



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magíster en Ciencias Mención Zoología

**¿UNA MARIPOSA SIN MAL DE ALTURA?: ECOLOGÍA Y
MORFOMETRÍA ALAR DE *Vanessa carye* (Hüber 1812) (LEPIDOPTERA:
NYMPHALIDAE) A DISTINTOS GRADIENTES ALTITUDINALES EN EL
ALTIPLANO CHILENO (0-5200 MSNM)**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Mención Zoología

POR SCOTT MAURICIO ESCOBAR SUÁREZ
Profesor Guía: Dr. Hugo Alejandro Benítez de la Fuente
Profesor Co-Guía: Dr. Mauricio Andrónico Urbina Foneron

Concepción, Chile 2022
Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magíster en Ciencias Mención Zoología

¿Una mariposa sin mal de altura?: Ecología y
morfometría alar de *Vanessa carye* (Hüber 1812) (Lepidoptera:
Nymphalidae) a distintos gradientes altitudinales en el
Altiplano chileno (0-5200 msnm)

COMISIÓN EVALUADORA

Dr. Hugo Alejandro Benítez de la Fuente

Profesor Guía

Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Maule

Universidad Católica del Maule

Dr. Mauricio Andrónico Urbina Foneron

Profesor Co-Guía

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Departamento de Zoología

Dr. Luis Eduardo Parra Jiménez

Evaluador Interno

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Departamento de Zoología

Dr. Enrique Mundaca

Evaluador Externo

Departamento de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Católica del Maule

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a mi madre por su apoyo incondicional.

Agradecer a la académica y doctora Viviane Jerez que me orientó en la primera etapa del magíster. También agradecer a mis tutores Dr. Hugo Benítez y Dr. Mauricio Urbina por su apoyo y comprensión en especial en mi periodo de depresión. Agradezco enormemente a estos tres doctores por su apoyo, su orientación y enseñanzas a lo largo de mi paso por este postgrado.

Agradecer enormemente a mi psicóloga Carolina Escobar por su gran ayuda con la psicoterapia que me ayudó a superar mi depresión, sin todo ese camino recorrido posiblemente esta tesis no existiría.

Gracias a todos mis cercanos, que a pesar de no saberlo me ayudaron mucho en muchos aspectos.

Agradecer a mi compañero de laboratorio y querido amigo Amado Villalobos por su apoyo no solo en lo académico, sino que también en lo personal, su apoyo y consejos han sido de gran ayuda.

Volver a agradecer a todas esas personas que sin saberlo me ayudaron a superar la depresión y recuperar la motivación para terminar esta etapa de mi vida en el programa, agradecer todos esos nuevos conocimientos tantos académicos como personales, esta etapa del magíster no fue solo crecimiento profesional, también crecimiento personal y poder conocerme mejor a mí mismo.

Índice de Contenidos

1	INTRODUCCIÓN	1
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
2.1	Hipótesis.....	15
2.1.1	Predicciones:.....	15
2.2	Objetivo general.....	15
2.2.1	Objetivos específicos:	15
3	METODOLOGÍA.....	16
3.1	Muestreo.....	16
3.2	Análisis filogeográficos.....	18
3.2.1	Extracción del ADN, amplificación y secuenciación del gen mitocondrial COI	18
3.2.2	Análisis de diversidad genética	19
3.3	Morfometría geométrica	20
4	RESULTADOS	22
4.1	Análisis genéticos.....	22
4.2	Morfometría geométrica	23
4.3	Variación por Rango altitudinal	24
4.4	Variación por áreas geográficas.....	31
5	DISCUSIÓN	38
5.1	Trabajos futuros y consideraciones finales.....	46
6	CONCLUSIONES.....	49
7	REFERENCIAS.....	50
	ANEXOS.....	61
	Anexo I: Publicación: Quantifying elevational effect on the geometric body shape of Russian beetle <i>Carabus exaratus</i> (Coleoptera: Carabidae).....	62
	Anexo II: Publicación: A geometric morphometrics and genetics characterization of <i>Vanessa carye</i> in an extreme elevational gradient in the Chilean Altiplano	69

Índice de Tablas

Tabla 1: Localidades de colecta y su clasificación por altitud y geografía (A: 0-1000, B: 1001-1500, C: 1501-2500, D: 2501-3500, E: 3501-4535 and F: 4536-5500 metros sobre el nivel del mar) y clasificación geográfica (Planicie: Plai, Altiplano: Alti, Alta montaña: Mont).	17
Tabla 2. Índices de diversidad	23
Tabla 3. Total de alas (anteriores y posteriores) utilizadas para los análisis de morfometría geométrica por rango de altitud.	24

Índice de figuras

- Figura 1:** Puntos de colecta de *Vanessa carye*, A) Mapa con vista general de las localidades estudiadas. B) ampliación de un sector del altiplano de las localidades estudiadas. (Puna province = Altiplano; Atacaman province= Provincia de Atacama o Desierto de Atacama)..... 18
- Figura 2:** Landmarks utilizados en las alas de *Vanessa carye* anteriores (Izquierda) y alas posteriores (Derecha)..... 21
- Figura 3:** Red de haplotipos usando el gen mitocondrial COI según las zonas de altitud del Altiplano (Tabla 1)..... 23
- Figura 4:** Regresión multivariada por criterio de altitud. A) alas anteriores, B) alas posteriores. Los colores de los puntos representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F). 26
- Figura 5:** Análisis de componentes principales (PCA) para A) alas anterior y B) posterior acorde a los grupos altitudinales. Los colores de los puntos representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Tabla 1). La gráfica del medio corresponde a la red de haplotipos creada con el gen COI que muestra que no hay estructuración genética. 27
- Figura 6:** Análisis de variables canónicas (CVA) para alas A) anterior y B) posterior acorde a los grupos altitudinales. Los colores de los puntos representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F). 28
- Figura 7:** Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas anteriores acorde a grupo altitudinal. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F)..... 30
- Figura 8:** Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas posteriores acorde a grupo altitudinal. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F)..... 31
- Figura 9:** Análisis de componentes principales para A) ala anterior y B) ala posterior determinado por las áreas geográficas. El color de los puntos indica a que nivel geográfico corresponden (Tabla 1): Azul: Planicie (1500m); Verde: Altiplano (4535m); Café: Alta Montaña (5200m) 32

Figura 10: Análisis de variables canónicas para A) ala anterior y B) ala posterior determinado por las áreas geográficas. El color de los puntos indica a que nivel geográfico corresponden (Tabla 1): Azul: Planicie (1500m); Verde: Altiplano (4535m); Café: Alta Montaña (5200m)..... 33

Figura 11: Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas anteriores acorde a grupo geográfico. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Azul: Grupo Planicie; Verde: Grupo Altiplano, Café: Grupo Alta Montaña). 35

Figura 12: Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas posteriores acorde a grupo geográfico. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Azul: Grupo Planicie; Verde: Grupo Altiplano, Café: Grupo Alta Montaña). 36

Figura 13: Forma alar promedio sobrepuestas para observar las diferencias en la forma por categoría geográfica del A) ala anterior y B) ala posterior (Plain: Grupo Planicie; Alti: Grupo Altiplano, Mont: Grupo Alta Montaña). Se observa que el ala anterior es muestra más diferencias que el ala posterior. 37

Resumen

La migración es el movimiento de un lugar a otro en la búsqueda de condiciones más favorables. Las alas de los animales migratorios voladores son el rasgo principal involucrado en el movimiento y su forma ha sido documentada entre especies migratorias y no migratorias. La mariposa de la tarde, *Vannesa carye* (Hüber 1812) que presenta una extensa distribución en América del Sur, ha sido observada volando en el Altiplano chileno desde la costa hasta las montañas, desde los 0 a los 5200 msnm. Sin embargo, poco se conoce sobre las adaptaciones de *V. carye* a los gradientes altitudinales, por lo que el amplio rango latitudinal y altitudinal junto con las diferentes condiciones climáticas hacen a esta especie un sujeto interesante para estudios migratorios y adaptativos. La presente tesis determinó la diversidad genética y estructuración poblacional de esta especie usando el marcador molecular COI en los diferentes rangos altitudinales de *V. carye* en el Altiplano Chileno y en el Desierto de Atacama. Se usó morfometría geométrica para determinar la presencia de morfotipos de la forma alar asociados a la altitud y geografía, para esto se utilizaron 16 *landmarks* en el ala anterior y 15 en el ala posterior. Los principales resultados de la presente tesis indican que la baja variabilidad de la forma alar (diferencias sutiles) junto con la baja estructuración genética son indicios de un posible comportamiento migratorio para esta especie y se proponen dos posibles rutas migratorias. Este es el primer trabajo que use morfometría geométrica para evaluar la forma alar de una mariposa nominalmente migratoria, sin embargo, estudios

complementarios hacen falta para confirmar el comportamiento migratorio de esta especie.

Abstract

Migration is the movement from a place to other in searching for more favorable conditions. Wings of flying migratory animals are the principal trait involved in movement, and their shape has been documented to change between migratory and non-migratory species. The Western Painted Lady butterfly, *Vanessa carye* (Hüber, 1812), in addition to presenting an extensive distribution in South America, has been observed flying in the Chilean Altiplano from the coast to the highlands, from 0 to 5200 masl. However, little is known about the adaptations of *V. carye* to elevational gradients, so the *V. carye*'s wide latitudinal and altitudinal range coupled with the different climatic conditions make this species an interesting subject for migration and adaptation studies. In this thesis the genetic diversity and population structure of this species were determinate by using COI molecular marker at different elevational ranges in the Chilean Altiplano and Atacama Desert. To determinate the presence of morphotypes of wing shape associated with altitude and geography geometric morphometric was used, 16 landmarks for forewing and 15 for hindwing were used. The main results of this thesis indicate low wing shape variability (subtle differences) with low genetic structure are signs of a probable migratory behavior for this species and two possible migratory routes are proposed. This is the first research that uses geometric morphometry to evaluate the wing shape of a nominal migratory

butterfly, however, complementary studies are needed to confirm the migratory behavior of this specie.

1 INTRODUCCIÓN

Los insectos tienen distintos roles ecológicos fundamentales para el ecosistema, están involucrados en relaciones tróficas, polinización, ciclo de nutrientes, en la salud del ecosistema entre otras funciones ecológicas (Altmann & Claros 2015). A nivel global, los insectos son el grupo de animales más diversos, corresponden a más del 50% de la biodiversidad global (Gullan & Cranston, 2015). A pesar de su gran diversidad y su importancia pocos grupos han sido estudiados y, por ende, su importancia ecológica aún es poco conocida, así como sus rasgos evolutivos. El orden más diverso de insectos es Coleoptera seguido de Lepidoptera (García-Robledo et al., 2020; Stork, 2018; Zhang, 2011).

Los insectos se desplazan por variados propósitos (Dingle & Drake, 2007), búsqueda de alimento, con fines reproductivos, para explorar y colonizar, incluso para migrar (Chapman et al., 2015). La migración en insectos ha recibido poca atención, este comportamiento ha sido mejor abordada en aves, mamíferos y peces por las facilidades metodológicas (Alerstam et al., 2003; Dingle & Drake, 2007).

Dingle & Drake (2007) mencionan que la palabra migración puede referirse a distintos conceptos, pero siempre referido al movimiento de un organismo o población de un lugar a otro distinto en busca de condiciones más favorables.

Los mismos autores clasifican distintos tipos de migración dependiendo del enfoque de la misma, asimismo una especie puede ser migrante obligatorio o facultativo; en el aspecto temporal pueden ser estacional o irruptivo; en cuanto a escala espacial la migración se puede clasificar como: *to-and-fro* (vaivén), *round-trip* (ida y retorno) o unidireccional. Cabe aclarar que la presente tesis se estará refiriendo a la migración de ida y retorno (*Round-trip*), este se refiere al desplazamiento de organismos donde se retorna al sitio reproductivo pasando por distintas zonas de descanso, por lo general, por una ruta seleccionada (fenotipo extendido).

Los organismos migrantes tienen adaptaciones morfológicas y fisiológicas que les permiten llevar a cabo la migración (Alerstam et al., 2003; McNeil, 2011; Weber & Hedenström, 2001). En el caso de migrantes voladores, las alas se someten a selección natural y solo las más óptimas son heredadas por las siguientes generaciones (Alvial et al., 2019; Huang et al., 2020; Neto et al., 2013). Es fundamental que la interacción del ala con la masa de aire permita al organismo volar grandes distancias, tener un vuelo eficiente y menos costoso energéticamente (Landell-mills, 2021; Thomas et al., 2004), lo que está asociado a un alta carga alar (relación entre área alar y masa corporal) en especies migratorias (Altizer & Davis, 2010; Flockhart et al., 2017), característica que permite vuelos a largas distancias (Le Roy et al., 2019). Aquellas alas que permitan esto serán las heredadas en poblaciones migratorias, como se mencionará más adelante. Sin embargo, existen variabilidad en la forma de las

alas en poblaciones migratorias y sedentarias de una misma especie (Huang et al., 2020; Outomuro & Johansson, 2019; Suárez-Tovar & Sarmiento, 2016), por lo tanto, la interacción con el flujo del aire es distinta en ambas poblaciones, por lo que el tipo de ala define la capacidad de vuelo y dispersión (Le Roy et al., 2019; Wang & Clarke, 2015). En la mariposa monarca, *Danaus plexippus* (Lepidoptera; Nymphalidae), los periodos migratorios actúan como episodios de selección para la morfología de las alas (Flockhart et al., 2017).

Ciertos eventos ambientales desencadenan el comportamiento migratorio en organismos que han desarrollado adaptaciones fisiológicas necesarias para migrar, como son: inhibición a ciertas respuestas fisiológicas (inhibición de madurez, reproducción, alimentación), respuesta a cambios ambientales (cambio en condiciones climáticas, fotoperiodo, magnetismo) (Åkesson et al., 2001; Susanne Åkesson & Hedenström, 2007; Alerstam et al., 2003; Guerra et al., 2014; Muheim et al., 2003), entre otros.

Los insectos ocupan distintas estrategias para migrar: dejarse llevar a la deriva por el viento o por corrientes de agua, usar el viento a favor del vuelo, entre otras que pueden variar de acuerdo al organismo (Chapman et al., 2015). Los principales órdenes de insectos que usan el vuelo para migrar son: Odonata, Orthoptera y Lepidoptera (Chapman et al., 2015). Los representantes migratorios de estos grupos de insectos usan los vientos para aumentar su velocidad, son capaces de volar a contra viento, en ocasiones para corregir la dirección del vuelo

(Srygley & Dudley, 2008). Para alcanzar mayor velocidad, y disminuir el uso de recursos energéticos, los insectos alcanzan altas alturas donde las corrientes de aire son más intensas incrementando la velocidad del vuelo si coincide con la dirección deseada por el insecto (Chapman et al., 2010). Sin embargo, esto tiene una desventaja, si el viento alcanza demasiada velocidad el insecto podría no ser capaz de corregir su dirección (Chapman et al., 2015).

Los insectos son capaces de resistir condiciones adversas gracias a la diapausa, por este motivo Chapman et al. (2015) proponen que la migración debe beneficiar de alguna forma a los insectos. Algunos de los beneficios mencionados son: mayor tasa de reproducción por año (Chapman et al., 2012), menor riesgo de mortalidad por depredadores, parásitos y patógenos (Altizer et al., 2011). Por ejemplo, las poblaciones de la mariposa monarca que no migran tienen mayor tasa de infecciones por el patógeno *Ophryocystis elektroscirrha*, en comparación a aquellas poblaciones migratorias (Altizer et al., 2000).

Las alas de animales migratorios cumplen un rol fundamental en el desplazamiento, pues cuentan con adaptaciones que facilitan la migración. Las alas de aves migratorias son más grandes, alargadas y puntiagudas en comparación a especies sedentarias o con bajo rango de migración/dispersión (Lockwood et al., 1998). Esta diferencia morfológica se puede observar dentro de una misma especie con poblaciones migrantes y no migrantes (Lockwood et al., 1998). Este patrón también es observado en insectos migratorios, la forma de las

alas en odonatos es distinta en especies migratorias (Johansson et al., 2009). Libélulas migratorias poseen alas más alargadas y angostas con la región anal y cubital más grandes que aquellas no migratorias (Huang et al., 2020), esta variación morfológica les proporciona un menor gasto energético (Suárez-Tovar & Sarmiento, 2016); por ejemplo, las poblaciones de *Pantala flavescens* (Odonata: Libellulidae) que no migran tienen alas anteriores más pequeñas en comparación a poblaciones migratorias (Alvial et al., 2019).

Las mariposas migratorias poseen alas anteriores de mayor tamaño en comparación a mariposas que no migran (Chowdhury et al., 2021; Johnson, 1963). En la mariposa monarca las poblaciones migratorias poseen alas más grandes y alargadas en comparación con aquellas poblaciones no migratorias, presentando alas más redondeadas (Altizer & Davis, 2010). Mariposas con alas de mayor tamaño y más alargadas son capaces de realizar vuelos más largos, los que les permite abarcar mayor distancia (Flockhart et al., 2017). La forma ala en animales migratorios les permite ser más aerodinámicos y tener un menor gasto energético para poder recorrer largas distancias. Una baja carga alar (razón entre masa corporal y área alar) está asociado a la migración, los individuos con alas más grandes presentan menor carga alar lo que beneficia la migración (Flockhart et al., 2017)

Existen pocos trabajos que investiguen la forma de las alas en mariposas migratorias. Para la mariposa monarca, por ejemplo, solo se ha evaluado las alas

con morfometría tradicional, midiendo la relación entre el largo y ancho para calcular la relación de aspecto (largo dividido en ancho), gracias a esto se sabe que las mariposas migratorias presentan alas de mayor tamaño (Altizer & Davis, 2010; Flockhart et al., 2017); sin embargo, no se ha evaluado la forma con morfometría geométrica.

La morfometría geométrica es una herramienta sensible que ha aumentado su uso y está en constante actualización, es capaz de resolver problemáticas cada vez más complejas a través del análisis de la forma (Villalobos-Leiva & Benítez, 2020). En morfometría geométrica el concepto de “forma” (*Shape*) se define como “toda información geométrica que resulta de retirar los efectos de la posición, escala y rotación” (Kendall, 1977), La morfometría geométrica entrega datos visuales e intuitivos en coordenadas cartesianas, a diferencia de la morfología tradicional que entrega tablas y gráficos menos intuitivos y que rara vez mantienen las relaciones geométrica y es muy dependiente del tamaño de los individuos (Benítez & Püschel, 2014; Villalobos-Leiva & Benítez, 2020). Entre las ventajas que presenta la morfometría geométrica destacan que entrega una descripción precisa de las formas y permite visualizar las diferencias entre morfotipos (Benítez & Püschel, 2014) sustentado bajo una robusta base matemática (Villalobos-Leiva & Benítez, 2020), elimina variables como la escala, traslación y rotación (Klingenberg, 2010) usando la superposición de Procrustes (Klingenberg, 2015) de esta forma se genera un mejor aprovechamiento de la forma geométrica (Benítez & Püschel, 2014).

La morfometría geométrica al analiza la forma de los organismos, entrega información biológica como adaptaciones a presiones ambientales, muestra las diferencias entre poblaciones, entre otras variaciones morfológicas. Además entrega una mejor interpretación biológica en distintos ámbitos ecológicos y evolutivos (Adams & Rohlf, 2000). La forma es obtenido utilizando hitos o *landmarks* en puntos homólogos e informativos, estos puntos deben estar bien definidos, en otras palabras, la forma está definida de la relación espacial entre los puntos escogidos (Toro-Ibacache et al., 2010).

Los estudios de morfometría geométrica publicados en mariposas responden a preguntas poblacionales (Taylor-Cox et al., 2020; Wells et al., 2018), como son los efectos del medio sobre la forma alar de los individuos (Bai et al., 2015) e incluso la variabilidad morfométrica a distintas latitudes (Sanzana et al., 2013), adaptaciones a un nuevo lugar en especies invasivas con enfoque en sus alas, pero no enfocados en la migración como tal. Para *Speyeria diana* (Lepidoptera: Nymphalidae) se evaluó el dimorfismo sexual y diferencia poblacional altitudinal con morfometría geométrica (Wells et al., 2018). Para *Pararge aegeria* (Lepidoptera: Nymphalidae) se determinó diferencias poblacionales y se menciona que las alas más redondeadas permiten mayor dispersión (Taylor-Cox et al., 2020); sin embargo, una mayor dispersión no es sinónimo de migración, principalmente porque la migración *round-trip* requiere una gran cantidad de adaptaciones para llevarse a cabo (Dingle & Drake, 2007).

El género *Vanessa* (Lepidoptera; Nymphalidae) es cosmopolita, excluyendo la Antártica, cuenta con 22 especies reconocidas (Wahlberg & Rubinoff, 2011). En este género se encuentran insectos vágiles y con distribución restringida. Seis especies tienen rango de distribución que abarca varios miles de kilómetros (*V. atalanta*, *V. cardui*, *V. carye*, *V. indica*, *V. itea* y *V. virginiensis*) y las 16 restantes tienen distribución restringida. Al ser un género con pocas especies y distribución global es posible trabajar con el total de los integrantes, por esto mismo, este género ha sido sujeto de varios estudios adaptativos, evolutivos (Abbasi & Marcus, 2015; Saphiro & Geiger, 1989; Wahlberg & Rubinoff, 2011) y migratorios (Nesbit et al., 2009; Stefanescu et al., 2016, 2021; Talavera & Vila, 2017).

Dentro del género se puede destacar a *Vanessa cardui* (Linnaeus, 1758) como una especie migratoria intercontinental que recorre desde las Islas Atlánticas del norte hasta el norte de África atravesando Europa, el Mar Mediterráneo y el Desierto del Sahara (Stefanescu et al., 2016; Suchan et al., 2019; Talavera & Vila, 2017; Wahlberg & Rubinoff, 2011). Tiene una de las distribuciones más extensas entre los animales terrestres (Shields, 1992). Un individuo puede volar más de 4000 km (Talavera & Vila, 2017), incluso puede volar a contraviento (Stefanescu et al., 2016), en invierno, cuando no puede hibernar, puede volar hasta 1000 km a áreas de reproducción cercanas (Wahlberg & Rubinoff, 2011). *V. cardui* ha sido una de las especies de mariposas migratoria más estudiada, puede recorrer 15000 km en un año (Migración *round-trip*) y en seis generaciones (Chapman et al., 2015; Nesbit et al., 2009; Stefanescu et al., 2013). La posición

del sol es una de las señales que usa para guiarse en su trayecto (Chapman et al., 2015; Nesbit et al., 2009; Stefanescu et al., 2013). Talavera & Vila (2017) observaron polimorfismo en adultos y larvas, además de diferencias de comportamiento en individuos migratorios y sedentarios de distintas localidades. Los mismos autores mencionan que los individuos migratorios son más activos en cumbres de colinas al final de las tardes. *Vanessa atalanta* es otra especie migratoria que migra entre Europa y el norte de África. Presenta migración latitudinal (Mikkola, 2003; Stefanescu, 2001) y posiblemente migración altitudinal, se estima que puede volar hasta los 3000m de altitud (Mikkola, 2003).

Entre los rasgos característicos de los organismos migratorios se encuentra la vagilidad, que es la capacidad de dispersión de un organismo. La vagilidad dentro del género *Vanessa* evolucionó de forma paralela (Wahlberg & Rubinoff, 2011). Especies vágiles tienen como especies hermanas a mariposas con distribución restringida: *V. cardui* tiene como especie hermana a *V. kershawi*, endémica de Austria; *V. atalanta* es la especie hermana de *V. tameamea*, endémica de las islas hawaianas (Abbasi & Marcus, 2015; Wahlberg & Rubinoff, 2011). Una hipótesis aceptada es que las mariposas del género *Vanessa* tengan pre-adaptaciones en su capacidad de vuelo y su esperanza de vida le permitieron modificar su hábito sedentario a un comportamiento migratorio, lo que favoreció la especiación (Talavera & Vila, 2017).

Chile cuenta con tres representantes del género, *V. terpsichore* y *V. carye* y se

reportó por primera vez en Chile la presencia de *V. braziliensis* en Socoroma a 3300 msnm en el año 2012 (Vargas, 2013). *V. terpsichore* se distribuye desde Coquimbo a Magallanes. En cambio, *V. carye* tiene una distribución muy amplia que abarca desde Venezuela a la Patagonia incluyendo islas oceánicas chilenas, se estima que esta podría ser migratoria. *V. carye* se ha observado desde los 0 hasta los 5200 msnm (Benítez et al., 2019), correspondiendo al altiplano chileno. Se desconocen los mecanismos que le permiten habitar en este amplio gradiente altitudinal, considerando la baja presión parcial de oxígeno propia de elevaciones a gran altura, y la diversidad climática, no solo del altiplano, sino que, de todo su rango de distribución, pareciera que vuela sin mayores dificultades. *V. carye* es una mariposa emblemática con colores muy llamativos, contradictoriamente son muy escasos los trabajos enfocados en esta mariposa. Se desconoce mucho de su biología, si es migratoria o no. Si bien ha sido incluida en estudios evolutivos, no se ha explicado ni documentado su historia natural. Esta mariposa junto a su especie hermana (*V. annabella*) forman el clado que sostiene la filogenia del género *Vanessa* (Wahlberg & Rubinoff, 2011). *V. annabella* es poco vágil y se distribuye en Norteamérica. Se estima que el ancestro común de estas dos especies existió en el Plioceno (2-4 m.a.).

