralelismos y convergencias evolutivas. Los valores por debajo de 0.5-0 indican que la característica es debida a un ancestro común.

RESULTADOS

Se recolectó un total de 84 hembras, las cuales se distribuyeron en tres especies monándricas (*H. charitonia*, *H. erato* y *H. hortense*) y una poliándrica (*H. ismenius*) de *Heliconius*, y una especie monándrica (*E. isabella*) y dos poliándricas (*E. aliphera* y *E. lybia*) de *Eueides* (Cuadro 2). Aunque ninguna de las hembras era virgen, solamente se obtuvieron espermátóforos útiles de ser cortados y medidos en 34 de las 84 hembras (40.5%), pertenecientes a las tres especies poliándricas y a dos de las cuatro monándricas (una de cada género).

1. Los *signa* en *Heliconius* y *Eueides*

Mediante los cortes de los *corpus bursae* con espermátóforo se pudo comprobar que en las cuatro especies con *signa* estudiadas [*H. ismenius* (poliándrica), *E. aliphera* (poliándrica), *E. lybia* (poliándrica) y *E. isabella* (monándrica)] dichas estructuras ayudan en la ruptura de los espermátóforos. En estas especies los *signa* no solo perforan o rasgan la cubierta de los espermátóforos, sino que al parecer remueven secciones de dicha cubierta debido a las múltiples perforaciones que producen las espinas que los cubren (Figura 9). Por otro lado, al medir la longitud de dichas espinas en ejemplares de *H. ismenius* y *E. isabella* (Figura 10), se vió que el tamaño de las espinas es similar al grosor de la cubierta de los espermátóforos (Cuadro 3). En la Figura 10 se puede observar que las espinas de los *signa* de *E. isabella* son de mayor tamaño que las de *H. ismenius* ($U = 2.00$, $p = 0.00107$, $n_{Hi} = 8$, $n_{Ei} = 9$), lo cual es congruente con el hecho de que en *E. isabella* las cubiertas del espermátóforo tienen un mayor grosor que las de *H. ismenius* (ver siguiente sección). Es interesante destacar que en todas las preparaciones de *E. isabella* se observó que los espermátóforos, a pesar de que habían perdido grandes secciones de su cubierta en las dos zonas de contacto con los *signa* (lados opuestos del espermátóforo) y su contenido ya había sufrido un cierto grado de digestión, aun mantenían la distensión del *corpus bursae* de la hembra.

Cuadro 2. Especies de *Heliconius* y *Eueides* colectadas en el campo donde se muestra el tamaño de la muestra total de las distintas especies colectadas y la fracción de esta muestra que resultó útil para realizar los cortes de los espermátóforos en el crióstato.

Especies monándricas	Muestra total	Muestra usada para cortes
<i>Heliconius charitonia</i>	29	0
<i>Heliconius erato</i>	7	0
<i>Heliconius hortense</i>	14	5
<i>Eueides isabella</i>	14	14
Especies poliándricas	Muestra total	Muestra usada para cortes
<i>Heliconius ismenius</i>	15	11
<i>Eueides alipha</i>	1	1
<i>Eueides lybia</i>	4	3

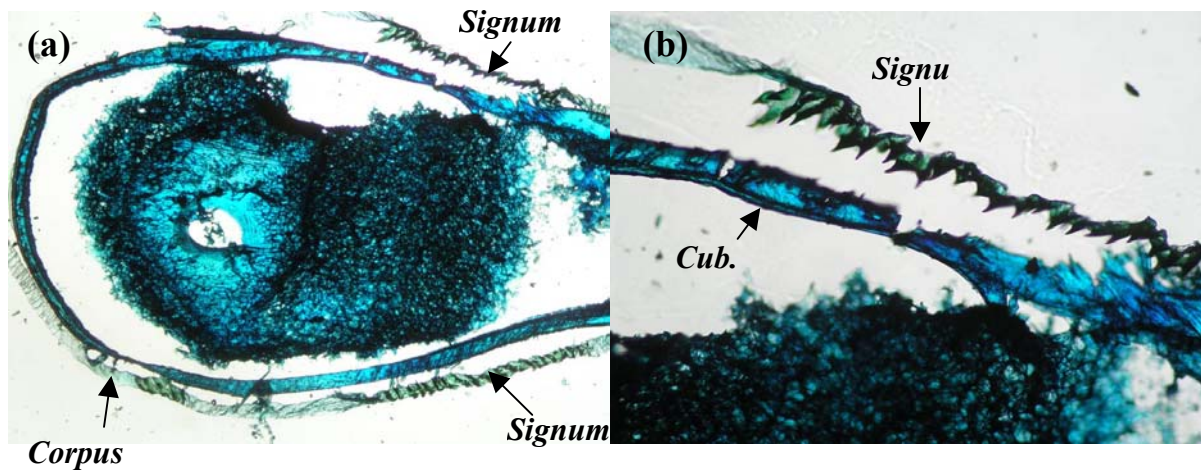


Figura 9. De *Eueides isabella*. **(a)** Corte longitudinal de un *corpus bursae* que contiene un espermatóforo cuya cubierta ha sido rota por los *signa*. **(b)** Detalle de (a) que muestra las rasgaduras que hacen las espinas de los *signa* sobre la cubierta del espermatóforo (= *Cub. Sptf.*).

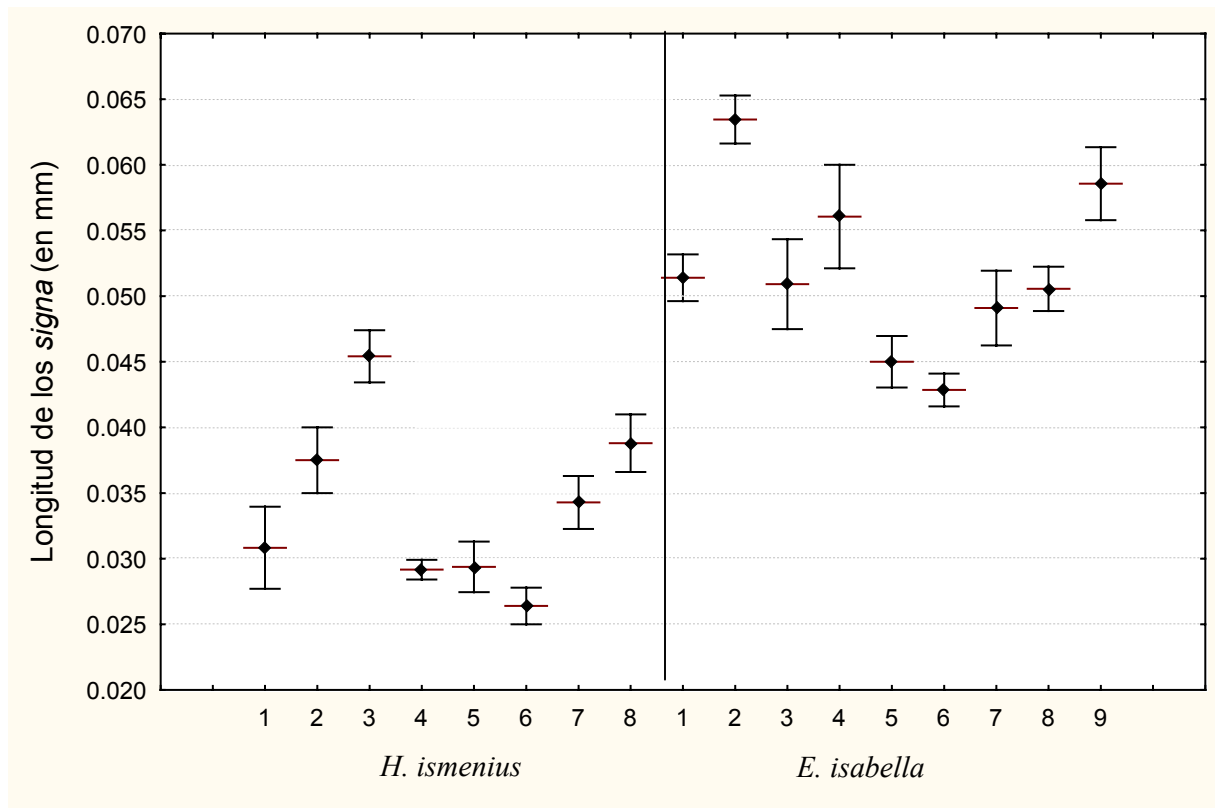


Figura 10. Longitud de las espinas (♦ Media \pm SE) que cubren a los *signa* del *corpus bursae* de ocho hembras de *H. ismenius* (especie poliándrica) y nueve de *E. isabella* (especie

Cuadro 3. Estadística descriptiva del grosor de las cubiertas de los espermátóforos (mm) de especies monándricas (en negritas) y poliándricas de los géneros *Heliconius* y *Eueides*. Los estadísticos por especies se obtuvieron a partir de los promedios de cada espermátóforo (cada uno de los espermátóforos tuvo varios cortes y de cada uno se realizaron cuatro mediciones).

