



Universidad del Valle

APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA EN LA DIFERENCIACIÓN DEL TAMAÑO Y LA FORMA DE CONCHAS DE CARACOL MARINOS *Plicopurpura pansa* (Gould 1853) Y *Plicopurpura patula* (Linneo 1758).

DIEGO FERNANDO PARRA CARRILLO

Director: Jaime Ricardo Cantera K. PhD. Oceanología.

Programa: Maestría en Ciencias - Biología.

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

Santiago de Cali, 2 de Enero de 2013.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	2
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRAC	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Características taxonómicas y ecológicas.....	17
2.2 Conceptos de morfometría geométrica	19
2.3 Aplicación de la morfometría geométrica en biología	24
2.4 Estudios morfológicos en el género <i>Plicopurpura</i>	26
2.4.1 Tamaño de las conchas.....	26
2.4.2 Forma de las conchas	28
3. OBJETIVOS	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1 Localización y muestreo.....	37
4.2 Adquisición de las imágenes	42
4.3 Elección de los hitos morfológicos	42
4.4 Método de superposición	45
4.5 Estudio del tamaño de las conchas	46
4.6 Estudio Alométrico	47
4.7 Normalización del tamaño de las conchas	47
4.8 Estudio de la forma de las conchas	48
5. RESULTADOS	50
5.1 Prueba para validar la precisión en la ubicación de los hitos	50
5.2 Tamaño de las conchas	51
5.2.1 Diferencias en el tamaño de las conchas	52

5.2.2 Tamaño de las conchas según morfometría tradicional	55
5.3 Pruebas alométricas	59
5.4 Estudio intrapoblacional de la forma	63
5.5 Estudio interpoblacional de la forma	72
5.5.1 Diferencias en la forma de las conchas	77
5.6 Visualización gráfica de las diferencias de forma	78
5.7 Clasificación de especímenes desconocidos (colección Univalle)	83
6. DISCUSIÓN	87
7. CONCLUSIONES.....	92
8. AGRADECIMIENTOS	95
9. LITERATURA CITADA.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Individuos género <i>Plicopurpura</i>	13
Figura 2. Comparación de las rádulas de <i>Plicopurpura</i>	14
Figura 3. Enfoque morfométrico tradicional	20
Figura 4. Enfoque morfometría geométrica	20
Figura 5. Especímenes de dos ecotipos de <i>Littorina saxatilis</i>	25
Figura 6. Descripción geométrica del cálculo del tamaño	27
Figura 7. Comparación de las especies del género <i>Plicopurpura</i>	29
Figura 8. Comparación de las especies del género <i>Púrpura</i>	31
Figura 9. PCA sobre 276 individuos de <i>P. pansa</i>	32
Figura 10. Diagnóstico morfológico de <i>P. pansa</i> y <i>P. columellaris</i>	33
Figura 11. Localización de los sitios de muestreo	38
Figura 12. Fotografías de los sitios de muestreo	40
Figura 13. Ubicación de 21 hitos morfológicos	45
Figura 14. Box plot tamaño de las conchas	52
Figura 15. Box plot tamaño de las conchas (Pacífico – Caribe)	54
Figura 16. Pruebas formales para validar normalidad	55
Figura 17. Box plot tamaño de las conchas enfoque tradicional	57
Figura 18. Box plot (Pacífico – Caribe) enfoque tradicional	58
Figura 19. Regresión multivariada (La Mancora)	59
Figura 20. Regresión multivariada (La Ventana)	60
Figura 21. Regresión multivariada (Tolú)	60
Figura 22. Regresión multivariada (Boquetillo).....	61
Figura 23. Regresión multivariada (Bocagrande)	61
Figura 24. Regresión multivariada (Barú).....	62
Figura 25. Superposición de hitos morfológicos (Isla Palma).....	63
Figura 26. Análisis de componentes principales (Isla Palma)	64
Figura 27. Superposición de hitos morfológicos (La Mancora).....	64
Figura 28. Análisis de componentes principales (La Mancora)	65

Figura 29. Superposición de hitos morfológicos (La Ventana)	65
Figura 30. Análisis de componentes principales (La Ventana).....	66
Figura 31. Superposición de hitos morfológicos (Arboletes)	66
Figura 32. Análisis de componentes principales (Arboletes).....	67
Figura 33. Superposición de hitos morfológicos (Tolú).....	67
Figura 34. Análisis de componentes principales (Tolú)	68
Figura 35. Superposición de hitos morfológicos (Boquetillo).....	68
Figura 36. Análisis de componentes principales (Boquetillo)	69
Figura 37. Superposición de hitos morfológicos (Bocagrande)	69
Figura 38. Análisis de componentes principales (Bocagrande).....	70
Figura 39. Superposición de hitos morfológicos (Barú).....	70
Figura 40. Análisis de componentes principales (Barú)	71
Figura 41. Análisis canónico sin normalización	73
Figura 42. Análisis canónico con normalización	75
Figura 43. Visualización gráfica de la forma (Isla Palma).....	78
Figura 44. Visualización gráfica de la forma (La Mancora).....	79
Figura 45. Visualización gráfica de la forma (La Ventana)	79
Figura 46. Visualización gráfica de la forma (Arboletes)	80
Figura 47. Visualización gráfica de la forma (Tolú)	80
Figura 48. Visualización gráfica de la forma (Boquetillo).....	81
Figura 49. Visualización gráfica de la forma (Bocagrande)	81
Figura 50. Visualización gráfica de la forma (Barú).....	82
Figura 51. Visualización gráfica de la forma (poblaciones Colombianas).....	82
Figura 52. Superposición de hitos morfológicos (Pacífico – Caribe)	84
Figura 53. Clasificación de especímenes desconocidos	86
Figura 54. Morfotipos de <i>P. patula</i> en Barú	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño promedio de las conchas de <i>P. Pansa</i>	27
Tabla 2. Coordenadas geográficas de las poblaciones muestreadas	37
Tabla 3. Errores estándar en la ubicación de los hitos morfológicos	50
Tabla 4. Estadística descriptiva del tamaño de las conchas	51
Tabla 5. Anova para validar diferencias de tamaño	53
Tabla 6. Post - Anova para validar diferencias de tamaño	53
Tabla 7. Prueba T para validar diferencias de tamaño (Caribe – pacífico)	54
Tabla 8. Tamaño promedio de las conchas enfoque tradicional	56
Tabla 9. Prueba de Mann – Whitney para validar diferencias en el tamaño	57
Tabla 10. Matriz de agrupamiento sin normalización	74
Tabla 11. Matriz de agrupamiento con normalización	76
Tabla 12. Manova no paramétrico para validar diferencias en la forma	77
Tabla 13. Matriz de agrupamiento con normalización (Pacífico – Caribe)	85
Tabla 14. Prueba F para validar diferencias en la forma (Pacífico – Caribe).....	85
Tabla 15. Matriz de agrupamiento con individuos desconocidos	86

RESUMEN

Por medio de técnicas de morfometría geométrica se obtuvieron variables asociadas al tamaño y la forma de las conchas de los caracoles marinos *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula*. La finalidad del estudio fue validar o descartar diferencias en el tamaño y la forma de las conchas de dichas especies. En total se analizaron 385 individuos correspondientes a dos localidades del Pacífico y cuatro del Caribe Colombiano. La morfometría geométrica resultó ser una técnica accesible y efectiva para encontrar diferencias estadísticas significativas en el tamaño y la forma de las conchas de las dos especies. Se encontró que las conchas de *P. pansa* son significativamente más grandes que las de *P. patula*, la causa podría ser el fenómeno de surgencia que ocurre con mayor intensidad en la cuenca del Pacífico y que conlleva a una mayor productividad. Sin embargo, se requieren estudios para validar esta hipótesis. En relación con la forma de las conchas, también se encontraron diferencias significativas entre las dos especies. Sin embargo, estas diferencias no se pueden identificar a simple vista, se necesitó de un análisis canónico multivariado, acompañado de técnicas morfogeométricas. Este resultado coincide con la definición de especies gemelas o crípticas. En ambas especies se encontró una relación directa entre la forma y el tamaño de las conchas (Alometría) y dos morfotipos posiblemente asociados con el grado de exposición al oleaje. Se sugiere realizar comparaciones a nivel molecular y pruebas de cruzamiento para validar aislamiento reproductivo y afirmar con certeza que *P. pansa* y *P. patula* son dos especies biológicas reales.

Palabras clave: *Plicopurpura*, Alometría, Especies crípticas, Istmo de Panamá, métodos de ordenamiento estadístico.

ABSTRAC

By means of geometric morphometric techniques were obtained variables associated with the size and shape of the shells of sea snails *Plicopurpura pansa* and *Plicopurpura patula*. The purpose of the study was to confirm or reject differences in the size and shape of the shells of these species. A total of 385 individuals were analyzed for two Pacific and four Caribbean Colombian Locations. Geometric morphometrics was an accessible and effective technique to find statistically significant differences in the size and shape of the two species. It was found that the shells of *P. pansa* are significant bigger than *P. patula*, the cause could be the upwelling that occurs with greater intensity in the Pacific basin and leading to higher productivity. However, further studies are required in order to validate this hipotesis. Regarding the form of shells, also was found significant differences between the two species. However, these differences can not be identified with the naked eye, was needed a multivariate canonical analysis, accompanied by Geometric morphometrics techniques. This result agrees with the definition of sibling species or cryptic species. In both species, we found a direct relationship between the shape and size of the shells (allometry) and two morphotypes possibly associated with the degree of wave exposure. It was suggests comparisons at the molecular level and mating tests to validate reproductive isolation to affirm certainty that *P. pansa* and *P. patula* are two real biological species.

Key words: *Plicopurpura*, Allometry, Cryptic species, Isthmus of Panama, statistical ordination methods.

1. INTRODUCCION

La diferenciación o delimitación de una especie biológica no es tarea fácil, especialmente cuando las diferencias morfológicas no se presentan o son tan sutiles que no se observan a simple vista. Este es el caso de las especies crípticas o especies gemelas que ocurren en menor o mayor frecuencia en casi todos los grupos de organismos vivos como protozoos, artrópodos, mamíferos, peces y aves (Sonneborn 1975, Palopoli y Wu 1994, Res 2002, Marsh et al. 1981, Mayr 1996).

Las especies gemelas o crípticas son comunes en la mayoría de grupos y hábitats marinos, su abundancia refleja un inadecuado estudio de las características morfológicas de los organismos (pseudo - especies gemelas) o divergencia en hábitats, historias de vida, estrategias de apareamiento sin divergencia morfológica (Knowlton 1993).

Hay un número de procesos evolutivos que dificultan la delimitación de una especie. La evolución en mosaico es el más importante de ellos, esto significa que ciertos caracteres pueden evolucionar mucho más rápido que otros; generando que el aislamiento reproductivo y las diferencias morfológicas, a menudo no

evolucioneen paralelamente. Esta es la razón por la cual existen las especies gemelas, ellas están reproductivamente aisladas pero morfológicamente permanecen indistinguibles (Mayr 1996).

Teniendo en cuenta lo complejo que resulta la delimitación de una especie biológica, el ornitólogo Ernst Mayr (1970) aconsejó recolectar la mayor cantidad de información disponible con el fin de inferir el grado de aislamiento reproductivo. Además, planteó que simultáneamente deben realizarse investigaciones que profundicen los aspectos morfológicos, geográficos, etológicos y moleculares.

La pregunta que surge en este estudio, como consecuencia de la revisión del concepto biológico de especie (Mayr 1963), está relacionada con la dificultad de diferenciar a simple vista las conchas de dos especies de caracoles marinos de la familia Muricidae: *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula*. Especies que se encuentran aisladas reproductivamente por la barrera geográfica que impone el istmo de Panamá (Lessios 2008).

Plicopurpura patula y *plicopurpura pansa*, son gasterópodos, depredadores de la zona intermareal, comunes sobre sustratos duros de las costas e islas del mar Caribe y Pacífico, respectivamente. El límite geográfico al norte para la especie *P. pansa* es Baja California y hacia el sur se ha reportado en las costas del Perú,

Chile y las Islas Galápagos. En el caso de *P. patula* los reportes ubican sus límites desde las costas de Venezuela hasta Palm Beach Florida (Domínguez 2009). Las especies del género *Plicopurpura* han sido reportadas en las costas e islas colombianas, principalmente en Golfo de Cupica, Bahía Málaga e Isla Gorgona en el Pacífico y Tolú, Coveñas, Cartagena y el Parque Tayrona en el Caribe.

Sin embargo, la mayoría de estudios se han desarrollado en las costas de México, especialmente para la especie *P. pansa* (Acevedo y Hernández 1987, Turok 1988, Álvarez 1989, Castillo 1992, Ríos et al. 1994, Morfín et al. 2002, Naegel 2004). Hasta el momento este es el primer estudio que se realiza para el género en Colombia.

El género *Plicopurpura* lo conforman las dos especies involucradas en este estudio y una subespecie llamada *Plicopurpura pansa columellaris* (Fig. 1) que cohabita con *P. pansa* y se aparean generando descendientes totalmente fértiles (Wellington 1983). Por el contrario, a pesar de la enorme similitud morfológica que existe entre las conchas de *P. pansa* y *P. patula*, estas se consideran especies diferentes, ya que se encuentran aisladas geográficamente desde el surgimiento del istmo de Panamá y en teoría no existe ningún tipo de contacto entre sus poblaciones (Kool 1988).

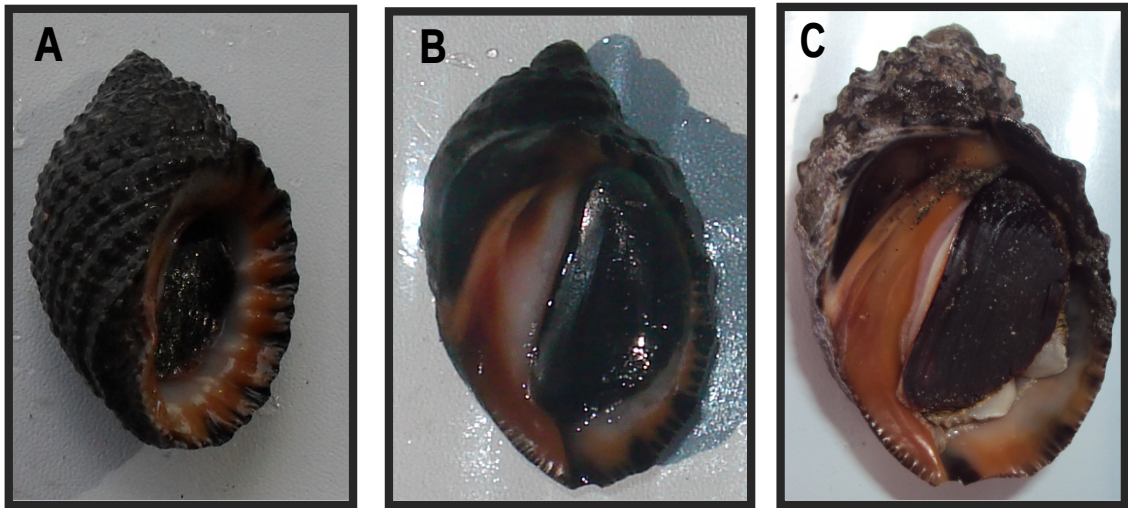


Figura 1. Individuos género *Plicopurpura*. (A) *P. pansa columellaris* (B) *P. pansa* (C) *P. patula*

Las especies pertenecientes al género *Plicopurpura* comparten ciertos caracteres taxonómicos que las agrupan dentro de un género diferente al género *Purpura*, estos caracteres son básicamente los siguientes: Diferencias morfológicas en la rádula (Fig. 2) y en la forma de las cápsulas que almacenan los huevos y a nivel anatómico, diferencias en las glándulas anexas al sistema digestivo y reproductivo. Estas diferencias se presentan en relación a la especie tipo *Purpura pérsica* que habita el Mar Rojo y el Océano Índico (Kool 1988).