Parte de la distribución de *Vanessa carye* abarca la cordillera de los Andes y el Altiplano chileno. La cordillera de los Andes se formó en distintos periodos geográficos, cada región tiene su propia historia geográfica (Gregory-Wodzicki, 2000). En el Andes central se encuentra el Altiplano o Puna, que es una meseta

extensa de gran altitud, cuya media es 3700m de altura, pero posee montañas que alcanzan entre los 5000m a 6000m de elevación (Strecker et al., 2007). Abarca Perú, Bolivia, Chile y Argentina (Strecker et al., 2007). La compresión del altiplano empezó en el Oligoceno, hace unos 25-26 millones de años, se estima que la mitad de su elevación actual se alcanzó hace unos 10 millones de años (Gregory-Wodzicki, 2000) y en el Mioceno alcanza su elevación actual (Garziona et al., 2017). El altiplano chileno corresponde a una estrecha línea en el noroeste del país desde los 17°30' S a los 27°S. Esta área se caracteriza por su clima árido y seco e inviernos fríos, de forma estocástica pueden llegar ser inviernos extremadamente fríos, lo que hace que la vegetación sea casi exclusivamente esteparia (Vila, 2010). El altiplano ha sido influenciado por la orogénesis andina, volcanismos y glaciaciones del Pleistoceno (Strecker et al., 2007; Trumbull et al., 2006; Vila, 2010), más la variación climática y aislamiento geográfico ha condicionado la biodiversidad presente. Estas características convierten al altiplano un lugar interesante para realizar estudios filogeográficos, de adaptación y mecanismos evolutivos. Los estudios existentes mayoritariamente se han realizado en vertebrados (Correa et al., 2010; Cruz-Jofré et al., 2016; Palma et al., 2005; Gallardo et al., 2011; Victoriano et al., 2015)

El altiplano posee barreras geográficas naturales que han propiciado el aislamiento geográfico de poblaciones, en consecuencia, el flujo génico se ve reducido. Esta reducción en el flujo génico puede llevar a eventos de especiación (Palma et al., 2005; Vila et al., 2013). Por otro lado, el aislamiento tiende a formar

poblaciones con distintos niveles de estructuración y, en consecuencia, la presencia de distintos linajes y la presencia de haplotipos propios de cada localidad (Correa et al., 2010; Eduardo Palma et al., 2005; Rivera et al., 2016). El Altiplano ha cumplido roles importantes en la diversificación de géneros, sin embargo, estos eventos de diversificación no siempre están relacionados directamente con el levantamiento altiplánico (Spotorno et al., 2001). Debido a las barreras creadas el desplazamiento de los organismos se ve limitado frente a un cambio climático o alguna otra adversidad. Algunos ejemplos de esto son: 1) en el género *Psectrascelis* (Coleoptera: Tenebrionidae) que cuenta con dos clados separados por un determinado gradiente altitudinal, esta separación fue provocada por la eliminación de corredores en un evento de cambio climático, evento sucedido posterior a la elevación actual del altiplano (Zúñiga-Reinoso et al., 2020). 2) La hormiga *Atta cephalotes* (Hymenoptera; Formicidae) cuenta con poblaciones aisladas debido al levantamiento andino que actuó como barrera geográfica reduciendo el flujo génico (Muñoz-Valencia et al., 2022). 3) El género de peces *Orestias* (Cyprinodontiformes) tiene varias especies que habitan lagos y ríos aislados unos de otros debido a la historia geográfica del altiplano, esto parece explicar las variaciones morfológicas de la forma de la cabeza de las distintas especies (Rojas et al., 2020). 4) La rana *Rinella spinulosa* (Anura; Bufonidae) tiene diferencias genéticas que están ligadas a las condiciones hídricas de las diferentes localidades de su distribución (Gallardo et al., 2011). Incluso animales voladores se ven afectados por las barreras geográficas y

ambientales causadas por el gradiente altitudinal del altiplano como ocurre con el cóndor andino *Vultur gryphos* (Aves; Cathartiformes) que a pesar de su amplia distribución y gran vagilidad la población no es panmíxica y la estructura genética muestra diferencias entre poblaciones norte y sur de su distribución (Padró et al., 2018).

El aislamiento por sí solo no es suficiente para generar una presión selectiva. Las características del paisaje también tienen un rol fundamental en la variabilidad genética en especies presente en el Altiplano (Gallardo et al., 2011). Por lo tanto, los organismos presentes en el Altiplano tienen distintas adaptaciones fisiológicas y morfológicas que les permiten habitar a diferentes gradientes altitudinales. Las condiciones bióticas y abióticas cambian con el incremento del gradiente altitudinal. En general, a mayor elevación mayor radiación, menor disponibilidad de oxígeno, más precipitaciones, mayor velocidad del viento, entre otros que promueven cambios ambientales dependientes de las condiciones del terreno (Hodkinson, 2005).

El amplio rango latitudinal y altitudinal, más las diferentes condiciones climáticas a las que *V. carye* se somete la hacen un buen sujeto de estudios migratorios y adaptativos. Los estudios de mariposas en Chile son escasos, y menos los que incluyen aspectos migratorios; y tampoco hay estudios que evalúen la forma alar de mariposas a pesar que este rasgo es fundamental para el vuelo y la migración. Estudiar las adaptaciones morfológicas de la forma alar y la estructuración

poblacional ayudarán a entender mejor su historia evolutiva y proponer los primeros indicios que puedan confirmar si es una especie migratoria. En este contexto, este sería el primer estudio en dar indicios de una posible migración para *V. carye* y en evaluar la migración en mariposas utilizando morfometría geométrica.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Vanessa carye posee baja diferenciación poblacional a nivel genético y morfológico, asociado con el gradiente altitudinal del altiplano chileno (0-5200 msnm).

2.1.1 Predicciones:

- Dado que *Vanessa carye* ha sido descrita como una mariposa migratoria, el flujo génico debería ser alto.
- La forma alar de *Vanessa carye* no presentaría diferencias morfométricas significativas a distintos niveles altitudinales del altiplano chileno y por tanto correspondería a una sola unidad poblacional.

2.2 Objetivo general

Determinar la estructura genética-morfológica de *Vanessa carye* en su rango altitudinal en el Altiplano chileno.

2.2.1 Objetivos específicos:

Caracterizar la forma geométrica alar de *V. carye* a diferentes gradientes altitudinales en el altiplano chileno (0-5200msnm) utilizando herramientas de morfometría geométrica.

Evaluar presencia de estructuración poblacional y patrones de diversidad genética de *V. carye* en el altiplano chileno.

3 METODOLOGÍA

3.1 Muestreo

Se colectaron ejemplares de *Vanessa carye* en 18 localidades del norte de Chile, la Región de Arica y Parinacota y la Región de Tarapacá (17°30'S a 24°S) (Tabla 1, Fig. 1). La captura de individuos se realizó con redes entomológicas en los periodos de marzo-abril del 2018; marzo-junio del 2019; mayo del 2021. Los sitios de colecta fueron agrupados acorde la elevación y categoría geográfica (Tabla 1) para estudiar el efecto de la altitud y geografía sobre la morfometría geométrica de las alas y la diversidad genética. Para la categoría de elevación se decidió utilizar distintos rangos de altura con la finalidad de observar si la forma alar se va modificando a medida que aumenta la altitud. Para la clasificación geográfica se consideraron como Planicie las localidades hasta los 1500msnm, como Altiplano localidades hasta los 4535msnm y Alta Montaña hasta los 5200msnm. El grupo Planicie incluye localidades que no son parte del Altiplano Chileno, el grupo Altiplano incluye localidades que corresponde al Altiplano *per se*. Se agruparon las localidades más altas como Alta Montaña debido a las diferencias ambientales documentadas a esas altitudes.

A los ejemplares colectados se les extrajo las alas, estas fueron extendidas y montadas en placas de vidrios para análisis de morfometría geométrica, posteriormente fueron fotografiadas con una cámara Sony A6000 con un lente de

60mm macro, ventral y dorsalmente. El cuerpo de los individuos fue depositado en etanol de 70° almacenado a -20°C para posterior extracción de ADN.

Tabla 1: Localidades de colecta y su clasificación por altitud y geografía (A: 0-1000, B: 1001-1500, C: 1501-2500, D: 2501-3500, E: 3501-4535 and F: 4536-5500 metros sobre el nivel del mar) y clasificación geográfica (Planicie: Plai, Altiplano: Alti, Alta montaña: Mont).

Región	Localidad	Altitud (msnm)	Clasificación de altitud	Clasificación geográfica
Arica y Parinacota	Azapa	270	A	Plai
	Codpa	1865	C	Alti
	Timar	2365	C	Alti
	Socoroma	3073	D	Alti
	Ticnamar	3250	D	Alti
	Belén	3267	D	Alti
	Chapiquiña	3311-3365	D	Alti
	Murmutani	3535	E	Alti
	Putre	3544-4000	E	Alti
	Misitune	4500	F	Mont
	Lago Chungará	4535	F	Mont
	Laguna Sorapata	5200	F	Mont
Tarapacá	Iquique	0-110	A	Plai
	Huara	1100	B	Plai
	Tarapacá	1397	B	Plai
	Chusmiza	3279	D	Alti
	Quebrada Copaquilla	3350	D	Alti
	Enquelga	3943	E	Alti

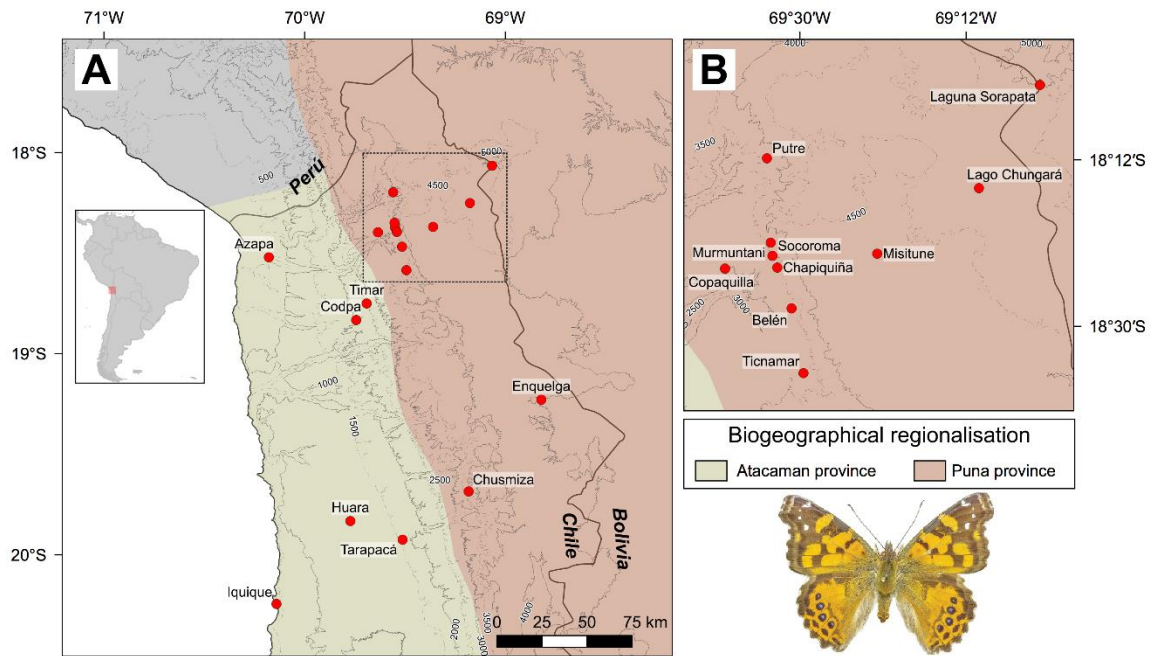


Figura 1: Puntos de colecta de *Vanessa carye*, A) Mapa con vista general de las localidades estudiadas. B) ampliación de un sector del altiplano de las localidades estudiadas. (Puna province = Altiplano; Atacaman province= Provincia de Atacama o Desierto de Atacama)

3.2 Análisis filogeográficos

3.2.1 Extracción del ADN, amplificación y secuenciación del gen mitocondrial COI

Las patas de las mariposas fueron usadas para extraer la muestra de ADN usando el método *Salting-out* (Jowett, 1986). El gen mitocondrial, Citocromo oxidasa I (COI), fue amplificado en un total de 30 μ l de mezcla para PCR, esta mezcla contenía Buffer PCR 1x (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl), MgCl₂ 2 mM, dNTP's 0.16 mM, F y R primers 0.1 μ M, *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen™) 0.03 U/ μ l y ADN 1 ng/ μ l. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 45 segundos de alineamiento a 50°C, 30 segundos de extensión a 72°C, y una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de la PCR fueron purificados y fueron secuenciados bi-direccionalmente por Macrogen, Inc. usando un secuenciador automático ABI3730x1. Las secuencias fueron editadas y alineadas con la opción ClustalW del software BioEdit v7.0,5 (Hall, 1999).

3.2.2 Análisis de diversidad genética

La diversidad genética de las muestras fue caracterizada usando los siguientes índices de diversidad de DnaSP (Librado & Rozas, 2009): Número de sitios polimórficos (S), Número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (Hd) y número promedio de diferencias entre secuencias (PI). Una red de haplotipos *Median Joining* (Bandelt et al., 1999) fue realizada con PopArt (Leigh & Bryant, 2015) usando $\epsilon=0$, finalmente se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) entre las poblaciones de las diferentes localidades con el software Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010)

3.3 Morfometría geométrica

Para la morfometría geométrica alar se seleccionaron las alas izquierdas, tanto anteriores como posteriores, en los casos que las alas no estaban en buenas condiciones se ocupó el ala derecha volteando la fotografía, esto asumiendo simetría bilateral en los ejemplares colectados. Debido a que las cuatro alas presentaban diferente nivel de daño/desgaste no fue posible tener ambas alas (anterior y posterior) para todos los individuos.

Con TPSDig2 ver. 2.30 se digitalizaron 16 *landmarks* en las alas anteriores y 15 en las alas posteriores, estos *landmarks* fueron colocados en intersecciones de venas y los márgenes alares en ambas alas en la vista ventral (Figura 2) debido a que son puntos fáciles de ubicar y homólogos en esta vista. Para cada set de datos una nueva digitalización de *landmarks* fue realizada para determinar el error de medición (Arnqvist & Mårtensson, 1998; Fruciano, 2016). Al tener las coordenadas 2D X Y del plano cartesiano para cada *landmark* se le aplicó un análisis de superposición de Procrustes en MorphoJ 1.07a (Klingenberg, 2011), esto se hizo con el objetivo de remover propiedades geométricas que son invariantes respecto a la variación, como lo son: la rotación, traslación y escala de tamaño, normalizando todas las muestras a una unidad de tamaño del centroide (Rohlf & Slice, 1990). Posteriormente se analizó la variación de la forma con el análisis de componente principal (PCA) basado en la matriz de covarianza

de la forma individual. De manera de evaluar los cambios de la forma de forma independiente por grupo se calculó la forma promedio en cada ala (anterior y posterior). Para esto se calculó la matriz de covarianza del promedio por grupo y sobre esta se realizaron los posteriores PCA del promedio de la forma. Se realizó un análisis canónico (CVA) para amplificar la variación interespecífica de cada grupo con el fin de determinar si existen diferencias *a priori* bajo un análisis discriminante. El PCA y CVA mostrarán si hay diferencia en la forma de las alas a diferentes gradientes altitudinales. Se realizó una regresión multivariada para determinar si el tamaño (tamaño de centroide) y la forma están relacionados (relaciones alométricas) Todos los análisis multivariados fueron realizados en MorphoJ 1.07a (Klingenberg 2011).

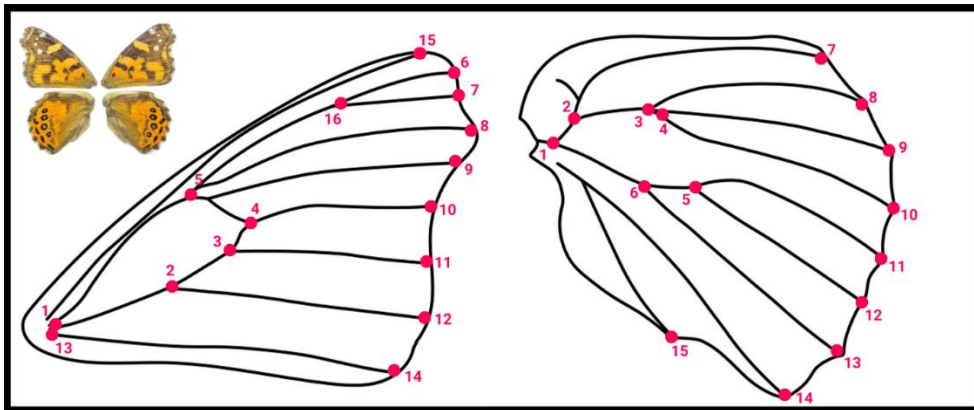


Figura 2: Landmarks utilizados en las alas de *Vanessa carye* anteriores (Izquierda) y alas posteriores (Derecha)

4 RESULTADOS

4.1 Análisis genéticos

Un total de 348 especímenes fueron secuenciados para el gen mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI). La red de haplotipos para las localidades de *V. carye* en el Altiplano chileno muestran una distribución en forma de estrella (Fig. 3) con un haplotipo central con uno a tres pasos mutacionales entre el resto de haplotipos. Estos resultados sugieren que las localidades de *V. carye* presentes en el Altiplano chileno son una sola población y posiblemente presenten un alto flujo génico. La diversidad haplotípica ($Hd=0.306$) concuerda con lo anterior mostrando un solo haplogrupo (Tabla 2). El test de AMOVA muestra ausencia de estructuración filogeográfica (AMOVA $\Phi_{ST} = 0.007$, $p > 0.05$).

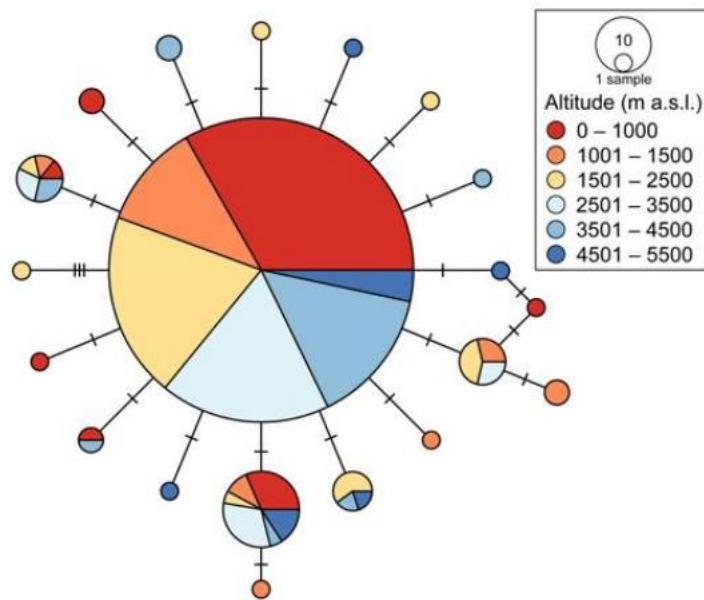


Figura 3: Red de haplotipos usando el gen mitocondrial COI según las zonas de altitud del Altiplano (Tabla 1).

Tabla 2. Índices de diversidad

Marcador molecular	Tamaño de secuencias (bp)	de S	K	Hd	π
COI	636	20	20	0.306	0.393

4.2 Morfometría geométrica

Se obtuvo un total de 222 alas anteriores y 201 alas posteriores, en la tabla 3 se observa el total de alas analizadas por rango altitudinal.

Tabla 3. Total de alas (anteriores y posteriores) utilizadas para los análisis de morfometría geométrica por rango de altitud.

Rango altitudinal (msnm)	Código	Clasificación Geográfica	Alas anteriores	Alas Posteriores
0-1000	A	Plai	31	31
1001-1500	B	Plai	40	33
1501-2500	C	Alti	25	20
2501-3500	D	Alti	61	54
3501-4500	E	Alti	48	47
4501-5500	F	Mont	17	16

4.3 Variación por Rango altitudinal

En la figura 4 se observa que Las relaciones alométricas del tamaño (tamaño del centroide) y la forma alar no están relacionadas al no distinguirse ningún tipo de agrupación en la nube de puntos ni para las alas anteriores (Fig. 4A) ni para las posteriores (Fig. 4B). El análisis de componentes principales mostró que no hay una diferenciación clara en la forma para los grupos altitudinales (Fig. 5A). Los tres primeros componentes principales explican el 62.472% (PCA1+PCA2+PCA3; 33.247; 17.283; 11.943) de la variación de la forma. Un 33% de variación en el PC1 muestra una pequeña variación para claras diferencias en los grupos altitudinales lo que podría interpretarse como posibles

morfotipos relacionados a la altitud a la que corresponde. Por otro lado, el PCA por criterio de altitud para las alas posteriores (Fig. 5B) mostró que no hay una diferenciación clara en la forma. Los tres primeros componentes principales explican el 63.668% (PCA1+PCA2+PCA3; 35.208; 17.538; 10.921) de la variación de la forma de las alas posteriores. Además, se encontró una alta superposición de los individuos siguiendo la misma variación morfológica que las alas anteriores.

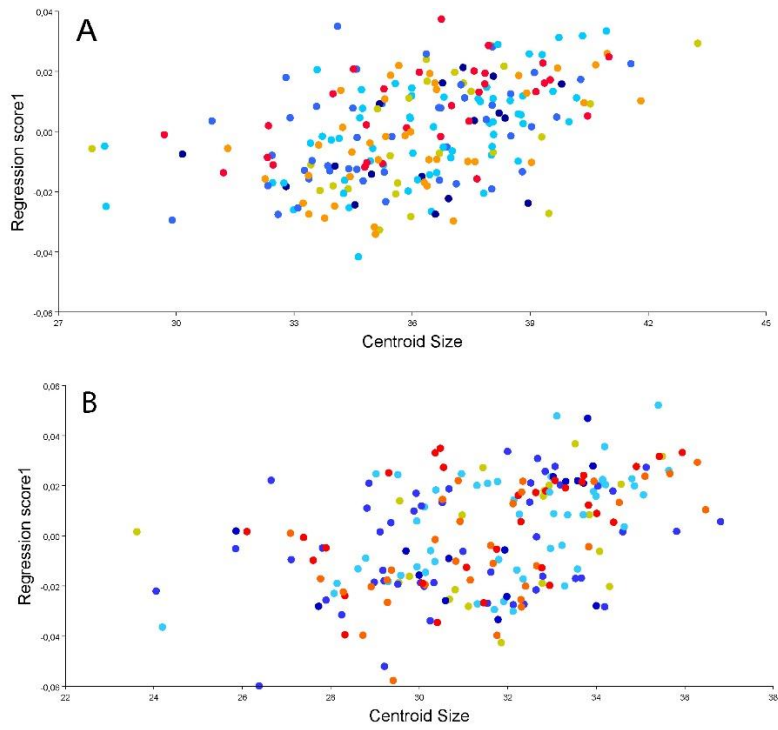


Figura 4: Regresión multivariada por criterio de altitud. A) alas anteriores, B) alas posteriores. Los colores de los puntos representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F).

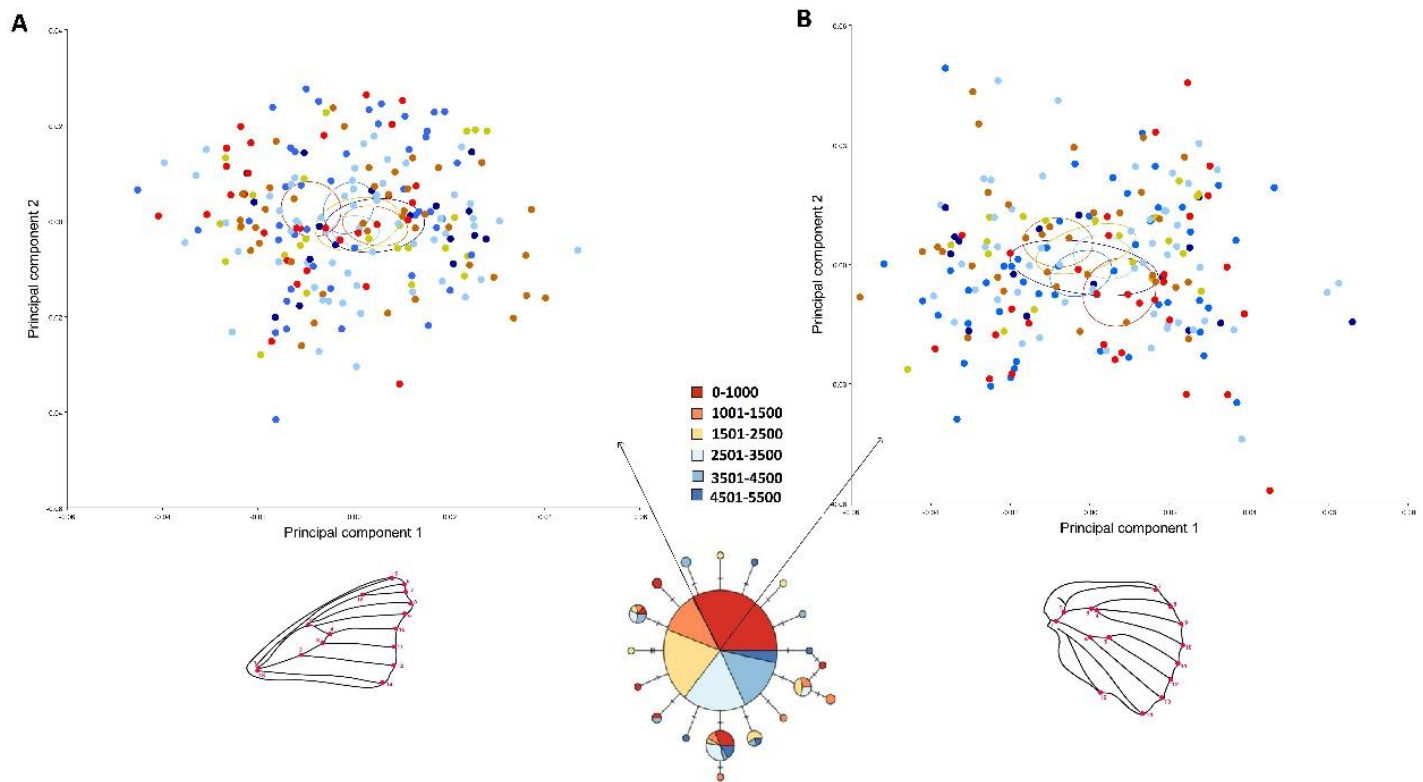


Figura 5: Análisis de componentes principales (PCA) para A) alas anterior y B) posterior acorde a los grupos altitudinales. Los colores de los puntos representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Tabla 1). La gráfica del medio corresponde a la red de haplotipos creada con el gen COI que muestra que no hay estructuración genética.