Especie	N	Media	Mediana	Mínimo	Máximo	Cuartil inferior	Cuartil superior	Desviación estándar	Error estándar
<i>H. ismenius</i>	11	0.0393	0.0400	0.0100	0.1100	0.02	0.02	0.0039	0.0025
<i>H. hortense</i>	5	0.0143	0.0100	0.0100	0.0500	0.01	0.01	0.0036	0.0016
<i>E. aliphera</i>	1	0.0502	0.0400	0.0300	0.1000	0.03	0.06	0.0210	0.0031
<i>E. lybia</i>	3	0.0226	0.0200	0.0100	0.0500	0.02	0.02	0.0017	0.0009
<i>E. isabella</i>	14	0.0585	0.0525	0.0200	0.2100	0.03	0.045	0.0100	0.0035

2. Predicciones acerca del grosor de las cubiertas de los espermatozoides

Predicción 1: Dentro del género *Heliconius* las cubiertas de los espermatozoides de las especies poliándricas serán más gruesas que las de las especies monándricas

Las principales causas de que los espermatozoides no pudieran ser cortados y medidos fueron que ya estaban muy degradados o que, aunque parecían estar más o menos completos, no se pudo detectar la cubierta que los delimita (Figura 11). El 89.8% (44 de 49) de las hembras cuyos espermatozoides no pudieron ser utilizados correspondieron a las tres especies monándricas de *Heliconius* (Cuadro 2), además de que únicamente en estas especies no se pudieron detectar las cubiertas de eyaculados aparentemente completos. En contraste, el 73% (11 de 15) de los espermatozoides de la especie poliándrica *H. ismenius* pudieron ser cortados y medidos, incluso en algunos casos en que el espermatozoides ya había comenzado a ser digerido. La diferencia entre el porcentaje de espermatozoides susceptibles de ser cortados entre las tres especies monándricas ($6/50 = 12\%$) y la poliándrica ($11/15 = 73.3\%$) de *Heliconius* es significativa (Chi cuadrada = 22.5, g. l. = 1, $p < 0.0001$). Estas observaciones y resultados son congruentes con la Predicción 1, ya que sugieren que los espermatozoides de las especies monándricas se degradan más rápido que los de las poliándricas, probablemente debido a que tienen cubiertas más delgadas y delicadas. Esto último parece apoyarse por el hecho de que las cubiertas de los espermatozoides de la especie monándrica (*H. hortense*) son significativamente menos gruesas que las de la especie poliándrica (*H. ismenius*) (Cuadro 3 y Figura 12; $U = 0.00$, $p = 0.0018$, $n_{Hh} = 11$, $n_{Hi} = 5$).

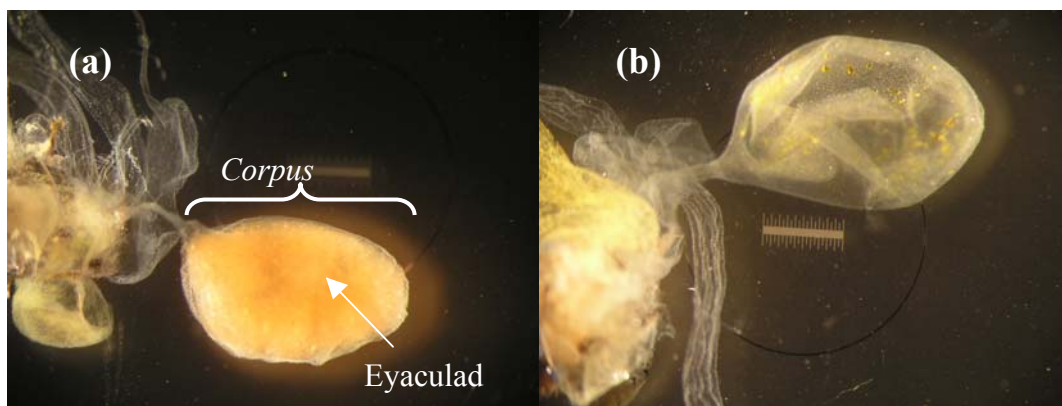


Figura 11. El espermatozoides de *H. charitonias* tiene una cubierta muy difícil de detectar. **(a)** *Corpus bursae* lleno de eyaculado; nótese que no se distingue una membrana o cubierta bien definida que envuelva dicho eyaculado. **(b)** Mismo *corpus bursae* que en (a) después de ser perforado con una pinza; nótese que el contenido salió del *corpus bursae* y no se observan restos de espermatozoides (en la mayoría de las especies se encuentran el *collum* y restos de la envoltura del espermatozoides).

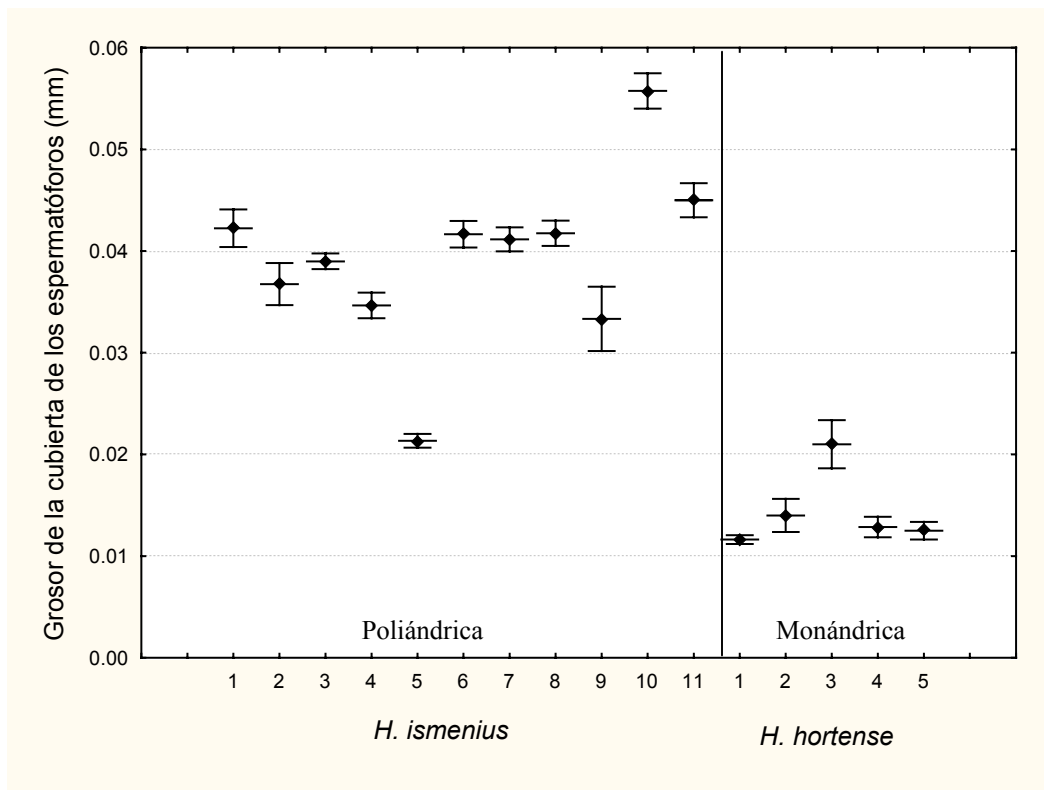


Figura 12. Grosor de la cubierta de los espermatozoides (\blacklozenge Media \pm SE) de cada uno de los individuos medidos de las especies *Heliconius ismenius* (poliándrica) y *H. hortense* (monándrica).

También se observó que en la especie poliándrica de *Heliconius* la distribución del grosor de la cubierta no es homogénea a lo largo de todo el espermatozoides, sino que hay una zona de mayor grosor que corresponde a la parte más cercana al *collum* (N = 15), que es la más esclerotizada de todo el espermatozoides (Drummond, 1984). Adicionalmente, se observó que en las especies monándricas de *Heliconius* el *corpus bursae* era suave y durante la disección se rompía con mayor facilidad (N = 50) y generalmente se desgarraba al ser cortado en el crióstato, que el de la especie poliándrica (N = 15),

Predicción 2: Dentro del género *Eueides* se espera que (2a) las cubiertas de los espermatozoides de las especies monándricas sean más gruesas que las de las poliándricas; o bien que (2b) en las especies poliándricas los *signa* sean más grandes y/o más “punzo-cortantes” (es decir, puntiagudos, afilados, aserrados, etc.) que los de las especies monándricas

Los resultados apoyan la predicción 2a, ya que la cubierta de los espermatozoides en la especie monándrica (*E. isabella*) presentó un mayor grosor que en las especies poliándricas (*E. lybia*;

Cuadro 3 y Figura 13; $U = 0.00$, $p = 0.0082$, $n_{Ei} = 14$, $n_{Ei} = 3$) (para este análisis no se incluyó a *E. aliphera* ya que esta solo representa un ejemplar colectado, aunque al incluirlo en el análisis las diferencias también fueron significativas; $U = 5.00$, $p = 0.0145$, $n_{Ei} = 14$, $n_{Ei+Ea} = 4$). En la Figura 13 también se observa que en la especie monándrica la variación dentro de la muestra resulta ser la más grande de todas las especies analizadas (tanto de *Heliconius* como de *Eueides*) con un rango de 0.03—0.15 mm de grosor. Sin embargo, no es posible saber si esta gran variación es característica del género debido a que la muestra de especies poliándricas fue muy pequeña (Cuadro 3).