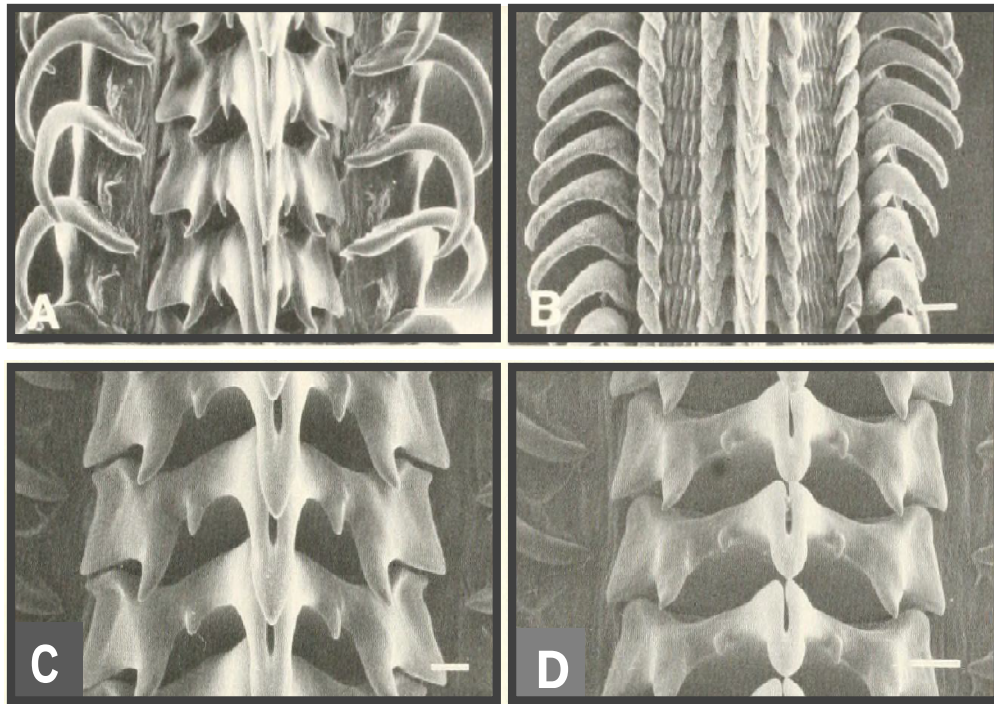


Figura 2. (A) Rádula de *Plicopurpura patula* (B) Rádula *Purpura pérsica*.
(C) Rádula de *Plicopurpura pansa* (D) Rádula *Plicopurpura pansa columellaris*. (Kool, 1988).

Diferencias en los caracteres conchiliológicos, radulares y estructura del tracto digestivo son indicadores para suponer divergencia específica entre *P. pansa*, *P. pansa columellaris* y *P. patula* (Castillo, 1992). Además, estudios citogenéticos realizados en especímenes de *P. pansa* y *P. pansa columellaris* encontraron diferencias en las longitudes relativas de los cromosomas, aunque comparten el mismo número cromosómico, $2n = 36$ (Arias et. al, 2007). Por lo tanto, los investigadores tienden a validar una posible divergencia específica, ubicando cada una de estas especies dentro de una unidad taxonómica propia.

Al observar la aparente similitud en el tamaño, forma de las conchas y otros caracteres de *P. patula* y *P. pansa* (Fig.1), surge la posibilidad de estar hablando de la misma especie; o de subespecies geográficamente aisladas en proceso de especiación. Sin embargo, por la dificultad que implica diferenciar estas especies a simple vista, la hipótesis que plantea esta investigación es que estamos ante un caso más de especies crípticas. Por consiguiente, se espera detectar diferencias morfológicas estadísticamente significativas, por medio de técnicas morfogeométricas. Otros métodos como evaluar el potencial reproductivo común mezclando individuos machos y hembras son muy difíciles de aplicar.

La finalidad de este estudio es probar de manera objetiva, por medio de técnicas de morfometría geométrica y pruebas estadísticas multivariadas, si existen o no diferencias significativas en el tamaño y forma de las conchas de estas especies. Las comparaciones morfométricas son el primer paso cuando se quiere diferenciar una especie; posteriormente, la ecología y los estudios moleculares completan el proceso de diferenciación siguiendo el modelo biológico de especie (Mayr 1970).

Encontrar diferencias a nivel morfométrico y poder discriminarlas estadísticamente es de gran utilidad en la identificación de especies fenotípicamente similares y de difícil reconocimiento. Además, puede contribuir en el diseño de futuros experimentos al reducir la inversión de tiempo y recursos económicos y en

algunos casos, evitar el sacrificio de individuos con fines de reconocimiento taxonómico.

2. ANTECEDENTES

En esta sección se presentan las características taxonómicas y ecológicas de las especies involucradas en este estudio, también se explican los fundamentos teóricos de la morfometría geométrica y sus aplicaciones en biología. Finalmente se presenta el estado actual de la investigación en el género *Plicopurpura* en relación al tamaño y la forma de las conchas.

2.1 CARACTERISTICAS TAXONÓMICAS Y ECOLÓGICAS

En el orden Neogastropoda se incluyen algunas especies de moluscos gasterópodos que se caracterizan por la secreción de un líquido que desde tiempo inmemorial se ha aprovechado para teñir productos textiles de color purpúreo (Castillo y Amezcua, 1992). En las costas Colombianas habitan tres especies del género *Plicopurpura* (Cossmann, 1903) conocidas como caracol morado o púrpura. Dos de ellas, *P. pansa* y *P. columellaris* habitan en el Pacífico y una de ellas *P. patula* en el mar Caribe (Arias et al., 2007).

Estos caracoles se encuentran comúnmente en sustratos rocosos expuestos al oleaje en la zona intermareal. Su máxima abundancia se observa en la franja superior y media del nivel mesolitoral donde muestran ciclos de actividad de períodos cortos relacionados con los cambios diurnos y del nivel de mareas

(Álvarez, 1989; León, 1989; Avilés et al., 1990). Son depredadores activos, se alimentan de invertebrados intermareales entre los que destacan los poliplacóforos (*Chiton* spp.) y otras especies de gasterópodos como *Nerita* spp. y *Littorina* spp. (Turok et al., 1988; Castillo y Amezcua, 1992).

En relación a la taxonomía, se llevó a cabo un estudio comparativo con base en las características de estructura radular y del tracto digestivo, entre la especie conocida como *Purpura pansa* (Gould, 1853) y las especies denominadas *Plicopurpura patula* (Linneo, 1758) y *Plicopurpura pansa columellaris* (Lamarck, 1816) propuestas por Kool en 1988 dentro del género *Plicopurpura*. Las tres especies se ajustan a un patrón morfológico afín en la estructura adaptativa de la concha, la rádula y el tracto digestivo. A pesar de esto, se encontraron diferencias básicas en: 1) talla y ornamentación de la concha; 2) altura de las cúspides laterales, los dentículos internos y hombros marginales con respecto a la cúspide central de la rádula y 3) tipo de conexión de las glándulas esofágicas y de Leiblein. Las tres especies muestran típicamente una hendidura conspicua en el diente central de la rádula (característica no observada en otras especies del género *Purpura*). Este carácter compartido y la similitud del tracto digestivo justifican que las tres especies se ubiquen en una sola unidad taxonómica. Se propuso la "nueva combinación" de la especie *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853), como se ha hecho con su gemela *Plicopurpura patula* (Linnaeus, 1758) y la subespecie con la que

cohabita y copula en las costas del Pacífico: *Plicopurpura pansa columellaris* (Lamarck, 1816).

2.2 CONCEPTOS DE MORFOMETRIA GEOMETRICA

El análisis del tamaño y la forma juega un papel importante para un gran número de estudios biológicos. Factores de tipo adaptativo, evolutivo o de desarrollo pueden generar diferencias en la forma o tamaño o en las relaciones entre las diferentes dimensiones con las que podemos estudiar el crecimiento de los organismos. Los conceptos de forma y tamaño basados en principios matemáticos contribuyeron enormemente al avance de la morfometría geométrica.

La forma se define como la información geométrica que permanece después de remover los efectos debidos a la posición, la escala y la rotación de un objeto (Bookstein, 1989). En morfometría geométrica, **el tamaño** se define como la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias entre cada hito morfológico y su centroide (Kendall, 1977).

Entre las ventajas más relevantes de la técnica de morfometría geométrica se encuentra la capacidad de representar detalladamente un objeto sin obviar ni redundar en sus medidas. Esto como consecuencia del manejo de **hitos morfológicos** representados en el plano cartesiano por parejas de coordenadas

(x, y), en contraposición a la morfometría tradicional, la cual se fundamenta en la medición de distancias lineales (Bookstein, 1991). Ver (Fig. 3 y 4).

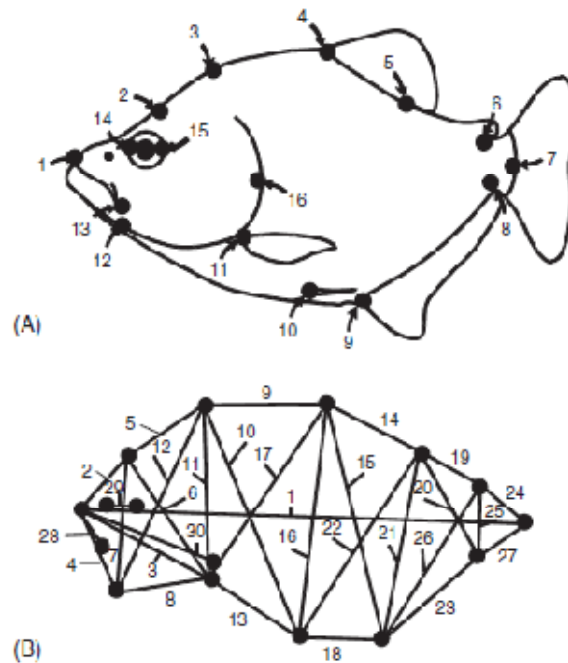


Figura 3. Enfoque morfométrico tradicional en un teleósteo **(A)** Definición de los puntos de medida. **(B)** Selección de 30 distancias en un enfoque tradicional (Zelditch et, al. 2004).

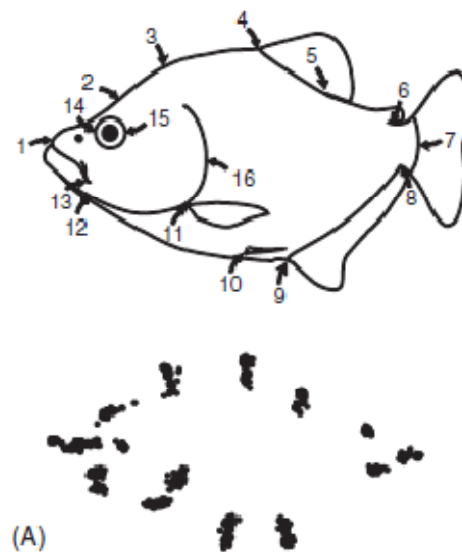


Figura 4. Enfoque morfometría geométrica. **(A)** Hitos morfológicos de todos los especímenes .

Un hito morfológico es un sitio anatómico discreto que puede ser localizado en todos los especímenes en estudio y en el mismo sitio. Idealmente, los hitos morfológicos deben cumplir ciertos requisitos: (1) la posición topológica no se debe alterar en relación a otros hitos morfológicos. (2) representar completamente la morfología de la población en estudio. (3) garantizar repetitividad y confiabilidad. (4) ser puntos coplanarios, es decir, que se encuentren en el mismo plano (Bookstein, 1985).

Como se mencionó con anterioridad, la definición del concepto de forma es uno de los aspectos más importantes en morfometría geométrica y por lo tanto es necesario remover los efectos de la posición, la escala y la rotación; con el fin de obtener una configuración de hitos morfológicos dependientes únicamente de la forma. Para esto existen varios métodos matemáticos, el más empleado y recomendado es el método de **Procrustes por mínimos cuadrados generalizado** (Rohlf, 1990), el cual se aplicó en este estudio.

El método de **Procrustes por mínimos cuadrados generalizado**, como todos los métodos de superposición busca remover toda la información que no tenga relación con la forma (posición, escala, rotación). La principal característica de este método es el criterio usado para minimizar las diferencias entre las configuraciones de puntos.

En resumen, el método de Procrustes por mínimos cuadrados consiste en:

1. Centrar cada configuración de hitos morfológicos en el origen, sustrayendo las coordenadas del centroide a cada uno de ellos. Así, se traslada cada centroide al origen y se reflejan las desviaciones de cada hito al centroide.
2. Escalar las configuraciones de hitos a un centroide de tamaño unitario, dividiendo cada coordenada de cada hito entre el centroide de la configuración.
3. Escoger una configuración de referencia, rotar una segunda configuración para minimizar la suma de cuadrados entre los hitos morfológicos entre configuraciones, en otras palabras, rotar la segunda configuración para minimizar las distancias parciales del Procrustes.

La ventaja más importante del método de Procrustes es su coherencia con la teoría matemática de la forma (Siegel y Benson, 1982). Las configuraciones de los hitos morfológicos se manipulan usando las tres operaciones que no alteran la definición de la forma. Las distancias calculadas entre configuraciones de puntos son distancias entre puntos en ciertos espacios o entre aproximaciones lineales de esos espacios. Las características de estas mediciones son bien conocidas

proporcionando fundamentos seguros y estables para un análisis biológico de la forma (Chapman, 1990).

Una de las principales desventajas es la generación de un número elevado de variables $2K$, donde K es el número de hitos morfológicos, lo cual es cuatro veces más el número de dimensiones del espacio generado por la forma (Bookstein, 1996). Afortunadamente este es un inconveniente que puede corregirse fácilmente. Una opción es convertir las coordenadas en unas variables conocidas como **puntuaciones de deformaciones parciales**, lo cual es consistente con el análisis, puesto que presentan las mismas unidades de medida.