Se realizaron análisis de variables canónicas (CVA) para ambas alas para visualizar mejor las posibles diferencias entre grupos. El CVA para las alas anteriores (Fig. 6A) muestra una distribución de la forma donde el grupo A crea

un grupo por sí solo, pero es cercano al grupo B, esto es muy similar a lo que se observa en el CVA de las alas posteriores (Fig. 6B). En ambos CVA el resto de los grupos son parte de una misma configuración.

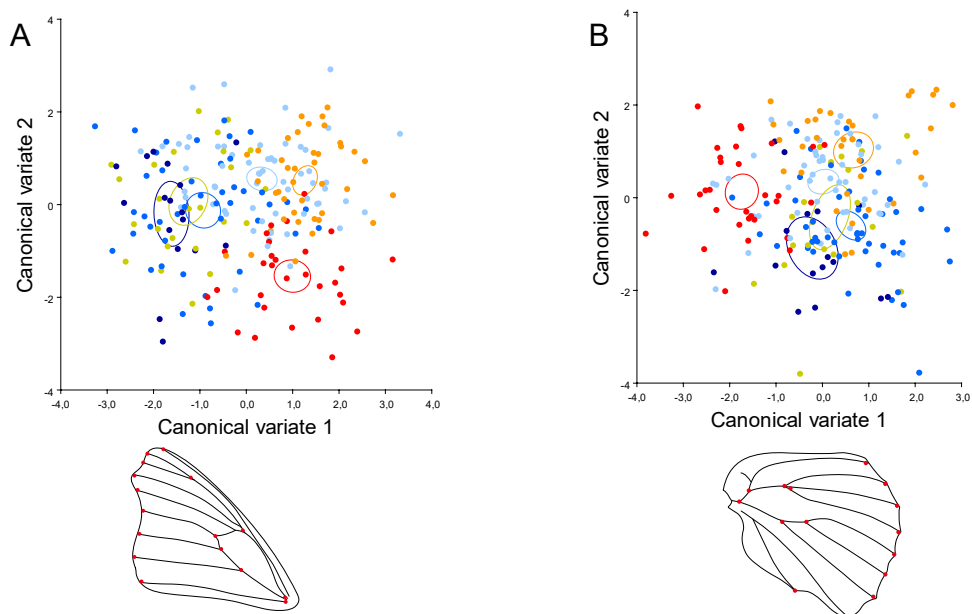


Figura 6: Análisis de variables canónicas (CVA) para alas A) anterior y B) posterior acorde a los grupos altitudinales. Los colores de los puntos representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F).

Para observar gráficamente la diferenciación de la forma del ala anterior se realizó un PCA con el promedio de la forma (Fig. 7) donde se aprecia que la

distribución de la forma asociada a zonas de mayor altitud tiene morfologías alares más similares con una configuración de *landmarks* con una tendencia a una forma globular a medida que aumenta la altitud. Aunque estos cambios sean sutiles se puede apreciar que entre más cercano al nivel del mar (costa; grupo A) el *landmark* 8 estira la forma resultando en una forma más alargada que involucra gran parte de los *landmarks*. Por el contrario, el *landmark* 16 pareciera ser el responsable de la tendencia a la forma globular. El PCA de la forma promedio para el ala posterior (Fig. 8) se observa que el grupo F tiene la forma promedio distinta al resto, mientras que los grupos C, D y E forman un grupo y los grupos A y B están separados, tanto entre sí como del resto de los grupos. En cuanto a las formas alares se observa que entre mayor altitud la configuración de la forma tiende a ser más englobada, aunque estos cambios son más sutiles que lo observado en las alas anteriores. El *landmark* 14 tiende a estirar la forma hacia abajo afectando la configuración de los *landmarks* y el *landmark* 7 tiene un efecto sobre la forma estirándola hacia arriba, pero en los grupos C y D el *landmark* 7 no tiene movimiento y el *landmark* 14 acorta levemente la forma. En el grupo E el *landmark* 15 es el que modifica la forma en vez del *landmark* 14. En el grupo F los *landmarks* 10, 11 y 12 forma una línea recta en comparación al resto de grupos en los que estos puntos forman una línea levemente curva.

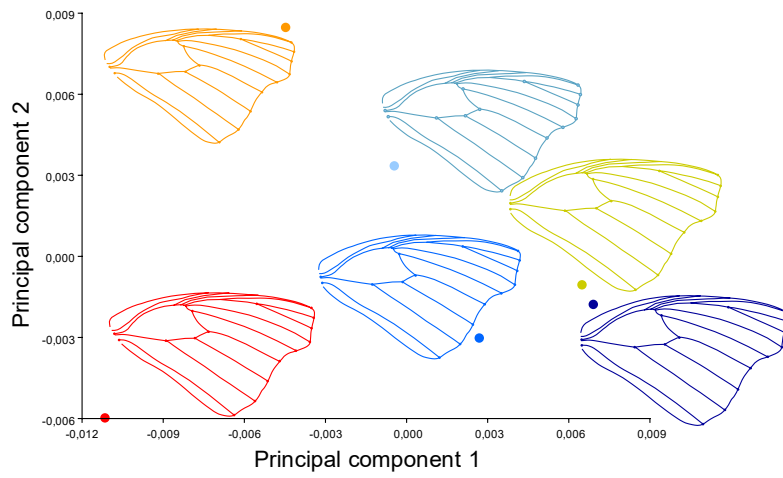


Figura 7: Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas anteriores acorde a grupo altitudinal. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F).

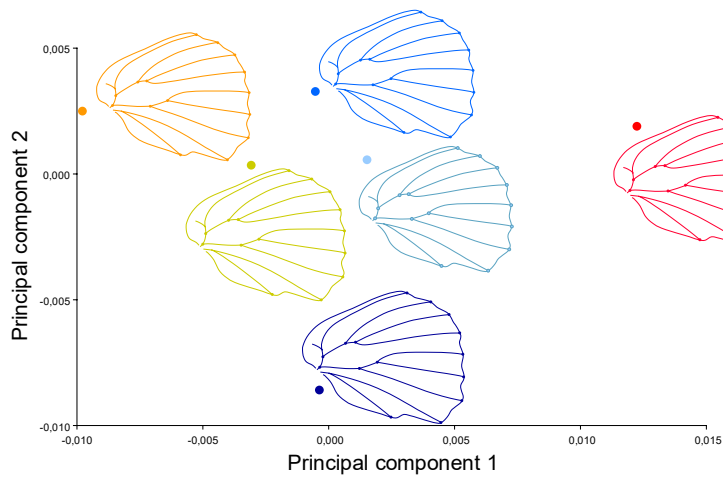


Figura 8: Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas posteriores acorde a grupo altitudinal. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Rojo: Grupo A; Naranja: Grupo B, Amarillo: Grupo C; Celeste Grupo D; Azul: Grupo E; Azul oscuro: Grupo F).

4.4 Variación por áreas geográficas

Al realizar PCA por áreas geográficas se observa una clara agrupación de los grupos morfológicos para las alas anteriores (Fig. 9A) como posteriores (Fig. 9B). A pesar que los *convex hulls* se superponen es posible observar la desigualdad morfológica entre los grupos de Planicie y de Altiplano para ambas alas. El grupo de Alta Montaña (color café en las figuras 9A y 9B) está agrupado junto a los otros dos grupos, pero con una forma independiente que podría sugerir diferentes habilidades para el vuelo a altitudes más altas.

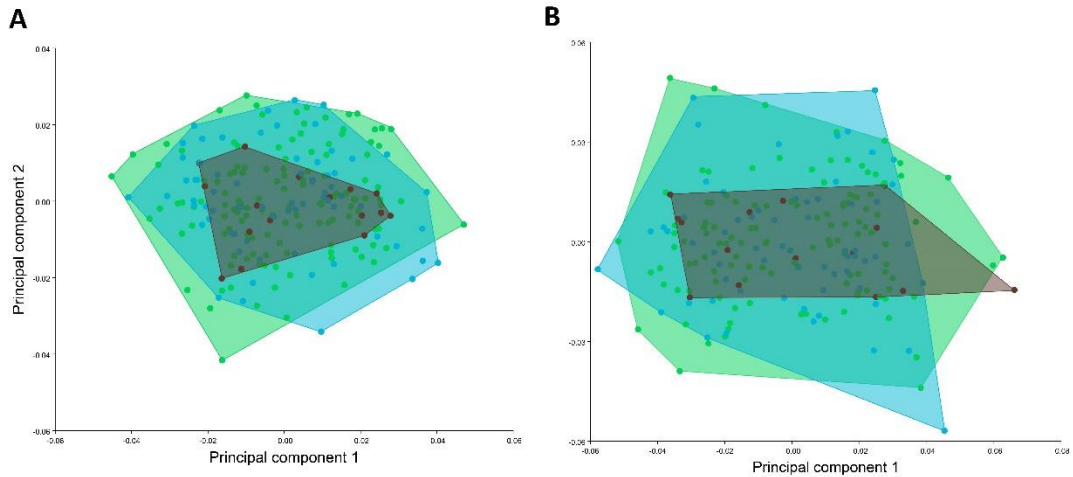


Figura 9: Análisis de componentes principales para A) ala anterior y B) ala posterior determinado por las áreas geográficas. El color de los puntos indica a que nivel geográfico corresponden (Tabla 1): Azul: Planicie (1500m); Verde: Altiplano (4535m); Café: Alta Montaña (5200m)

El CVA elaborado con el criterio geografía para el ala anterior (Fig.10A) muestra una agrupación clara entre el altiplano y la alta montaña. En cuanto al grupo Planicie se observa una separación con la alta montaña, pero unido con el altiplano. Esto se corresponde con la distribución de los grupos altitudinales donde el grupo Planicie corresponde a los grupos A y B y están separados de la alta montaña que contiene al grupo F, y tanto en el CVA por geografía y en el CVA por altitud estos grupos están separados. El CVA elaborado para las alas posteriores (Fig. 10B) muestra que el grupo Alta Montaña se mezcla con el grupo Altiplano y parte del grupo Planicie, mientras que los grupos Altiplano y Planicie

están mezclados, esta tendencia se observa en las alas anteriores, pero con mayor diferenciación en las nubes de puntos.

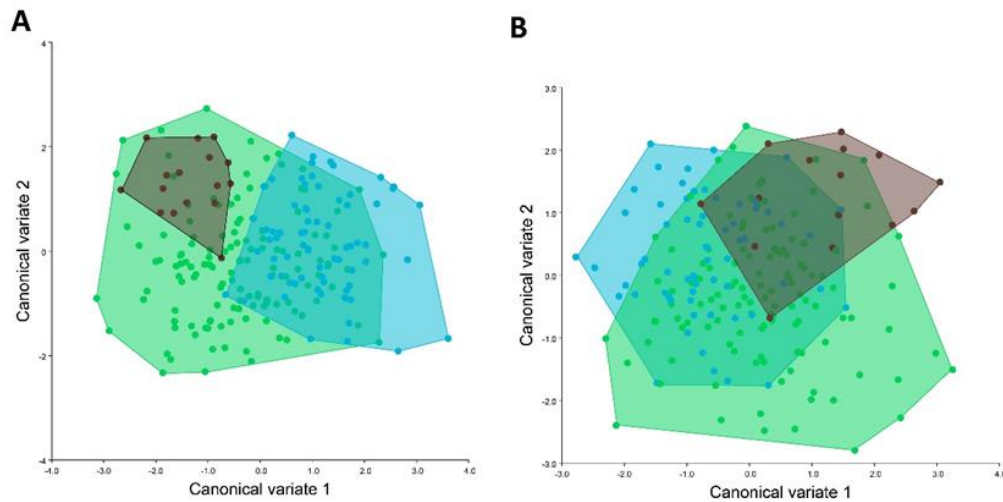


Figura 10: Análisis de variables canónicas para A) ala anterior y B) ala posterior determinado por las áreas geográficas. El color de los puntos indica a que nivel geográfico corresponden (Tabla 1): Azul: Planicie (1500m); Verde: Altiplano (4535m); Café: Alta Montaña (5200m)

Al igual que para los grupos de altitud, se realizaron PCA de la forma promedio acorde a las áreas geográficas para ambas alas. En el PCA de la forma promedio usando la clasificación geográfica del ala anterior (Fig. 11) se aprecia una diferenciación clara entre los grupos Planicie (grupos A y B), Altiplano (grupos C, D y E) y Alta Montaña (Grupo F) (Fig. 13A), esta diferencia coincide con los CVAs ya mencionados. Como se observa en la Fig. 13A la forma alar del grupo Planicie tiende a una forma más alargada y la forma correspondiente al grupo Alta

Montaña tiende a una configuración de *landmarks* más globular, al igual a lo observado con los grupos por altitud. El *landmark* 8 va alargando la forma mientras se acerca a la forma del grupo Planicie y el *landmark* 16 provoca la forma globular de Alta Montaña, además se puede apreciar un leve efecto del *landmark* 12 en la configuración de la forma alar. Mientras que, el PCA de la forma promedio para las alas posteriores (Fig. 12) muestra una agrupación entre la forma alar de los grupos Planicie y Altiplano, pero la forma promedio del grupo Alta Montaña tiene una distribución distinta en el PCA, esto coincide con la distribución de la forma en el PCA promedio por altitud donde los grupos A, B, C, D y E se podrían considerar un gran grupo separado del grupo F correspondiente a al grupo Alta Montaña. En la Fig. 13B se observa que el ala posterior es menos variable que el ala anterior. El *landmark* 7 tiende a estirar la forma hacia arriba e izquierda, mientras que el *landmark* 13 estira la abajo en forma del grupo Altiplano. Sin embargo, en la forma de Alta Montaña los *landmarks* 14 y 15 estiran la forma hacia arriba y a la derecha, siendo esta forma la más diferente, aunque es más sutil que lo observado en las alas anteriores, por lo que las alas posteriores son menos explicativas.

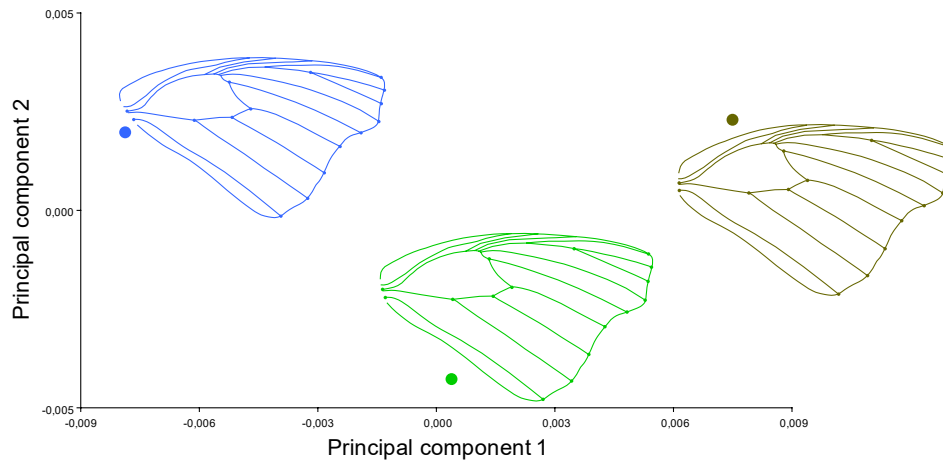


Figura 11: Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas anteriores acorde a grupo geográfico. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Azul: Grupo Planicie; Verde: Grupo Altiplano, Café: Grupo Alta Montaña).

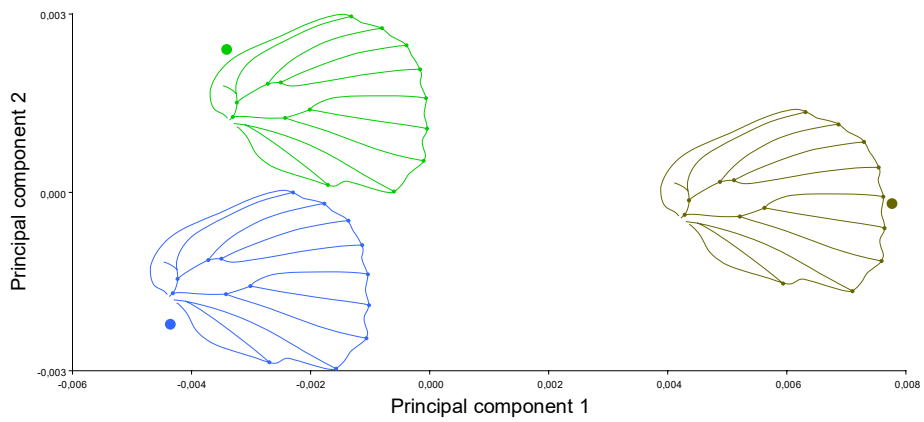


Figura 12: Análisis de componentes principales de la forma promedio de las alas posteriores acorde a grupo geográfico. Los colores representan el grupo altitudinal al cual corresponden (Azul: Grupo Planicie; Verde: Grupo Altiplano, Café: Grupo Alta Montaña).

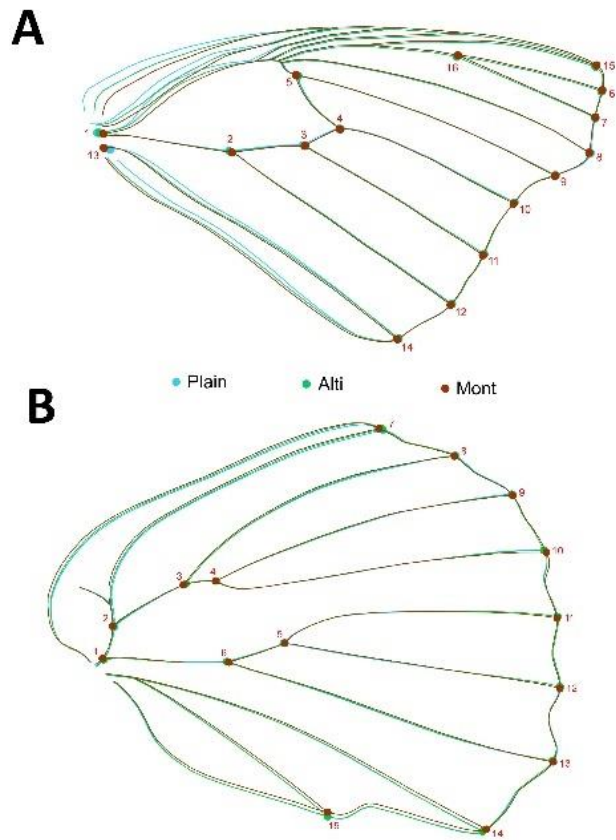


Figura 13: Forma alar promedio sobrepuestas para observar las diferencias en la forma por categoría geográfica del A) ala anterior y B) ala posterior (Plain: Grupo Planicie; Alti: Grupo Altiplano, Mont: Grupo Alta Montaña). Se observa que el ala anterior es muestra más diferencias que el ala posterior.

5 DISCUSIÓN

Habitar zonas geográficas con altitudes superiores a los 4000msnm es un reto para todo organismo, no obstante, algunas especies han evolucionado y adaptado a estas condiciones (Rojas et al., 2020; Scattolini et al., 2018). El Altiplano es un ecosistema de altura y se han documentado condiciones áridas, inviernos fríos, fuertes vientos, accesos limitados a fuentes de agua, alta radiación, disminución gradual en la disponibilidad de oxígeno en relación al gradiente altitudinal, entre otros factores abióticos (Gregory-Wodzicki, 2000; Strecker et al., 2007). Estos factores le conceden al Altiplano condiciones extremas que condicionan la diversidad biológica propia de esta área geográfica. Estudiar las adaptaciones a las condiciones extremas del Altiplano es fundamental para entender los patrones ecológicos y evolutivos que hay detrás del comportamiento migratorio de especies sometidas a estas condiciones durante su migración. Sin embargo, la información disponible es limitada en varias especies migratorias, en especial en insectos, además que su distribución espacio-temporal no siempre está documentada.

Esta tesis es la primera aproximación que incorpora la técnica de morfometría geométrica junto a herramientas genéticas para comprender la adaptación de la forma alar de *V. carye* en el Altiplano chileno, abarcando todo el rango altitudinal documentado para esta especie, desde el nivel de mar hasta los 5200 msnm

(Benítez et al., 2019) y entrega las primeras aproximaciones sobre si esta especie podría tener un comportamiento migratorio.

Los principales resultados morfométricos mostraron bajos niveles de diferenciación de la forma alar, aun así, se logró identificar diferencias sutiles asociados a los gradientes altitudinales de las localidades analizadas. Las alas anteriores fueron más sensibles a los cambios morfométricos en comparación a las alas posteriores (Fig. 13). La variación de la forma del ala anterior puede ser explicada debido a la mayor presión selectiva y adaptativa que estas alas deben enfrentar (Altizer & Davis, 2010; Flockhart et al., 2017; Owens et al., 2020). Los lepidópteros tienen vuelo anteromotorio (Le Roy et al., 2019), es decir, las alas anteriores generan la principal cantidad de fuerza para el vuelo (Bode-Oke & Dong, 2020) por esto son un rasgo considerado fundamental para el vuelo (Altizer & Davis, 2010; Flockhart et al., 2017; Taylor-Cox et al., 2020) y tienen interacción directa con el viento. Cabe mencionar que la morfología general de las alas es un carácter fijo dentro de una especie, pero que en ocasiones pueden verse modificadas en morfotipos cuando las condiciones lo permiten o existe estructuración poblacional con diferencias en el fenotipo con influencia en el *fitness* (Flockhart et al., 2017; Lyons et al., 2012; Wells et al., 2018).

En cuanto a las alas posteriores, estas tienen una función estabilizadora y son fundamentales al momento de planear (ej. búsqueda de sitios de ovoposición), además de brindar la maquinaria aerodinámica suficiente para ejercer maniobras

rápidas cuando sean requeridas, como para escapar de predadores (Le Roy et al., 2019). Cabe mencionar que la maculación alar de la cara ventral de las alas posteriores sirve de camuflaje al estar posadas en el género *Vanessa* (Abbasi & Marcus, 2015). Es de esperar entonces, que las alas anteriores y posteriores se vean sometidas a distintas presiones selectivas y posiblemente tengan historias evolutivas distintas (Le Roy et al., 2019) pero funcionan como una sola unidad al momento del vuelo (Bode-Oke & Dong, 2020; Le Roy et al., 2019).

Diferentes estudios han mostrado que las mariposas migratorias tienen alas anteriores más elongadas, como es el caso de la mariposa monarca, un rasgo que puede ser asociado con un bajo coste energético y baja carga alar (Le Roy et al., 2019). Alas más elongadas con alta relación de aspecto (relación entre largo y ancho de las alas) y mayor carga alar están asociadas a la capacidad de vuelos a largas distancias, tanto en aves como en insectos voladores (Altizer & Davis, 2010). Una alta carga alar ha sido asociado con mariposas con vuelos de largas distancias y especies migratorias, sin embargo, se suele utilizar solo el ala anterior para estas mediciones (Altizer & Davis, 2010; Flockhart et al., 2017), posiblemente porque se estima que la migración actúa como un episodio selectivo sobre las alas anteriores y no sobre las posteriores (Flockhart et al., 2017). Nuestros resultados muestran de forma indirecta un posible primer indicio que, tanto la alta carga alar y bajo coste energético podrían ser características observadas en *V. carye*, esto gracias a que el ala anterior es alargada con diferencias morfológicas sutiles que no cambian la forma de manera significativa,

lo que indicaría una forma alar conservada. Por otro lado, pequeñas modificaciones en las alas anteriores de *V. carye* podrían facilitar la migración y el patrón morfológico generalista con sus propias diferencias (pequeñas modificaciones) posiblemente podría ayudar a estos individuos a sobrellevar las condiciones extremas del altiplano sin afectar su eficiencia, en otras palabras, podrían favorecer el *fitness*. Al evaluar las relaciones alométricas en el tamaño (tamaño del centroide) y la forma del ala no mostraron estar relacionados entonces, esto podría sugerir que este carácter haya sido seleccionado y fijado en las poblaciones del altiplano de *V. carye*. Esta es una de las características de especies migratorias con una posible población panmíxica. Jantzen & Eisner, (2008) mencionan que las alas posteriores no son esenciales para el vuelo en Lepidoptera, lo que explicaría la baja variabilidad morfométrica encontrada para las poblaciones de *V. carye*.