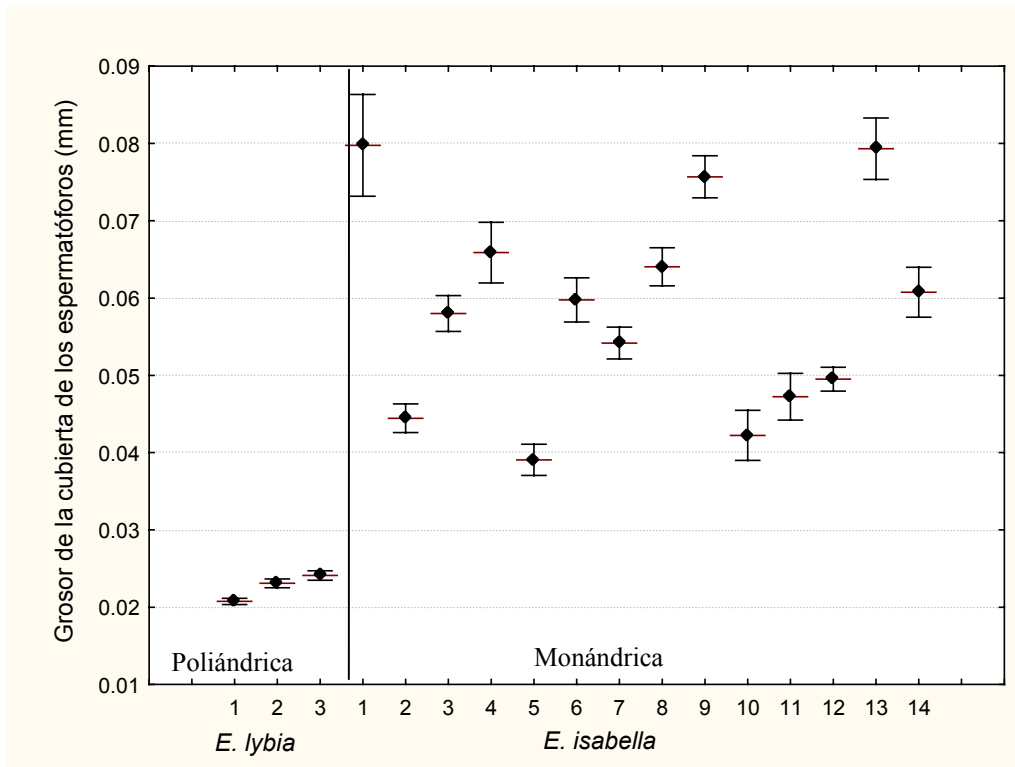


Figura 13. Grosor de la cubierta de los espermátóforos (♦ Media \pm SE) de cada uno de los individuos medidos de las especies *E.s lybia* (poliándrica) y *E. isabella* (monándrica).

3. Predicción 3: Los *signa* presentarán el patrón de evolución divergente típico de las características sujetas a coevolución sexual

Se construyó un superárbol de parsimonia utilizando información sobre la filogenia de varios grupos de lepidópteros (tanto diurnos como nocturnos). Se realizó una búsqueda heurística de parsimonia, utilizando 100 réplicas y optimizando los caracteres con el método de ACCTRAN (Transformación Acelerada). Se obtuvieron un total de 125 caracteres (en este caso presencia o ausencia de los grupos

en cada rama), los cuales todos fueron definidos como desordenados, con el mismo peso. De los 125 caracteres obtenidos, 17 de fueron constantes y 108 variables; de éstos últimos, 72 fueron filogenéticamente informativos, por lo que el superárbol se basó en ellos. Debido a que se escogieron solamente grupos cuya filogenia estuviera resuelta y que no entraran en conflicto con otros grupos, el índice de consistencia fue el más alto posible (= 1) y, por lo tanto, el índice de homoplasia fue también el más bajo (= 0). Se encontraron 297 árboles más parsimoniosos, con 108 pasos y con los índices antes mencionados. Se calculó el árbol de consenso con la opción de estricto, lo que significa que las ramas que se presentan están en todos los árboles encontrados (297).

En el árbol de consenso se mapearon por separado, con el programa MacClade 4.03 (Maddison y Maddison, 2001), cada una de las siguientes características de los *signa*: presencia/ausencia (Figura 14), forma (Figura 15), número (Figura 16) y posición relativa dentro del *corpus bursae* (Figura 17). Los bajos índices de Consistencia (CI) y de Retención (RI) (rangos: CI = 0.08—0.22, RI = 0.26—0.47; Cuadro 4) y los altos índices de Homoplasia (HI) (rango HI = 0.78—0.92; Cuadro 4) indican que las cuatro características son evolutivamente inestables y con débil enlace filogenético. Estos resultados confirman la Predicción 3, ya que indican que los *signa* presentan el patrón de evolución divergente típico de las características que evolucionan como resultado de la coevolución sexual.

En el caso de la característica de presencia/ausencia de los *signa* (Figura 14), se observa que el estado ancestral en los Lepidoptera es la presencia de *signa* y que la pérdida de los mismos ha evolucionado independientemente 15 veces en los taxones considerados en este análisis, aunque si se consideran los taxones donde pueden o no tener *signa* como perdidas el número aumenta hasta 24 veces. La pérdida de los *signa* ocurrió en nueve de las 13 superfamilias incluidas, y en algunos grupos como Papilionoidea, Noctuoidea y Sesiioidea evolucionó independientemente más de una vez. Este patrón es consistente con la hipótesis de la coevolución sexual de los *signa*, ya que en un estudio previo se demostró que la poliandria es el estado ancestral en los Lepidoptera y que a partir de este evolucionó la monandria en varias ocasiones (Sánchez, Hernández y Cordero, en preparación; un análisis preliminar se puede encontrar en Sánchez, 2004).

En la Figura 15 se muestra que formas similares de *signa* han evolucionado independientemente en distintos grupos y, por lo tanto, es una característica que tiene muy poca “señal filogenética”. En este caso particular, debemos recordar que las categorías de forma utilizadas en este trabajo fueron deliberadamente amplias, lo que significa que dentro de cada una de ellas también existe una gran diversidad de formas (Figura 8) que, si se tomaran en cuenta de manera más

explícita en el análisis, seguramente acentuarían aún más el patrón de evolución divergente e independiente de la forma de los *signa*.

Algo similar a lo encontrado con la presencia/ausencia y forma de los *signa* se encontró en el caso del número de *signa* (Figura 16) y la posición relativa de los *signa* dentro del *corpus bursae* (Figura 17), ya que ambas características poseen muy poca “señal filogenética”. Por último se mapeo la característica posición relativa de los *signa* dentro del *corpus bursae* de la hembra obteniéndose los mismos resultados que para las anteriores características apoyando así la idea de que los *signa* han evolucionado de forma divergente en los Lepidoptera.

En resumen, los patrones divergentes de evolución de la presencia/ausencia, forma, número y posición relativa de los *signa* encontrados en este estudio apoyan la Predicción 3 de la hipótesis de que los *signa* de las hembras de Lepidoptera son un producto de la coevolución sexual.

Cuadro 5. Índices de consistencia, retención y homoplasia para cada una de las características de los *signa* mapeadas. Los índices de consistencia y retención tienen un intervalo de 0 → 1 y comúnmente se dice que por debajo de 0.5 los índices son bajos, el índice de homoplasia también tiene valores que van 0 → 1, y valores por debajo de 0.5 nos dicen que la característica es

Característica de los <i>signa</i> mapeada en la filogenia	Índice de consistencia	Índice de retención	Índice de homoplasia
Presencia/ausencia de <i>signa</i>	0.08	0.26	0.92
Forma de los <i>signa</i>	0.19	0.47	0.81
Número de <i>signa</i>	0.22	0.47	0.78
Posición relativa de los <i>signa</i>	0.20	0.30	0.80