Las deformaciones parciales son estructuras auxiliares para interpretar cambios o variaciones en la forma de las configuraciones de hitos morfológicos. Geométricamente son bases ortonormales de un espacio tangencial al espacio generado por la forma (Bookstein, 1989).

Otra opción es utilizar métodos de remuestreo estadístico, los cuales no están supeditados a los grados de libertad (Good, 1994). Otra opción es usar una prueba F de Goodall, específicamente adaptada a las coordenadas generadas por el método de Procrustes. En resumen, el exceso de variables no es un obstáculo para validar los análisis estadísticos.

2.3 APLICACIÓN DE LA MORFOMETRÍA GEOMÉTRICA EN BIOLOGÍA

La morfometría geométrica ha sido aplicada en menor o mayor frecuencia en casi todos los grupos de organismos vivos: moluscos, insectos, aves, reptiles, peces y mamíferos incluyendo humanos. (Wagner, 1995; Kingsolver y Wiernasz, 1991; Klingenberg et. al, 2001; Arnold y Phillips, 1999; Fink y Zelditch, 1995; Shea, 2002).

La técnica de morfometría geométrica basada en hitos morfológicos ha demostrado ser altamente efectiva cuando se desea capturar la información asociada con la forma de un organismo (Corti et. al, 1996; Hingst et. al, 2000). La efectividad de esta técnica radica en la capacidad de separar las variables asociadas a la forma y las asociadas al tamaño independientemente unas de otras. Para conseguir esta independencia de variables se debe combinar las técnicas morfométricas con procedimientos de análisis estadísticos multivariados (Houle et. al, 2002).

La aplicación de técnicas morfogeométricas en gasterópodos presenta ventajas por la facilidad de ubicar los hitos morfológicos en comparación con otros grupos taxonómicos (Caley, 1995). Esto sucede como consecuencia de la presencia de vértices, suturas y pliegues en las espiras que conforman las conchas (Bookstein, 1991; Stone, 1998; Guralnick y Kurpius, 2001).

Investigaciones basadas en morfometría geométrica en las costas de Escocia, Gales y España (Carvajal, et al. 2005; Conde, et al. 2007); lograron diferenciar por medio de un análisis discriminante canónico (96% confiabilidad), dos ecotipos de *Littorina saxatilis* asociadas a dos microhábitats distintos; uno de ellos expuesto a fuerte oleaje y el otro protegido de su acción (Fig. 5).

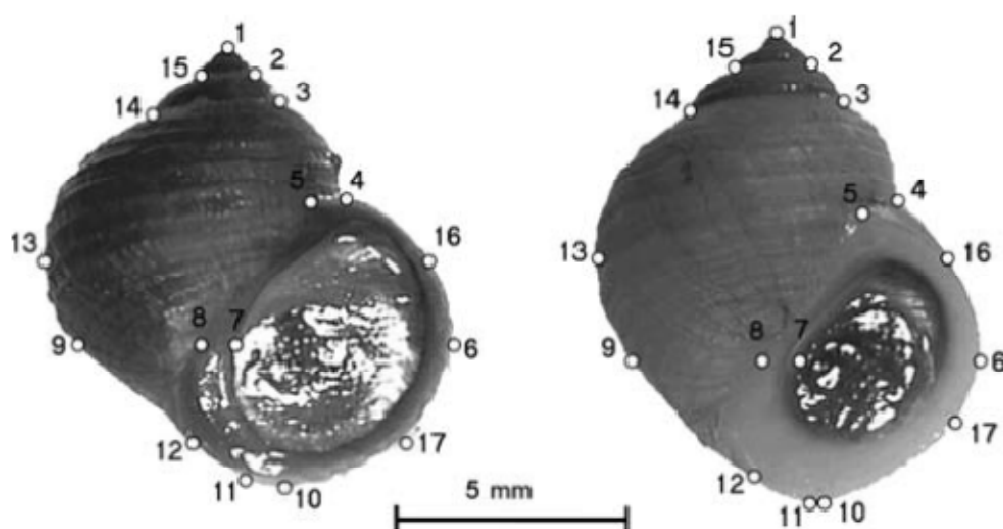


Figura 5. Especímenes representativos de dos ecotipos de *Littorina saxatilis*. Expuesto (izquierda), protegido (derecha). Se observan 17 puntos usados en el estudio morfogeométrico de la forma y el tamaño (Conde, et al. 2007).

Los investigadores concluyeron que los individuos sometidos a oleaje fuerte presentan conchas con aberturas grandes para asirse mejor al sustrato; por otro lado, los individuos presentes en zonas con poco oleaje muestran un patrón conquiliológico de abertura pequeña para evitar la desecación y ataque de depredadores (Ibíd.).

En conclusión, la morfometría geométrica es un método con un soporte conceptual, matemático y estadístico que permite detectar diferencias morfológicas sutiles a un bajo costo económico.

2.4 ESTUDIOS MORFOLOGICOS EN EL GENERO *PLICOPURPURA*

Generalmente, los estudios morfológicos involucran dos componentes. Ellos son: el tamaño y la forma. Siguiendo este enfoque se presentan las investigaciones realizadas hasta el momento en el género *Plicopurpura*.

2.4.1 TAMAÑO DE LAS CONCHAS

Estudios relacionados con el tamaño de las especies *P. pansa* y *P. pansa columellaris* en costas del Pacífico mexicano se llevaron a cabo siguiendo un enfoque morfométrico tradicional (Ramírez y Naegel, 2003; Ibáñez et. al, 2004). El tamaño de los individuos se tomó como la longitud máxima de las conchas (Tabla 1), en contraposición al enfoque morfogeométrico que define al tamaño como la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias entre cada hito morfológico y su centroide (Fig. 6).

Tabla 1. Tamaño promedio de las conchas de *P. pansa* en las costas del pacífico mexicano (Ramírez y Naegel, 2003).

LOCALIDAD	TAMAÑO(mm)	MAXIMO(mm)	MINIMO(mm)
Punta Perico	32,5	59,0	16,0
Cerrito	28,0	74,0	13,0
Guerrero	21,7	62,2	7,3

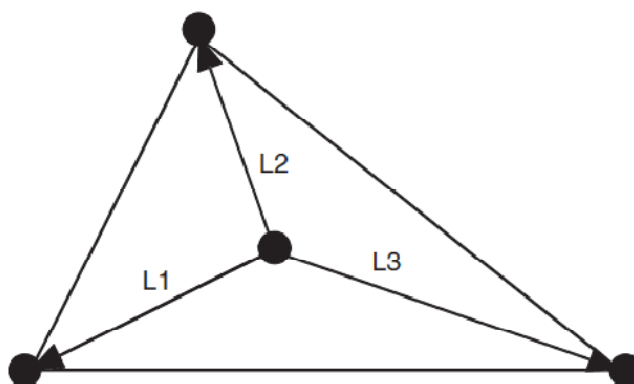


Figura 6. Descripción geométrica del cálculo del tamaño, el cual es igual a la raíz cuadrada de la suma de las longitudes L1, L2, L3 elevadas al cuadrado (Zelditch et, al. 2004).

Siguiendo con el enfoque morfométrico tradicional, Wellington y Kuris (1983), en un estudio realizado en las islas Galápagos y en el golfo de Panamá encontraron que las conchas de *P. pansa columellaris* (Longitud promedio = 49 mm) fueron significativamente más grandes que las de *P. pansa* (Longitud promedio = 40 mm) con $P < 0.05$, (prueba U Mann Whitney). Las diferencias intra e interespecíficas de

tamaño que se presentan en *P. pansa* y *P. pansa columellaris* fueron explicadas por los citados autores como consecuencia de los siguientes factores: el gradiente latitudinal, fuerza del oleaje, explotación antropogénica, entre otras.

2.4.2 FORMA DE LAS CONCHAS

La forma de las conchas de la especie *P. pansa* fue descrita por Castillo (1992) de la siguiente manera: “varía de oblonga a oval; espira generalmente baja; protoconcha con 2.25 vueltas; abertura grande de la concha, forma elipsoidal u ovalada, que ocupa el 70% de la altura total de la concha. Primera vuelta de la protoconcha, lisa; después de la segunda vuelta se presentan hendiduras pequeñas. El tamaño de la vuelta o cuerpo de la espira es similar al de la altura de la abertura de la concha; ocupa del 70 al 75% de la altura total de la concha; vueltas de la espira de la teleoconcha, ornamentada con siete-ocho hileras de nódulos, más pronunciados en los estadios juveniles, con estrías pequeñas en los interespacios. Columela lisa que forma un ángulo de 45° en la parte inferior. Canal anal pronunciado y canal sifonal corto y superficial” (Fig. 7).

En relación a la forma de la especie *P. patula*, Kool (1988) anota lo siguiente: “Concha ovalada en su contorno, alcanza hasta 9 cm de altura, presenta cerca de cinco vueltas fuertemente escalonadas. Protoconcha de 2.25 vueltas, con labio débil, escalonado hacia afuera e indentado sinusigeralmente ; primera vuelta lisa,

con cortas y diminutas plicas subsuturales en las últimas 1.25 vueltas. La última mitad de la protoconcha presenta pústulas microscópicas. Concha con espira baja, el cuerpo de la espira ocupa entre $3/4$ y $6/7$ de la altura de la concha. La teleoconcha presenta entre 7 y 8 hileras espirales de nódulos, mayormente en especímenes juveniles, con cuatro estrías pequeñas en los interespacios. Abertura amplia, elíptica, que ocupa más de $3/4$ de la altura de la concha. Columela aplanada, amplia, con un ángulo agudo de 45° en la porción más baja. Labio apertural crenulado, presenta manchas negras sobre y entre la zona crenulada del borde interno del labio externo. Canal anal pronunciado ajustado al canal sifonal posterior. Canal sifonal anterior corto y superficial. Color de la concha entre blanco grisáceo y café claro. Columela café caramelo frecuentemente con manchas café oscuras sobre la región parietal” (Fig. 7).



Figura 7. Comparación de las conchas de las tres especies del género *Plicopurpura* de las costas de México: *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) (Derecha); *P. pansa columellaris* (Lamarck, 1822) (Izquierda), y *P. patula* (Linnaeus, 1758) (Centro). Fuente: Gastropods.com

De acuerdo con las descripciones anteriores, los caracteres conquiliológicos y anatómicos de las especies nominales *P. pansa*, *P. patula* y *P. columellaris* integran un grupo interespecífico morfológicamente afín (Fig. 7). Algunas de las características conquiliológicas importantes de estas especies han sido descritas separadamente por Clench (1947), Keen (1965), Abbott (1974), Castillo (1982) y Kool (1987 y 1988). Los rasgos más sobresalientes de morfología y ornamentación externa que comparten son: forma casi oval de la concha; ombligo y coloración anaranjada del labio interno; pliegues con manchas alternadas clarooscuros en el labio externo; presencia de nódulos con líneas tenues intercaladas y espirales; y una protoconcha con 2 y 1/4 vueltas.

En el caso de *Plicopurpura columellaris* espesor de la concha; tendencia a estrechez de la abertura pedal; dientecillos gruesos del labio externo; inclinación angular de la columela; existencia de un dentículo en el borde del labio interno, y la presencia regular de ejemplares menores de 4 cm, marcan la diferencia con las otras dos especies, dentro de un marco de similitud morfológica general (Fig. 7).

De acuerdo con el trabajo realizado por Castillo (1992), la semejanza es aún mayor entre las especies gemelas *Plicopurpura pansa* de las costas del Pacífico y *Plicopurpura patula* del Mar Caribe mexicano, descritas como tales por Keen (1971), Abbott (1974) y Vermeij (1978). Sin embargo, las características morfológicas en otras congéneres de entidades geográficas diversas, como

Purpura haustorium (Gmelin, 1791), de Nueva Zelanda; *Purpura persica* (Linnaeus, 1758), del mar Rojo y Océano Índico; *Purpura panama* (Röding, 1798), del Indo – Pacífico; *Purpura planospira* (Lamarck, 1822), de la Provincia Panámica e Islas Galápagos, y *Purpura nodosa* (Linnaeus, 1758), África Occidental; no manifiestan similitud con las especies del género *Plicopurpura* que habitan en costas Americanas (Fig. 8).

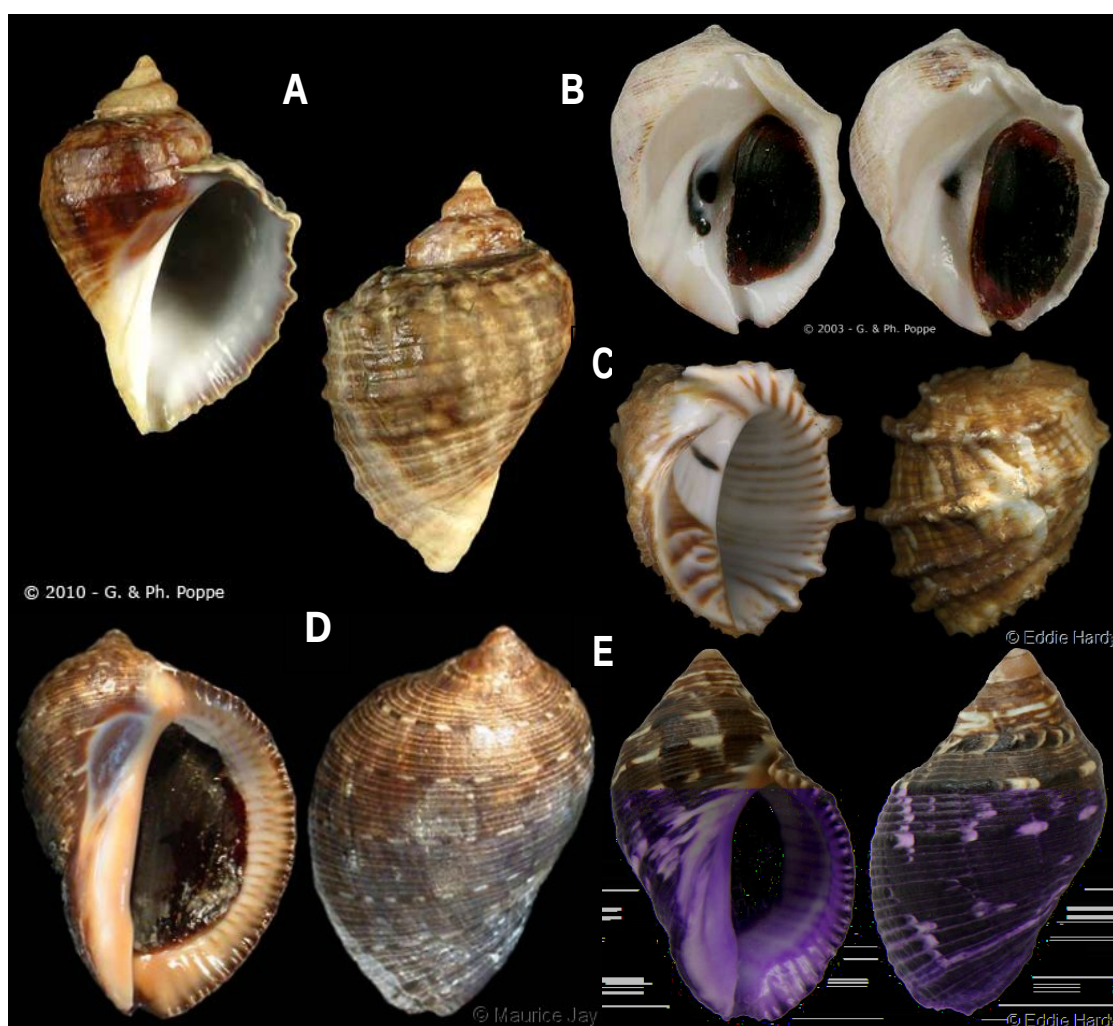


Figura 8. Comparación de las conchas de cinco especies del género *Purpura*: **(A)** *P. haustorium* (Gmelin, 1791); **(B)** *P. nodosa* (Linnaeus, 1758); **(C)** *P. planospira* (Lamarck, 1822); **(D)** *P. persica* (Linnaeus, 1758) y **(E)** *P. panama* (Röding, 1798). Fuente: Gastropods.com

Cuantitativamente, Wellington y Kuris (1983) realizaron un trabajo de morfometría tradicional con el cual buscaban diferenciar la forma de las conchas de *P. pansa* y *P. columellaris*. Los resultados de este trabajo se muestran en la Fig. 9. De acuerdo a esta figura, el eje I representa el tamaño de las conchas y explica un 94 % de la varianza, el eje II representa la forma y explica solo un 4.6 % de la varianza.