Los resultados genéticos sugieren altos niveles de flujo génico entre las localidades de *V. carye* en su gradiente altitudinal sin estructuración filogeográfica, esto evidencia que el Altiplano y el Desierto de Atacama no actúan como barreras geográficas para esta especie lo cual podría contribuir como una evidencia de migración en el sujeto de estudio y se concuerda con los pequeños cambios morfométricos detectados con la herramienta de morfometría geométrica. Las modificaciones morfométricas sutiles evidenciadas gracias a la morfometría geométrica podrían validar la hipótesis de múltiples rutas migratorias, como es el caso de la mariposa monarca con diferentes rutas

migratorias y fenotipos alares asociados a estas rutas (Altizer & Davis, 2010; Flockhart et al., 2017), pero sin diferenciación genética (Lyons et al., 2012). Un alto flujo génico y sutiles modificaciones morfológicas han sido documentadas en especies migratorias como el ave *Phylloscopus trochilus* (Bensch et al., 1999) y el murciélago *Tadarida brasiliensis mexicana*, este último con 4 rutas migratorias y son diferenciación genética (Russell et al., 2005)

Dado que este estudio es la primera aproximación que evalúa la presencia de poblaciones altiplánicas de gran altura, el gen COI fue utilizado con la finalidad de evaluar una primera aproximación de la estructuración poblacional en las localidades estudiadas, no obstante, este gen tiene ciertas limitaciones al entregar resultados filogenéticos. El gen mitocondrial Citocromo oxidasa I, o COI, muestra diferenciación a grandes escalas, principalmente en la identificación de especies y diversidad genética (Arif & Khan, 2009), siendo este un marcador de bajo costo que es utilizado para determinar primeras aproximaciones en estudios genéticos poblacionales, no obstante, marcadores más robustos en algunos casos son necesarios de utilizar cuales tienen una mayor resolución y trabajan a escalas más finas (microsatélites y SNPs) (Aranguren-Méndez et al., 2005). En *Cyanistes teneriffae* (Clase Aves), la filogenia de las distintas poblaciones muestra un elevado soporte en los nodos entregados por los SNPs en comparación a la filogenia entregada por el gen COI, que entrega un bajo soporte (Gohli et al., 2015). Es importante destacar que los resultados genéticos obtenidos confirman los primeros indicios de una población panmíxica, no obstante, futuros estudios

con marcadores de alta resolución a una escala más fina podrían soportar mejor una hipótesis migratoria en *V. carye*.

A pesar de la falta de evidencia genética que de soporte a grupos diferenciados o poblaciones en *V. carye*, los análisis morfométricos fueron capaces de dilucidar diferencias entre los gradientes altitudinales A y B (Planicie) con formas alares elongadas, donde el grupo A tuvo un mayor valor de centroide que B. El grupo A corresponde al sector costero, donde alas más alargadas permitirían un mejor aprovechamiento de los vientos para un vuelo más eficiente (Landell-mills, 2021). Los patrones de la forma de las alas en el gradiente altitudinal obtenidos indican que tanto el ala anterior como posterior tienden a una configuración más globular de *landmarks* a altitudes altas donde los vientos son más fuertes, entre otras condiciones ambientales, este es un rasgo común en especies voladoras migratorias (Flockhart et al., 2017; Lockwood et al., 1998; Lyons et al., 2012). Finalmente, se observó que los especímenes encontrados en zonas de altitudes altas tienen márgenes alares menos pronunciados, lo cual podría prevenir un rápido deterioro de las alas a causa de los vientos fuertes. Márgenes más pronunciados podrían permitirles tomar ventaja de los vientos costeros y de baja altitud volviendo más eficiente la aerodinámica del vuelo. Existen varios estudios de aerodinámica en mariposas (Bode-Oke & Dong, 2020; Sane, 2003), no obstante, no se ha evaluado las diferencias en los márgenes alares de una misma especie.

El cómo las leyes aerodinámicas actúan sobre las alas y el vuelo de las mariposas es un tema interesante de abordar. Modificaciones sutiles en la forma alar y el efecto sobre el vuelo y *fitness* entre distintas poblaciones, como un morfotipo se comportaría en condiciones distintas a las originales en las cuales se desarrolló es un tópico interesante de investigar, considerando que las mariposas migratorias deben pasar por distintos ambientes, en ocasiones muy crudos como el desierto del Sahara en el caso de *V. cardui*.

Con los resultados de los CVA, podríamos considerar la posibilidad de la existencia de dos rutas migratorias en *C. carye*, una costera y otra del Altiplano, a pesar de sus alas conservadas. La ruta costera podría corresponder al grupo Planicie, donde los PCA diferencian los grupos A y B; y la ruta del Altiplano podría corresponder a localidades altas, es decir, los grupos C, D y E + el grupo de Alta Montaña (Grupo F). Los resultados concuerdan con lo observado en *Danaus plexippus*, la que presenta dos linajes y rutas con diferencias morfológicas en sus alas anteriores (Lyons et al., 2012).

En *V. atalanta* se ha sugerido que podría presentar dos tipos de migración: una latitudinal y otra altitudinal, pero esta última no ha sido evaluada (Mikkola, 2003). Los resultados morfológicos sugieren que *V. carye* podría tener migración latitudinal, pero no altitudinal. Estudios asociados con la distribución de *V. carye* (Benítez et al., 2019) señalan que esta especie puede volar sin problemas aparentes a los 5200 msnm (posiblemente hasta los 6000 msnm) sobrepasando

a *V. atalanta* que ha sido documentada hasta los 3000msnm. Estudios poblacionales a nivel genético y morfométrico han determinado que hay grupos de organismos los cuales, a pesar de su amplia distribución, tienen comportamientos migratorios como no migratorios, como es el caso de *Pantala flavescens*, una libélula con amplio rango de distribución de la familia Libellulidae (Alvial et al., 2019), o diferentes tipos de mariposas (Altizer & Davis, 2010; Chowdhury et al., 2021; Johnson, 1963). Esto abre la pregunta si *V. carye*, independiente de su amplio rango de distribución, tiene este tipo de comportamiento. Este estudio marca el primer precedente de una tendencia migratoria en *V. carye* para la zona altiplánica del norte de Chile, y entrega los primeros indicios de panmixía genética de una gran y amplia población de distribución altiplánica. La morfometría geométrica como herramienta rara vez ha sido utilizada para evaluar migración en insectos y este trabajo es el primero en cuantificar la forma alar de una posible especie migratoria. Por último, a nivel global en el género *Vanessa* especies migratorias no han registrado diferencias morfológicas o genéticas en sus distintas rutas migratorias, entonces *V. carye* podría ser la primera especie del género con resultados que podrían evidenciar dos rutas migratorias distintas. Futuros estudios que combinen aproximaciones genómicas y de isótopos estables más la amplitud del rango geográfico son requeridos para confirmar con certeza el comportamiento migratorio de la especie de mariposa del género *Vanessa* con la distribución más amplia de América del Sur.

5.1 Trabajos futuros y consideraciones finales

Para poder confirmar o desmentir que *V. carye* tiene un comportamiento migratorio es necesario realizar más investigaciones con distintas herramientas que se complementen entre sí. Cabe destacar que este trabajo solo se enfocó en la distribución de dos regiones socio-políticas del norte de Chile, sin embargo, es necesario realizar trabajos morfométricos y genéticos en toda su distribución, no solo en Chile. Aquí se evaluó si la diferencia altitudinal influye sobre la estructuración poblacional y morfometría de la forma alar. Como ya se mencionó, es necesario el uso de marcadores moleculares más finos y con mayor resolución para analizar una posible estructuración filogeográfica.

Los isotopos estables se han utilizado para analizar la migración en *V. cardui* (Stefanescu et al., 2016) y *V. atalanta* (Brattström et al., 2010, 2018), mostrando que es una buena herramienta para determinar distancia migratoria, por lo tanto, sería muy informativo utilizar esta técnica en conjunto con las anteriormente mencionadas en futuros estudios de *V. carye*. Durante la colecta para el estudio se observaron muchos individuos con desgaste mecánico en las alas, un desgaste muy parejo en los dos pares de alas que no podría ser resultado de un ataque o un accidente. Otro tópico interesante de analizar es el efecto de las variaciones de la forma alar en distintas magnitudes en la aerodinámica del vuelo de especies migratorias, además de evaluar cómo se comporta la carga alar en esta mariposa.

Un factor a considerar para próximos estudios es la dificultad de muestreo de la especie y el desconocimiento de periodos migratorios. Está documentado que para ciertas mariposas la abundancia observada en una misma época, pero en años distintos puede variar, como ocurre con *V. atalanta*. Mikkola (2003) registró años con mayor observación de individuos que otros años, incluso algunos años muy pobres en observación. Esto fue observado para *V. carye* en el periodo de colecta de mayo del 2022, donde solo se observaron en todas las localidades muestreadas un total de 9 mariposas en todo el periodo que duró la expedición lo que contrasta con el año 2021 en el mismo momento del año, donde en un solo punto y en un solo día se colectaron cerca de 30 ejemplares. Queda evidenciado que es importante registrar los avistamientos para tener una idea de cómo se comporta esta mariposa.

Otro punto a considerar que se intentó realizar en la expedición del 2022 fue estudiar parte de la fisiología de *V. carye*, lamentablemente no fue posible realizarlo por la falta de ejemplares disponibles en terreno. Los factores más importantes considerados al momento del estudio de organismos a altas altitudes es la temperatura y la disponibilidad de oxígeno (Javal et al., 2019; Karl et al., 2008; Karl & Fischer, 2009), variables de las que se puede tener registro fácilmente, sin embargo, las mediciones se deben hacer en campo donde estas variables no son controladas y pueden ir variando a cada momento, lo que dificulta aún más realizar este tipo de estudios sin antecedentes previos. Más aún

si consideramos que la temperatura tiene efectos sobre los procesos fisiológicos de los insectos (Javal et al., 2019; Karl & Fischer, 2009).

6 CONCLUSIONES

Este estudio es pionero en establecer aproximaciones para evaluar si *Vanessa carye* tiene comportamiento migratorio con herramientas genética-morfológicas. Se observaron variaciones sutiles en la forma de las alas en ejemplares de las diferentes localidades estudiadas en donde entre más cercano al nivel del mar, las mariposas tienen alas anteriores más alargadas, mientras que a mayor altitud tienden a ser más globosas. Estos morfotipos podrían concederle ciertas ventajas al momento del vuelo en distintas condiciones ambientales. Los resultados morfométricos permiten establecer dos rutas migratorias, una en la costa y otra altiplánica.

El análisis del gen COI estableció una sola gran población en el Altiplano y el Desierto de Atacama, en las 18 localidades presentes en el estudio. Se requieren más estudios genéticos con marcadores más finos para observar si existe una mejor estructuración.

Este estudio abre la puerta a nuevas investigaciones que complementen esta aproximación como estudios con isotopos estables, estudios fisiológicos, estudios genéticos con marcadores moleculares de mayor resolución y estudios que ayuden a entender la biología de esta carismática mariposa, que a pesar de ser muy común su historia natural es desconocida.

7 REFERENCIAS

- Abbasi, R., & Marcus, J. M. (2015). Color pattern evolution in *Vanessa* butterflies (Nymphalidae: Nymphalini): Non-eyespot characters. *Evolution and Development*, 17(1), 63–81. <https://doi.org/10.1111/ede.12109>
- Adams, D. C., & Rohlf, F. J. (2000). Ecological character displacement in *Plethodon*: Biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4106–4111. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.8.4106>
- Åkesson, S., Morin, J., Muheim, R., & Ottosson, U. (2001). Avian orientation at steep angles of inclination: Experiments with migratory white-crowned sparrows at the magnetic North Pole. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1479), 1907–1913. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1736>
- Åkesson, Susanne, & Hedenström, A. (2007). How migrants get there: Migratory performance and orientation. *BioScience*, 57(2), 123–133. <https://doi.org/10.1641/B570207>
- Alerstam, T., Hedenstro, A., & Susanne, A. (2003). Long-distance migration : evolution and determinants. *Oikos*, 103(2), 247–260.
- Altizer, S., Bartel, R., & Han, B. A. (2011). Animal migration and infectious disease risk. *Science*, 331(6015), 296–302. <https://doi.org/10.1126/science.1194694>
- Altizer, S., & Davis, A. K. (2010). Populations of monarch butterflies with different migratory behaviors show divergence in wing morphology. *Evolution*, 64(4), 1018–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00946.x>
- Altizer, S. M., Oberhauser, K. S., & Brower, L. P. (2000). Associations between host migration and the prevalence of a protozoan parasite in natural populations of adult monarch butterflies. *Ecological Entomology*, 25(2), 125–139. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2000.00246.x>
- Altmann, S. H., & Claros, S. (2015). Insect abundance and damage on the deciduous *Nothofagus macrocarpa* increase with altitude at a site in the Mediterranean climate zone of Chile. *Austral Entomology*, 54(4), 402–410. <https://doi.org/10.1111/aen.12142>
- Alvial, I. E., Vargas, H. A., Marinov, M., Esquivel, C., Araya, J., Araya-Donoso,

- R., Vila, I., & Véliz, D. (2019). Isolation on a remote island: genetic and morphological differentiation of a cosmopolitan odonate. *Heredity*, 122(6), 893–905. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0165-z>
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Arch. Latinoam. Prod. Anim. Recibido Octubre Aceptado: Diciembre*, 13(11), 30–42.
- Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32(1), 9–17. <https://doi.org/10.32800/abc.2009.32.0009>
- Arnqvist, G., & Mårtensson, T. (1998). Measurement error in geometric morphometrics: Empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. In *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* (Vol. 44, Issues 1–2, pp. 73–96).
- Bai, Y., Ma, L. Bin, Xu, S. Q., & Wang, G. H. (2015). A geometric morphometric study of the wing shapes of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) from the Qinling Mountains and adjacent regions: An environmental and distance-based consideration. *Florida Entomologist*, 98(1), 162–169. <https://doi.org/10.1653/024.098.0128>
- Bandelt, H.-J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Benítez, H. A., & Püschel, T. A. (2014). Modelando la varianza de la forma: Morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *International Journal of Morphology*, 32(3), 998–1008. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022014000300041>
- Benítez, H. A., Villalobos-Leiva, A., Ordenes, R., & Cruz-Jofré, F. (2019). Elevational record of *Vanessa carye* (Hübner 1812) (Lepidoptera Nymphalidae) in the northern Chilean Altiplano Highlands. *Nota Lepidopterologica*, 42(2), 157–162. <https://doi.org/10.3897/nl.42.38549>
- Bensch, S., Andersson, T., & Akesson, S. (1999). Morphological and molecular variation across a migratory divide in willow warblers, *Phylloscopus trochilus*. 53(6), 1925–1935.
- Bode-Oke, A. T., & Dong, H. (2020). The reverse flight of a monarch butterfly (*Danaus plexippus*) is characterized by a weight-supporting upstroke and postural changes. *Journal of the Royal Society Interface*, 17(167).

<https://doi.org/10.1098/rsif.2020.0268>

- Brattström, O., Bensch, S., Wassenaar, L. I., Hobson, K. A., & Åkesson, S. (2010). Understanding the migration ecology of European red admirals *Vanessa atalanta* using stable hydrogen isotopes. *Ecography*, 33(4), 720–729. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2009.05748.x>
- Brattström, O., Shapoval, A., Wassenaar, L. I., Hobson, K. A., & Åkesson, S. (2018). Geographic origin and migration phenology of European red admirals (*Vanessa atalanta*) as revealed by stable isotopes. *Movement Ecology*, 6(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40462-018-0143-3>
- Chapman, J. W., Bell, J. R., Burgin, L. E., Reynolds, D. R., Pettersson, L. B., Hill, J. K., Bonsall, M. B., & Thomas, J. A. (2012). Seasonal migration to high latitudes results in major reproductive benefits in an insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(37), 14924–14929. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207255109>
- Chapman, J. W., Nesbit, R. L., Burgin, L. E., Reynolds, D. R., Smith, A. D., Middleton, D. R., & Hill, J. K. (2010). Flight orientation behaviors promote optimal migration trajectories in high-flying insects. *Science*, 327, 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.1182990>
- Chapman, J. W., Reynolds, D. R., & Wilson, K. (2015). Long-range seasonal migration in insects : mechanisms , evolutionary drivers and ecological consequences. *Ecology Letters*, 18, 287–302. <https://doi.org/10.1111/ele.12407>
- Chowdhury, S., Fuller, R. A., Dingle, H., Chapman, J. W., & Zalucki, M. P. (2021). Migration in butterflies: a global overview. *Biological Reviews*, 61. <https://doi.org/10.1111/brv.12714>
- Correa, C., Pastenes, L., Sallaberry, M., Veloso, A., & Méndez, M. A. (2010). Phylogeography of *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) in northern Chile. *Amphibia Reptilia*, 31(1), 85–96. <https://doi.org/10.1163/156853810790457939>
- Cruz-Jofré, F., Morales, P., Vila, I., Esquer-Garrigos, Y., Hugueny, B., Gaubert, P., Poulin, E., & Méndez, M. A. (2016). Geographical isolation and genetic differentiation: The case of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), an Andean killifish inhabiting a highland salt pan. *Biological Journal of the Linnean Society*, 117(4), 747–759. <https://doi.org/10.1111/bij.12704>
- Dingle, H., & Drake, V. A. (2007). What Is Migration ? *BioScience*, 57(2), 113–121.
- Eduardo Palma, R., Marquet, P. A., & Boric-Bargetto, D. (2005). Inter- and

- intraspecific phylogeography of small mammals in the Atacama Desert and adjacent areas of northern Chile. *Journal of Biogeography*, 32(11), 1931–1941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01349.x>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Flockhart, D. T. T., Fitz-gerald, B., Brower, L. P., Derbyshire, R., Altizer, S., Hobson, K. A., Wassenaar, L. I., & Norris, D. R. (2017). Migration distance as a selective episode for wing morphology in a migratory insect. *Movement Ecology*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40462-017-0098-9>
- Fruciano, C. (2016). Measurement error in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution*, 226(3), 139–158. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0537-4>
- Gallardo, C., Hernández, H. J., Diniz-filho, J. A. F., Palma, R. E., & Méndez, M. A. (2011). Relationship between the genetic structure of the Andean toad *Rhinella spinulosa* (Anura : Bufonidae) and the northern Chile landscape (21 ° - 24 ° S). *Revista Chilena de Historia Natural*, 84, 391–406.
- García-Robledo, C., Kuprewicz, E. K., Baer, C. S., Clifton, E., Hernández, G. G., & Wagner, D. L. (2020). The Erwin equation of biodiversity: From little steps to quantum leaps in the discovery of tropical insect diversity. *Biotropica*, 52(4), 590–597. <https://doi.org/10.1111/btp.12811>
- Garzione, C. N., McQuarrie, N., Perez, N. D., Ehlers, T. A., Beck, S. L., Kar, N., Eichelberger, N., Chapman, A. D., Ward, K. M., Ducea, M. N., Lease, R. O., Poulsen, C. J., Wagner, L. S., Saylor, J. E., Zandt, G., & Horton, B. K. (2017). Tectonic Evolution of the Central Andean Plateau and Implications for the Growth of Plateaus. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 45(June), 529–559. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-063016-020612>
- Gohli, J., Leder, E. H., Garcia-Del-Rey, E., Johannessen, L. E., Johnsen, A., Laskemoen, T., Popp, M., & Lifjeld, J. T. (2015). The evolutionary history of Afrocanarian blue tits inferred from genomewide SNPs. *Molecular Ecology*, 24(1), 180–191. <https://doi.org/10.1111/mec.13008>
- Gregory-Wodzicki, K. M. (2000). Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Bulletin of the Geological Society of America*, 112(7), 1091–1105. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(2000\)112<1091:UHOTCA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(2000)112<1091:UHOTCA>2.0.CO;2)
- Guerra, P. A., Gegear, R. J., & Reppert, S. M. (2014). A magnetic compass aids

- monarch butterfly migration. *Nature Communications*, 5, 1–8.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5164>
- Gullan, P. J., & Cranston, P. S. (2015). *The Insects an Outline of Entomology* (Fifth). Wiley Blackwell.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hodkinson, I. D. (2005). Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 80(3), 489–513.
<https://doi.org/10.1017/S1464793105006767>
- Huang, S. T., Wang, H. R., Yang, W. Q., Si, Y. C., Wang, Y. T., Sun, M. L., Qi, X., & Bai, Y. (2020). Phylogeny of Libellulidae (Odonata: Anisoptera): Comparison of molecular and morphology-based phylogenies based on wing morphology and migration. *PeerJ*, 1–22.
<https://doi.org/10.7717/peerj.8567>
- Jantzen, B., & Eisner, T. (2008). Hindwings are unnecessary for flight but essential for execution of normal evasive flight in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), 16636–16640. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807223105>
- Javal, M., Thomas, S., Lehmann, P., Barton, M. G., Conlong, D. E., Du Plessis, A., & Terblanche, J. S. (2019). The Effect of Oxygen Limitation on a Xylophagous Insect's Heat Tolerance Is Influenced by Life-Stage Through Variation in Aerobic Scope and Respiratory Anatomy. *Frontiers in Physiology*, 10(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01426>
- Johansson, F., Söderquist, M., & Bokma, F. (2009). Insect wing shape evolution: Independent effects of migratory and mate guarding flight on dragonfly wings. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(2), 362–372.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2009.01211.x>
- Johnson, C. G. (1963). Physiological factors in insect migration by flight. *Nature*, 198, 423–427. <https://doi.org/10.1038/198423a0>
- Jowett, T. (1986). Preparation of nucleic acids. In D. B. Roberts (Ed.), *Drosophila: A Practical Approach* (p. 1986). IRL Press, Oxford.
- Karl, I., & Fischer, K. (2009). Altitudinal and environmental variation in lifespan in the Copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Functional Ecology*, 23(6), 1132–1138.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01607.x>
- Karl, I., Janowitz, S. A., & Fischer, K. (2008). Altitudinal life-history variation and

- thermal adaptation in the copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Oikos*, 117(5), 778–788. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2008.16522.x>
- Kendall, D. G. (1977). The Diffusion of Shape. *Buffon Bicentenary Symposium*, 3, 428–430.
- Klingenberg, C. P. (2010). Evolution and development of shape: Integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 623–635. <https://doi.org/10.1038/nrg2829>
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: An integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
- Klingenberg, C. P. (2015). Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: Concepts, methods, and applications. *Symmetry*, 7(2), 843–934. <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
- Landell-mills, N. (2021). *How insects fly according to Newtonian physics , including bees and butterflies*. December. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.13994.98247>
- Le Roy, C., Debat, V., & Llaurens, V. (2019). Adaptive evolution of butterfly wing shape: from morphology to behaviour. *Biological Reviews*, 94(4), 1261–1281. <https://doi.org/10.1111/brv.12500>
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lockwood, R., Swaddle, J. P., & Rayner, J. M. V. (1998). Avian wingtip shape reconsidered: wingtip shape indices and morphological adaptations to migration. 29(3), 273–292.
- Lyons, J. I., Pierce, A. A., Barribeau, S. M., Sternberg, E. D., Mongue, A. J., & De Roode, J. C. (2012). Lack of genetic differentiation between monarch butterflies with divergent migration destinations. *Molecular Ecology*, 21(14), 3433–3444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05613.x>
- McNeil, J. N. (2011). Studying the cost of migration: A comparison of *Pseudaletia unipuncta* populations from Canada and the Azores. *Açoreana*, 7, 125–137
- Mikkola, K. (2003). Red Admirals *Vanessa atalanta* (Lepidoptera: Nymphalidae) select northern winds on southward migration. *Entomologica Fennica*,

14(1), 15–24. <https://doi.org/10.33338/ef.84168>

- Muheim, R., Åkesson, S., & T., A. (2003). Compass orientation and possible migration routes of passerine birds at high arctic latitudes. *Oikos*, 103(2), 341–349.
- Muñoz-Valencia, V., Vélez-Martínez, G. A., Montoya-Lerma, J., & Díaz, F. (2022). Role of the Andean uplift as an asymmetrical barrier to gene flow in the neotropical leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Biotropica*, 54(1), 191–204. <https://doi.org/10.1111/btp.13050>
- Nesbit, R. L., Hill, J. K., Woiwod, I. P., Sivell, D., Bensusan, K. J., & Chapman, J. W. (2009). Seasonally adaptive migratory headings mediated by a sun compass in the painted lady butterfly, *Vanessa cardui*. *Animal Behaviour*, 78(5), 1119–1125. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.07.039>
- Neto, J. M., Gordinho, L., Belda, E. J., Marín, M., Monrós, J. S., Fearon, P., & Crates, R. (2013). Phenotypic Divergence among West European Populations of Reed Bunting *Emberiza schoeniclus*: The Effects of Migratory and Foraging Behaviours. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063248>
- Outomuro, D., & Johansson, F. (2019). Wing morphology and migration status, but not body size, habitat or Rapoport's rule predict range size in North-American dragonflies (Odonata: Libellulidae). *Ecography*, 42(2), 309–320. <https://doi.org/10.1111/ecog.03757>
- Owens, H. L., Lewis, D. S., Condamine, F. L., Kawahara, A. Y., & Guralnick, R. P. (2020). Comparative Phylogenetics of Papilio Butterfly Wing Shape and Size Demonstrates Independent Hindwing and Forewing Evolution. *Systematic Biology*, 69(5), 813–819. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syaa029>
- Padró, J., Lambertucci, S. A., Perrig, P. L., & Pauli, J. N. (2018). Evidence of genetic structure in a wide-ranging and highly mobile soaring scavenger, the Andean condor. *Diversity and Distributions*, 24(11), 1534–1544. <https://doi.org/10.1111/ddi.12786>
- Rivera, D. S., Vianna, J. A., Ebensperger, L. A., & Eduardo Palma, R. (2016). Phylogeography and demographic history of the Andean degu, *Octodontomys gliroides* (Rodentia: Octodontidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 178(2), 410–430. <https://doi.org/10.1111/zoj.12412>
- Rohlf, F. J., & Slice, D. (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39(1), 40–59. <https://doi.org/10.2307/2992207>
- Rojas, P., Scott, S., Tobar, I., Romero, Ú., & Vila, I. (2020). Head morphometry of *Orestias* (Cyprinodontiformes). Response to extreme Southern Altiplano

- systems? *Environmental Biology of Fishes*, 103(8), 953–964.
<https://doi.org/10.1007/s10641-020-00997-2>
- Russell, A. L., Medellín, R. A., & McCracken, G. F. (2005). Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology*, 14(7), 2207–2222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02552.x>
- Sane, S. P. (2003). The aerodynamics of insect flight. *Journal of Experimental Biology*, 206(23), 4191–4208. <https://doi.org/10.1242/jeb.00663>
- Sanzana, M. J., Parra, L. E., Sepúlveda-Zúñiga, E., & Benítez, H. A. (2013). Latitudinal gradient effect on the wing geometry of *Auca coctei* (Guérin) (Lepidoptera, Nymphalidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 57(4), 411–416. <https://doi.org/10.1590/S0085-56262013005000045>
- Saphiro, A., & Geiger, H. (1989). Electrophoretic comparisons of vicariant *Vanessa*: Genetic differentiation between *V. anabella* and *V. carye* (Nymphalidae) since the great american interchange. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 43(2), 81–92.
- Scattolini, M. C., Confalonieri, V., Lira-Noriega, A., Pietrokovsky, S., & Cigliano, M. M. (2018). Diversification mechanisms in the Andean grasshopper genus *Orotettix* (Orthoptera: Acrididae): Ecological niches and evolutionary history. *Biological Journal of the Linnean Society*, 123(4), 697–711. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly008>
- Shields, O. (1992). World distribution of the *Vanessa cardui* group (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, 46(3), 235–238.
- Spotorno, A. E., Walker, L. I., Flores, S. V., Yevenes, M., Marín, J. C., & Zuleta, C. (2001). Evolución de los filotinos (Rodentia, Muridae) en los Andes del Sur. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74(1), 151–166. <https://doi.org/10.4067/s0716-078x2001000000019>
- Srygley, R. B., & Dudley, R. (2008). Optimal strategies for insects migrating in the flight boundary layer: Mechanisms and consequences. *Integrative and Comparative Biology*, 48(1), 119–133. <https://doi.org/10.1093/icb/icn011>
- Stefanescu, C., Páramo, F., Åkesson, S., Alarcón, M., Ávila, A., Brereton, T., Carnicer, J., Cassar, L. F., Fox, R., Heliölä, J., Hill, J. K., Hirneisen, N., Kjellén, N., Kühn, E., Kuussaari, M., Leskinen, M., Liechti, F., Musche, M., Regan, E. C., ... Chapman, J. W. (2013). Multi-generational long-distance migration of insects: Studying the painted lady butterfly in the Western Palaearctic. *Ecography*, 36(4), 474–486. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07738.x>
- Stefanescu, C., Soto, D. X., Talavera, G., Vila, R., & Hobson, K. A. (2016).