Presencia/Ausencia de *signa*

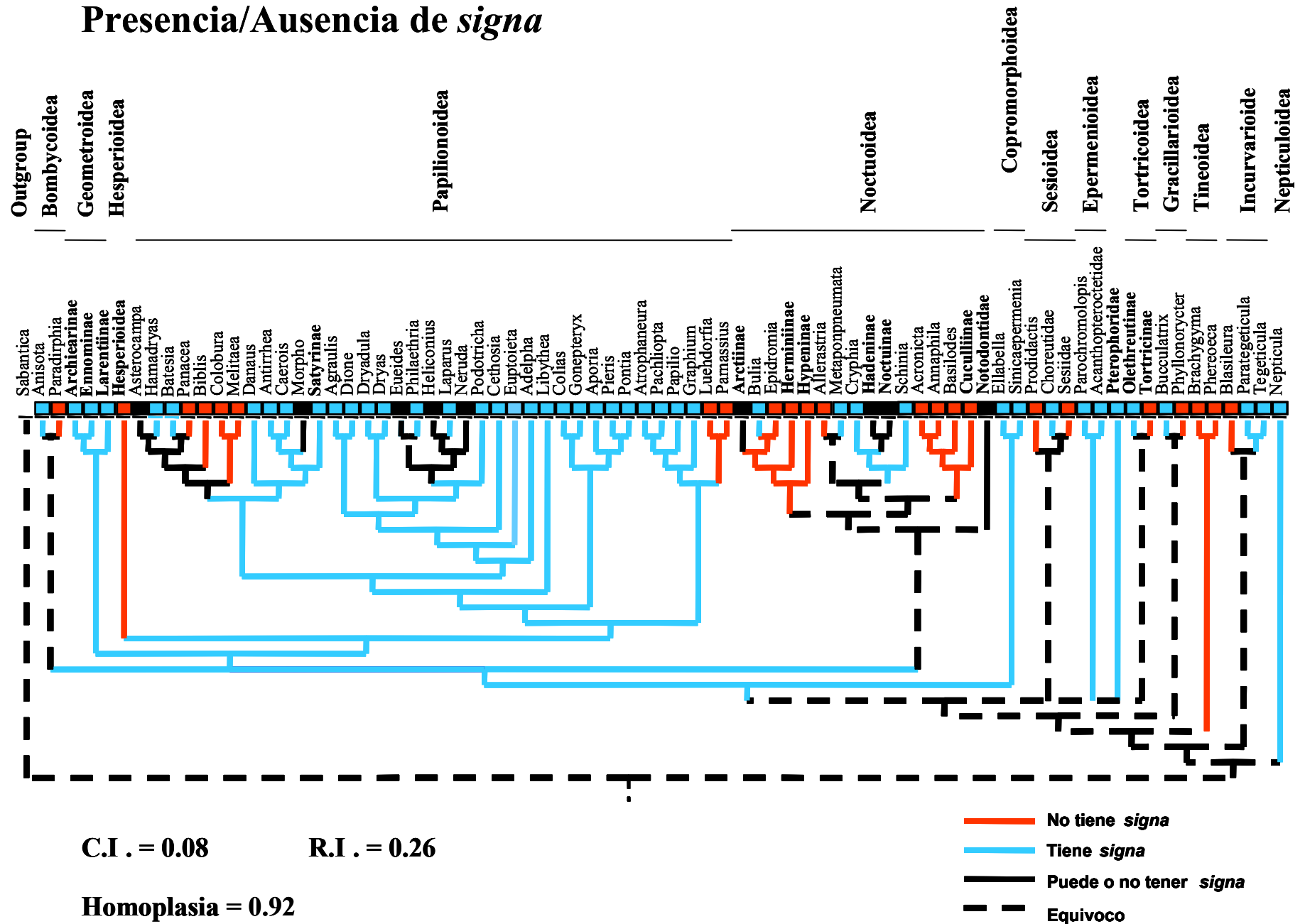


Fig. 14. Árbol consenso con el mapeo de la característica presencia/ausencia de los *signa*. Los taxones en negrita corresponden a grupos supragenéricos (Familias y Subfamilias). Los índices presentados para cada una de las características son: Índice de Consistencia (C.I.) y el Índice de Retención (R.I.).

Forma de los *signa*

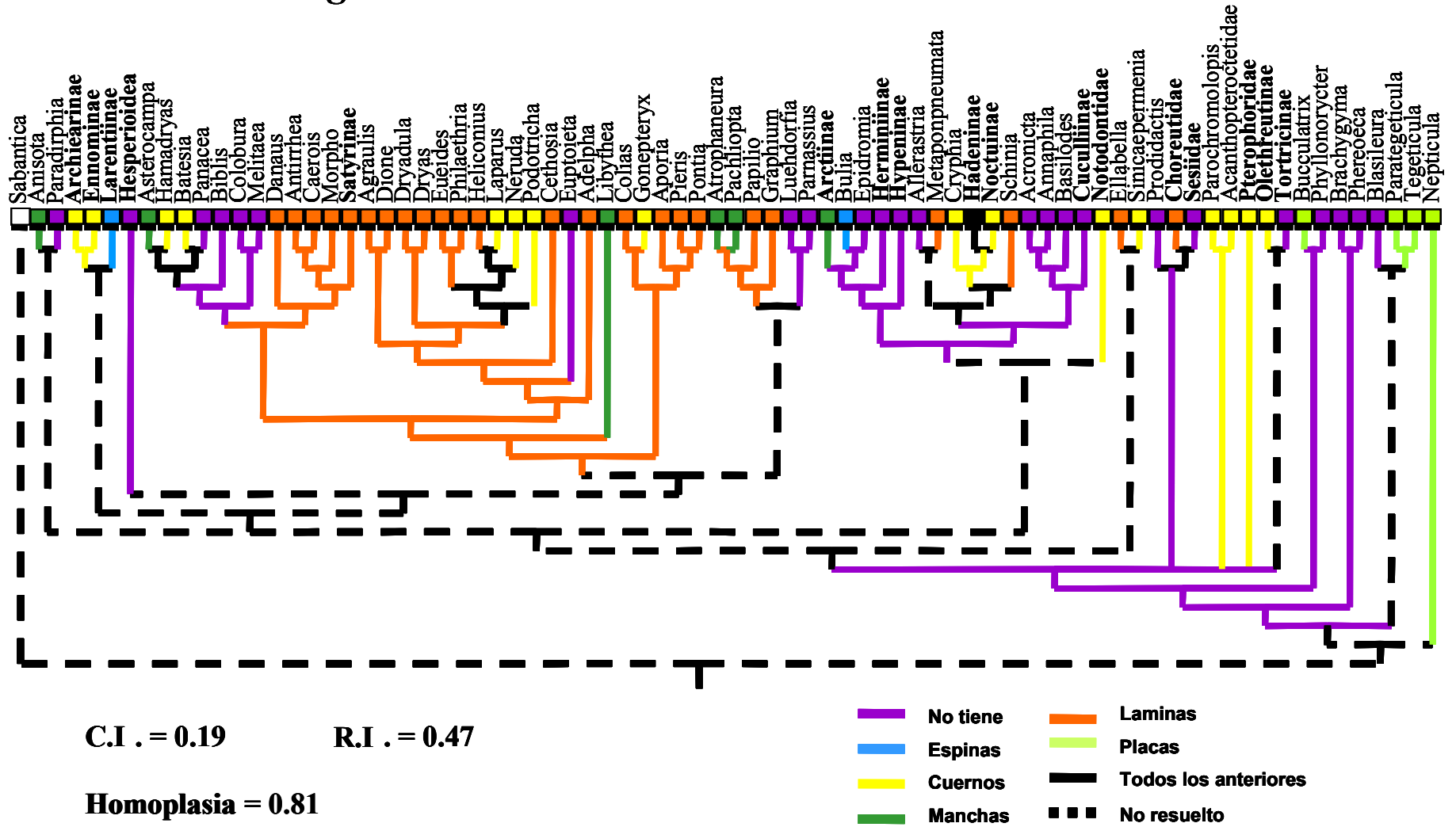


Fig. 15. Árbol consenso con el mapeo de la característica formas de los *signa*. Los taxones en negritas corresponden a grupos supragenéricos (Familias y Subfamilias). Los índices presentados para cada una de las características son: Índice de Consistencia (C.I.) y el Índice de Retención (R.I.).

Número de *signa* presente dentro del *corpus bursae*

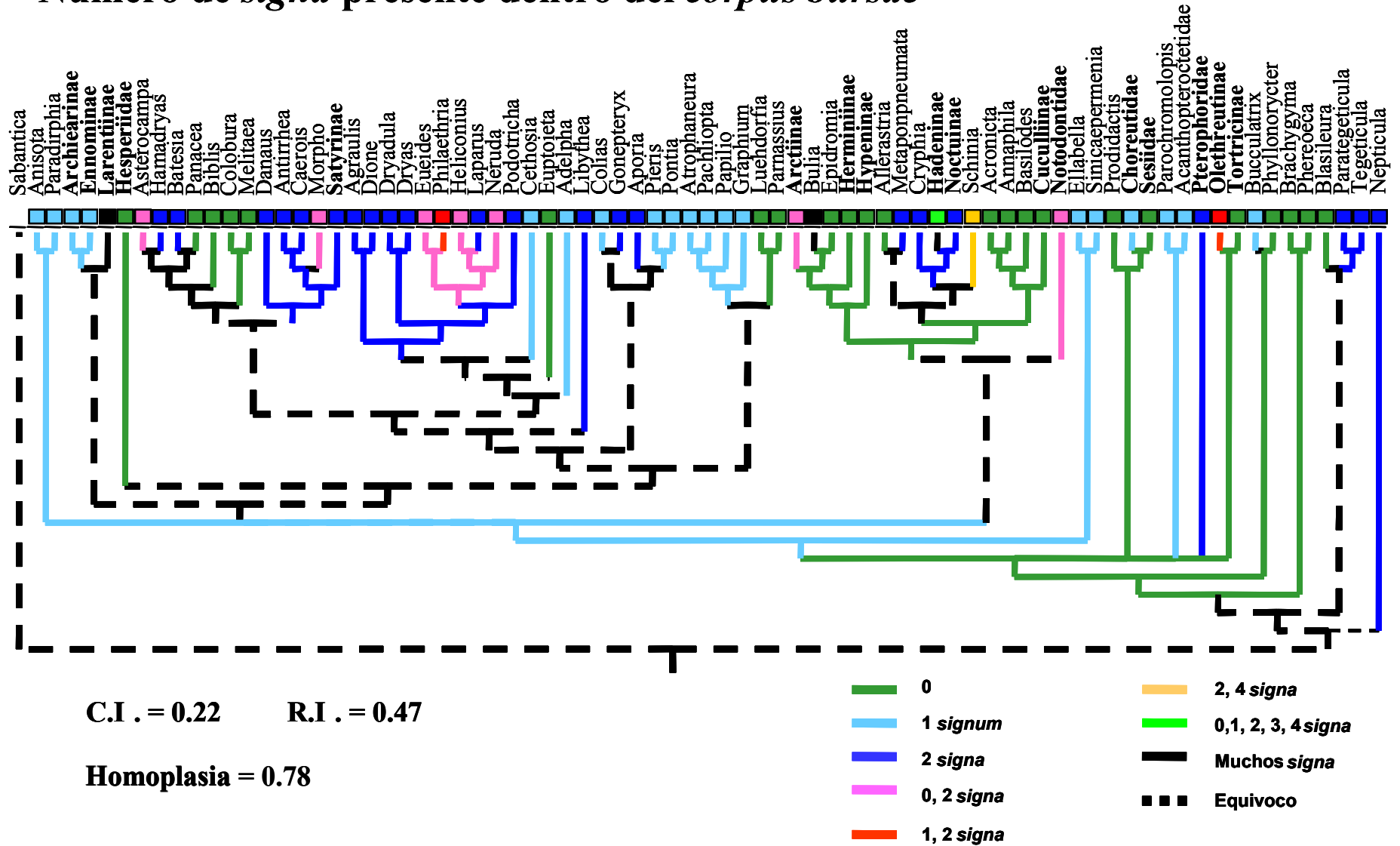
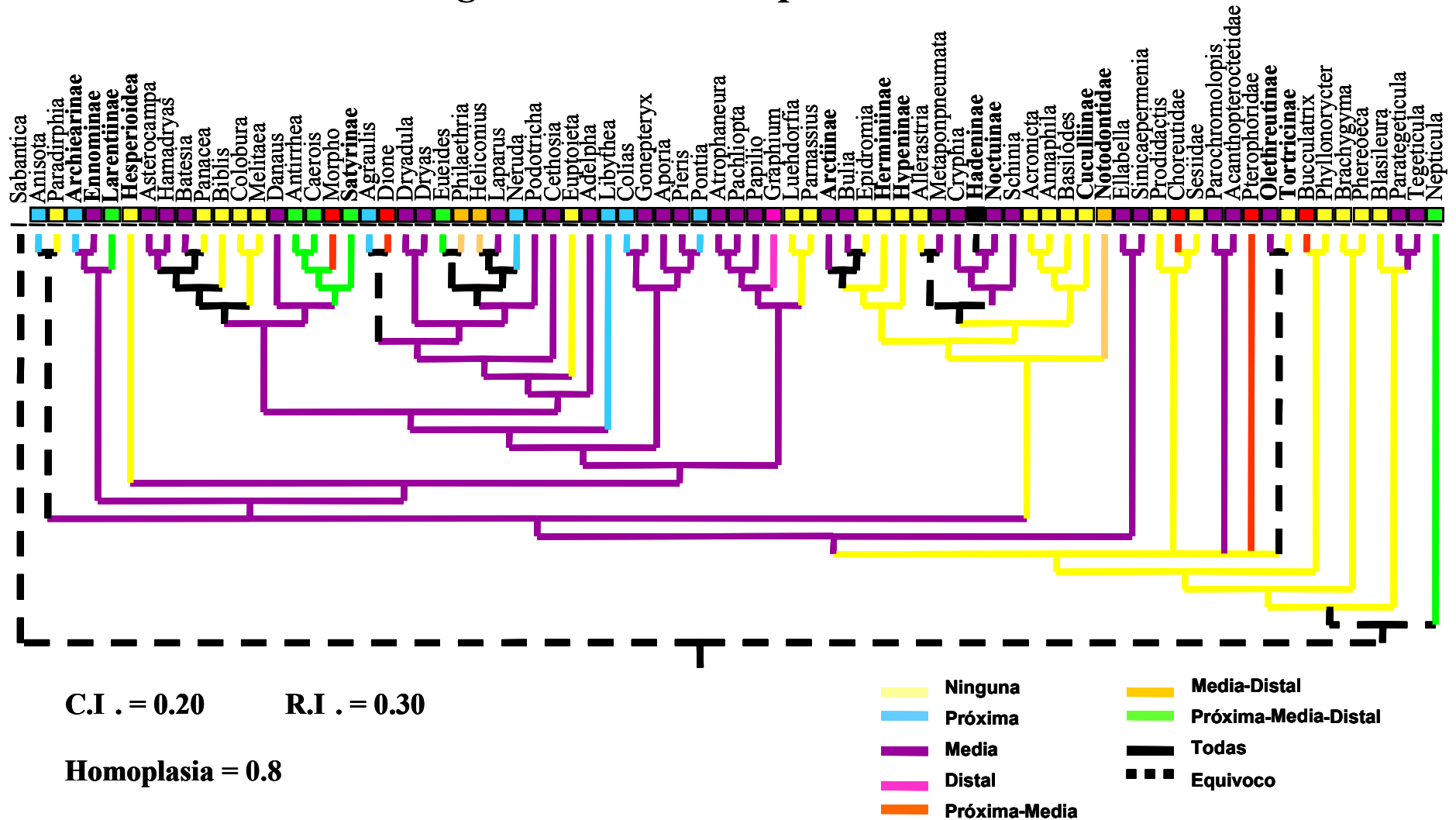