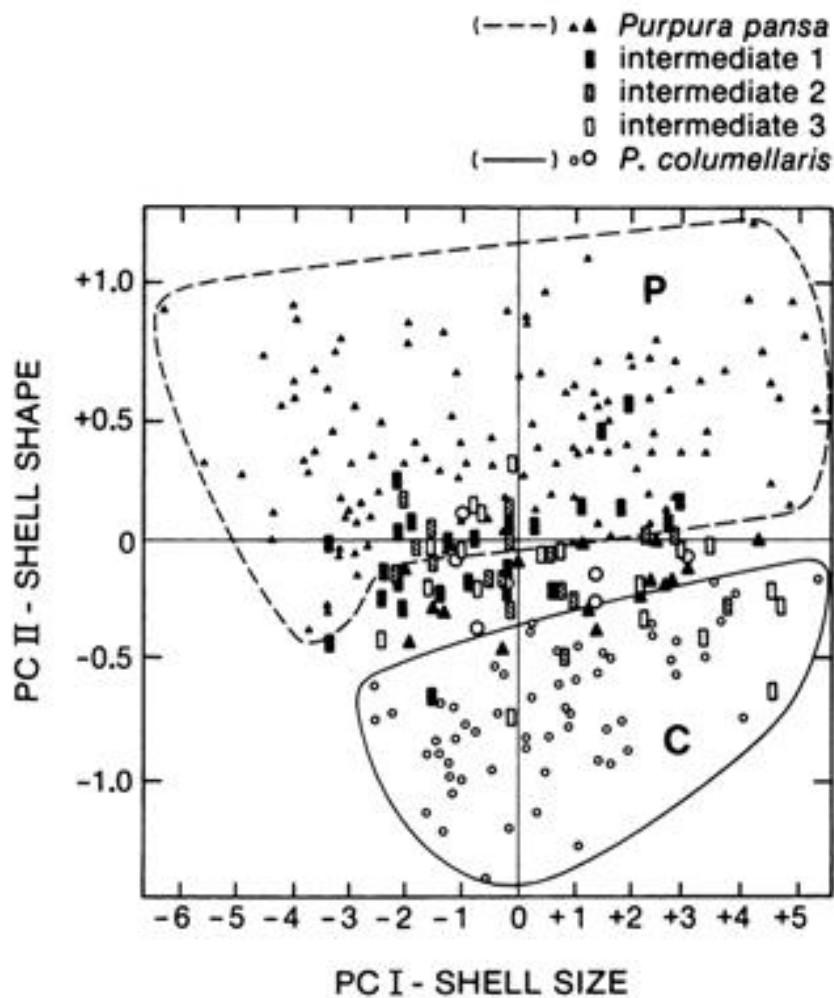


Figura 9. PCA sobre 276 individuos de *P. pansa* (demarcados por la línea discontinua) y *P. pansa columellaris* (Demarcados por la línea continua). Wellington y Kuris (1983).

Las variables que determinaron el tamaño fueron la longitud y el ancho máximo de la concha; por la forma se tomó el alto de la espira y la longitud y ancho de la abertura. Esta representación de la forma fue tomada arbitrariamente por los autores, no se sustenta sobre ningún fundamento teórico, situación contraria a la concepción de la forma en morfometría geométrica, la cual se define de manera precisa y objetiva.

Como puede observarse en la Fig. 9, lo que los autores denominaron tamaño y asociaron al eje I, no logró discriminar claramente las especies. Sin embargo, el eje II nombrado como forma, a pesar de explicar solo el 4.6% de la varianza, logró separar los individuos de *P. pansa* y *P. pansa columellaris*. Finalmente, se concluyó que la especie *P. pansa* presenta una concha con mayor abertura y espira más corta que su congénere *P. pansa columellaris*, como consecuencia de esta configuración la concha es también más liviana (Fig. 10).

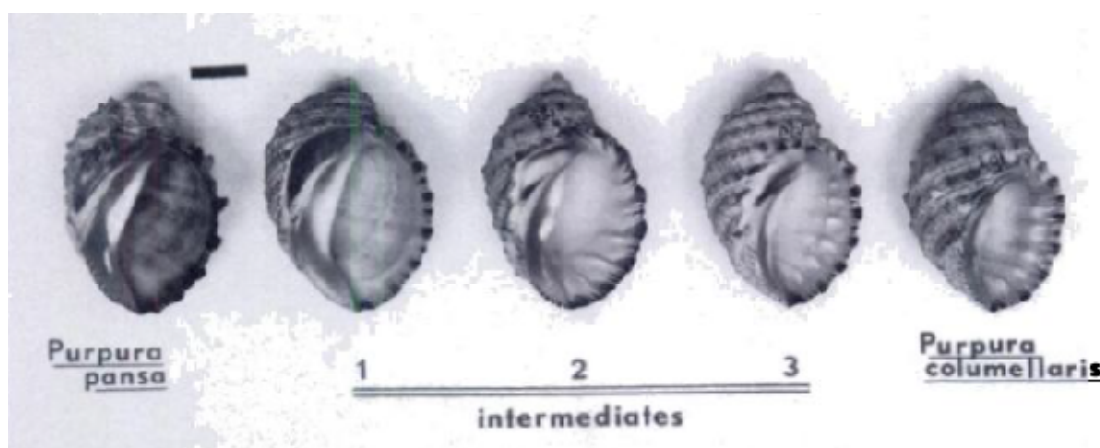


Figura 10. Diagnóstico morfológico de *P. pansa* y *P. pansa columellaris* (Barra negra = 1 cm). Wellington y Kuris (1983).

En los estudios realizados hasta el momento han empleado un enfoque morfométrico tradicional y solo involucran las especies *P. pansa* y *P. pansa columellaris*, su congénere *P. patula* no cuenta con ningún estudio cuantitativo relacionado con el tamaño o la forma de las conchas.

OBJETIVO GENERAL

- Demostrar si existen diferencias significativas de forma y tamaño entre las conchas de *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula* en poblaciones colombianas y encontrar un procedimiento que permita diferenciar efectivamente las conchas de las especies involucradas en este estudio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener variables asociadas a la forma y al tamaño de las conchas de *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula* en poblaciones colombianas.
- Determinar si existen diferencias de tamaño entre las conchas de *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula* en poblaciones colombianas.

- Determinar si existen diferencias en la forma de las conchas de *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula* en poblaciones colombianas.
- Comprobar la utilidad y efectividad del procedimiento propuesto para diferenciar las conchas de *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula*.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 LOCALIZACION Y MUESTREO:

Los muestreos se realizaron en dos islas del Pacífico Colombiano: Isla Palma (Valle del Cauca) e Isla Gorgona (Cauca), sitios donde se había reportado con anterioridad la presencia de la especie *P. pansa*. De igual forma, en el Caribe Colombiano se colectaron los individuos de *P. patula* en las zonas costeras de los municipios de Tolú (Sucre), Cartagena (Bolívar), Barú (Bolívar) y en un pequeño islote ubicado en frente de Arboletes (Antioquia) (Fig.11). Las coordenadas geográficas de los sitios de muestreo y el nombre de las poblaciones se observan en la tabla 2.

Tabla 2. Coordenadas geográficas y poblaciones muestreadas en cada localidad.

LOCALIDAD	COORDENADA NORTE	COORDENADA OESTE	POBLACIONES
Isla Palma	3°54'05.79''	77°21'31.55''	Punta brava.
Gorgona	2°58'02.20''	78°10'22.75''	La mancora, La ventana.
Arboletes	8°51'06.02''	76°25'50.72''	Islote virgen del Carmen.
Tolú	9°31'27.06''	75°35'08.70''	Espolones del muelle.
Cartagena	10°25'29.56''	75°33'16.25''	El boquetillo, Bocagrande.
Barú	10°17'58.77''	75°35'21.85''	Barú

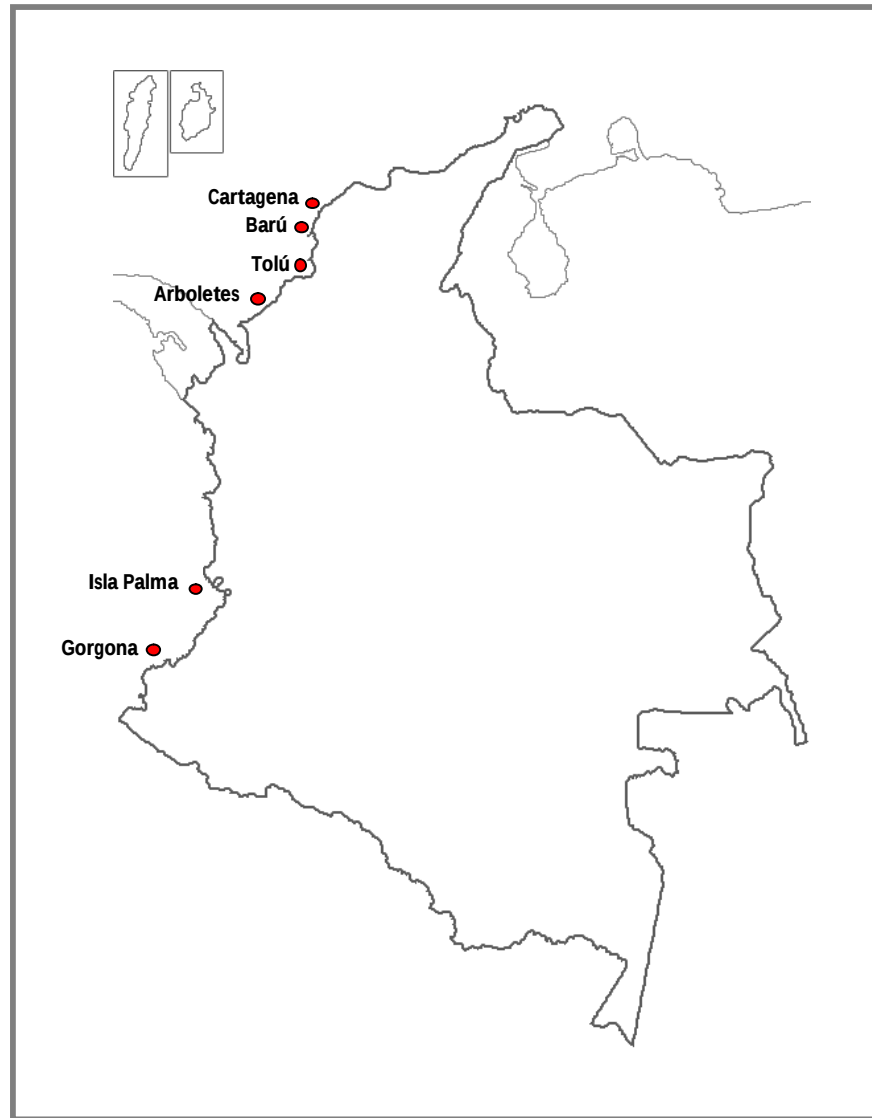


Fig. 11 Localización de los seis lugares donde se realizaron los muestreos en Colombia.

Isla Palma (Fig. 12 – A) es una pequeña isla localizada a menos de 4 km de la costa y está rodeada por acantilados rocosos con alturas entre 6 y 15 m, formados principalmente por rocas sedimentarias limolitas (Cantera et al. 1998).

La isla Gorgona (Fig. 12 – B), localizada en la costa pacífica colombiana, exhibe una secuencia de rocas ultramáficas que incluye a las únicas komatiitas cretácicas reportadas hasta ahora en el mundo. Además de las komatiitas, presenta una inusual secuencia de rocas ultramáficas similar a lo que se conoce como el Plateau del Caribe (secuencias máficas – ultramáficas del Caribe in-situ y acrecionadas a la margen septentrional de Suramérica) (Serrano, 2009).

El municipio de Tolú (Fig. 12 – C), ubicado en el golfo de Morrosquillo, geológicamente presenta gran complejidad estructural y sedimentaria. Conformado por rocas del Paleógeno al Oriente y del Neógeno en la parte Occidental, sobre las anteriores se halla una cobertura de sedimentos de origen marino, fluvial y marino – aluvial que reposan discordantemente sobre rocas terciarias (Barrera et al, 2012).

La isla Barú (Fig. 12 – D), geológicamente corresponde a los conjuntos superior e inferior de la unidad calcárea de la formación La Popa, donde prevalecen las calizas arrecifales y las areniscas calcáreas (Ibíd.).

Los sectores de Bocagrande y el Boquetillo pertenecientes al casco urbano de Cartagena (Fig. 12 – E), corresponden geológicamente a los depósitos cuaternarios de origen marino donde predomina material granular tipo arena limosa con fragmentos de calizas arrecifales y gravas (Universidad de Cartagena, 2010).

La franja costera de Arboletes (Fig. 12 – F) hace parte del denominado “Cinturón del Sinú”, una secuencia sedimentaria de unos 8 km de espesor, conformada principalmente por rocas turbidíticas y hemipelágicas del Oligoceno-Plioceno. Las rocas consolidadas que afloran a lo largo de la línea de costa actual son principalmente arcillolitas y lodolitas, plegadas y fracturadas, eventualmente con lentes de areniscas y conglomerados (Duque, 1984).