- Long-distance autumn migration across the Sahara by painted lady butterflies : exploiting resource pulses in the tropical savannah. *Biology Letters*, 12(20160561.).
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2016.0561>
- Stefanescu, C., Ubach, A., & Wiklund, C. (2021). Timing of mating, reproductive status and resource availability in relation to migration in the painted lady butterfly. *Animal Behaviour*, 172, 145–153.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.12.013>
- Stork, N. E. (2018). How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? *Annual Review of Entomology*, 63, 31–45.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043348>
- Strecker, M. R., Alonso, R. N., Bookhagen, B., Carrapa, B., Hilley, G. E., Sobel, E. R., & Trauth, M. H. (2007). Tectonics and climate of the southern central Andes. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 35, 747–787.
<https://doi.org/10.1146/annurev.earth.35.031306.140158>
- Suárez-Tovar, C. M., & Sarmiento, C. E. (2016). Beyond the wing planform: Morphological differentiation between migratory and nonmigratory dragonfly species. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(4), 690–703.
<https://doi.org/10.1111/jeb.12830>
- Suchan, T., Talavera, G., & Sáez, L. (2019). Pollen metabarcoding as a tool for tracking long - distance insect migrations. *Molecular Ecology Resources*, 19(July 2018), 149–162. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12948>
- Talavera, G., & Vila, R. (2017). Discovery of mass migration and breeding of the painted lady butterfly *Vanessa cardui* in the Sub-Sahara : the Europe – Africa migration revisited. *Biological Journal of the Linnean Society*, 120(2), 274–285. <https://doi.org/10.1111/bij.12873>
- Taylor-Cox, E. D., Macgregor, C. J., Corthine, A., Hill, J. K., Hodgson, J. A., & Saccheri, I. J. (2020). Wing morphological responses to latitude and colonisation in a range expanding butterfly. *PeerJ*, 8.
<https://doi.org/10.7717/peerj.10352>
- Thomas, A. L. R., Taylor, G. K., Srygley, R. B., Nudds, R. L., & Bomphrey, R. J. (2004). Dragonfly flight: Free-flight and tethered flow visualizations reveal a diverse array of unsteady lift-generating mechanisms, controlled primarily via angle of attack. *Journal of Experimental Biology*, 207(24), 4299–4323.
<https://doi.org/10.1242/jeb.01262>
- Toro-Ibacache, M. V., Soto, G. M., & Galdames, I. S. (2010). Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: De la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology*,

28(4), 977–990.

- Trumbull, R. B., Riller, U., Oncken, O., Scheuber, E., Munier, K., & Hongn, F. (2006). The Time-Space Distribution of Cenozoic Volcanism in the South-Central Andes: a New Data Compilation and Some Tectonic Implications. *The Andes*, 29–43. https://doi.org/10.1007/978-3-540-48684-8_2
- Vargas, H. A. (2013). First record of *Vanessa braziliensis* (Moore) (Lepidoptera: Nymphalidae) in Chile. *Gayana*, 77(2), 171–173. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382013000200009>
- Victoriano, P. F., Muñoz-Mendoza, C., Muñoz-Ramírez, C., Fibla, P., Méndez, M. A., Sáez, P. A., Salinas, H. F., & Sallaberry, M. (2015). Evolution and Conservation on Top of the World: Phylogeography of the Marbled Water Frog (*Telmatobius marmoratus* Species Complex; Anura, Telmatobiidae) in Protected Areas of Chile. *Journal of Heredity*, 106(S1), 546–559. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv039>
- Vila, I., Morales, P., Scott, S., Poulin, E., Véliz, D., Harrod, C., & Méndez, M. A. (2013). Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: The relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *Journal of Fish Biology*, 82(3), 927–943. <https://doi.org/10.1111/jfb.12031>
- Vila, T. (2010). Geología de los depósitos salinos andinos, Provincia de Antofagasta, Chile. *Revista Geológica de Chile*, 0(2).
- Villalobos-Leiva, A., & Benítez, H. A. (2020). Geometric morphometric and its new applications in ecology and evolutionary biology. Part 2. *International Journal of Morphology*, 38(6), 1818–1836. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022020000601818>
- Wahlberg, N., & Rubinoff, D. (2011). Vagility across *Vanessa* (Lepidoptera: Nymphalidae): mobility in butterfly species does not inhibit the formation and persistence of isolated sister taxa. *Systematic Entomology*, 36, 362–370.
- Wang, X., & Clarke, J. A. (2015). The evolution of avian wing shape and previously unrecognized trends in covert feathering. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1816). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1935>
- Weber, T. P., & Hedenström, A. (2001). Long-distance migrants as a model system of structural and physiological plasticity. *Evolutionary Ecology Research*, 3(3), 255–271.
- Wells, C., Munn, A., & Woodworth, C. (2018). Geomorphic Morphometric Differences between Populations of *Speyeria diana* (Lepidoptera:

Nymphalidae). *Florida Entomologist*, 101(2), 195–202.
<https://doi.org/10.1653/024.101.0207>

Zhang, Z.-Q. (2011). Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. In *Zootaxa* (Vol. 3148).
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.3148.1.10>

Zúñiga-Reinoso, A., Ritter, B., & Predel, R. (2020). The colonization of the Puna and Atacama Biogeographic Province by sister clades of *Psectrascelis* (Coleoptera: Tenebrionidae): Synchronous expansion without spatial overlap. *Journal of Biogeography*, December 2020, 1–11.
<https://doi.org/10.1111/jbi.14123>

ANEXOS

A lo largo de la elaboración de la presente tesis se publicó un artículo con tema afín a la temática de adaptaciones altitudinales y la cuantificación de la variabilidad geométrica e la forma corporal de un escarabajo ruso (Anexo 1). También se presenta en el segundo anexo la actual investigación en formato de publicación científica de la revista Zoologischer Anzeiger donde fue enviada.

Anexo I: Publicación: Quantifying elevational effect on the geometric body shape of Russian beetle *Carabus exaratus* (Coleoptera: Carabidae)

JCZ: Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology 302 (2023) 30–36



Contents lists available at ScienceDirect

Zoologischer Anzeiger

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcz



Research paper

Quantifying elevational effect on the geometric body shape of Russian beetle *Carabus exaratus* (Coleoptera: Carabidae)

Hugo A. Benítez^{a,b,*}, Raisa A. Sukhodolskaya^c, Tamara A. Avtaeva^d, Scott Escobar-Suárez^{a,e}, Rodrigo Órdenes-Clavería^e, David Laroze^e, Raquel Hernández-P^g, Dmitriy N. Vavilov^a

^a Laboratorio de Ecología y Morfometría Evolutiva, Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Maule, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile

^b Instituto Milenio Biodiversidad de Ecosistemas Antárticos y Subantárticos (BASE), Las Palmeras 3425, Santiago, Chile

^c Research Institute for Problems of Ecology and Mineral Wealth Use of Tatarstan Academy of Sciences, Kazan, Tatarstan, 420000, Russia

^d Chechen State Pedagogical University, Grozny, Chechen Republic, 364014, Russia

^e Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Casilla 70, Arica, 1000000, Chile

^f Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

^g Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Carabus exaratus
Altitudinal cline
Geometric morphometrics
Morphology
Centroid size

ABSTRACT

The study of phenotypic changes in organisms at different organizational levels (population, community, and ecosystem) in combination with genetic and genomic tools have helped researchers to understand how micro-evolutionary processes may lead to adaptation. Insects have been used in many studies as change bioindicators in the ecosystem and they have been the focus of many genetic, ecological and morphological studies. In the following research, we studied how an endemic beetle species *Carabus exaratus* Quensel, modified its phenotype in response to the altitudinal clines in the Russian North Caucasus. Altitude plays an important role in the size and shape of many species. Shape changes were studied across three altitudinal gradients from 90 to 1018 m.a.s.l using geometric morphometric tools in order to identify if there are specialized phenotypes to altitude. Our results showed a principal relationship between centroid size and altitude where specimens from higher mountains were bigger than the other two groups, also an independent body shape was noted between the three populations where organisms of the mountain had a bigger and convex shape in comparison with smaller and oval shape from the foothill and plain. These results were analyzed using geometric morphometrics for the first time on endemic beetles from the Russian North Caucasus, helping us to understand morphological changes. They suggest that these changes may depend on climatic conditions at high altitudes, where univoltine and bivoltine reproductive behaviors were noticed, implying larger and shorter breeds which are directly reflected on morphological changes. More studies are needed to identify the ontogenetic pattern that affects the body shape in these environments.

1. Introduction

Characterizing the pattern of adaptation to altitude and understanding its process has been a practice to infer the relationship between climate and species adaptation (Leung et al., 2021). The adaptation of organisms to the altitudinal gradient has been studied principally to understand their biological characteristics as a response to climate and other factors affecting species distribution (Colares et al., 2021; Demirel et al., 2012; Malhi et al., 2010). As the elevation increase, climatic condition as temperature, oxygen, precipitation, wind velocity between

other change according to altitude. Normally, higher variabilities of these factors could decrease the ability of organisms to survive and keep their fitness active, limiting abiotic environment (Hodkinson, 2005). Climate conditions, induce changes in the organism phenotype like body size or limb development that may increase fitness, and consequently organisms show the ability to adjust their phenotype to cope with existing local conditions (Bai et al., 2015; Espeland, 2013; Maveety and Browne, 2014). In mountainous landscapes, organism life traits, such as development time, fecundity, mating success, depend on multiple factors, especially in insects, where these traits may be affected by the

* Corresponding author. Laboratorio de Ecología y Morfometría Evolutiva, Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Maule, Universidad Católica del Maule, Talca, Chile.

E-mail address: hbenitez@ucm.cl (H.A. Benítez).

<https://doi.org/10.1016/j.jcz.2022.11.005>

Received 18 June 2022; Received in revised form 18 October 2022; Accepted 6 November 2022

Available online 10 November 2022

0044-5231/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.

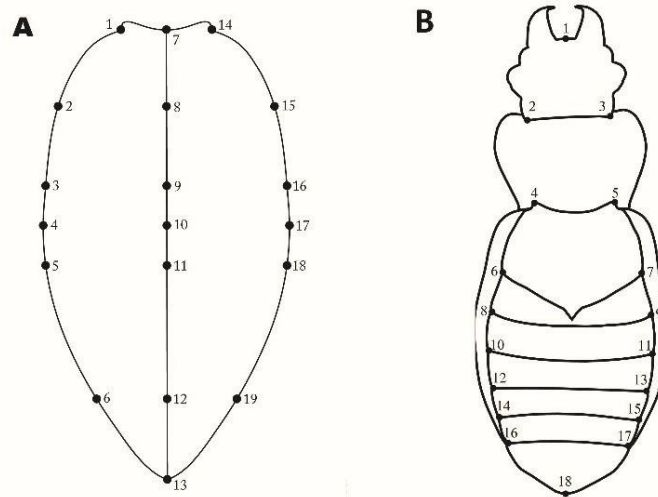


Fig. 1. Representation of dorsal and ventral landmarks of *Carabus exaratus*. A: dorsal (elytral) view with 19 landmarks, B: ventral view with 18 landmarks.

clines (Demirci et al., 2012). Studying the phenotype adaptation at population levels helps to understand the microevolutionary processes leading to adaptation (Arnold et al., 2001). Body size is one of the most significant traits in organisms, since it completely relates to fitness and has been studied in relation with altitudinal gradients, where the results showed some positive allometry as a fitness trait (Alibert et al., 2001; Cox et al., 2003; Klingenberg and Zimmermann, 1992; Luzyanin et al., 2022). The increase in size can rely on voltinism character shifts when insects prolong their maturation for several years (Chown and Gaston, 2010; Zeuss et al., 2017), but the decrease in size is often related to resource limitation restricting potential growth (Brehm et al., 2019). Diverse phenotypes and their phenologies lead to different responses to adverse environmental factors (Bhusal et al., 2020; Forrest, 2016; Gutiérrez and Wilson, 2021). High altitude insects have a suite of adaptations which allows them to inhabit places with harsh conditions like mountaintops, to survive in these habitats, many species have to tolerate freezing temperatures during the night and be able to avoid desiccation during daytime (Somme and Zachariassen, 1981), also has been found that for *Cicindela togata* which can depress their metabolism and switch to anaerobic metabolic pathways for energy metabolism in presence of hypoxia (Hoback et al., 2000; Hoback and Stanley, 2001). For other groups of beetles studies are limited, Stanbrook et al. (2021) studied for dung beetles (*Onthophagus proteus*) a presence of typical morphometric characteristics like flattening and increase in the body size, associated with an increase in the convexity of the elytra also depending the altitudinal range which horn length are density dependent, also they observed an increase in cephalic horn length at high elevations (Stanbrook et al., 2021). In *Carabus* species, body size declines towards high elevations in Russian landscapes (Benítez et al., 2020; Sukhodolskaya et al., 2020a; Sukhodolskaya et al., 2020b). Interestingly, in all cases morphometric structure in the populations dwelling at different elevations differed significantly related with their habitat effect on shape variation (Alibert et al., 2001; Benítez et al., 2014; Benítez et al., 2021; De Esteban-Trivigno, 2011; Lemic et al., 2016; Vilaseca et al., 2021). For these previous studies a morphological tool called geometric morphometrics (GM) has been used. This method became popular in the last decades due to its accuracy in shape variation analysis (Adams et al., 2013). Geometric Morphometrics (GM) arose due to the limitations of

traditional morphometrics which use length, volume and areas. GM allows analyzing the shape of organisms and/or structures, using the geometric space and multivariate statistical methods that have better biological interpretation, also this methods use a proxy of the geometric size called Centroid size which is calculated as the square root of the sum of squared distances of all the landmarks of an object from their centroid (center of gravity, whose location is obtained by averaging the x and y coordinates of all landmarks) (Klingenberg, 2016). The combination analyses using size and shape (GM) has been especially useful to quantify the differences between ecological and adaptive aspect of coleopteran species as demonstrated in many studies (Benítez et al., 2013; Benítez et al., 2020; Espinoza-Donoso et al., 2020; Lemic et al., 2014; Lemic et al., 2021; Zúñiga-Reinoso and Benítez, 2015). The aim of this research is to estimate body shape and size variation in Caucasus endemic *Carabus exaratus* Quensel, 1806 in evaluating the morphological variation between elevational gradients and their pattern of adaptation at different climate condition.

2. Materials and methods

C. exaratus Quensel, 1806 (Fig. 1b) is endemic to the Caucasus, a eurytopic species with forest and forest-meadow features that has a spring-summer type of reproduction (Aydamirova and Avtaeva, 2008). This species lives from the foothill steppes to the subnival zone, dominates in mountain slopes and floodplain forests. *C. exaratus* inhabits the floodplain forests of the Tersko-Kuma lowland and high-mountainous steppe areas, hornbeam and beech forests of the high belt of the Black Mountains, and also in the plains of the Ciscaucasia (Avtaeva et al., 2017). The average body length is 22.5 mm.

2.1. Data sampling

Specimen of *C. exaratus* were collected in the North Caucasus (42°38'N 46°44'E, Chechen Republic, Russia, S = 1600 th. ha). In the study area, the main feature of orography is a consistent increase in absolute altitude and an increase in dissection from north to south. The study area is within the foothill-plain (Tersko-Kumskaya, Gudermes lowlands, Nadterechnaya plain) and mountain geomorphological

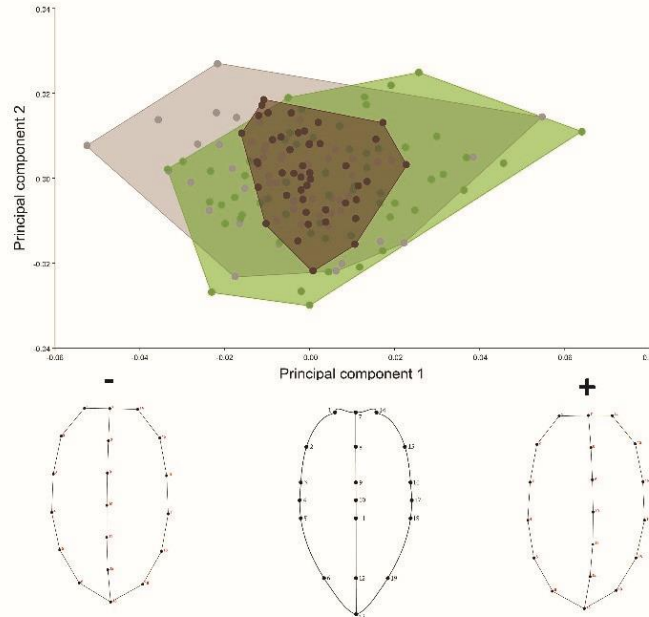


Fig. 2. Principal Component analysis of the dorsal view of *Carabus exaratus*. The colors represent the different levels of altitude: Lower elevation (plain): grey, middle elevation (foothill): green, and higher elevation (mountain): brown. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

provinces (Tersko-Sunzhenskaya Upland, Black Mountains, Pasture system ridges, Skalisty and Bokovoy ridges). The following geographic patterns and phenomena are concentrated on the territory of the Chechnya: latitudinal and altitudinal zonation, intrazonality, inversion (Gvozdetzky, 1954). The most important circumstance is the location at the junction of the temperate and subtropical climatic zones. The climate of the Chechen Republic is quite diverse: there is a consistent increase in precipitation and a decrease in annual air temperatures from north and northeast to south. In the direction from north to south, the air humidity, the duration of the frost-free period, and the depth of the snow cover vary greatly. It is also an essential fact that Chechnya is fenced off by high mountain barriers. It is open to the access of both warm and dry, and cold and humid air masses. On the foothill-plain territory, the climate is more or less stable, but in mountainous conditions, all meteorological parameters vary greatly depending on the mountain elevational exposure, and steepness. The main forest-forming species in the study area is oriental beech, the secondary one is hornbeam, ash, linden, high-mountain elm, Norway maple, field, and alpine oak, birch, sweet cherry, pear, apple. A feature of alpine meadows is that they consist of cereal and sedge grasses, forming a dense sod with roots (Astamirova et al., 2016).

Traps were located at three elevations in the mountainous terrain: flood-plain forest (91 m.a.s.l., hereinafter referred to as plain), beech forest (676 m.a.s.l., foothills) and beech forest in high mountains (1018 m.a.s.l., mountains). Carabids were caught by pitfall traps which are glass jars with 70 mm diameter and a volume of 0.5 L, and 4% formalin was used as a fixative. Pitfall traps were placed in a straight line at 5 m interval. The captured insects were selected every week from the third week of May to the second week of September. Images were taken with a Nikon D5100 camera with custom opaque light disperser and a box with opaque reflective surface.

2.2. Geometric morphometrics analyses

For the morphometrics analyses three levels of elevation were used; 60 specimens of *C. exaratus* were used for plain, 58 specimens for foothills, and 45 specimens for mountains.

The dorsal and ventral view of *C. exaratus* were used in order to analyze the shape using 2D geometric morphometrics. For the ventral and dorsal views, 18 and 19 landmarks (See Fig 1 a, c) were digitized using the software tpsDig2 (Rohlf, 2013), respectively, following the literature on beetles and geometric morphometrics (Benítez et al., 2021; Espinoza-Donoso et al., 2020). To extract all shape information a Procrustes superimposition analysis from dorsal and ventral landmark configurations was performed (Rohlf and Slice, 1990). It is important to mention that this analysis removes all non-shape information by standardizing each specimen to a unit centroid size, removing scale, rotation and orientation (Dryden and Mardia, 1998).

In order to visualize the shape variation between the different elevational gradients a Principal Component analysis (PCA) (Jolliffe, 2002) was performed using the covariance matrix of individual shape, for that purpose the scatterplot of the PCA principally from the first two dimensions of the shape spaces were visualized. In order to identify if there any differences between *C. exaratus* size between elevational gradients a violin graph plotted using the R package ggplot2 (Wickham, 2016), was performed using the centroid size (as a proxy of size in geometric morphometrics) of the three elevational gradients. As mentioned before, the size is an important element of shape, for our analysis a multivariate regression of shape as a dependent variable and centroid size as an independent variable was computed to identify if there is any allometry (effect of size on shape) in the morphology due to the altitude (Monteiro, 1999). To identify if there any shape differences statistically, a permutation test between levels of elevation were

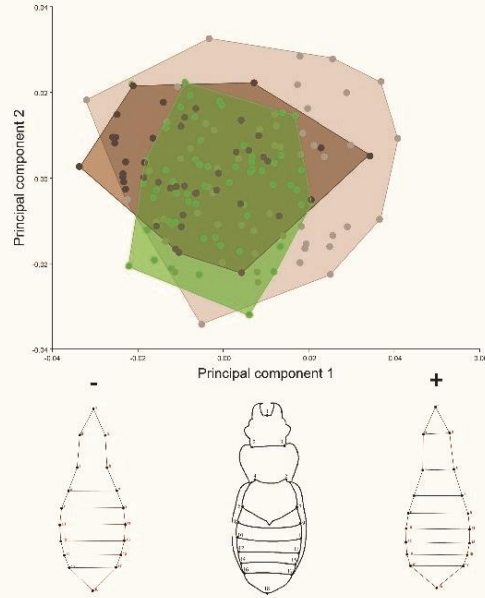


Fig. 3. Principal Component analysis of the ventral view of *Carabus exaratus*. The colors represent the different levels of altitude: Lower elevation (plain): grey, middle elevation (foothill): green, and higher elevation (mountain): brown. Graphical representation of the negative and positive shape contribution of the principal component 1. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

performed using two distances of the shape Procrustes and Mahalanobis distances. Finally, after corroborate that shape is statistically different between groups, a Canonical Variate analysis (CVA) as a discriminant analysis was performed, identifying the elevational gradients in order to graphically visualize the shape variation between elevational gradients.