Fig. 16. Árbol consenso con el mapeo de la característica número de los *signa*. Los taxones en negritas corresponden a grupos supragenéricos (Familias y Subfamilias). Los índices presentados para cada una de las características son: Índice de Consistencia (C.I.) y el Índice de Retención (R.I.).

Posición relativa de los *signa* dentro del *corpus bursae*



↗ **Fig. 17.** Árbol consenso con el mapeo de la característica posición de los *signa*. Los taxones en negritas corresponden a grupos supragenéricos (Familias y Subfamilias). Los índices presentados para cada una de las características son: Índice de Consistencia (C.I.) y el Índice de Retención (R.I.).

DISCUSIÓN

Las tres predicciones que se evaluaron en este trabajo apoyan la hipótesis sobre la coevolución sexual de los *signa* de los Lepidoptera y las cubiertas de los espermátóforos.

La hipótesis general de que la evolución de los *signa* y las cubiertas de los espermátóforos son resultado de la coevolución sexual se basa en la suposición de que los *signa* sirven para romper los espermátóforos, permitiendo la digestión de su contenido. Las observaciones hechas en los cortes de los espermátóforos de las cuatro especies con *signa* estudiadas (*H. ismenius*, *E. aliphera*, *E. lybia* y *E. isabella*) apoyan esta interpretación.

La hipótesis de la coevolución sexual tiene predicciones específicas con respecto a la asociación entre el patrón de apareamiento y la presencia/ausencia de *signa*, al grosor esperado de las cubiertas de los espermátóforos (Cordero, 2005), y con respecto al patrón de evolución de los *signa*. En el primer caso, se predice que los *signa* deberán estar presentes principalmente en las especies poliándricas, donde los machos podrían haber evolucionado cubiertas de espermátóforos difíciles de romper con el fin de prolongar el periodo de receptividad sexual disminuida de las hembras, y que deberán tender a estar ausentes en especies monándricas. Un estudio filogenético-comparativo previo encontró evidencia que apoya claramente esta predicción (Sánchez, 2004; Sánchez, Hernández y Cordero, en preparación).

En el presente trabajo se pusieron a prueba las predicciones relativas al grosor de la cubierta de los espermátóforos. La primer predicción evaluada fue que en las especies poliándricas con *signa* las cubiertas de los espermátóforos deberían tener un mayor grosor que las de especies monándricas sin *signa* (Predicción 1). Como se esperaba, las especies monándricas sin *signa* de *Heliconius* presentaron cubiertas de espermátóforos más delgadas que las de especies poliándricas con *signa* del mismo género. Esta predicción se basa en el argumento de que la condición ancestral en los Lepidoptera es la poliandria y que la existencia de presiones de selección sobre las hembras en favor de la monandria favorece la pérdida de los *signa* y de las cubiertas gruesas de los espermátóforos (Figura 18), debido a que la producción de estas características podrían resultar costosas, tanto para las hembras (*signa*), como para los machos (cubiertas de espermátóforos gruesas) y si éstas ya no son útiles, los beneficios que pudieran contrarrestar los costos de producirlas se verían minimizados. En congruencia con este argumento, el análisis filogenético de los *signa* muestra que tanto la monandria como la ausencia de los *signa* son las condiciones derivadas en los Lepidoptera.

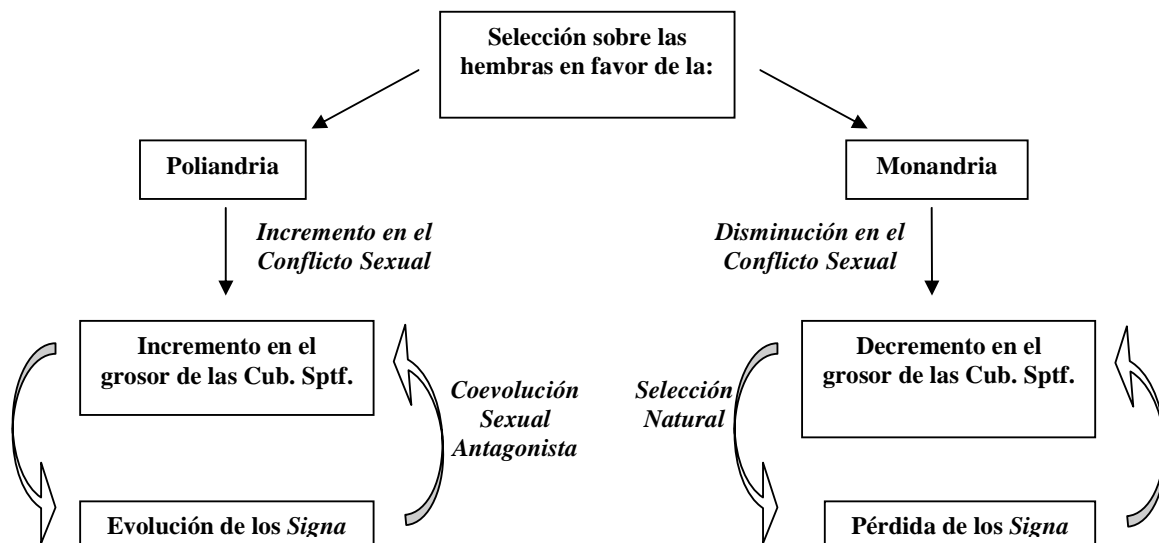


Figura 18. Posibles escenarios que llevarían a la pérdida o mantenimiento de los *signa* y las cubiertas gruesas de los espermatozoides. Si la selección favorece la poliandria en las hembras, los *signa* y las cubiertas de los espermatozoides podrían sufrir una coevolución sexual antagonista (diagrama de la izquierda). Por el contrario, si la selección favorece la monandria en las hembras el conflicto sexual disminuiría haciendo innecesaria el mantenimiento de los *signa* y las cubiertas gruesas de los espermatozoides (diagrama de la derecha); si, además, dichas características son costosas para hembras y machos, se espera que la selección natural favorezca su desaparición. Cub. Sptf = Cubierta del espermatozoides.