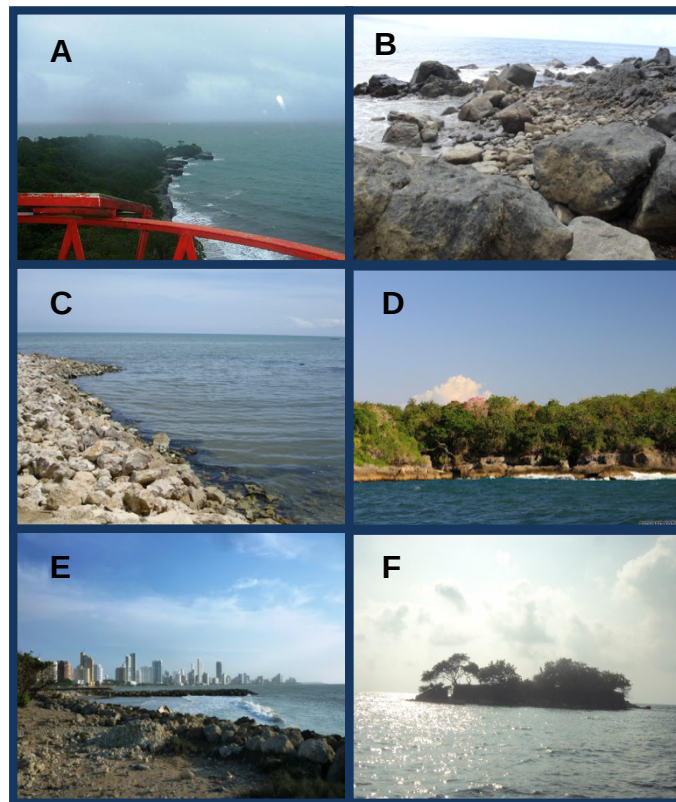


Figura 12. Fotografías de los sitios donde se realizaron los muestreos: **A.** Isla palma. **B.** Isla Gorgona. **C.** Tolú. **D.** Barú. **E.** Cartagena. **F.** Arboletes.

El sistema de muestreo consistió en examinar el sustrato rocoso siguiendo el procedimiento de muestreo simple al azar. Dadas las características de la línea de costa, se cubrieron las siguientes áreas: Isla Palma, 1550 m²; Gorgona, 2700 m²; Tolú, 950 m²; Cartagena, 1450 m² y Barú, 450 m². Para el muestreo en Arboletes no se tiene dato del área muestreada.

En el Pacífico, los muestreos se llevaron a cabo en mayo de 2009 en Isla Palma y en marzo de 2011 en Gorgona. En las localidades del Caribe: Tolú, Arboletes, Cartagena y Barú; el muestreo se hizo en junio de 2011. Cada muestreo se efectuó bajo condiciones de marea baja recolectando manualmente todos los individuos mayores de 1.8 cm (talla mínima de madurez) (García y Naegel, 2006) presentes en la franja mesolitoral y supralitoral. No se colectaron individuos de la subespecie *P. pansa columellaris*, puesto que no presentan ninguna dificultad de reconocimiento taxonómico, el estudio se concentró en las especies *P. pansa* y *P. patula*, las cuales generan controversia en su diferenciación. Los individuos colectados fueron liberados inmediatamente después de haber sido fotografiados.

La información colectada solo discriminó los individuos por localidades y poblaciones naturales dentro de ellas. No se realizaron actividades de sexado puesto que involucran el sacrificio de organismos vivos, lo cual no era del interés del trabajo.

4.2 ADQUISICIÓN DE LAS IMAGENES

Todas las imágenes fueron adquiridas por medio de una cámara fotográfica SONY DSC – W510 a una resolución de 12.1 mega pixeles en formato raster JPEG, el balance óptimo de la luz se obtuvo de acuerdo a las condiciones ambientales y a las características propias de cada espécimen. Para minimizar las distorsiones inherentes a la imagen se siguieron las recomendaciones y pruebas preliminares propuestas por Zelditch et al. (2004).

Los especímenes se orientaron de manera que el eje principal de la concha coincidiera con el eje Y del plano cartesiano, al igual que el eje de la abertura lateral. Es decir, el eje de la concha se ubicó perpendicular al plano horizontal. Se utilizó una cuadrícula para corroborar la orientación de los especímenes y facilitar la ubicación de los hitos morfológicos.

4.3 ELECCIÓN DE LOS HITOS MORFOLOGICOS

Para la elección de los hitos morfológicos se tuvieron en cuenta los supuestos de homología, representatividad, repetitividad y coplanariedad descritos por Zelditch et al. (1992) y Roth (1993). Para garantizar el supuesto de repetitividad se seleccionó una imagen de un espécimen de cada localidad y se ubicaron todos los hitos morfológicos diez veces; por medio del programa TPS - DIG se obtuvieron las coordenadas X e Y de cada hito, las cuales fueron exportadas al programa

estadístico PAST versión 2.13 en el cual se obtuvo el error estándar de cada coordenada.

Con base en la clasificación tipológica propuesta por Bookstein (1991), los hitos morfológicos en este estudio pertenecen al tipo I (características locales específicas) y tipo II (máximos o mínimos locales de una curva). Matemáticamente, un hito morfológico no es más que un punto ubicado en el mismo locus anatómico y el conjunto de dichos puntos representa idealmente la forma del objeto en estudio.

Con el fin de capturar la mayor información acerca de la forma, se ubicaron 21 hitos morfológicos (HM) bordeando el perímetro de las conchas en cada espécimen (Fig. 13). El HM₁ se ubicó en la cúspide de la concha. HM₂ en el borde derecho de la sutura superior de la última espira del perímetro de la protoconcha. HM₃ en el borde derecho de la sutura inferior de la última espira del perímetro de la teleoconcha. HM₄ en el primer pliegue del perímetro del labio externo. HM₅ en el segundo pliegue del perímetro del labio externo. HM₆ en el tercer pliegue del perímetro del labio externo. HM₇ en el cuarto pliegue del perímetro del labio externo. HM₈ en el quinto pliegue del perímetro del labio externo. HM₉ en el sexto pliegue del perímetro del labio externo. HM₁₀ en el séptimo pliegue del perímetro del labio externo. HM₁₁ en el vértice inferior de la columela. HM₁₂ en el borde izquierdo de la sutura inferior de la última hilera de la última espira del perímetro

de la teleoconcha. HM₁₃ en el borde izquierdo de la sutura superior de la última hilera de la última espira del perímetro de la teleoconcha. HM₁₄ en el último pliegue del labio interno. HM₁₅ en el penúltimo pliegue del labio interno. HM₁₆ en el antepenúltimo pliegue del labio interno. HM₁₇ en el borde izquierdo de la sutura superior de la penúltima hilera de la última espira del perímetro de la teleoconcha. HM₁₈ en el borde izquierdo de la sutura superior de la antepenúltima hilera de la última espira del perímetro de la teleoconcha. HM₁₉ en el borde izquierdo de la sutura superior de la trasantepenúltima hilera de la última espira del perímetro de la teleoconcha. HM₂₀ en el borde izquierdo de la sutura superior de la pre-trasantepenúltima hilera de la última espira del perímetro de la teleoconcha. HM₂₁ en el borde izquierdo de la sutura superior de la última espira del perímetro de la protoconcha.

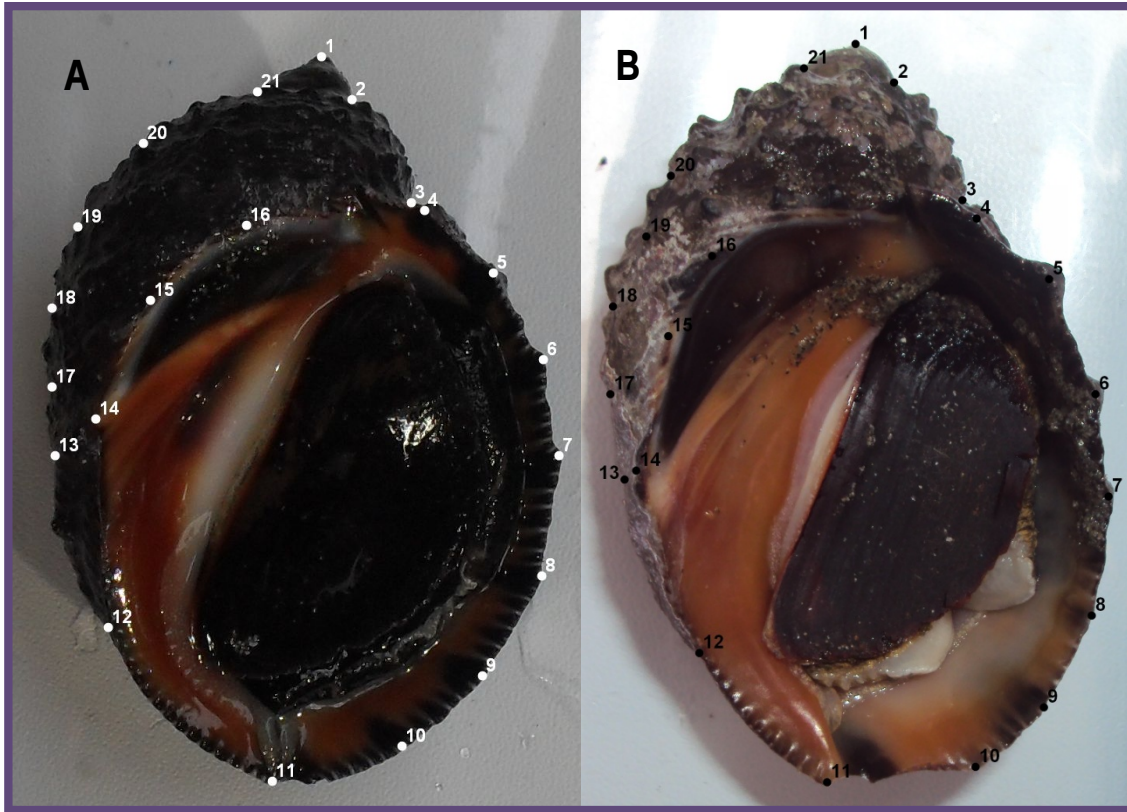


Figura 13. Ubicación de 21 hitos morfológicos. **(A)** *P. pansa* (Talla = 6.38 cm).
(B) *P. patula* (Talla = 5.74 cm).

4.4 METODO DE SUPERPOSICIÓN

El método empleado para comparar las configuraciones de hitos morfológicos fue el de superposición de puntos por Procrustes de mínimos cuadrados generalizado. Este método minimiza las diferencias entre las configuraciones de hitos morfológicos sin alterar la forma de los individuos. La ventaja más importante es su coherencia con la teoría matemática de la forma (Kendall 1977).

La aplicación empleada para generar la superposición fue COORDGEN 6. Los valores del tamaño centroidal utilizados para efectuar el estudio del tamaño de las conchas también se obtuvieron por esta aplicación.

4.5 ESTUDIO DEL TAMAÑO DE LAS CONCHAS

La medida del tamaño más usada en morfometría geométrica se conoce como Tamaño centroidal, la preferencia radica en que esta no induce ningún tipo de correlación entre el tamaño y la forma. Matemáticamente el tamaño centroidal se calcula de la siguiente manera:

$$CS(X) = \sqrt{\sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^M (X_{ij} - C_j)^2}$$

Es decir, la raíz cuadrada de la sumatoria de las distancias entre cada hito morfológico y el centroide de cada concha elevadas al cuadrado.

Una vez calculados los valores del tamaño centroidal para todos los individuos, se procedió a efectuar un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, con el fin de determinar si hay diferencias estadísticas significativas de tamaño entre las poblaciones naturales del Pacífico y Caribe Colombiano. Seguidamente, se realizó la prueba de Tukey para saber cuáles poblaciones son diferentes entre sí (Post ANOVA). Antes de realizar estas pruebas se evaluaron los supuestos de

normalidad y homocedasticidad. Para esta parte del estudio se empleó el software estadístico PAST versión 2.13.

4.6 ESTUDIO ALOMETRICO

Huxley en 1932 fue el primero en postular la posibilidad de que los cambios en la forma de un individuo pudieran ser explicados por los cambios en el tamaño. Posteriormente, Gould reconoció y enfatizó esta idea dentro del campo de la alometría evolutiva (Huxley 1932; Gould 1966).

Para comprobar si el tamaño de las conchas está relacionado con su forma se realizaron regresiones lineales multivariadas en cada población. La variable independiente fue el Log_{10} del tamaño centroidal y la independiente las 42 variables que describen la forma y que provienen de las coordenadas X, Y de los 21 hitos morfológicos. Se verificó que efectivamente las relaciones entre las variables se ajustaran a un modelo lineal, para lo cual se empleó la aplicación REGRESS 6.

4.7 NORMALIZACION DEL TAMAÑO DE LAS CONCHAS

Cuando se presenta crecimiento alométrico en una especie, los patrones que determinan la forma se ven distorsionados por el tamaño de los individuos (Zelditch et al. 2004). Por lo cual, es necesario normalizar el tamaño de las conchas para saber si realmente ellas difieren en su forma cuando se controla la

variable tamaño. La normalización se efectuó por medio de la aplicación STANDARD 6 y la longitud de normalización fue 1.8 cm. tamaño en el cual la especie alcanza su madurez sexual (García y Naegel, 2006).

4.8 ESTUDIO DE LA FORMA DE LAS CONCHAS

Se realizó inicialmente un estudio intrapoblacional de la forma de cada una de las muestras adquiridas en las localidades del Pacífico y Caribe colombiano. Para el estudio intrapoblacional se empleó la técnica de análisis de componentes principales PCA, para el cual se utilizó la aplicación PCAGEN 6. Posteriormente, se efectuó un estudio interpoblacional de la forma de las conchas, en este caso la técnica de ordenamiento empleada fue un análisis canónico discriminante CVA, efectuado por medio de la aplicación CVAGEN 6.

Es importante aclarar que los métodos de ordenamiento como PCA y CVA no sirven para validar o rechazar hipótesis, solo son una herramienta útil en la visualización e interpretación de los datos. La validación formal de la hipótesis sobre las diferencias de forma entre las poblaciones se llevó a cabo por medio de un análisis multivariado de varianza no paramétrico, debido a la imposibilidad de validar los supuestos de normalidad multivariada y homocedasticidad de los datos.

Simultáneamente a los estudios intra e interpoblacionales de la forma, las aplicaciones antes mencionadas ofrecen un complemento gráfico de los cambios y deformaciones más significativas en cada configuración de hitos morfológicos, lo cual complementa los análisis estadísticos con una visión gráfica de la forma.