All the GM and statistical analyses were performed using the software MorphoJ v1.06d (Klingenberg, 2011) and using the R packages geomorph and gmshtiny v4.0 (Adams and Otárola-Castillo, 2013; Baken

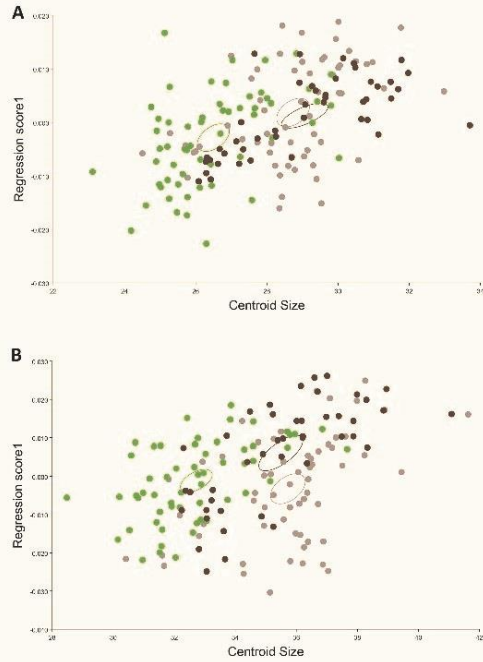


Fig. 5. Multivariate regression of shape on centroid size (independent variable) in *Carabus exaratus*. The colors represent the different levels of altitude: Lower elevation (plain): grey, middle elevation (foothill): green, and higher elevation (mountain): brown. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

et al., 2021).

3. Results

The percentage of variance of the shape space (PCA) showed different levels of variation depending on the view, where the dorsal

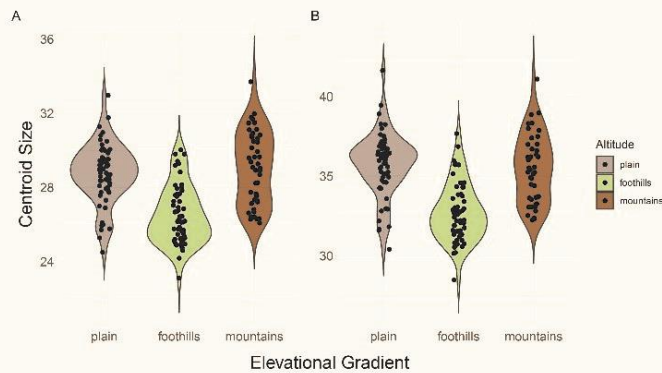


Fig. 4. Violin graph of centroid size representing the geometric body size for A: Dorsal and B: Ventral view of *C. exaratus*. The colors represent the different levels of altitude: Lower elevation (plain): grey, middle elevation (foothill): green, and higher elevation (mountain): brown. Graphical representation of the negative and positive shape contribution of the principal component 1. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 1

Permutation test between elevational gradients for *C. exaratus* dorsal and ventral the values of shape distances (Procrustes and Mahalanobis) and their respective p value of comparison are shown.

	Foothill	Mountain	Foothill	Mountain
	Mahalanobis	Mahalanobis	Procrustes	Mahalanobis
	P-value	P-value	P-value	P-value
Mountain	2.0268		0.008	
	<0.0001		0.0207	
Plain	2.6011	3.2952	0.0111	0.0091
	<0.0001	<0.0001	0.0019	0.0022
VENTRAL				
	Foothill	Mountain	Foothill	Mountain
	Mahalanobis	Mahalanobis	Procrustes	Mahalanobis
	P-value	P-value	P-value	P-value
Mountain	2.0426		0.0108	
	<0.0001		0.0013	
Plain	1.9535	2.9756	0.0121	0.0169
	<0.0001	<0.0001	0.0001	<0.0001

view explains an 82.4% (PC1: 50.7%, PC2: 21%, PC3:10.7) of variation in the first three components in comparison with the ventral view, which only explains a 56.3% (PC1: 24.8%, PC2: 17%, PC3:14.5%). It is important to note that independently from the bigger percentage of variation, a higher overlapping of specimens was found in the scatterplot of the PCA for both views, but where the plain and foothill specimens from the dorsal view (Fig. 2) have more variable shapes in contrast to mountain populations, which remain in the center as a concentrated group of morphologies that are mountain type.

For the ventral view, more disparity was found in plain populations, covering almost the complete shape space for the first 2 dimensions; however, the mountain populations kept the central position of the shape space as a less variable with the shape similar to the mean shape of plain populations morphology (Fig. 3).

The shape variation of the dorsal view was noticeable with elongated shapes for mountain populations, with central landmarks 7 which vary upwards and 12 showing a variation downwards, making elongated shapes in comparison with more cylindrical elytra shape from the foothills and plain, which are also combined with oval shapes, covering most of the shape space. For the ventral view, the shape variation was less apparent due to the higher disparity present in the specimens from the plain populations, which present forms from elongated shapes to shorter oval shapes. Nevertheless, the mountain populations remain with concentrated groups of specimens in the shape space with elongated shapes than foothills populations.

The violin plot of centroid size between elevational gradients showed for both views that specimens from foothills (middle elevation) were found to have lower centroid sizes in contrast to the specimens from mountains which in general were found to be larger than the other two

elevations. For specimens of plain which is the lower elevation the results showed that mostly all (accumulation of points in the middle section of the violin) the specimens have a middle centroid size (Fig. 4). In order to exclude that the size effect corresponds to some allometric effect, the multivariate regression showed a very low percentage of allometry in both views (dorsal: 3.9%, P-value: 0.0005 and ventral: 3.7%, P-value: <0.0001). Nevertheless, more compact shapes were found in foothills populations compared to plain and mountain populations (Fig. 5). In order to identify if there any statistically differences between groups the permutation test indicate for the Procrustes and Mahalanobis distances that shape variation between elevational gradient are statistically significant which means that the landmark variation between groups are different between groups (Table 1).

Finally, a CVA as a discriminant analysis was performed for both views in order to detect if the maximum variation between altitude levels produces a cluster of specimens, resulting in very clear groups for the dorsal and ventral populations (Fig. 6).

4. Discussion

The shape variation of *C. exaratus* was clearly exhibited by the tool of geometric morphometrics. Our results indicate that dorsal and ventral morphological variation between the three altitudinal populations, may be due to differences combined principally by shape, but also in some levels by the centroid size. Given this, a particular shape structure was noticeable, differentiating the mountain populations from the others, suggesting that size variations between elevational gradients are necessarily influenced by the environment.

Previous studies by Sukhodolskaya et al. (2020a) in *C. exaratus* regarding body size only have confirmed a slight body size increase depending on the altitude which depend directly to the longer period of development in larvae. Similarly, but with a clear pattern, our research found in the higher elevational area a clear pattern of an accumulation of higher values of centroid size in the mountain population (Fig. 3) in contrast to the other two elevational levels, with particular elongated phenotype. In other species of *Carabus* like *Carabus odoratus* Shil. in Barguzin Ridge in Russia, the opposite to our results has been found, where body size decreased towards high elevation (Sukhodolskaya and Ananina, 2015). An important observation in mountain populations of beetles is an irregular life cycle from univoltine to bivoltine species, an example of that was *Pterostichus montanus* which modifies their life cycle depending on the elevational gradient, finding a combination of increasing and decreasing body sizes depending on the levels of altitude (Sharova and Khobrakova, 2005; Sukhodolskaya et al., 2021; Sukhodolskaya and Saveliev, 2017). In our results we, found that specimens from mountain population have respond to increase the body size and modify they shape, even if we did not evaluate the life cycle of the *C. exaratus*, we suggest, that the increase of size in contrast with previous

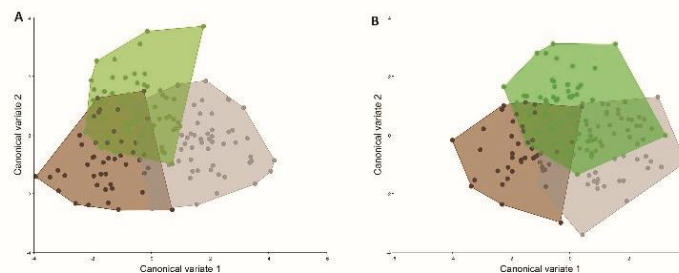


Fig. 6. Canonical variate analysis between A: dorsal and B: ventral views of *Carabus exaratus* populations. The colors represent the different levels of altitude: Lower elevation (plain): grey, middle elevation (foothill): green, and higher elevation (mountain): brown. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

results found in other beetles like which decrease size as higher levels of elevation, may be related with the longer period of developmental processes.

Stanbrook et al. (2021) founds in terms of shape variation at altitudinal gradient, that trait changes associated with elevation in an African dung beetle where an increase in cephalic horn size and shape were found at high elevations. Ariza-Marín and Amat-García (2021) mention that the shape reduction has been observed in Plecoptera, Grylloblattodea, Neuroptera, and other families of Coleoptera (Carabidae) (Hodkinson, 2005; McCulloch et al., 2019; Sømme et al., 1996). The pattern of adaptation of the shape variation along elevational gradients may allow species to adapt under several climate variable and often harsh conditions which can be typical of mountain environments. These evolutionary patterns may occur as a change in phenotypic structures, such as wingspan reductions or enlargement, elongation of elytrae, and reduction of size (Eweleit and Reinhold, 2014; Hodkinson, 2005; Stanbrook et al., 2021; Suzuki et al., 2019).

Finally, this research found a positive relationship of size and shape, where higher elevation entails complex changes in the environment, which results in particular plastic morphologies with higher values of centroid size. Some of the environment responses are relate with a reduction of oxygen, low temperatures and strong wind, characteristics which may reflect adaptation by natural selection, changing particular traits and generating complex morphologies like the shape of *C. exaratus*. Future studies in this regard, combining in situ experiment on developmental biology and mapping the gene influence may contribute to understand the adaptation of insects to generate complex morphologies as a response to climate influence.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgement

This work was carried out with partial financial support from the Program of Fundamental Scientific Research (FSR) of the State Russian Academies of Sciences for 2021–2025, project 0271-2021-0001 (FWSM - 2021-0001), No. 12110309000138-8. HB thanks to Juan Dueñas for their help contribution in the figures.

References

Adams, D.C., Otárola-Castillo, E., 2013. Geomorph: an R package for the collection and analysis of geometric morphometric shape data. *Methods Ecol. Evol.* 4.

Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E., 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix* 24, 7–14.

Alibert, P., Moureau, B., Dommergues, J.L., David, B., 2001. Differentiation at a micro geographical scale within two species of ground beetle, *Carabus auronitens* and *C. nemoralis* (Coleoptera, Carabidae): a geometrical morphometric approach. *Zool. Scripta* 30, 299–311.

Ariza-Marín, E.R., Amat-García, G., 2021. Morphometric Changes in Wings of Bess Beetles (Coleoptera: Psephenidae) Related to Elevation: a Case of Study in the Colombian Andes. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, pp. 1–11.

Arnold, S.J., Pfander, M.E., Jones, A.G., 2001. The adaptive landscape as a conceptual bridge between micro-and macroevolution. *Microevolution rate, pattern, process* 9–32.

Astamirova, M., Umarov, M., Taysamov, M., 2016. Anatomical and physiological adaptations of cryophilic plants of central and eastern Main Caucasus Ridge. *Annals Krasnoyarsk State Agric. Univ.* 11, 114–122.

Avtaeva, T., Kushalleva, S., Fominikh, D., 2017. Life-cycles in Carabus genus species in conditions of Chechen Republic. *Euro-Asian entomological journal* 16, 375–387.

Aydamirova, T., Avtaeva, T., 2008. Ecological and Faunal Characteristics in Carabid Fauna in Urban Landscape (The Case Study in Grozny), vol. 1. *Proceeding of Stavropol Department of Russian Entomological Society*, pp. 179–184.

Bai, Y., Ma, L.B., Xu, S.-Q., Wang, G.-H., 2015. A geometric morphometric study of the wing shape of Pieris rapae (Lepidoptera: pieridae) from the Qinling Mountains and adjacent regions: an environmental and distance-based consideration. *Fla. Entomol.* 98, 162–169.

Baken, E.K., Collyer, M.L., Kaliontzopoulou, A., Adams, D.C., 2021. Geomorph v4.0 and gmshiny: enhanced analytics and a new graphical interface for a comprehensive morphometric experience. *Methods Ecol. Evol.* 12, 2355–2363.

Benítez, H.A., Pizarro-Araya, J., Bravi, R., Sazana, M.-J., M. A.F., 2014. Morphological variation on isolated populations of *Practes (Practes) spinolai*. *J. Insect Sci.* 14, 1–12.

Benítez, H.A., Sazana, M.-J., Jerez, V., Parra, L.E., Hernandez, C.E., Canales-Aguirre, C. B., 2013. Sexual shape and size dimorphism in carabid beetles of the genus *Ceroglossus* is geometric body size similar between sexes due to sex ratio? *Zool. Sci.* 30, 289–295.

Benítez, H.A., Sukhodolskaya, R.A., Ordeñez-Clavería, R., Avtaeva, T.A., Kushalleva, S. A., Saveliev, A.A., 2020. Measuring the inter and intraspecific sexual shape dimorphism and body shape variation in generalist ground beetles in Russia. *Insecta* 11, 361.

Benítez, H.A., Sukhodolskaya, R.A., Ordeñez-Clavería, R., Vavilov, D.N., Ananina, T., 2021. Assessing the shape plasticity between Russian biotopes in Pteroticichus dilutipes (Motschulsky, 1844)(Coleoptera: Carabidae) a geometric morphometric approach. *Zool. Anz.* 293, 163–167.

Bhural, N., Lee, M., Han, A.R., Han, A., Kim, H.S., 2020. Responses to drought stress in *Prunus argentea* and *Larix kaempferi* seedlings using morphological and physiological parameters. *For. Ecol. Manag.* 465, 118099.

Brehm, G., Zeuss, D., Colwell, R.K., 2019. Moth body size increases with elevation along a complete tropical elevational gradient for two hyperdiverse clades. *Ecography* 42, 632–642.

Chown, S.L., Gaston, K.J., 2010. Body size variation in insects: a macroecological perspective. *Biol. Rev.* 85, 139–169.

Colares, C., Roza, A.S., Mermudes, J.R., Silveira, L.F., Khattar, G., Mayhew, P.J.J., Monteiro, R.F., Nunes, M.F.S., Macedo, M.V., 2021. Elevational specialization and the monitoring of the effects of climate change in insects: beetles in a Brazilian rainforest mountain. *Ecol. Indicat.* 120, 106888.

Cox, R.M., Skelly, S.L., John-Alder, H.B., 2003. A comparative test of adaptive hypotheses for sexual size dimorphism in lizards. *Evolution* 57, 1653–1669.

De Etuban-Trivigno, S., 2011. Ecomorphology of extinct Xenarthrans: analysis of the mandible using geometric morphometric methods. *Ameghiniana* 48, 381–398.

Demirci, B., Lee, Y., Lanzaro, G.C., Alten, B., 2012. Altitudinal genetic and morphometric variation among populations of *Culex theileri* Theobald (Diptera: Culicidae) from northeastern Turkey. *J. Vector Ecol.* 37, 197–209.

Dryden, I.L., Mardia, K.V., 1998. *Statistical Shape Analysis*. Wiley, Chichester.

Espeland, E.K., 2013. Predicting the dynamics of local adaptation in invasive species. *J. Arid Land* 5, 268–274.

Espinosa-Donoso, S., Angulo-Bedoya, M., Lemic, D., Benítez, H.A., 2020. Assessing the influence of allometry on sexual and non-sexual traits: an example in Cicindelina trifaxiata (Coleoptera: Cicindelinae) using geometric morphometrics. *Zool. Anz.*

Eweleit, L., Reinhold, K., 2014. Body size and elevation: do Bergmann's and Rensch's rule apply in the polytypic bushcricket *Poecilimon veluchianus*? *Ecol. Entomol.* 39, 133–136.

Forrest, J.R., 2016. Complex responses of insect phenology to climate change. *Curr. Opin. Insect Sci.* 17, 49–54.

Gutiérrez, D., Wilson, R.J., 2021. Intra- and interspecific variation in the responses of insect phenology to climate. *J. Anim. Ecol.* 90, 248–259.

Gvozdevsky, N., 1954. *Physical Geography of the Caucasus*. Publishing House of Moscow State University, Moscow.

Hoback, W., Podrabsky, J., Higley, L., Stanley, D., Hand, S., 2000. Anoxia tolerance of con-familial tiger beetle larvae is associated with differences in energy flow and anaerobiosis. *J. Comp. Physiol. B* 170, 307–314.

Hoback, W.W., Stanley, D.W., 2001. Insects in hypoxia. *J. Insect Physiol.* 47, 533–542.

Hodkinson, I.D., 2005. Terrestrial insects along elevation gradients: species and community responses to altitude. *Biol. Rev.* 80, 489–513.

Jolliffe, I.T., 2002. *Principal Component Analysis*, second ed. Springer-Verlag, New York.

Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Res.* 11, 353–357.

Klingenberg, C.P., 2016. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Dev. Gene. Evol.* 226, 113–137.

Klingenberg, C.P., Zimmermann, M., 1992. Static, ontogenetic, and evolutionary allometry: a multivariate comparison in nine species of water striders. *Am. Nat.* 140, 601–620.

Lemic, D., Benítez, H.A., Bažok, R., 2014. Intercontinental effect on sexual shape dimorphism and allometric relationships in the beetle pest *Dibrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae). *Zoologischer Anzeiger - J. Comparat. Zoology* 253, 203–206.

Lemic, D., Benítez, H.A., Püschel, T.A., Gašparić, H.V., Šatvar, M., Bažok, R., 2016. Ecological morphology of the sugar beet weevil Croatian populations: evaluating the role of environmental conditions on body shape. *Zoologischer Anzeiger - J. Comparat. Zoology* 260, 25–32.

Lemic, D., Pajač Živković, I., Šulčić, M., Benítez, H.A., 2021. Exploratory analysis of color forms' variability in the invasive Asian Lady beetle *Harmonia axyridis* (pallas 1773). *Animals* 11, 2436.

Leung, K.W., Yang, S., Wang, X., Tang, K., Hu, J., 2021. Ecogeographical adaptation revisited: morphological variations in the plateau Brown frog along an elevation gradient on the Qinghai-Tibetan plateau. *Biology* 10, 1081.

Luzyanin, S., Saveliev, A., Ukhova, N., Vorobyova, I., Solodovnikov, I., Anciferov, A., Shagidullin, R., Teofilova, T., Nogovityrva, S., Brygadyrenko, V., 2022. Modeling

- sexual differences of body size variation in ground beetles in geographical gradients: a case study of *Pterostichus melanarius* (Illiger, 1798) (Coleoptera, Carabidae). *Life* 12, 112.
- Mahli, Y., Silman, M., Salinas, N., Bush, M., Meir, P., Saatchi, S., 2010. Introduction: elevation gradients in the tropics: laboratories for ecosystem ecology and global change research. *Global Change Biol.* 16, 3171–3175.
- Maveety, S.A., Browne, R.A., 2014. Patterns of morphology in carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) along a Neotropical altitudinal gradient. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 34, 157–171.
- McCulloch, G.A., Forter, E.J., Dutoit, L., Ingram, T., Hay, E., Veale, A.J., Dearden, P.K., Waters, J.M., 2019. Ecological gradients drive insect wing loss and speciation: the role of the alpine treeline. *Mol. Ecol.* 28, 3141–3150.
- Monteiro, L.R., 1999. Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search for causal factors in the analysis of shape. *Syst. Biol.* 48, 192–199.
- Rohlf, F.J., 2013. *TPSdig*, v. 2.17. State University at Stony Brook, NY.
- Rohlf, F.J., Slice, D., 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39, 40–59.
- Sharova, I.K., Khobrakova, L.T., 2005. Features of the life cycles of *Pterostichus montanus* (Motschulsky, 1844) and *Carabus loschnikovi* (Fischer-Waldheim, 1822) (Coleoptera, Carabidae) in conditions of the mountain taiga belt in the Eastern Sayan. *Biol. Bull.* 32, 27–37.
- Sempe, L., Davidson, R.L., Onore, G., 1996. Adaptations of insects at high altitudes of Chimborazo, Ecuador. *Eur. J. Entomol.* 93, 313–318.
- Sempe, L., Zachariasen, K.E., 1981. Adaptations to low temperature in high altitude insects from Mount Kenya. *Ecol. Entomol.* 6, 199–204.
- Stanbrook, R.A., Harris, W.E., Wheeler, C.P., Jones, M., 2021. Evidence of phenotypic plasticity along an altitudinal gradient in the dung beetle *Onthophagus proteus*. *PeerJ* 9, e10798.
- Sukhodolskaya, R., Ananina, T., Saveliev, A., 2021. Variation in body size and sexual size dimorphism of ground beetle *Pterostichus montanus* Motsch. (Coleoptera, Carabidae) in altitude gradient. *Contemporary Prob. Ecol.* 14, 62–70.
- Sukhodolskaya, R., Avtaeva, T., Gordienko, T., Vodounon, N., Kushalleva, S.A., 2020a. Body Size Variation in Ground Beetle *Carabus exoratus* Quensel, 1806 (Coleoptera, Carabidae) in Altitude Gradient. *Биологическое разнообразие Казахстана Юра Россия: вопросы, проблемы, состояние исследований*, pp. 178–186.
- Sukhodolskaya, R., Vavilov, D., Gordienko, T., Mukhametbajev, T., 2020b. Variability of Assemblage structure and body sizes in the ground beetle (Coleoptera, Carabidae) along an Anthropogenic impact gradient. *Povolzhskiy J. Ecol.* 99–114.
- Sukhodolskaya, R.A., Ananina, T.L., 2015. Altitudinal variation in population density, body size and morphometric structure in *Carabus odoratus* Shil, 1996 (Coleoptera: Carabidae). *Acta Biol. Univ. Daugavp.* 15, 179–190.
- Sukhodolskaya, R.A., Saveliev, A.A., 2017. Impact of environmental factors on the body shape variation and sexual shape dimorphism in *Carabus granulatus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Zoological Systematics* 42, 71–89.
- Suzuki, T., Suzuki, N., Tojo, K., 2019. Parallel evolution of an alpine type ecomorph in a scorpionfly: independent adaptation to high-altitude environments in multiple mountain locations. *Mol. Ecol.* 28, 3225–3240.
- Vilaseca, C., Méndez, M.A., Pinto, C.F., Lemic, D., Benítez, H.A., 2021. Unraveling the morphological variation of *Tritoma infestans* in the peridomestic habitats of Chuquisaca Bolivia: a geometric morphometric approach. *Insects* 12, 185.
- Wickham, H., 2016. *Data Analysis, Ggplot2*. Springer, pp. 189–201.
- Zeuss, D., Brunzel, S., Brandl, R., 2017. Environmental drivers of voltinism and body size in insect assemblages across Europe. *Global Ecol. Biogeogr.* 26, 154–165.
- Zúñiga-Reinosoro, A., Benítez, H.A., 2015. The overrated use of the morphological cryptic species concept: an example with *Nyctella* darkbeetles (Coleoptera: Tenebrionidae) using geometric morphometrics. *Zoologischer Anzeiger-J. Comparat. Zoology* 255, 47–53.

Anexo II: Publicación: A geometric morphometrics and genetics
characterization of *Vanessa carye* in an extreme elevational gradient in the
Chilean Altiplano

**A geometric morphometrics and genetics characterization of *Vanessa carye* in an
extreme elevational gradient in the Chilean Altiplano**

Scott Escobar-Suárez^{1,2}, Amado Villalobos-Leiva^{1,2}, Alejandra Fabres², Rodrigo
Órdenes⁴, Franco Cruz-Jofré⁵, David Laroze⁴, Margarita Correa², Moisés A.
Valladares^{6,7} and Hugo A. Benítez^{2,3} *

¹Universidad de Concepción, Depto. de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y
Oceanografía, Barrio Universitario S/N, Concepción 4030000, Chile,
scoescobar@udec.cl, avillaleiv@gmail.com

²Laboratorio de Ecología y Morfometría Evolutiva, Centro de Investigación de Estudios
Avanzados del Maule, Instituto Milenio Biodiversidad de Ecosistemas Antárticos y
Subantárticos (BASE), Universidad Católica del Maule, Talca 3466706, Chile,
hbenitez@ucm.cl, mcorreag@ucm.cl, alejandra.fabres@gmail.com

³Centro de Investigación en Recursos Naturales y Sustentabilidad (CIRENYS),
Universidad Bernardo O'Higgins, Avenida Viel 1497, Santiago 8370993, Chile

⁴Instituto de Alta Investigación, Universidad de Tarapacá, Casilla 7D, Arica 1000000,
Chile, rodrigo.ordenescl@gmail.com, dlarozen@uta.cl

⁵ Universidad Santo Tomás, Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Recursos
Naturales y Medicina Veterinaria, Limonares 190, Viña del Mar, 2561780, Chile,
francocruzjo@santotomas.cl

⁶Laboratorio de Biología Evolutiva, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias
Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago 8331150, Chile,
valladares.moises@gmail.com

⁷Grupo de Biodiversidad y Cambio Global (GBCG), Departamento de Ciencias Básicas, Universidad del Bío-Bío, Chillán 3790246, Chile

*Correspondence: hbenitez@ucm.cl

Abstract

The Western Painted Lady butterfly, *Vanessa carye* (Hüber, 1812), in addition to presenting an extensive distribution in South America, has been observed flying in the Chilean Alti-plano from the coast to the highlands, from 0 to 5200 m.a.s.l. and it is suggested that could be a migratory insect. Some animal species move from one place to another by migration searching for favorable conditions. Wings of flying migratory animals are the principal trait involved in movement, and their shape has been documented to change between migratory and non-migratory species or populations. In this sense, little is known about the adaptations of butterflies to elevational gradients, so the *V. carye*'s wide latitudinal and altitudinal range coupled with the different climatic conditions makes this species an interesting subject for adaptation studies. This research studies *V. carye* at different elevational ranges in extreme environments at the Chilean Altiplano and Atacama Desert to determine the presence of morphotypes through geometric morphometrics associated with altitudinal patterns, and to determine the genetic diversity and population structure of this species by using COI molecular marker. Subtle morphometric changes between populations were found, so two morphometric lineages were defined: a "coastal" lineage with more elongated wings and an "altiplano" lineage with more rounded wings. Nevertheless, low genetic diversity and no genetic structure associated to these morphological differences were found. Understanding the processes underlying the wing shape of *V. carye* morphological adaptations will help to understand its natural history. Results here may be a first approach of evidence to answer the question "Is this butterfly a migratory species?"