De acuerdo con la Predicción 1, las hembras cuyos espermatozoides no pudieron ser utilizados para hacer cortes debido a que se encontraban demasiado degradados o a que no se pudieron detectar las cubiertas de eyaculados aparentemente completos fueron en su mayoría (~90%) de las tres especies monándricas de *Heliconius*, mientras la mayor parte (~73%) de los espermatozoides de la especie poliándrica (*H. ismenius*) pudieron ser cortados y medidos, incluso en casos donde el espermatozoides ya había comenzado a ser digerido. Esto sugiere que los espermatozoides de las especies monándricas se degradan más rápido que los de las poliándricas y que esto probablemente se debe a que tienen cubiertas más delgadas y delicadas. Debido a que en todos los machos de Lepidoptera la transferencia del eyaculado es dentro de un espermatozoides (Powell, 2003), el que no se hayan encontrado los restos de los espermatozoides en la mayoría de las hembras monándricas hace suponer que el espermatozoides que transfieren los machos de estas especies podría tener una cubierta muy delgada que las hembras rompen rápidamente, posiblemente mediante una acción enzimática o que su cubierta es tan delicada que se rompe con las contracciones musculares del abdomen de las hembras. Pudiera pensarse que la imposibilidad de medir las cubiertas de los espermatozoides de las especies monándricas de *Heliconius* podría deberse a que dichas hembras eran vírgenes. Sin embargo, las hembras del género *Heliconius* no

maduran huevos hasta que no se han apareado (Dunlap-Pianka *et al.*, 1977, Mendoza, 2005) y en todas las hembras que se disectaron se encontraron huevos maduros, por lo que se puede asegurar que ya se habían apareado. Por otro lado, en las hembras vírgenes el *corpus bursae* está vacío y no se encuentra distendido (V. S., observación personal), mientras que en las hembras que se disectaron el *corpus bursae* estaba distendido y contenía un líquido de color blanco o anaranjado pálido, lo cual también indica que ya se habían apareado, ya que las hembras vírgenes no presentan ningún tipo de líquido dentro del *corpus bursae* (V. S., observación personal).

Las observaciones de los cortes de los espermatozoides de *H. hortense*, la única especie monándrica de la que se pudo obtener cortes lo suficientemente completos como para realizar mediciones, también apoyan la Predicción 1. La medición del grosor de las cubiertas de los espermatozoides de esta especie fue muy difícil, ya que al colocar el corte en el portaobjetos la cubierta del espermatozoides se doblaba y no permanecía vertical debido a que es muy delgada (Figura 19).

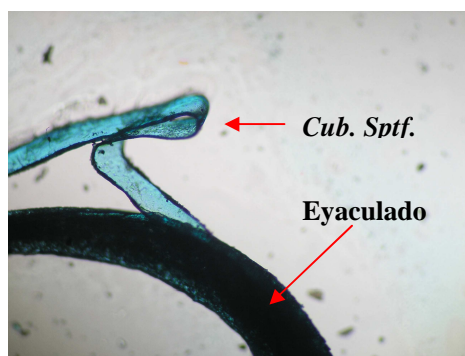


Figura 19. Corte de la cubierta del espermatozoides (*Cub. Sptf.*) de *Heliconius hortense*. Se observa que la cubierta del espermatozoides se dobla y separa del eyaculado, dificultando la medición del grosor de dicha cubierta.

En la literatura existe muy poca evidencia que permita poner a prueba las predicciones relativas a la cubierta de los espermatozoides, habiéndose encontrado únicamente un trabajo con información relevante. El estudio de Matsumoto y Suzuki (1995) de seis géneros de Papilionidae muestra las relaciones predichas por la hipótesis general de la coevolución sexual de los *signa* (ver introducción) entre el grado de poliandria, el grosor de la cubierta del espermatozoides y la presencia/ausencia y tamaño de los *signa* (Figura 20). Los géneros *Luehdorfia* y *Parnassius*, cuyas hembras son monándricas, carecen de *signum* y de una cubierta bien definida del espermatozoides (a la que Matsumoto y Suzuki denominan cápsula), mientras que los géneros ligeramente poliándricos *Atrophaneura* y *Pachliopta* presentan un *signum* pequeño y una

cubierta del espermatóforo (cápsula) relativamente gruesa; por último, los géneros más poliándricos *Graphium* y *Papilio* tienen un *signum* bien desarrollado y una cubierta del espermatóforo (cápsula) gruesa. Además, dentro de esta muestra de géneros, los poliándricos resultan ser más basales en la filogenia y los monándricos más derivados (Nijhout, 1991), apoyando también la hipótesis coevolutiva.

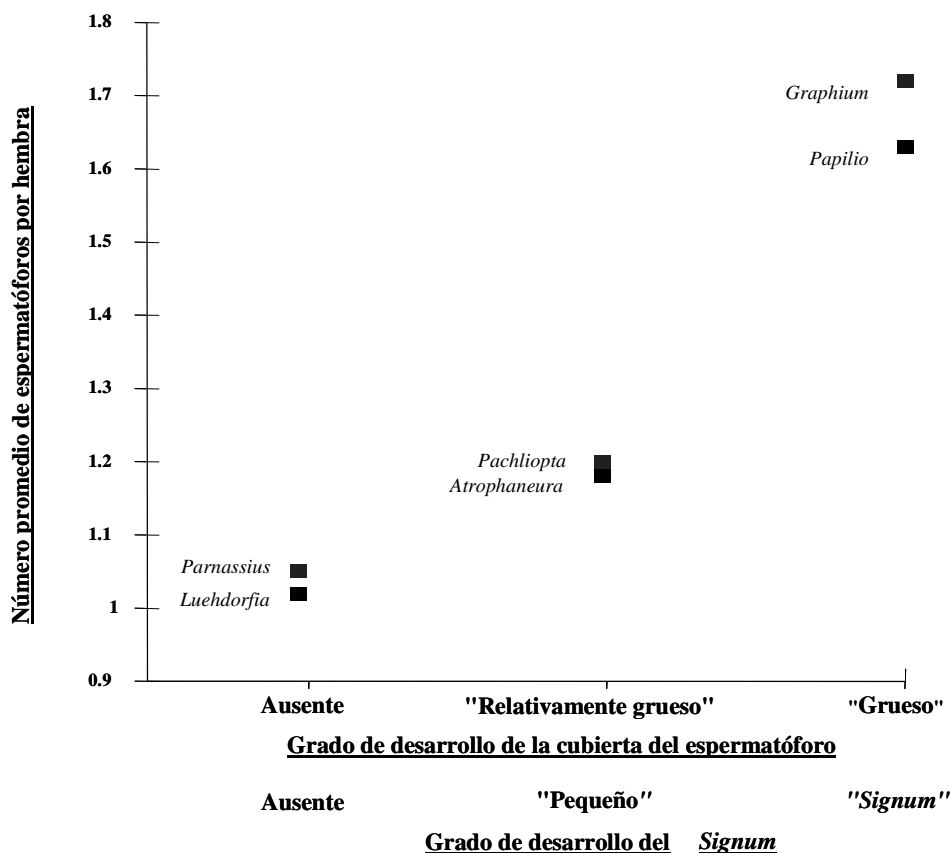


Figura 20. Asociación entre el patrón de apareamiento y el grado de desarrollo de la cubierta del espermatóforo y del *signum*, para seis géneros de Papilionidae (datos de Matsumoto y Suzuki, 1995). En la figura se puede observar que los géneros monándricos presentan el menor grado de desarrollo de la cubierta de los espermatóforos y del *signum*, y los géneros poliándricos presentan el mayor desarrollo tanto de la cubierta de los espermatóforos como del *signum*.

Que las cubiertas de los espermatóforos de mayor grosor se encontraran en la única especie monándrica con *signa* estudiada (*E. isabella*) sugiere que los machos de esta especie podrían estar “un paso adelante” en la carrera coevolutiva de adaptaciones y contra-adaptaciones. Es decir, es posible que en esta especie los machos manipulen a las hembras a ser monándricas contra sus intereses, debido a que la adaptación femenina para recuperar el control de su frecuencia de reapareamiento (los *signa*) ha perdido efectividad frente a las cubiertas extremadamente gruesas de los espermatóforos (Cordero, 2005). En otras palabras, suponemos que en *E. isabella*, el momento en la coevolución sexual antagonista es diferente al detectado en

las especies monándricas del género *Heliconius* y en las especies poliándricas de *Eueides*. Esta interpretación es congruente con el hecho de que, mientras el grosor de la cubierta de los espermátóforos de las especies poliándricas *E. aliphera* y *E. lybia* es muy parecido al grosor de las cubiertas de la especie poliándrica de *Heliconius* (*H. ismenius*), el grosor de las cubiertas de la especie monándrica (*E. isabella*) es mayor que el de todas las demás especies (comparar Figuras 12 y 13).

Por último, se apoyó la predicción más general de la coevolución sexual, la cual nos dice que los *signa* de los lepidópteros presentarán el patrón de divergencia típico de las características sujetas a coevolución sexual (Eberhard, 1996; 2006 Holland y Rice, 1998; Chapman *et al.*, 2003; Hosken y Stockley, 2004; Sánchez, 2004; Cordero, 2005). La divergencia en características de las hembras y los machos que están bajo una dinámica coevolutiva es probable cuando machos y hembras no llegan a una solución estable a los problemas que se imponen unos a otros (Eberhard, 2006). En el caso de los *signa*, podrían haber evolucionando divergentemente en distintas poblaciones/especies si los machos de distintas poblaciones/especies colocan mayor o menor cantidad de quitina en distintos lugares de la cubierta del espermátóforo, lo cual haría que no existiera una forma o tamaño ideal para romper o perforar la cubierta de todos los espermátóforos.