Finalmente se aplicó una función computacional del software empleado para todo el estudio (IMP: Integrated Morphometrics Programs). Esta función consiste en utilizar el análisis canónico discriminante para asignar especímenes desconocidos dentro de un grupo o población previamente establecida. Esta herramienta se aplicó en los especímenes del género *Plicopurpura* de la colección de la Universidad del Valle, con el objetivo de clasificar cada espécimen dentro de la especie correcta.

5. RESULTADOS

5.1 PRUEBA PARA VALIDAR LA PRECISION EN LA UBICACIÓN DE LOS HITOS MORFOLOGICOS

Para garantizar el supuesto de repetitividad en la ubicación de los 21 hitos morfológicos que describen la forma de las conchas, se seleccionó un individuo de cada población y se repitió el procedimiento de ubicación de los hitos un número de 10 veces. Los errores estándar obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Errores estándar calculados para 42 coordenadas X, Y de los 21 hitos morfológicos en 1 espécimen de cada población.

POBLACION	ERROR	ERROR	ERROR
	ESTANDAR MINIMO	ESTANDAR MAXIMO	ESTANDAR MEDIO
Isla Palma	0.133	0.833	0.389
La Mancora	0.100	0.920	0.400
La Ventana	0.133	0.906	0.466
Arboletes	0.000	0.433	0.226
Tolú	0.152	0.653	0.292
Boquetillo	0.133	0.872	0.420
Bocagrande	0.000	0.963	0.480
Barú	0.458	0.979	0.774

5.2 TAMAÑO DE LAS CONCHAS

El tamaño de las conchas se analizó por medio de la variable tamaño centroidal. El número de individuos colectados y la información descriptiva de cada población se resume en la tabla 4 y en la figura 14. Los datos fueron transformados aplicando la función Log_{10} ; esto se realizó con el fin de validar los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad, requeridos por este tipo de análisis.

Tabla 4. Estadística descriptiva tamaño de las conchas *P. pansa* (Ventana, Palma y Mancora) y *P. patula* (Arboletes, Tolú, Boquetillo, Bocagrande y Barú).

	Ventana	Arboletes	Barú	Bocagrande	Boquetillo	Palma	Tolú	Mancora
N	62	35	58	73	125	31	94	71
Min	0.609	0.330	0.508	0.562	0.479	0.670	0.288	0.520
Max	1,096	0.741	0.956	1,106	1,072	0.966	0.979	1,119
Sum	55,370	16,767	43,257	53,700	82,200	25,926	63,449	56,839
Promedio	0.893	0.479	0.746	0.736	0.658	0.836	0.675	0.801
Error Stan.	0.013	0.018	0.016	0.013	0.010	0.016	0.015	0.011
Varianza	0.011	0.011	0.015	0.012	0.013	0.008	0.022	0.009
Desv. Stan.	0.106	0.106	0.121	0.108	0.116	0.090	0.149	0.093
Mediana	0.892	0.441	0.767	0.716	0.623	0.861	0.695	0.806
25 percentil	0.819	0.412	0.653	0.665	0.583	0.749	0.562	0.748
75 percentil	0.971	0.521	0.842	0.798	0.714	0.906	0.777	0.855
Media Geo.	0.887	0.469	0.736	0.728	0.649	0.831	0.657	0.795

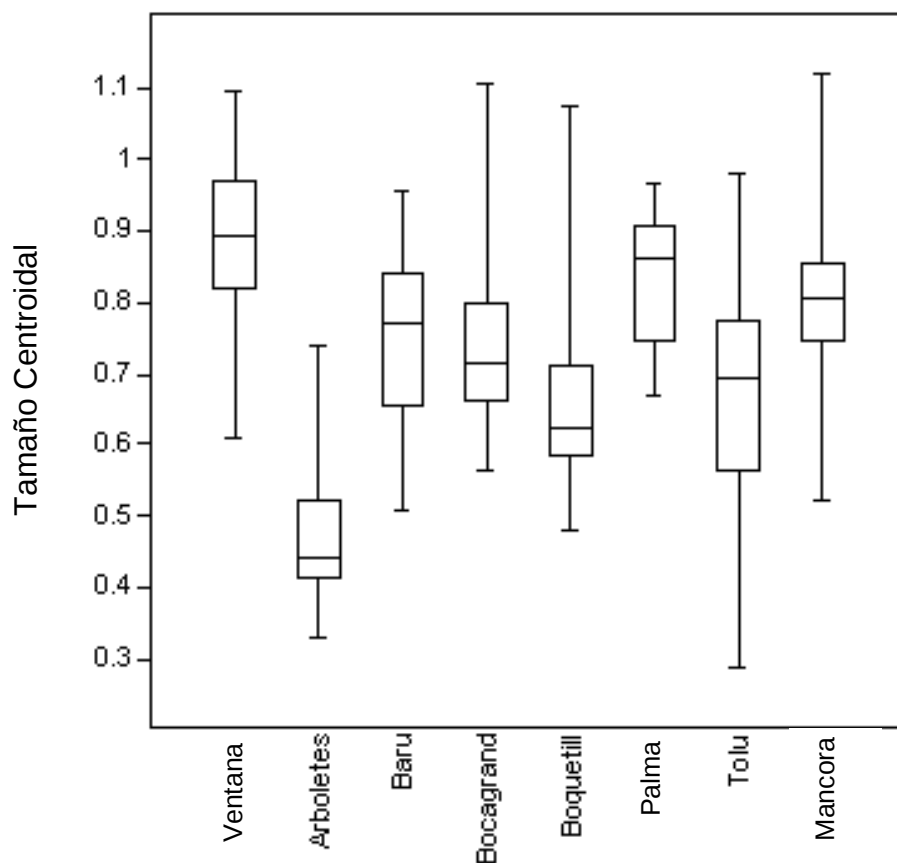


Figura 14. Box plot para el $\log_{10}$ del tamaño de las conchas (cm.) *P. pansa* (Ventana, Palma y Mancora) y *P. patula* (Arboletes, Tolú, Boquetillo, Bocagrande y Barú). Medias, cuartiles e intervalos de 95% de confianza.

5.2.1 DIFERENCIAS EN EL TAMAÑO DE LAS CONCHAS

Para validar o rechazar la hipótesis nula que plantea la inexistencia de diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de las conchas, se efectuó un ANOVA de una vía (Tabla 5) y posteriormente un POST ANOVA (Prueba de Tukey) (Tabla 6).

Tabla 5. ANOVA para validar diferencias en el tamaño de las conchas *P. pansa* (Ventana, Palma y Mancora) y *P. patula* (Arboletes, Tolú, Boquetillo, Bocagrande y Barú).

	Suma Cuadr.	df	Media Cuadr.	F	p
Entre grupos:	522,009	7	0.87	74.28	4.20E-61
En los grupos:	524,698	448	0.0117		
Total:	104,671	454			
omega^2:	0.4915				
Prueba de Levene para homogeneidad varianza : p =	0.1388				
Basada en medianas: p =	0.2827				

Tabla 6. POST ANOVA (Prueba de Tukey) para validar diferencias en el tamaño de las conchas *P. pansa* (Ventana, Palma y Mancora) y *P. patula* (Arboletes, Tolú, Boquetillo, Bocagrande y Barú).

	Ventana	Arboletes	Barú	Bocagrande	Boquetillo	palma	Tolú	Mancora
Ventana		0.03222	0.03	0.03222	0.03222	0.1543	0.03222	0.000593
Arboletes	26.87		0.032	0.03222	0.03222	0.0322	0.03222	0.03222
Barú	9.555	17.31		0.9998	0.00135	0.0009	0.0255	0.1905
Bocagrande	10.22	16.65	0.662		0.00826	0.0001	0.09949	0.05806
Boquetillo	15.28	11.58	5.725	5.063		0.0322	0.9933	0.03222
Palma	3.683	23.18	5.873	6.535	11.6		0.03222	0.725
Tolú	14.15	12.71	4.596	3.934	1.129	10.47		0.03237
Mancora	6.004	20.86	3.551	4.213	9.276	2.321	8.148	

Después de comparar todas las poblaciones entre sí, se realizó el agrupamiento de todas las poblaciones del Pacífico en una sola población (*P. pansa*) y se hizo lo mismo con todas las del Caribe (*P. patula*). Los resultados de la prueba t para analizar las diferencias en el tamaño de las conchas se observan en la Tabla 7 y la Figura 15.

Tabla 7. Prueba t para validar diferencias estadísticas en el tamaño de las conchas de *P. pansa* (Pacífico) y *P. patula* (Caribe).

PACIFICO		CARIBE	
N:	164	N:	291
Media:	0.84229	Media:	0.67329
95%:	(0.82603 0.85855)	95%:	(0.65717 0.6894)
Var.:	0.011119	Var.:	0.019514

95% conf. Para diferencias entre medias: (0.14436 0.19365)

Prueba

t: 13.477

p: 4.75E-31

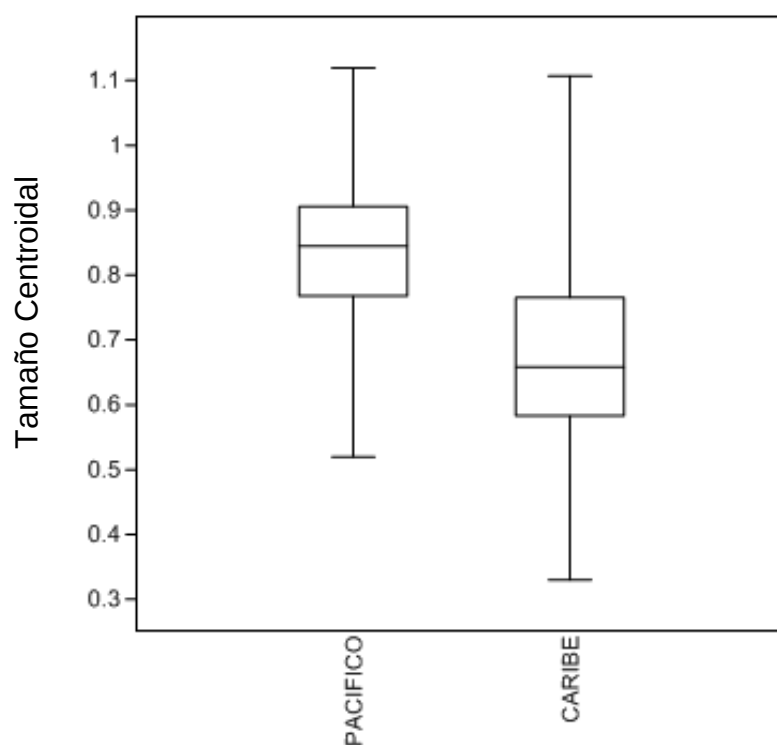


Figura 15. Box plot de las diferencias del log₁₀ tamaño de las conchas (cm.) entre *P. pansa* (Pacífico) y *P. patula* (Caribe). Medias, cuartiles e intervalos de 95% de confianza.

En la figura 16 se observa la gráfica de distribución Normal de los datos y el resultado de la prueba de Shapiro Wilks que valida efectivamente el supuesto de normalidad. La validación del supuesto de homogeneidad de varianza se efectuó por medio de la prueba de Levene, los resultados se muestran en la Tabla 5.

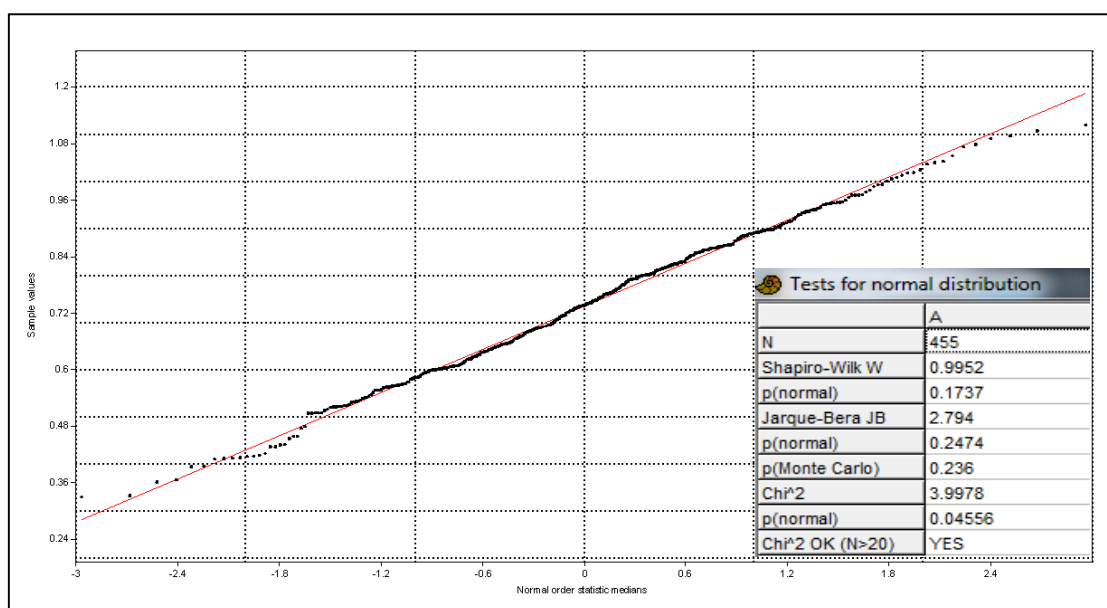


Figura 16. Probabilidad normal y pruebas formales para validar normalidad de los datos.

5.2.2 TAMAÑO DE LAS CONCHAS SEGÚN MORFOMETRIA TRADICIONAL

En morfometría tradicional el tamaño de las conchas equivale a su longitud máxima. Teniendo en cuenta que este es el primer estudio en donde se aplican técnicas morfogeométricas para este género, se optó por presentar los resultados del tamaño de las conchas del presente estudio empleando también el enfoque

tradicional (Tabla 8 y Figura 17), esto con la finalidad de contrastar los resultados de las poblaciones colombianas con aquellos que se obtuvieron en otros países.

Tabla 8. Tamaño promedio (mm) de las conchas de *P. pansa* (Palma, Mancora y Ventana) en el Pacífico y *P. patula* (Arboletes, Tolú, Boquetillo, Bocagrande y Barú) en el Caribe Colombiano.

LOCALIDAD	TAMAÑO PROMEDIO	MAXIMO	MINIMO
ISLA PALMA	41.8	54.1	28.4
LA MANCORA	38.6	74.9	20.5
LA VENTANA	47.2	71.6	24.0
ARBOLETES	19.6	33.2	13.4
TOLU	29.7	56.4	11.4
BOQUETILLO	27.9	67.8	17.9
BOCAGRANDE	32.8	72.5	21.4
BARU	35.1	55.2	20.3

Al igual que en el método de morfometría geométrica, se agruparon todas las poblaciones del Pacífico en una sola población (*P. pansa*) y se comparó por medio de una prueba no paramétrica las diferencias de tamaño con la población *P. patula* (Caribe) (Tabla 9 y Figura 18). La razón de utilizar una prueba no paramétrica fue la imposibilidad de validar el supuesto de normalidad aún después de transformar los datos de la altura de la concha.