Keywords: Elevational gradients; wing shape; *Vanessa carye*; morphometrics; butterfly; migration; Altitudinal adaptations

Introduction

The genus *Vanessa* (Lepidoptera; Nymphalidae) is a remarkable biological model. *Vanessa* is a cosmopolitan genus, excluding Antarctica, with 22 species (Wahlberg and Rubinoff, 2011), where at least six of them are considered to be vagile and their distribution range spans several thousand kilometers (*V. atalanta*, *V. cardui*, *V. carye*, *V. indica*, *V. itea* and *V. virginiensis*), while the remaining 16 species have a very restricted distribution. Since it is a small genus with a global distribution, it is possible to do research with the whole group. For this reason, it has been the subject of several adaptive, evolutionary (Abbasi and Marcus, 2015; Shapiro and Geiger, 1989; Wahlberg and Rubinoff, 2011) and migratory studies (Nesbit et al., 2009; Stefanescu et al., 2016; Stefanescu et al., 2021; Talavera and Vila, 2017). Chile has three representatives of the genus: *V. terpsichore* (Phillipi, 1859), which is distributed from Coquimbo to Magallanes; *V. carye* (Hüber, 1812), which flies throughout the national territory. In addition, the presence of *V. braziliensis* (Moore, 1883) was reported in Socoroma at 3300 m in 2012 (Vargas, 2013). *Vanessa carye* is an emblematic, brightly colored butterfly distributed from Venezuela to Patagonia including Chilean oceanic islands, and it has been suggested that it may be migratory due to its capacity to lay eggs on ornamental and natural Malvaceae species, Asteraceae species, among other host plant species (Wahlberg and Rubinoff, 2011). Furthermore, some specimens with the same level of mechanical wear in both pairs of wings have been observed. Although this species has been included in studies of the genus, it has been poorly studied and its natural history still needs further insight. One of the few observations on its natural history is that it has been reported flying from 0 to 5200 m.a.s.l in the Chilean Altiplano (Benítez et al., 2019); however, its population structure and habits are unknown. The Altiplano or Puna is located in the central Andes with high mountains that reach elevations from 5000m to 6000m, running through part of Peru, Bolivia, Argentina and Chile (Strecker et al., 2007). Due to the geographical barriers formed, the movement of organisms in this region has been mainly

influenced by habitat fragmentation and historical environmental changes. In this sense, it has been proposed that the physiography of the Altiplano and Atacama Desert, in general, have promoted high levels of population structure in the species inhabiting this region. This pattern of high genetic differentiation has been reported for a multiplicity of species, such as insects (Muñoz-Valencia et al., 2022; Zúñiga-Reinoso et al., 2021), aquatic invertebrates (Valladares et al., 2022; Valladares et al., 2018), fishes (Cruz-Jofré et al., 2016; Rojas et al., 2020), amphibians and birds. Little is known about adaptations of butterflies to altitudinal gradients, physiological adaptations of *Lycaena tityrus* (Lepidoptera; Lycaenidae), present in Europe and Asia, have been reported at different altitudinal levels and it has been proposed that they have genetic differentiation concerning the altitude level, even though no morphological differences were observed (Karl and Fischer, 2009). A recent study combining genomics tools in *Heliconius erato* and *H. Melpomene* found that these tropical group of butterflies have repeatedly and independently adapted to montane habitats on either side of the Andes (Montejo-Kovacevich et al., 2022). The adaptations in *V. carye* populations that support its wide elevational gradient are still unknown. Following the vagility study in *Vanessa* from Wahlberg and Rubinoff (Wahlberg and Rubinoff, 2011), it suggests *V. carye* is a migratory butterfly due to its wide distributional range, high vagility, its adaptations to different environmental conditions in its whole distribution, the presence of mechanical wearing of its wings, besides migratory behavior records of other vagile *Vanessa* species like *V. cardui* and *V. atalanta*. *Vanessa cardui* is one of the most studied migratory butterflies with a wide distribution, even one of the most extensive among terrestrial animals (Shields, 1992). Its migration is intercontinental, it flies from the northern Atlantic Islands to North Africa, across Europe, the Mediterranean Sea and the Sahara Desert (Stefanescu et al., 2016; Suchan et al., 2019; Talavera and Vila, 2017; Wahlberg and Rubinoff, 2011). It can fly more than 4000 km, even upwind (Stefanescu et al., 2016) and perform a round-trip migration of 15000 km in one year and six generations (Chapman et al., 2015; Nesbit et al., 2009; Stefanescu et al., 2013). *Vanessa atalanta* is another migratory species that migrates between Europe and North Africa. It has latitudinal

(Mikkola, 2003; Stefanescu, 2001) and possibly altitudinal migration and it may fly up to 3000 m altitude (Mikkola, 2003). As the wings of flying migratory animals are the main trait involved in movement, they are subjected to natural selection, and only those with modifications that favor migration (Outomuro and Johansson, 2019) are inherited (Alvial et al., 2019; Huang et al., 2020; Neto et al., 2013). Traditional morphometric studies are available on the wing shape in migratory butterflies, but no studies using geometric morphometrics (GM) have been performed. For the last 25 years, GM has been used to study the morphological variability in insect species (Adams and Funk, 1997; Benítez, 2013; Benítez et al., 2022; Bravi and Benítez, 2013; Chazot et al., 2016; Klingenberg et al., 1998; Pretorius, 2005; Rohlf et al., 1996). GM allows exploring the morphology, providing sophisticated graphic analyses 2D or 3D based on which morphometric variation can be quantified and visually perceived. With geometric morphometrics analysis, we aim at identifying the ecological and functional significance of morphological features of this species pattern of adaptation to extreme environments (Adams et al., 2004; Adams et al., 2013). Wing morphology in insects has been widely used as an important model in developmental and evolutionary studies, in part because well-defined landmarks can be established on the wing vein intersections, consequently making them very suitable for morphometric analyses (Klingenberg et al., 2010; Klingenberg et al., 1998; Outomuro et al., 2016; Pezzoli et al., 1997). The veins are linear structures, which are distributed in specific patterns in the wing, providing structural rigidity. The wide latitudinal and altitudinal range coupled with the different climatic conditions where it is found, makes *V. carye* a good subject for adaptation studies. Research on butterflies in Chile are scarce, and there are no studies available that evaluate butterfly wing shape, despite the fact that it is fundamental for flight. Studying the wing shape of *V. carye* morphological adaptations will help us to understand its altitudinal adaptations. Therefore, the aim of this research is to evaluate the wing shape of *V. carye* at different elevational gradients in the Chilean Altiplano, in order to determine the presence of morphotypes associated with altitudinal patterns and to determine the genetic diversity and the population structure of this species. This study intends to be the first approach to contribute with research to

answer the question: “Is *V. carye* an actually migratory species?”, although this is beyond the scope of this research, but we are giving the first insights on the topic, considering all the traits that this butterfly shares with other migratory species of the genus.

Materials and Methods

Area and Sampling

The Chilean Altiplano corresponds to a narrow line in the northwestern part of the country, from 17°S to 27°S. The Atacama Desert is located to the west of the Chilean Altiplano (at lower altitudes), and then the coastal regions of the Pacific Ocean extend in Chile. According to Morrone (Morrone, 2014, 2015), this region would correspond to the South American Transition Zone. This zone is characterized by arid and dry climates with cold winters. In addition, natural geographic barriers and landscape characteristics (i.e., mountains, streams, climate variation at different elevations, vegetation variation, etc.) have favored the isolation of populations, reducing gene flow (Palma et al., 2005; Vila et al., 2013). The sampling of *V. carye* was performed with an entomological net in the periods of March-April 2018, March-June 2019, and May 2021. Individuals were collected in 18 sites from the Arica and Parinacota Region to the Tarapacá Region (17°30'S to 24°S) in northern Chile (Table 1, Fig. 1). Sampling sites were grouped according to their geographical category to study the effect of altitude on *V. carye* (Table 1). Samples collected up to 1500 meters above sea level (m.a.s.l) were considered as Plain, and samples taken up to 4535 m.a.s.l and 5200 m.a.s.l were classified as Altiplano and High Mountain, respectively. The Plain group includes localities that are not part of the Chilean Altiplano, the Altiplano group includes localities that correspond to the Altiplano *per se*, and principally due to the extreme conditions (strong wind, and lower temperature), the High Mountain group was separated of the Altiplano group. It is important to note that a population of *Vanessa carye* was first discovery laying eggs and flying in those extreme condition recently in 2019 (Benítez et al., 2019). Because of the difficulty to sample in

extreme environmental conditions at 4500 m.a.s.l., the unknown temporal distribution of the butterfly and the complexity to get to those localities, the sampling efforts of this group were limited. Sample wings were separated from the body and slide mounted for morphometric analyses. Bodies were stored in 70° Ethanol at -20°C for DNA extraction.

DNA extraction and COI sequencing

Butterfly legs were used to extract the sample DNA with the Salting-out method. The mitochondrial gene, cytochrome c oxidase I, was amplified in a total of 30 µl of PCR mix containing PCR Buffer 1x (200 mM Tris-HCL pH 8.4, 500 mM KCl), MgCl₂ 2 mM, dNTP's 0.16 mM, F and R primers 0.1µM, *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™) 0.03 U/µl and DNA 1 ng/µl. PCR conditions were as follows: 45s of annealing at 50°C, 30s of extension at 72°C, and a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were purified and bi-directionally sequenced by MacroGen, Inc. using an automatic sequencer ABI3730x1. Sequences were edited and aligned with the ClustalW option of BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999).

Genetic diversity analyses

The genetic diversity was characterized by using the following diversity indices from DnaSP v.6.0.1 (Rozas et al., 2009): number of polymorphic sites (S), number of haplotypes (K), haplotypic diversity (Hd), and average number of differences between sequences (PI). The relationships between haplotypes were visualized by building a Median Joining haplotype network (Bandelt et al., 1999) produced in PopArt v.1.7 (Leigh and Bryant, 2015). Finally, an analysis of molecular variance (AMOVA) among the populations from different locations was performed using the software program Arlequin v3.5 (Excoffier and Lischer, 2010).

Geometric Morphometrics analyses

Anterior and posterior wings were extracted and slide mounted to perform morphometric analyses. The left wings were selected for each sample; when not available, the right wing was used. A photograph of each wing was taken with a Sony A6000 camera and 60 mm lens macro, ventrally and dorsally. If the right wing was used, the photo was turned, assuming bilateral symmetry on the sample. For some samples, it was impossible to get the anterior and posterior wings due to different damage levels. Sixteen and fifteen landmarks were digitized on the anterior and posterior wings, respectively (Fig. 2), using TPSDig2 v.2.3 (Rohlf, 2013). All landmarks were placed in the wing margin and vein intersections. To determine the measurement error, we produced a new landmark digitizing for each dataset (Arnqvist and Martensson, 1998; Fruciano, 2016). A Procrustes superimposition analysis (Rohlf and Slice, 1990) was performed in order to remove all the non-mathematic elements of shape (translation, rotation and scaling) and X and Y 2D coordinates of each landmark were produced using the software MorphoJ v.1.07a (Klingenberg, 2011). In order to represent graphically the shape space, a Principal component analysis (PCA) was performed using the covariance matrix of the individuals and to represent the average shape between groups the shape was extracted using the covariance matrix of the average groups. Finally, a canonical variate analysis (CVA), performed by the software MorphoJ, was used to determine the existence of *a priori* differences under a discriminant analysis, by amplifying the interspecific variation within geographical groups confirmed using permutation analyses with 10.000 rounds. It is important to note that this CVA is a discriminant analyses which use the data provided from the PCA to discriminate the morphological groups using the maximum variation between them. Finally in order to determine if there any size effect on the wing shape a multivariate regression was performed for both anterior and posterior wing.

Results

Genetic analysis

A total of 348 specimens were sequenced for the Cytochrome oxidase I mitochondrial gene (COI). The haplotype network of *V. carye* populations in the Chilean Altiplano showed a star-shaped structure (Fig. 3), with a central haplotype and from one up to three mutational steps between the other haplotypes. Haplotype diversity shows a single haplogroup with a value of $Hd = 0.306$. Consistent with the haplotype network, the AMOVA test showed an absence of phylogeographic structure (AMOVA $\Phi_{ST} = 0.007$, $p > 0.05$). This result suggests that all *V. carye* localities present in the Chilean Altiplano and Atacama Desert constitute a single population and probably with high levels of gene flow.

Variation by geographical areas

The allometric relationship in size (centroid size) and wing shape are unrelated with a 6.5% of size influence on shape in the Anterior wing and 5.5% for the posterior wing. After grouping the PCA for geographical areas a clear overlap between morphological groups can be observed; nevertheless, an inside group (Higher Mountain group) was clearly distinguished. The first three principal components explain 62.5% of the shape for the anterior wing variation (PCA1+PCA2+PCA3; 33.3%; 17.3%; 11.9%). A 33% of variation in the PC1 showed a little variation in geographical classification, which may be explained because these morphologies may represent different geographic routes between populations (Fig. 4A), for the posterior wing, the PCA showed similar results as above where the first three components explain 63.7% of the shape variation (PCA1 + PCA2 + PCA3; 35.2%; 17.5%; 10.9%). An overlap between individuals was found following the same morphological variation of the anterior wings (Fig. 4B). Although the convex hulls overlap, most of the morphological disparity can be observed in the Plain and Altiplanic groups for both anterior and posterior wings. Secondly, the High Mountain group, which is represented by the brown color in Fig. 4A and Fig 4B, is clustered with an independent shape which may represent different abilities to perform flight at high levels of altitude; however, this clustering could be due to the small number of samples from the localities at those elevation.

The CVA by geographical areas in anterior wings (Fig. 5A) shows a clustering between the Altiplano and the High Mountains. As for the Plain, there is a separation from the High Mountain, but slightly similar to the Altiplano. In the PCA (Fig. 4), a clear differentiation between the Plain, Altiplano and High Mountain can be appreciated in the distribution of the wing shape. The wing shape of the Plain tends to a more elongated shape and the shape found in the High Mountain tends to a more globular configuration of landmarks. Landmark 8 elongates the shape as it approaches the Plain, and movements of landmark 16 cause the globular shape of the High Mountain (Fig 6A).

For the posterior wing, the CVA (Fig. 5B) shows that the High Mountain group is mixed with the Altiplano group and part of the Plain group; however, Altiplano and Plain are mixed. This tendency is observed in the anterior wing, but with a greater differentiation in the point clouds. The PCA for the posterior wing (Fig. 4B) shows a clustering between the Altiplano and Plain wing shapes, but different from the High Mountain shape. Landmark 7 tends to stretch the shape upward and to the left, while landmark 13 stretches the downward shape of the altiplano group. However, in the High Mountain shape, landmarks 14 and 15 stretch the shape up and to the right, being this the most different shape, although it is more subtle than that observed in the forewings, making the posterior wings less explanatory (Fig 6B).

Discussion

Understanding species adaptation to extreme environment like the Altiplano is fundamental to understand its natural and evolutionary history. This research is the first approach to incorporate geometric morphometric and genetic tools to understand *V. carye*'s wing shape adaptation to extreme altitude. The main results showed low levels of wing shape differentiation. However, subtle differentiations associated with the altitudinal gradients of the analyzed localities were detected. In this sense, *V. carye* anterior wings were observed to be more sensitive to morphological changes than the posterior wings. The anterior wing shape variation may be explained by the greater selective pressure and

adaptation that the anterior wings of butterflies have to face (Altizer and Davis, 2010; Flockhart et al., 2017; Owens et al., 2020), since it is a trait considered fundamental for flight (Altizer and Davis, 2010; Flockhart et al., 2017; Taylor-Cox et al., 2020) directly interacting with the wind. The posterior wings have a stabilizing and gliding function (e.g. search for oviposition sites), as well as providing sufficient aerodynamic performance for fast maneuvers (e.g. escape from predators) (Le Roy et al., 2019). Different studies have shown that migratory butterflies have more elongated anterior wings, as in the case of the monarch butterfly, a trait that could be associated with a lower energy cost (Taylor-Cox et al., 2020) and low wing loading (wing area to body mass ratio) (Flockhart et al., 2017). The latter being related to butterflies with long-distance flights and migratory species (Altizer and Davis, 2010; Flockhart et al., 2017). Our results would be a first insight to show similar relationships in *V. carye* because the overall shape of its anterior wings is elongated with subtle differences that do not change the shape significantly.

According to Jantzen & Eisner (Jantzen and Eisner, 2008), posterior wings are not essential for flight in Lepidoptera, which could explain the low morphometric variability found in the *V. carye* populations. However, small modifications in the anterior wings of *V. carye* could be favoring flight performance, and the generalist morphological pattern with its own differences (small modifications) may help these individuals to cope with the extreme conditions of the Altiplano without affecting their efficiency. When evaluating the allometric relationships in size (centroid size) and wing shape, these showed to be unrelated, so this could suggest that this character could have been selected and fixed in the Altiplano populations of *V. carye*. This is one of the characteristics of migratory species as a possible panmictic population.

The genetic results suggest high levels of gene flow between localities of *V. carye* in the highlands, so there is no phylogeographic structuring, which may contribute as evidence of migration in *V. carye* and agrees with the minimal morphometric changes detected with GM tools. It should be noted that those minimal morphometric modifications evidenced with GM may be supporting the hypothesis of multiple migratory routes, as the case of the monarch butterfly with different migratory routes exhibiting wing phenotypes

associated with these routes (Altizer and Davis, 2010; Flockhart et al., 2017), but without genetic differentiation (Lyons et al., 2012). A high gene flow and subtle morphological modifications have been documented in migratory species such as the bird *Phylloscopus trochilus* (Bensch et al., 1999), and the bat *Tadarida brasiliensis mexicana*, the latter with four migratory routes and no genetic differentiation (Russell et al., 2005).

The mitochondrial gene Cytochrome oxidase I (COI) was selected to have a first approach to the genetic diversity and genetic structure of the *V. carye* populations studied. This molecular marker has been useful for species identification and genetic diversity studies (Arif and Khan, 2009). It is important to note that the genetic results confirm the first indications of a panmictic population; however, future studies with high-resolution markers at a finer scale could better support a migratory hypothesis in *V. carye* (SNP's, whole genome). Despite the lack of genetic evidence to support differentiated groups or populations in *V. carye*, geometric morphometric analyses were able to elucidate differences: on the one side, the Plain with elongated wing shapes, corresponding to the coastal and plain populations, where elongated wings allow better use of winds for a more efficient flight; on the other side, when the altitude pattern was observed, both the anterior and posterior wings tended to have more globular configuration of landmarks at higher altitudes. The globular wings may provide better flight efficiency in higher altitude sectors where winds are stronger, among other environments, since this trait is common in flying migratory species (Flockhart et al., 2017; Lockwood et al., 1998; Lyons et al., 2012). Finally, it was observed that specimens analyzed at higher altitudes have less pronounced wing margins, which may prevent rapid wing deterioration due to strong winds. More pronounced margins could allow them to take advantage of coastal winds efficiently. There are several studies of aerodynamics on butterflies (Bode-Oke and Dong, 2020; Sane, 2003); however, these do not evaluate differences in wing margins within the same species.

Our results use two morphological approaches to answer the question of shape variation, a first an preliminary observation of the wing shape using a PCA where shape was noticed to not change very much between groups, PCA do not incorporate any statistical approach

to find differences between groups, nevertheless is the main analysis of geometric morphometrics to identify shape differences and variation between analyzed groups, on the contrary the CVA use a discriminant function to use the maximum variation of the a priori selected groups to use this maximum variation to create the discrimination axes of the CVA (Campbell and Atchley, 1981; Klingenberg and Monteiro, 2005), analysis that allowed us to identify the geographical groups.

With the results observed in the CVA, we could consider the possibility of the existence of two routes, a "coastal" and the one in the "altiplano", although the general morphology of analyzed samples has almost no changes. The coastal route may correspond to the Plain and the altiplano route may correspond to the Altiplano + High Mountain groups. Our results are coincident with *Danaus plexippus*, which presents two lineages and routes with morphological differentiation in their forewings (Lyons et al., 2012).

Studies associated with the distribution of *V. carye* (Benítez et al., 2019) show that this species can fly without apparent problems at the highest recorded altitude of the genus at 5200 m.a.s.l (possibly up to 6000 m.a.s.l), surpassing *V. atalanta* that has been recorded at 3000 m.a.s.l. Therefore, this study marks the first precedent of migratory tendency in *V. carye* for the altiplanic zone of northern Chile, providing the first indications of genetic panmixia of a large and broad altiplanic population. Geometric morphometrics has rarely been used as a tool to evaluate migration in insects and this work is the first to quantify the wing shape for a nominal migratory species of Lepidoptera. Finally, in the genus *Vanessa* globally, migratory species have not recorded morphological or genetic differences for different migratory routes, so *V. carye* would be the first species of the genus with results that could confirm two distinct migratory routes. Future studies are required where genomic and stable isotope approaches, plus the breadth of the geographic range are combined to confirm with certainty the migratory behavior of the butterfly species of the genus *Vanessa* with the widest South American distribution.

Acknowledgments

This research was funded by Fondecyt de Iniciación, ANID grant n° 11180366. MAV thanks FONDECYT Postdoctorado 3220352. This work was partly funded also by ANID – Millennium Science Initiative Program – ICN2021_002.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- Abbasi, R., Marcus, J., 2015. Colour pattern homology and evolution in *Vanessa* butterflies (Nymphalidae: Nymphalini): eyespot characters. *Journal of Evolutionary Biology* 28, 2009-2026.
- Adams, D.C., Funk, D.J., 1997. Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles: Multivariate applications of the thin-plate spline. *Systematic Biology* 46, 180-194.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E., 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology* 71, 5-16.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E., 2013. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix-Italian Journal of Mammalogy* 24, 7-14.
- Altizer, S., Davis, A.K., 2010. Populations of monarch butterflies with different migratory behaviors show divergence in wing morphology. *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 64, 1018-1028.
- Alvial, I., Vargas, H., Marinov, M., Esquivel, C., Araya, J., Araya-Donoso, R., Vila, I., Véliz, D., 2019. Isolation on a remote island: genetic and morphological differentiation of a cosmopolitan odonate. *Heredity* 122, 893-905.

- Arif, I., Khan, H., 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal biodiversity and conservation* 32, 9-17.
- Arnqvist, G., Martensson, T., 1998. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 44, 73-96.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16, 37-48.
- Benítez, H.A., 2013. Sexual dimorphism using geometric morphometric approach. *Sexual Dimorphism*, 35-50.
- Benítez, H.A., Püschel, T.A., Suazo, M.J., 2022. Drosophila Wing Integration and Modularity: A Multi-Level Approach to Understand the History of Morphological Structures. *Biology* 11, 567.
- Benítez, H.A., Villalobos-Leiva, A., Ordenes, R., Cruz-Jofré, F., 2019. Elevational record of *Vanessa carye* (Hübner 1812)(Lepidoptera Nymphalidae) in the northern Chilean Altiplano Highlands. *Nota Lepidopterologica* 42, 157.
- Bensch, S., Andersson, T., Akesson, S., 1999. Morphological and Molecular Variation across a Migratory Divide in Willow Warblers, *Phylloscopus trochilus*. *Evolution*, 1925-1935.
- Bode-Oke, A.T., Dong, H., 2020. The reverse flight of a monarch butterfly (*Danaus plexippus*) is characterized by a weight-supporting upstroke and postural changes. *Journal of the Royal Society Interface* 17, 20200268.
- Bravi, R., Benítez, H.A., 2013. Left-right asymmetries and shape analysis on *Ceroglossus chilensis* (Coleoptera: Carabidae). *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* 52, 57-62.
- Campbell, N.A., Atchley, W.R., 1981. The Geometry of Canonical Variate Analysis. *Systematic Zoology* 30, 268-280.
- Chapman, J.W., Reynolds, D.R., Wilson, K., 2015. Long-range seasonal migration in insects: mechanisms, evolutionary drivers and ecological consequences. *Ecology letters* 18, 287-302.

Chazot, N., Panara, S., Zilbermann, N., Blandin, P., Le Poul, Y., Cornette, R., Elias, M., Debat, V., 2016. Morpho morphometrics: shared ancestry and selection drive the evolution of wing size and shape in Morpho butterflies. *Evolution* 70, 181-194.

Cruz-Jofré, F., Morales, P., Vila, I., Esquer-Garrigos, Y., Hugueny, B., Gaubert, P., Poulin, E., Méndez, M.A., 2016. Geographical isolation and genetic differentiation: the case of *Orestias ascotanensis* (Teleostei: Cyprinodontidae), an Andean killifish inhabiting a highland salt pan. *Biological journal of the Linnean Society* 117, 747-759.

Excoffier, L., Lischer, H.E., 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10, 564-567.

Flockhart, D.T., Fitz-Gerald, B., Brower, L.P., Derbyshire, R., Altizer, S., Hobson, K.A., Wassenaar, L.I., Norris, D.R., 2017. Migration distance as a selective episode for wing morphology in a migratory insect. *Movement ecology* 5, 1-9.

Fruciano, C., 2016. Measurement error in geometric morphometrics. *Dev Genes Evol* 226.