Algo que es muy importante hacer notar en este trabajo es que el objetivo de la construcción del superárbol para Lepidoptera no fue explorar las distintas metodologías que hay para la construcción de un superárbol, sino tener una visión más concreta de cómo las características se han comportado en la historia evolutiva de Lepidoptera. Por esta razón, ni remotamente se pretende que la filogenia sea tomada como una propuesta final de la evolución en Lepidoptera y que esta trate de resolver los problemas filogenéticos que existen dentro del orden, sino que debe tomarse como una herramienta, que nos da una idea general del proceso de diversificación. Sin embargo, es importante señalar que el superárbol filogenético con el que se puso a prueba esta predicción concuerda en términos generales con otros trabajos donde se proponen las relaciones filogenéticas de las familias y superfamilias de Lepidoptera (*e.g.* Powell, 2003; Grimaldi y Engel, 2005).

La divergencia genital es una de las más interesantes tendencias en la evolución morfológica (Jagdeeshan y Singh, 2006). Eberhard (1985), propone que las estructuras genitales masculinas son complejas y rápidamente se diversifican mientras que los genitales femeninos permanecen sin variación, lo cual ha sido apoyado en distintos estudios (Eberhard, 2004, 2006; Jagdeeshan y Singh, 2006), pero en el presente trabajo se pudo probar que características de los genitales femeninos como los *signa* son complejas y presentan gran variación morfológica, por lo

que presentan un patrón de evolución divergente. Sin embargo, en general, la divergencia coevolutiva en la hembras parece ser poco común (Eberhard, 2006).

Actualmente existen varios ejemplos de correlación genital entre los sexos, aunque muchos de los trabajos en los que se propone una evolución genital por coevolución sexual tan solo se han estudiado características “simples” como: la longitud espermática y la longitud vaginal por ejemplo, en insectos (Presgraves, Baker y Wilkinson, 1999; Morrow y Gage, 2000; Pitnick, *et al.*, 2002; Minder, Hosken y Ward, 2005), mamíferos (Gomedio y Roldan, 1999; Kinahan, *et al.*, 2006) y aves (Briski y Montgomerie, 1993). Aunque existen trabajos como el realizado por Córdoba (2004) en libélulas donde se propone que la coevolución sexual es la responsable de la selección direccional en el ancho de los aedeagos de los machos y la reducción de sensilas (estructuras que participan en la expulsión de espermatozoides durante la fertilización) en las hembras, lo cual representa un trabajo mas detallado.

En este trabajo se evaluaron características más complejas que simplemente el largo de los espermatozoides y el largo de los tractos genitales femeninos, por lo que la evidencia de coevolución sexual encontrada es más detallada. La coevolución sexual es uno de los principales componentes de la evolución genital (Hosken y Stockley, 2004), por lo que futuros estudios deberán abordar la importancia relativa de los diferentes mecanismos de selección sexual que la originan (elección femenina y/o coevolución antagonista). Aunque existe una gran dificultad para evaluar la importancia relativa de ambos tipos de selección en el proceso de coevolución sexual (Cordero y Eberhard, 2003).

Literatura Citada

- Abraham D., Ryrholm N., Wittzell H., Holloway J. D., Scoble M. J. y Löfstedt C. 2001. Molecular Phylogeny of the Subfamilies in Geometridae (Geometroidea: Lepidoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20: 65-77.
- Abundis Santamaria L. 2006. Estudio sobre las causas y consecuencias de la tendencia a la monandria en la mariposa *Callophrys xami* (Lycaenidae). Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Arnqvist G. y Nilsson T. 2000. The evolution of polyandry: multiple mating en female fitness in insects. *Animal Behaviour*. 60: 145-164.
- Arnqvist G. y Rowe L. 2002. Correlated evolution of male and female morphologies in water striders. *Evolution*. 56: 936-947.
- Arnqvist G., y Rowe L. 2005. *Sexual Conflict*. Princenton University Press.
- Baum, B. R. 1992. Combining trees as a way of combining data sets for phylogenetic inference, and the desirability of combining genes tress. *Taxon*. 41: 3-10.
- Baldizzone G. 1997. Contribuzioni alla conoscenza dei *Coleophoridae*. LXXXVII. *Coleophoridae* nuovi o poco conosciuti dell'Africa settentrionale (Lepidoptera: *Coleophoridae*). SHILAP Revta. Lepid. 25: 219-257.
- Bininda-Emonds O. R. P. 2004. The evolution of the supertrees. *Trens in Ecology and Evolution*. 19: 315-322.
- Bininda-Emonds O. R. P. Y Bryant H. N. 1998. Properties of matrix representation with parsimony analyses. *Systematic Biology*. 47: 497-508.
- Brower A. V. Z. 2000. Phylogenetic relationships among the Nymphalidae (Lepidoptera) inferred from partial sequences of the wingless gene. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 267: 1201-1211.
- Brown J. W. 2001. Review of *Rebinea* Razowski and *Eliachna* Razowski (Tortricidae: Euliini) sister groups endemic to Chile and Argentina. *Journal of the Lepidopterists' Society*. 55: 129-139.
- Brown J. W. y Cramer A. 1999. Five new species of *Argyrotaenia* (Tortricidae: Archipini) from Mexico and The Southwestern United States. *Journal of the Lepidopterists' Society*. 53: 114-125.
- Caballero Mendieta N. 2004. Tasa de utilización de los espermátóforos y su efecto en la receptividad sexual de las hembras de la mariposa *Callophrys xami* (Lepidoptera: Lycaenidae). Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Chapman T., Arnqvist G., Banghan J. y Rowe L. 2003. Sexual conflict. *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 41-47.
- Cheong S. W., Lee C. E. y Park H. C. 1990. A microscopic study on the bursa copulatrix of korean Pieridae (Lepidoptera). *Esakia*. 1: 167-172.
- Cordero C. 2000. Is spermatophore number a good measure of mating frequency in female *Callophrys xami* (Lycaenidae)? *Journal of the Lepidopterists' Society* 53: 170-171.
- Cordero C. 2005. The evolution of *signa* in female Lepidoptera: Natural and sexual selection hypotheses. *Journal of Theoretical Biology*. 232: 443-449.
- Cordero C. y Eberhard W. G. 2003. Female choice of sexually antagonistic male adaptations: a critical review of some current research. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1-6.
- Cordero C. y Eberhard W. G. 2005. Interaction between sexually antagonistic selection and mate choice in the evolution of female responses to male traits. *Evolutionary Ecology*. 19: 111-122.

- Cordoba A. A. 2005. Possible coevolution of male and female genital form and function in a calopterygid damselfly. *Journal of Evolutionary Biology*. 18: 132-137.
- Cunningham E. J. A. y Birkhead T. R. 1998. Sex roles and sexual selection. *Animal Behaviour*. 56: 1311-1321.
- DeVries, P. J. 1987. *The Butterflies of Costa Rica and their natural history. Volume I: Papilionidae, Pieridae, Nymphalidae*. Princenton: Princenton University Press.
- Drummond B. A. III 1984. Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera. En: Smith RL ed. *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. Academic Press, Orlando, pp 291-371.
- Dunlap-Pianka H., Boggs C. L. y Gilbert L. E. 1977. Ovarian dynamics in Heliconiine butterflies: Programmed senescence versus eternal youth. *Science*. 197: 487-490.
- Eberhard W. G. 1985. *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Harvard Univ. Press, Harvard.
- Eberhard W. G. 1996. Femel control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press. Princeton, NJ.
- Eberhard W. G. 2004. Rapid divergent evolution of sexual morphology: comparative tests of antagonistic coevolution and traditional female choice. *Evolution*. 58: 1947-1970.
- Eberhard W. G. 2006. Sexual antagonistic coevolution in insects is associated with only limited morphological diversity. *Journal of Evolutionary Biology*. 19: 657-681.
- Emlen D. J., Marangelo J., Ball B., y Cunningham C. W. 2005. Diversity in the weapons of sexual selection: horn evolution in the beetle genus *Onthophagus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Evolution*. 59: 1060-1084.
- Eulenstein O., Chen D., Gordon-Burleigh J., Fernández-Baca D. y Sanderson M. J. 2004. Performance of flip supertree construction with a heuristic algorithm. *Systematic Biology*. 53: 299-308.
- Ferris C. D. 1991. Appearance of the "heathii" Aberration and genitalic variation in a Mitoura population from Oregon (Lycaenidae: Theclinae). *Journal of Research on the Lepidoptera*. 30: 113-120.
- Ferris C. D. 2004. A new species of *Passadenoides* Neunzig from Wyoming and New Mexico (Lepidoptera: Pryralidae: Phycitinae). *Zootaxa*. 705: 1-8.
- Ferro D. N. y Akre R. D. 1975. Reproductive morphology and mechanics of mating of Codling moth, *Laspeyresia pomonella*. *Annals of the Entomological Society of America*. 68: 417-424.
- Galicia Mendoza D. I. 2006. *Descripción morfológica y funcional de los signa en la mariposa Callophrys xami (Lepidoptera: Lycaenidae)*. Tesis para el grado de Maestro en Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología. UNAM.
- Gielis C. 1995. Neotropical Pterophoridae 11: The genus *Stenoptilia* Hübenr, (1825) (Lepidoptera: Pterophoridae). *Shilap Revta. Lepid.* 23: 141-152.
- Gielis C. 1996 Neotropical Pterophoridae 12: New species (Lepidoptera: Pterophoridae). *Shilap Revist de Lepidopterología*. 24: 81-110.
- Geiger H. J. 1980. Enzyme electrophoretic studies on the genetic relationships of pierid butterflies (Lepidoptera: Pieridae) I. European taxa. *Journal of Research on the Lepidoptera*. 19: 181-195.
- Gilbert L. E. 1991. Biodiversity of a Central American Heliconius community: Patterns, Process and Problems pp 403-428. En: Price P. W., T.M. Lewinsohn G. W. Fernandez y W. W. Benson (eds). *Plant-Animal Interactions*. John Wiley & Sons, Inc. New Cork.
- Gomedio M. y Roldan R. S. E. 1993. Coevolution between male ejaculates and female reproductive biology in eutherian mammals. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 252:7-12.