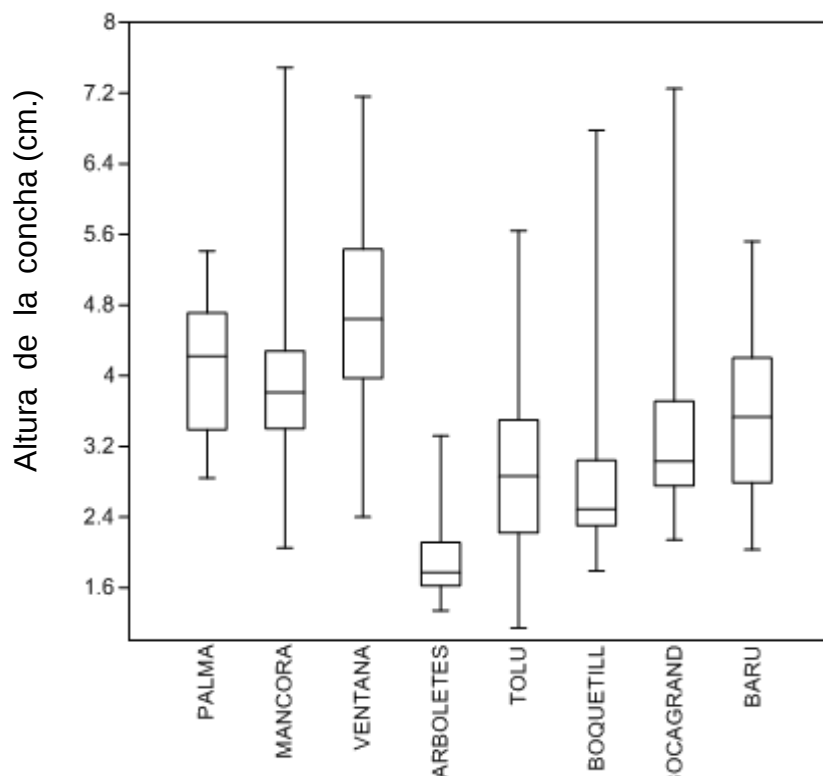


Figura 17. Box plot tamaño de las conchas *P. pansa* (Ventana, Palma y Mancora) y *P. patula* (Arboletes, Tolú, Boquetillo, Bocagrande y Barú). Enfoque morfométrico tradicional.

Tabla 9. Prueba de Mann – Whitney para validar diferencias estadísticas en el tamaño de las conchas de *P. pansa* (Pacífico) y *P. patula* (Caribe).

PACIFICO	CARIBE
N = 163	N = 384
Rango promedio = 120.4	Rango promedio = 153.6
U = 1.013 E04	
Z = - 12.52	
p = 5.654 E - 36	

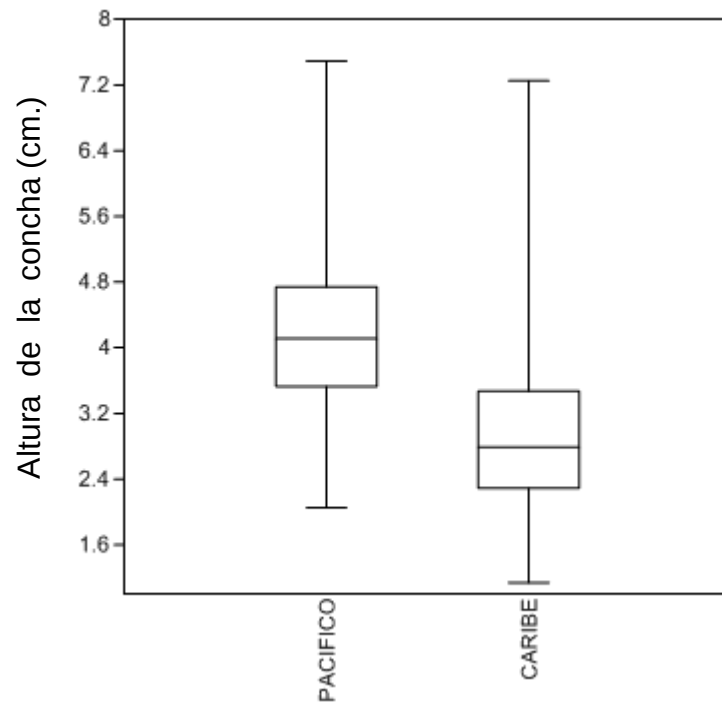


Figura 18. Box plot de las diferencias del tamaño de las conchas entre *P. pansa* (Pacífico) y *P. patula*. (Caribe). Enfoque morfométrico tradicional.

Los resultados de los estudios del tamaño de las conchas, permiten afirmar que la especie *P. pansa* es significativamente más grande que la especie *P. patula*. A esta conclusión se llega empleando el enfoque morfogeométrico como también por medio de la morfometría tradicional.

5.3 PRUEBAS ALOMETRICAS

Los resultados de las regresiones multivariadas y los gráficos que corroboran la relación existente entre tamaño y forma de las conchas se muestran en las Figuras 19 – 24. Las poblaciones correspondientes a Isla Palma y Arboletes no se tuvieron en cuenta en este análisis puesto que no contaban con el tamaño de muestra necesario para efectuar las pruebas ($n = 2K$, donde K es el número de hitos morfológicos).

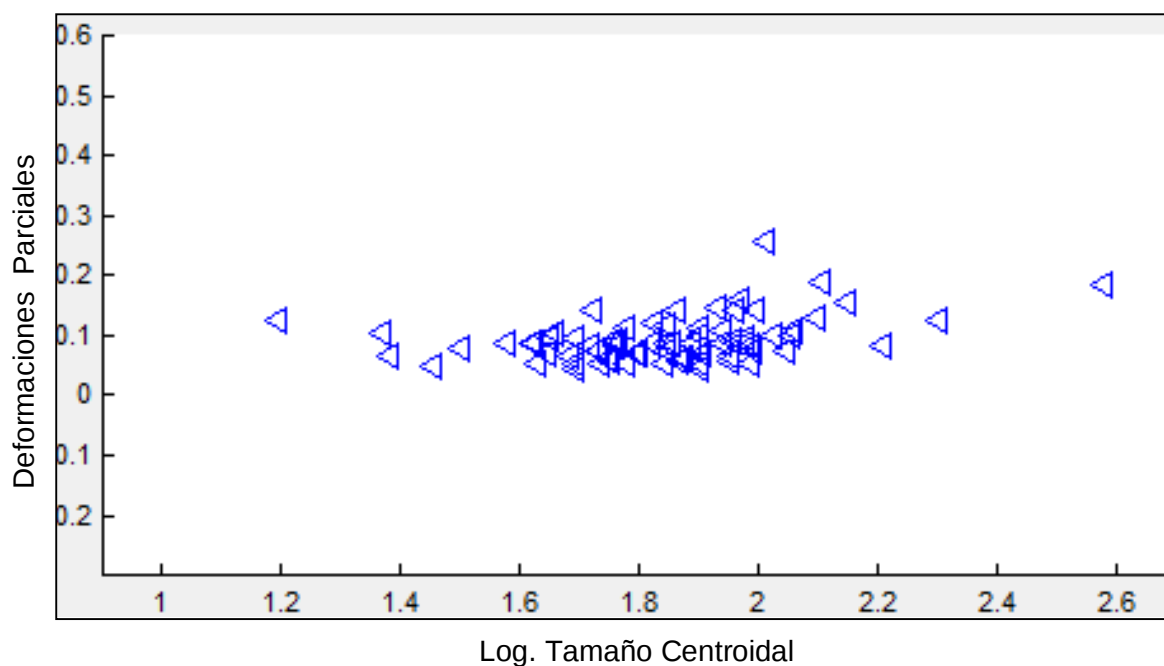


Figura 19. Regresión multivariada (Población La Mancora). Lambda de Wilks = 0.1459;
 $F = 4.9303$; % varianza explicada = 85.41; $p < 0.001$.

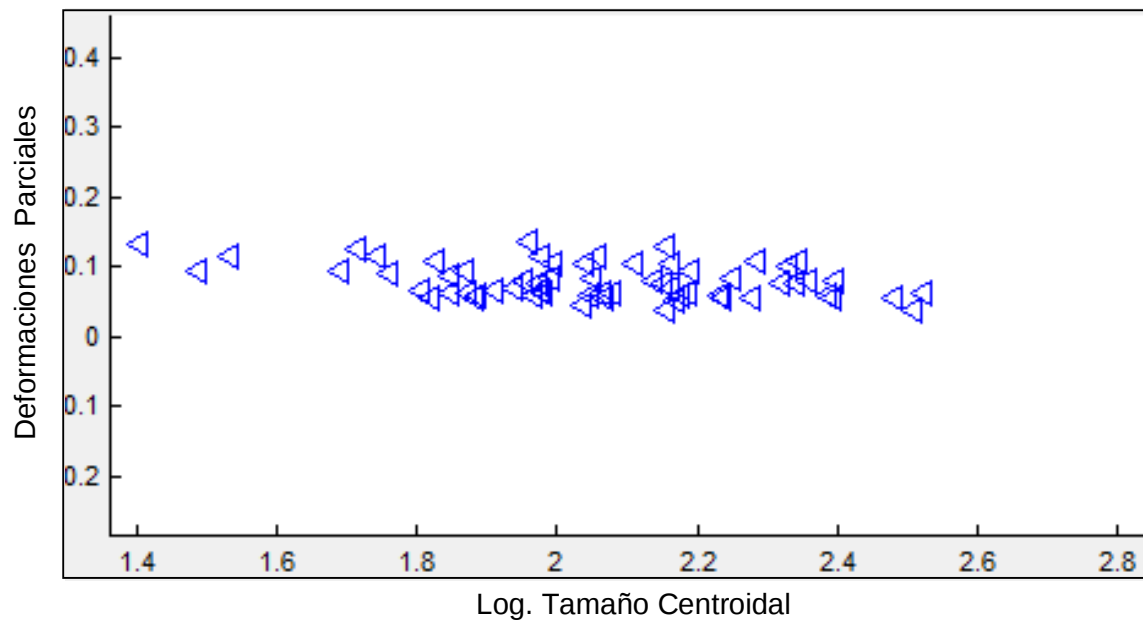


Figura 20. Regresión multivariada (Población La Ventana).). Lambda de Wilks = 0.1715;

F = 2.9247; % varianza explicada = 82.85; p = 0.004

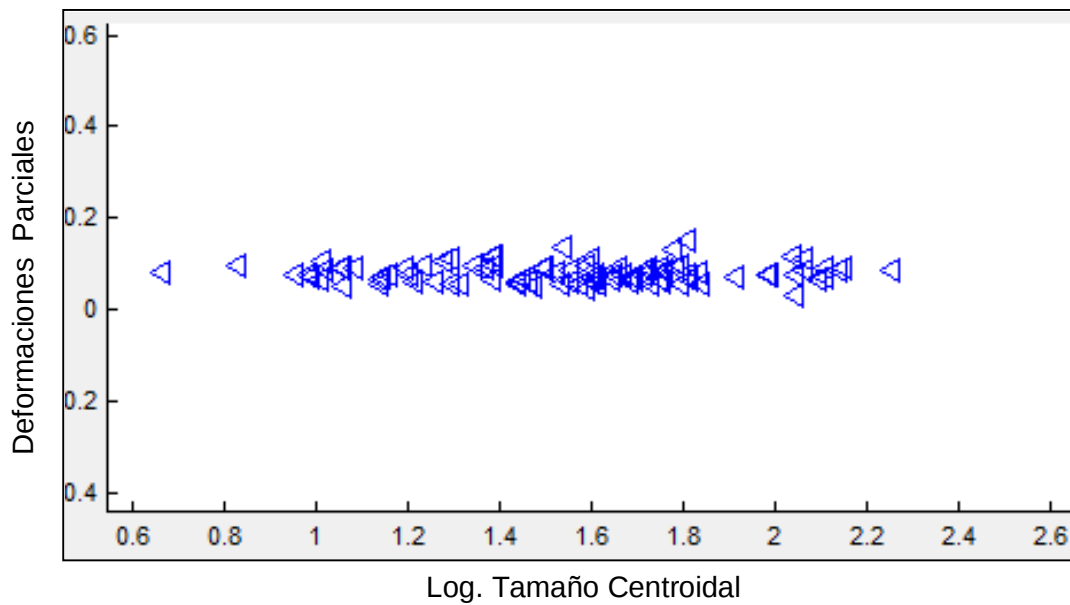


Figura 21. Regresión multivariada (Población Tolú).). Lambda de Wilks = 0.1310;

F = 9.6009; % varianza explicada = 86.90; p << 0.001

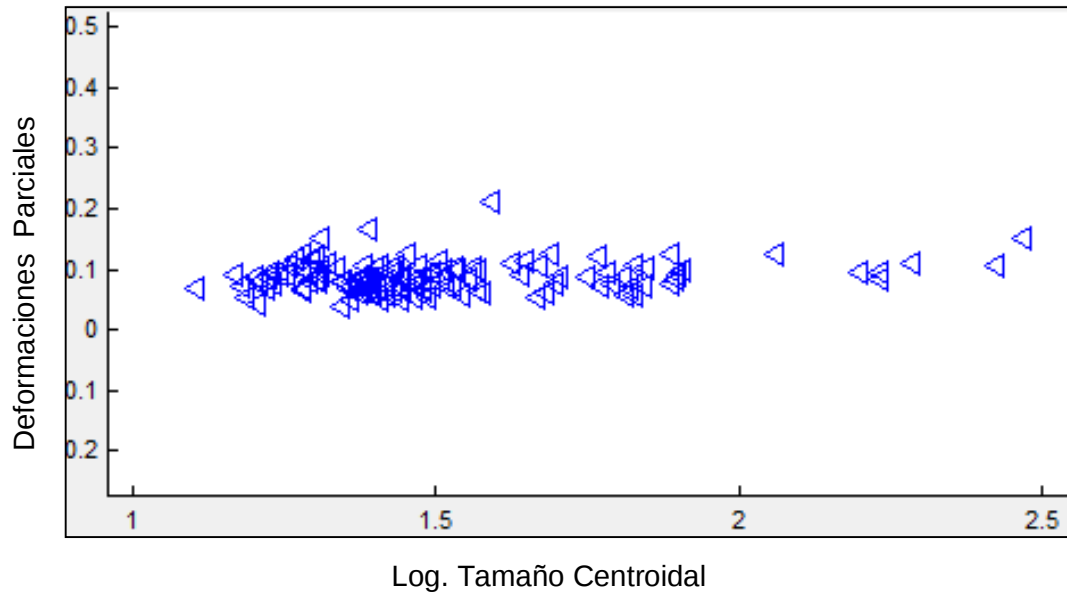


Figura 22. Regresión multivariada (Población Boquetillo). Lambda de Wilks = 0.1876;
F = 9.7987; % varianza explicada = 81.24; $p < 0.001$