Gallardo, C.E., Hernandez, H.J., Diniz Filho, J.A.F., Palma, R.E., Mendez, M.A., 2011. Relationship between the genetic structure of the andean toad *Rhinella spinulosa* (Anura: Bufonidae) and the northern Chile landscape.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, Nucleic acids symposium series. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., pp. 95-98.

Huang, S.-T., Wang, H.-R., Yang, W.-Q., Si, Y.-C., Wang, Y.-T., Sun, M.-L., Qi, X., Bai, Y., 2020. Phylogeny of Libellulidae (Odonata: Anisoptera): comparison of molecular and morphology-based phylogenies based on wing morphology and migration. *PeerJ* 8, e8567.

Jantzen, B., Eisner, T., 2008. Hindwings are unnecessary for flight but essential for execution of normal evasive flight in Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16636-16640.

Karl, I., Fischer, K., 2009. Altitudinal and environmental variation in lifespan in the Copper butterfly *Lycaena tityrus*. *Functional Ecology* 23, 1132-1138.

- Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11, 353-357.
- Klingenberg, C.P., Debat, V., Roff, D.A., 2010. Quantitative genetics of shape in cricket wings: Developmental integration in a functional structure. *Evolution* 64, 2935-2951.
- Klingenberg, C.P., McIntyre, G.S., Zaklan, S.D., 1998. Left-right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 265, 1255-1259.
- Klingenberg, C.P., Monteiro, L.R., 2005. Distances and directions in multidimensional shape spaces: Implications for morphometric applications. *Systematic Biology* 54, 678-688.
- Le Roy, C., Debat, V., Llaurens, V., 2019. Adaptive evolution of butterfly wing shape: from morphology to behaviour. *Biological Reviews* 94, 1261-1281.
- Leigh, J.W., Bryant, D., 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6, 1110-1116.
- Lockwood, R., Swaddle, J.P., Rayner, J.M., 1998. Avian wingtip shape reconsidered: wingtip shape indices and morphological adaptations to migration. *Journal of Avian Biology*, 273-292.
- Lyons, J.I., Pierce, A.A., Barribeau, S.M., Sternberg, E.D., Mongue, A.J., De Roode, J.C., 2012. Lack of genetic differentiation between monarch butterflies with divergent migration destinations. *Molecular Ecology* 21, 3433-3444.
- Mikkola, K., 2003. Red admirals *Vanessa atalanta* (Lepidoptera: Nymphalidae) select northern winds on southward migration. *Entomologica Fennica* 14, 15–24-15–24.
- Montejo-Kovacevich, G., Meier, J.I., Bacquet, C.N., Warren, I.A., Chan, Y.F., Kucka, M., Salazar, C., Rueda-M, N., Montgomery, S.H., McMillan, W.O., 2022. Repeated genetic adaptation to altitude in two tropical butterflies. *Nature Communications* 13, 1-16.
- Morrone, J.J., 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782, 1-110.
- Morrone, J.J., 2015. Biogeographical regionalisation of the Andean region. *Zootaxa* 3936, 207–236-207–236.

- Muñoz-Valencia, V., Vélez-Martínez, G.A., Montoya-Lerma, J., Díaz, F., 2022. Role of the Andean uplift as an asymmetrical barrier to gene flow in the neotropical leaf-cutting ant *Atta cephalotes*. *Biotropica* 54, 191-204.
- Nesbit, R., Hill, J., Woiwod, I., Sivell, D., Bensusan, K., Chapman, J., 2009. Seasonally adaptive migratory headings mediated by a sun compass in the painted lady butterfly, *Vanessa cardui*. *Animal Behaviour* 78, 1119-1125.
- Neto, J.M., Gordinho, L., Belda, E.J., Marín, M., Monrós, J.S., Fearon, P., Crates, R., 2013. Phenotypic divergence among West European populations of reed bunting *Emberiza schoeniclus*: the effects of migratory and foraging behaviours. *PloS one* 8, e63248.
- Outomuro, D., Johansson, F., 2019. Wing morphology and migration status, but not body size, habitat or Rapoport's rule predict range size in North-American dragonflies (Odonata: Libellulidae). *Ecography* 42, 309-320.
- Outomuro, D., Soderquist, L., Nilsson-Ortman, V., Cortazar-Chinarro, M., Lundgren, C., Johansson, F., 2016. Antagonistic natural and sexual selection on wing shape in a scrambling damselfly. *Evolution* 70, 1582-1595.
- Owens, H., Lewis, D., Condamine, F.L., Kawahara, A., Guralnick, R., 2020. Comparative phylogenetics of *Papilio* butterfly wing shape and size demonstrates independent hindwing and forewing evolution. *Systematic biology* 69, 813-819.
- Padró, J., Lambertucci, S.A., Perrig, P.L., Pauli, J.N., 2018. Evidence of genetic structure in a wide-ranging and highly mobile soaring scavenger, the Andean condor. *Diversity and Distributions* 24, 1534-1544.
- Palma, R.E., Rivera-Milla, E., Salazar-Bravo, J., Torres-Pérez, F., Pardiñas, U.F., Marquet, P.A., Spotorno, A.E., Meynard, A.P., Yates, T.L., 2005. Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate south America. *Journal of Mammalogy* 86, 191-200.
- Pezzoli, M.C., Guerra, D., Giorgi, G., Garoia, F., Cavicchi, S., 1997. Developmental constraints and wing shape variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 79, 572-577.

Pretorius, E., 2005. Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera - a case study based on the genus *Tachysphex* Kohl (Hymenoptera : Sphecidae : Larrinae). *Australian Journal of Entomology* 44, 113-121.

Rohlf, F.J., 2013. TPSdig, v. 2.17. . State University at Stony Brook. , NY

Rohlf, F.J., Loy, A., Corti, M., 1996. Morphometric analysis of old world talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores. *Systematic Biology* 45, 344-362.

Rohlf, F.J., Slice, D., 1990. Extensions of the Procrustes methods for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39, 40-59.

Rojas, P., Scott, S., Tobar, I., Romero, Ú., Vila, I., 2020. Head morphometry of Orestias (Cyprinodontiformes). Response to extreme southern Altiplano systems? *Environmental Biology of Fishes* 103, 953-964.

Rozas, J., Librado, P., Sanchez-Del Barrlo, J., Messeguer, X., Rozas, R., 2009. DnaSP version 5 help contents. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.

Russell, A.L., Medellín, R.A., McCracken, G., 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology* 14, 2207-2222.

Sane, S.P., 2003. The aerodynamics of insect flight. *Journal of experimental biology* 206, 4191-4208.

Shapiro, A.M., Geiger, H., 1989. Electrophoretic comparisons of vicariant Vanessa: genetic differentiation between *V. annabella* and *V. carye* (Nymphalidae) since the Great American Interchange. *Journal of the Lepidopterists' Society* 43, 81-92.

Shields, O., 1992. World distribution of the *Vanessa cardui* group (Nymphalidae). *Journal of the Lepidopterists' Society* 46, 235-238.

Stefanescu, C., 2001. The nature of migration in the red admiral butterfly *Vanessa atalanta*: evidence from the population ecology in its southern range. *Ecological Entomology* 26, 525-536.

Stefanescu, C., Páramo, F., Åkesson, S., Alarcón, M., Ávila, A., Brereton, T., Carnicer, J., Cassar, L.F., Fox, R., Heliölä, J., 2013. Multi-generational long-distance migration of

insects: studying the painted lady butterfly in the Western Palaearctic. *Ecography* 36, 474-486.

Stefanescu, C., Soto, D.X., Talavera, G., Vila, R., Hobson, K.A., 2016. Long-distance autumn migration across the Sahara by painted lady butterflies: exploiting resource pulses in the tropical savannah. *Biology letters* 12, 20160561.

Stefanescu, C., Ubach, A., Wiklund, C., 2021. Timing of mating, reproductive status and resource availability in relation to migration in the painted lady butterfly. *Animal Behaviour* 172, 145-153.

Strecker, M., Alonso, R., Bookhagen, B., Carrapa, B., Hilley, G., Sobel, E., Trauth, M., 2007. Tectonics and climate of the southern central Andes. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 35, 747-787.

Suchan, T., Talavera, G., Sáez, L., Ronikier, M., Vila, R., 2019. Pollen metabarcoding as a tool for tracking long-distance insect migrations. *Molecular Ecology Resources* 19, 149-162.

Talavera, G., Vila, R., 2017. Discovery of mass migration and breeding of the painted lady butterfly *Vanessa cardui* in the Sub-Saharan: the Europe–Africa migration revisited. *Biological Journal of the Linnean Society* 120, 274-285.

Taylor-Cox, E.D., Macgregor, C.J., Corthine, A., Hill, J.K., Hodgson, J.A., Saccheri, I.J., 2020. Wing morphological responses to latitude and colonisation in a range expanding butterfly. *PeerJ* 8, e10352.

Valladares, M.A., Fabres, A.A., Collado, G.A., Sáez, P.A., Méndez, M.A., 2022. Coping With Dynamism: Phylogenetics and Phylogeographic Analyses Reveal Cryptic Diversity in *Heleobia* Snails of Atacama Saltpan, Chile. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10, 869626.

Valladares, M.A., Méndez, M.A., Collado, G.A., 2018. Influenced but not determined by historical events: genetic, demographic and morphological differentiation in *Heleobia ascotanensis* from the Chilean Altiplano. *PeerJ* 6, e5802.

Vargas, H.A., 2013. Primer registro de *Vanessa braziliensis* (Moore)(Lepidoptera: Nymphalidae) en Chile. *Gayana (Concepción)* 77, 171-173.

Vila, I., Morales, P., Scott, S., Poulin, E., Véliz, D., Harrod, C., Méndez, M., 2013. Phylogenetic and phylogeographic analysis of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae) in the southern Chilean Altiplano: the relevance of ancient and recent divergence processes in speciation. *Journal of Fish Biology* 82, 927-943.

Wahlberg, N., Rubinoff, D., 2011. Vagility across *Vanessa* (Lepidoptera: Nymphalidae): mobility in butterfly species does not inhibit the formation and persistence of isolated sister taxa. *Systematic Entomology* 36, 362-370.

Zúñiga-Reinoso, A., Ritter, B., Predel, R., 2021. The colonization of the Puna and Atacama Biogeographic Province by sister clades of *Psectrascelis* (Coleoptera: Tenebrionidae): Synchronous expansion without spatial overlap. *Journal of Biogeography* 48, 1930-1940.

Figure and Table legends

Figure 1: Map of the *Vanessa carye* sampling localities: Map A represents all the points of samples taken for this study, Map B represents samples from a section of the Chilean Altiplano until 5200 m.a.s.l.

Figure 2: Graphical representation of the Anterior (left) and posterior (right) wings of *Vanessa carye* with 16 and 15 landmarks correspondingly.

Figure 3. Haplotype network using the mitochondrial COI gene according to altitudinal zones in the Altiplano.

Figure 4. Principal Component analysis (PCA) for A) anterior and B) posterior wing determined by geographical areas. The point colors indicate the geographical areas where they belong (Table 1); Blue: Plain (1500 m), Green: Altiplano (4535 m), and Brown: High Mountain (5200 m).

Figure 5: Canonical variate analysis (CVA) for A) anterior and B) posterior wing determined by geographical areas. The point colors indicate the geographical areas; Blue: Plain (1500 m), Green: Altiplano (4535 m), and Brown: High Mountain (5200 m).

Figure 6: Wing Average Shape between geographical area; A: Anterior Wing, B: Posterior Wing, the colors indicate the geographical area; Blue: Plain (1500 m) Green: Altiplano (4535 m), and Brown: High Mountain (5200 m).

Table 1. Sampling sites and their geographical classification (Plain: Plai, Altiplano: Alti, High Mountain: Mont).

Region	Locality	Altitude (masl)	Geographical classification
Arica_y	Azapa	270	Plai
Parinacota	Codpa	1865	Alti
	Timar	2365	Alti
	Socoroma	3073	Alti
	Ticnamar	3250	Alti
	Belén	3267	Alti
	Chapiquiña	3311-3365	Alti
	Murmutani	3535	Alti
	Putre	3544-4000	Alti
	Misitune	4500	Mont
	Lago Chungará	4535	Mont
	Laguna Sorapata	5200	Mont
Tarapacá	Iquique	0-110	Plai
	Huara	1100	Plai
	Tarapacá	1397	Plai
	Chusmiza	3279	Alti
	Quebrada		Alti
	Copaquilla	3350	
	Enquelga	3943	Alti

Figure 1

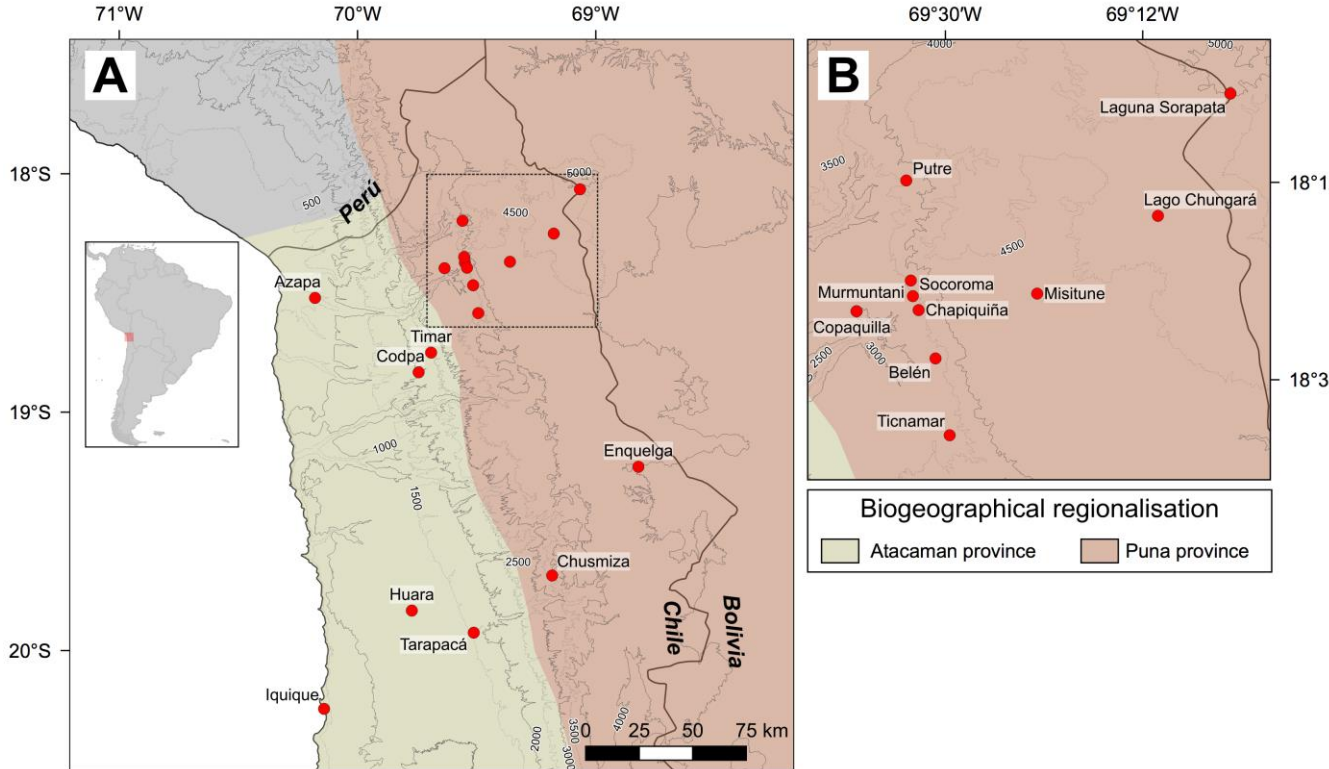


Figure 2

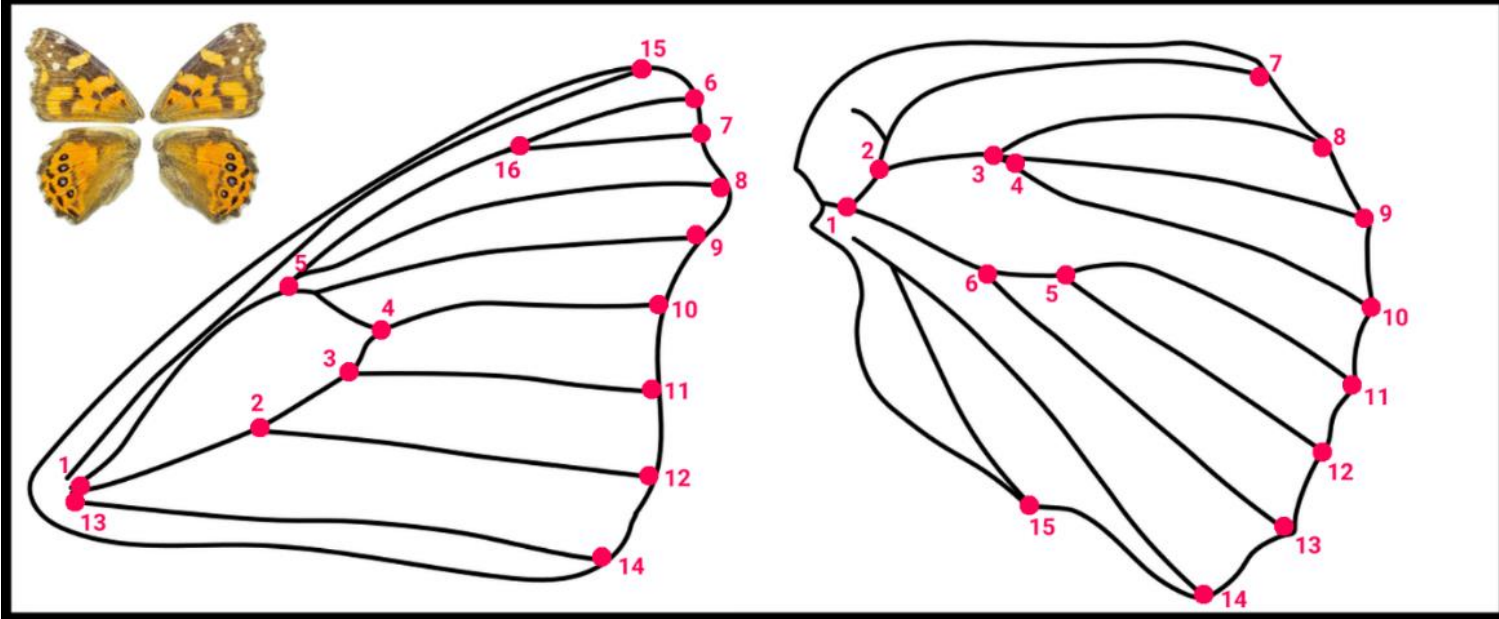


Figure 3

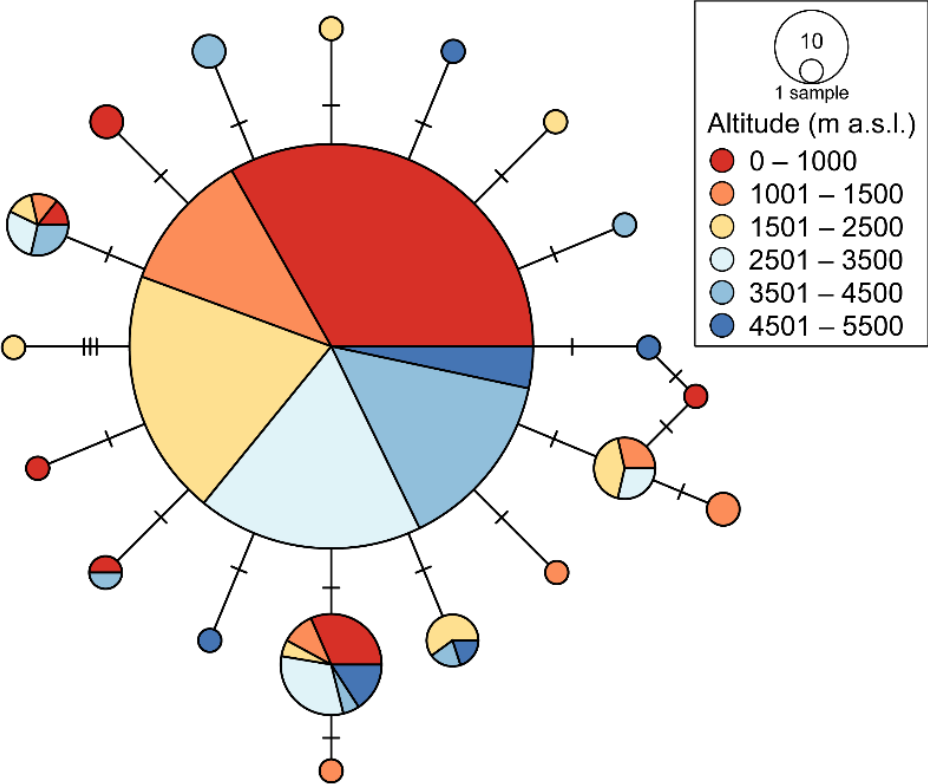


Figure 4

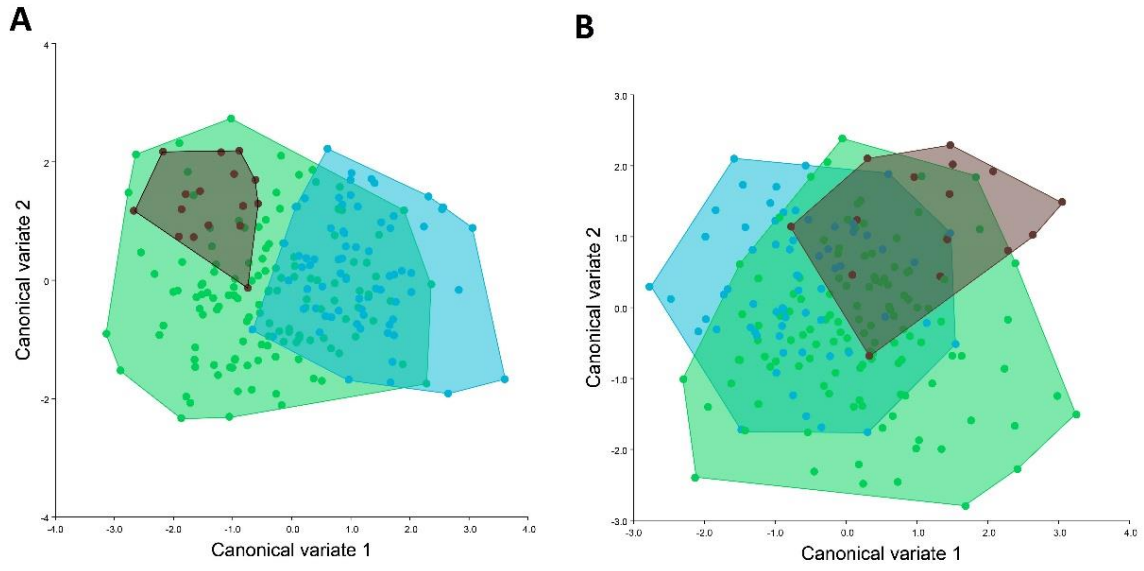


Figure 5

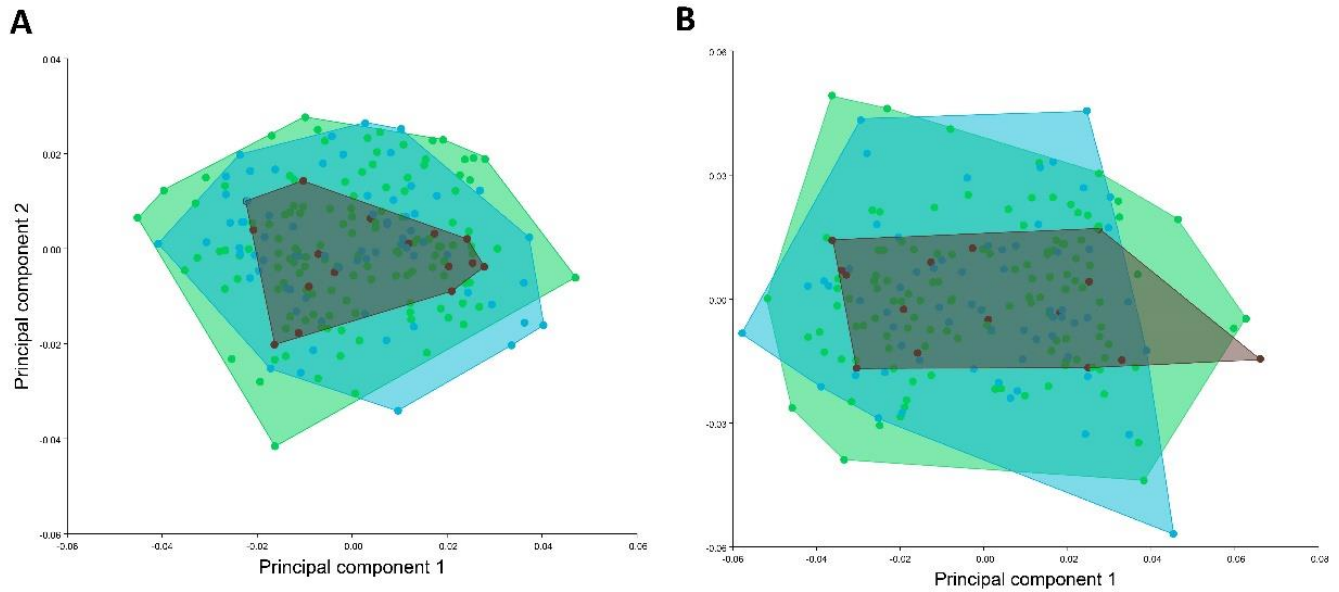


Figure 6