- Grimaldi D. y Engel M. S. 2005. *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press. New York.
- He Y. y Tsubaki Y 1991. Effects of spermatophore size on female remating in the Armyworm, *Pseudaletia separata*, with reference to larval crowding. *Journal of Entomology*. 9: 47-50.
- Hinton, H. E. 1964. Sperm transfer in insects and the evolution of haemocelic insemination. pp 95-107 En: K. C. Highnam, ed. *Insect Reproduction*. Symposium of the Royal Entomological Society of London, London.
- Holland B. y Rice W. R. 1998. Chase-away selection: antagonistic seduction vs. resistance. *Evolution*. 52: 1-7.
- Hosken D. J. y Stockley P. 2004. Sexual selection and genital evolution. *Trends in Ecology and Evolution*. 19: 87-93.
- Hsu Y. F., Ding D., Yen S. H. y Qian Z. Q. 2004. Systematic problems surrounding *Howarthia melli* (Foster) (Lepidoptera: Lycaenidae: Theclinae), with description of a new species and a review of *Rhododendron*- association in Lycaenid butterflies. *Annals of Entomological Society of America*. 97: 653-666.
- Iruegas R., Gomez B., Cruz-Lopez L., Malo E. A. y Rojas J. C. 2002. A new record of a moth attacking sapodilla, with descriptions of female genitalia and the last instar larva. *Florida Entomologist*. 85: 394-397.
- Jagadeeshan S. y Singh R. S. 2006. atime-sequence functional analysis of mating behaviour and genital coupling in *Drosophila*: role of cryptic female choice and male sex-drive in the evolution of male genitalia. *Journal Compilation*. 19: 1058-1070.
- Johnson K., Quinter E. L. y Matusik D. 1986. A new species of *Calisto* from Hispaniola with a review of the female genitalia of Hispaniolan congeners. *Journal of Research on the Lepidoptera*. 25: 73-82.
- Kaila L. 2004. Phylogeny of the superfamily Gelechioidea (Lepidoptera: Ditrysia): an exemplar approach. *Cladistics*. 20:303-340.
- Karlsson B. 1995. Resource allocation and mating systems in butterflies. *Evolution*. 49: 955-961.
- Karlsson B. 1996. Male Reproductive reserves in relation to mating system in butterflies: a comparative study. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences* 263: 187-192.
- Kinahan A. A., Bennet N. C., O'Riain M. J., Hart L. y Bateman P. W. 2006. Size matters: genital allometry in an African mole-rat (Family: Bathyergidae). *Evolutionary Ecology*.
- Li H. y Zheng Z. 1996. A systematic study on the genus *Dichomeris* Hübner, 1818 from China (Lepidoptera: Gelechiidae). *Shilap Revista de Lepidopterología*. 24: 229-273.
- Luis-Martínez, A., Llorente-Bousquets, J. E. y Vargas-Fernández, I. 2003. *Nymphalidae de México I (Danainae, Apaturidae, Biblionidae y Heliconiinae): Distribución geográfica e ilustración*. México. Universidad Nacional autónoma de México.
- Maddison, D. R. y Maddison W. P. 2001. MacClade 4: Analysis of Phylogeny and Character Evolution. Version 4.03. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Matsumoto, K. y Suzuki, N. 1995. The nature of mating plugs and the probability of reinsemination in Japanese Papilionidae. pp.145-154 En: J. M. Scriber, Y. Tsubaki, y R. C. Lederhause, eds. *Swallowtail Butterflies: Their Ecology and Evolutionary Biology*. Scientific Publishers, Gainesville.
- Mendoza Cuenca L. F. 2005. Estrategias alternativas de apareamiento den la mariposa *Heliconius charitonia*: Factores involucrados en la evolución del apareamiento pupal. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Instituto de Ecología A.C.
- Millar W. E. 2001. A new species of *Eucosmomorpha* from North America (Tortricidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*. 55: 81-84.

- Minder A. M., Hosken D. J. y Ward P. I. 2005. Co-evolution of male and female reproductive characters across the Scathophagidae (Diptera). *Journal of Evolutionary Biology*. 18: 60-69
- Mitchell A., Mister C. y Regier J. C. 2006. Systematics and evolution of the cutworm moths (Lepidoptera: Noctuidae): evidence from two protein-coding nuclear genes. *Systematic Entomology*. 31: 21-46.
- Morrow E. H. y Gage M. J. G. 2000. The evolution of length in moths. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 267: 307-313.
- Nijhout F. H. 1991. *The development and evolution of butterfly wing patterns*. Smithsonian Institution Press. USA.
- Parker G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biological Reviews*. 45: 525-567.
- Pellmyr O. y Balcazar-Lara M. 2000. Systematics of the Yucca moth genus *Parategeticula* (Lepidoptera: Prodoxidae), with description of three mexican species. *Entomological Society of America*. 93: 431-439.
- Pellmyr O. y Segraves K. A. 2003. Pollinator divergente with an obligate mutualism: Two Yucca moth species (Lepidoptera; Prodoxidae: *Tegeticula*) on the Joshua Tree (*Yucca brevifolia*; Agavaceae). *Entomological Society of America*. 96:716-722.
- Presgraves D. C., Baker R. H. y Wilkinson G. S. 1999. Coevolution of sperm and female reproductive tract morphology in stalk-eyed flies. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 266:1041-1047.
- Pitnick S., Miller G. T., Schneider K. y Markow T. A. 2003. Ejaculate-female coevolution in *Drosophila mojavensis*. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 270: 1507-1512.
- Powell J. A. 2003. Lepidoptera (Moths, Butterflies). 631-663 *En* V. H. Vincent y R. T. Cardé, eds. *Encyclopedia of Insects*. Academic Press.
- Ragan M. A. 1992. Phylogenetic inference based on matrix representation of trees. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 1: 53-58.
- Regier J. C., Fang Q. Q., Mitter C., Peigler R. S., Friedlander T. P., y Solis M. A. 1998. Evolution and phylogenetic utility of the period gene in Lepidoptera. *Molecular Biology and Evolution*. 15: 1172-1182.
- Rice W. R. 2000. Dangerous Liaisons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 12953-12955.
- Rogers, S. H. y Wells, H. 1984. The structure and function of the bursa copulatrix of the monarch butterfly (*Danaus plexippus*). *Journal of Morphology*. 180: 213-221.
- Sánchez Martínez V. M. 2004. *La evolución de los signa Lepidoptera: Un estudio comparativo de coevolución sexual*. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Solis M. A. y Styler L. 2003. Revision and phylogenetic analysis of *Accinctapubes* Solis (Pyrilidae: Epipaschiinae) with a larval description of an avocado-feeding species. *Journal of the Lepidopterists' Society*. 57: 121-136.
- Scoble M. J. 1992. *The Lepidoptera from, Function and Diversity*. Oxford University Press. USA.
- Sugawara, T. 1979. Stretch reception in the bursa copulatrix of the butterfly *Pieris rapae* crucivora, and its role in behaviors. *Journal of Comparative Physiology A*, 130: 191-199.
- Swofford D. L. 1999. PAUP * Phylogenetic analysis using parsimony, ver. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Thompson, J.N. 1999. Specific hypotheses on the geographic mosaic of coevolution. *American Naturalist*. 153: S1-S14.
- Thompson J. N. 2003. *El proceso coevolutivo*. Fondo de Cultura Económica, México. pp. 418.

- Torres-Vila L. M., Stockel J. y Rodriguez-Molina M. C. 1997. Physiological factors regulating polyandry in *Lobesia botrana*. (Lepidoptera: Tortricidae). *Physiological. Entomology*. 22: 387-393.
- Tschudi-Rein, K. y Benz, G. 1990. Mechanisms of sperm transfer in female *Pieris brassicae*. *Annals of the Entomological Society of America*, 83: 1158-1164.
- Vahed K. 1998. The function of nuptial feeding in insecta: A review of empirical studies. *Biological Reviews*. 73:43-78.
- Wahlberg N., Braby M. F., Brower A. V. Z., Jong R., Lee M. M., Nylin S., Pierce N. E., Sperling F. A. H., Vila R., Warren A. D. y Zakharov E. 2005. Synergistic effects of combining morphological and molecular data in resolving the phylogeny of butterflies and skippers. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 272: 1577-1586.
- Wedell N. 2001. Female remating in butterflies; interaction between female genotype and nonfertile sperm. *Journal of Evolutionary. Biology*. 14: 746-754.
- Wedell N. 2005. Female receptivity in butterflies and moths. *The Journal of Experimental Biology*. 208: 3433-3440.
- Wedell N. y Cook P. A. 1999. Butterflies tailor their ejaculate in response to sperm competition risk and intensity. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 266: 1033-1039.
- Wedell N., Wiklund C. y Cook P. A. 2002. Monandry and polyandry as alternative lifestyles in butterfly. *Behavioral Ecology*. 13: 450-455.