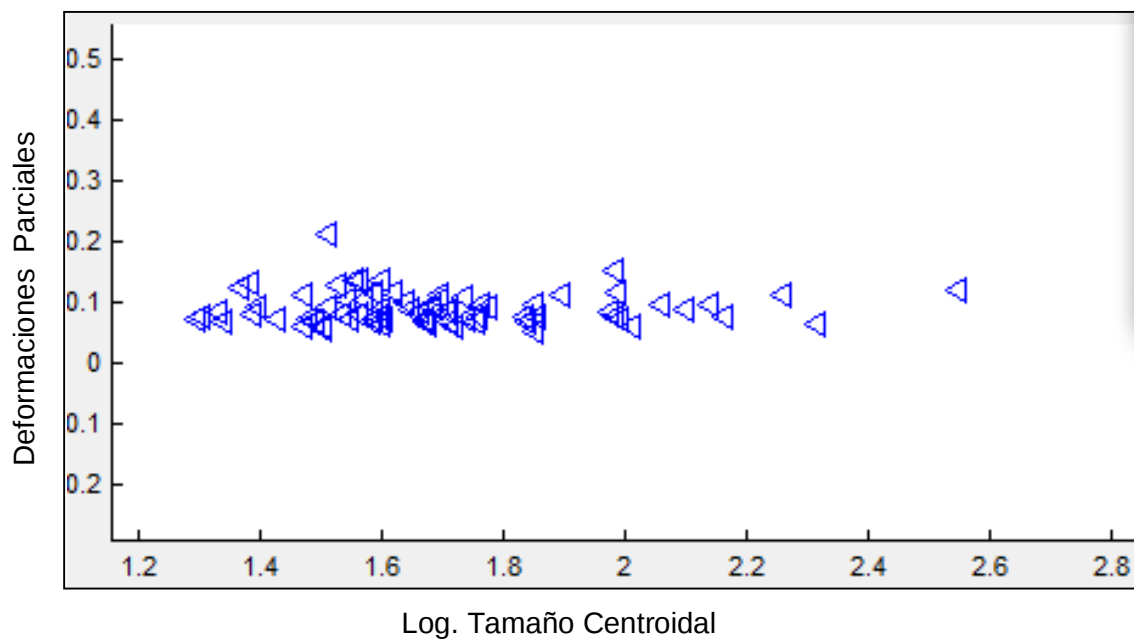


Figura 23. Regresión multivariada (Población Bocagrande). Lambda de Wilks = 0.1330;
F = 5.8323; % varianza explicada = 86.70; $p < 0.001$

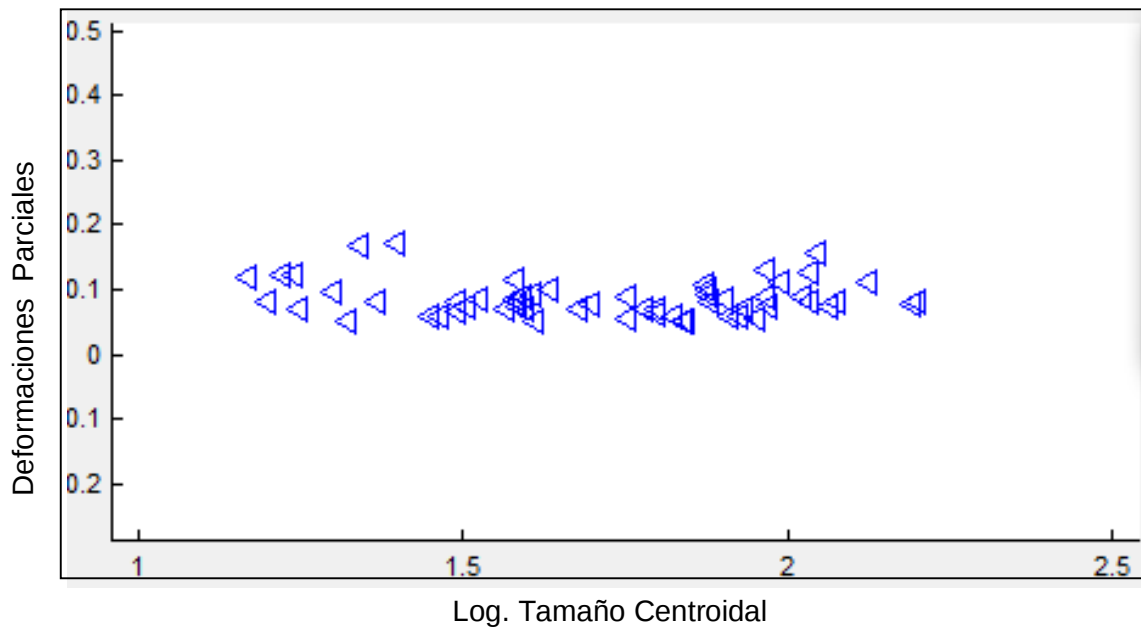


Figura 24. Regresión multivariada (Población Barú). Lambda de Wilks = 0.1206;

F = 3.6447; % varianza explicada = 87.94; p = 0.002

Los resultados anteriores corroboran el crecimiento alométrico en las especies estudiadas. Las gráficas muestran una relación lineal entre la variable tamaño centroidal (eje X) y las deformaciones parciales que representan las 42 variables de la forma (eje Y). Además, el porcentaje de varianza explicada se encuentra en un rango de 81% a 88%, lo que significa que el tamaño de las conchas está relacionado con su forma.

5.4 ESTUDIO INTRAPOBLACIONAL DE LA FORMA

Con el fin de observar los patrones de variación de la forma dentro de cada población, se efectuaron superposiciones de hitos morfológicos con el método Procrustes y análisis de componentes principales sobre 42 variables de la forma. Los resultados se muestran en las Figuras 25 - 40.

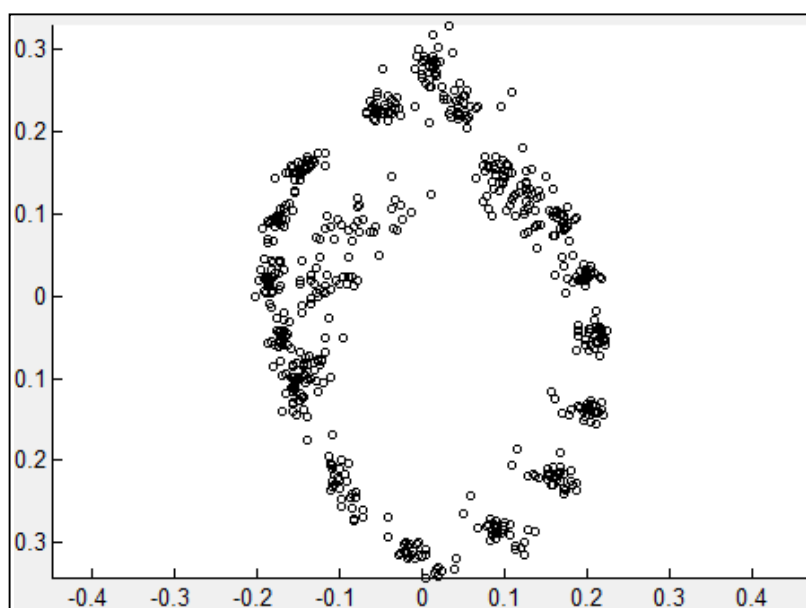


Figura 25. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población Isla Palma.

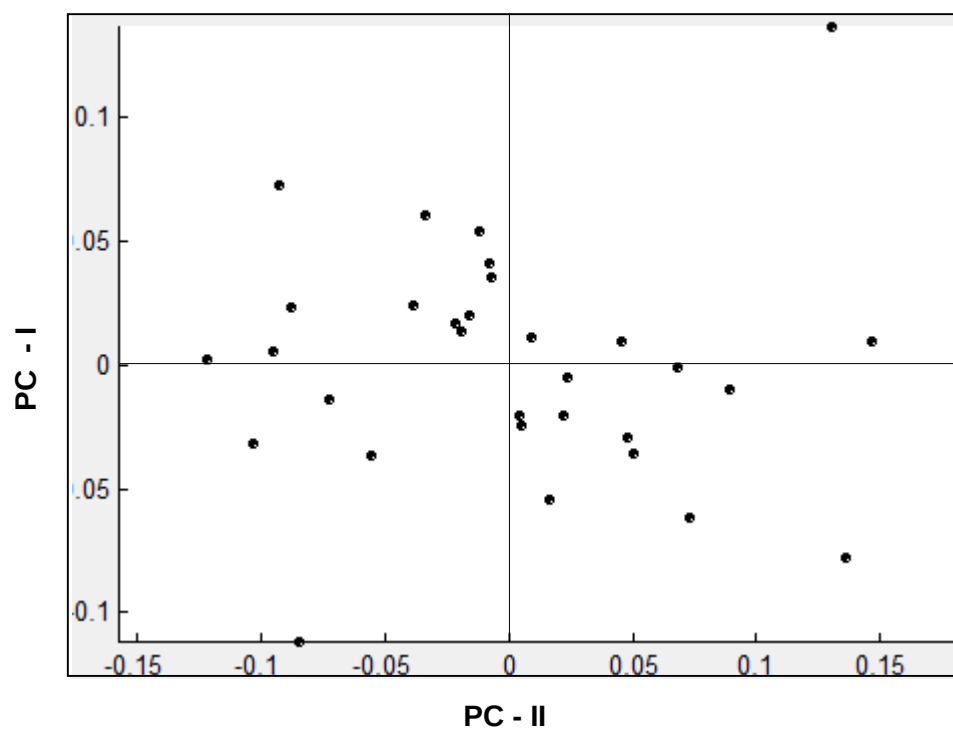


Figura 26. Análisis de componentes principales. Población Isla Palma.

Varianza explicada = 66.51%

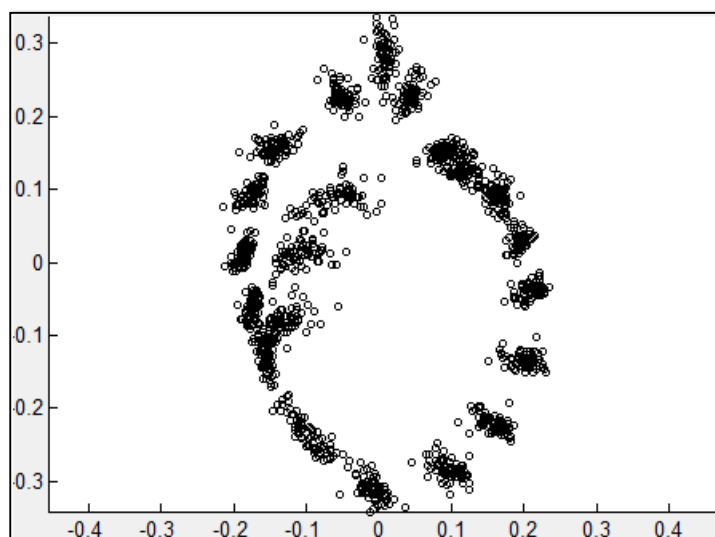


Figura 27. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población La Mancora.

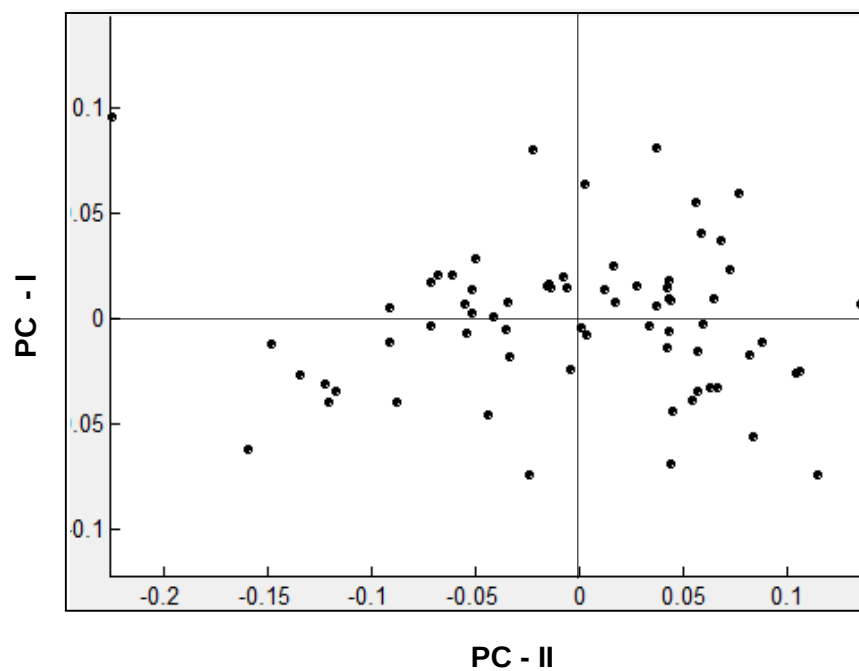


Figura 28. Análisis de componentes principales. Población La Mancora.

Varianza explicada = 66.16%

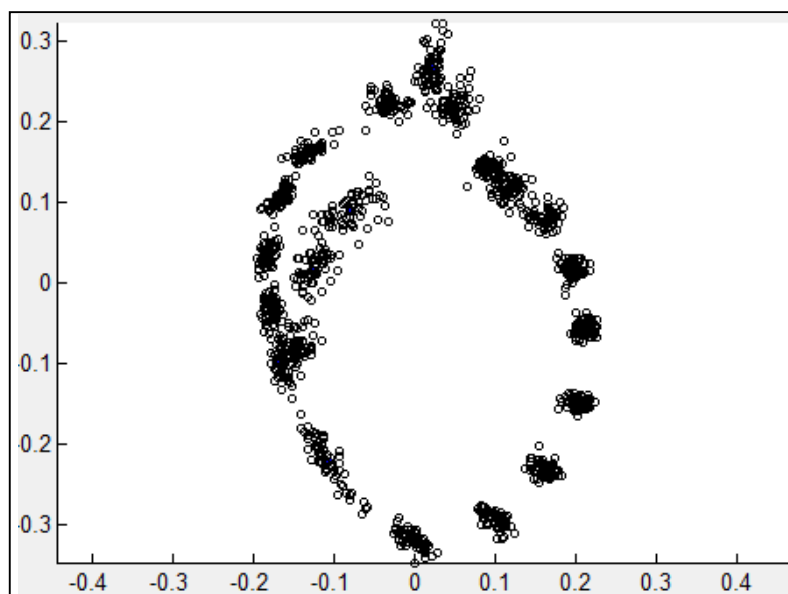


Figura 29. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población La Ventana.

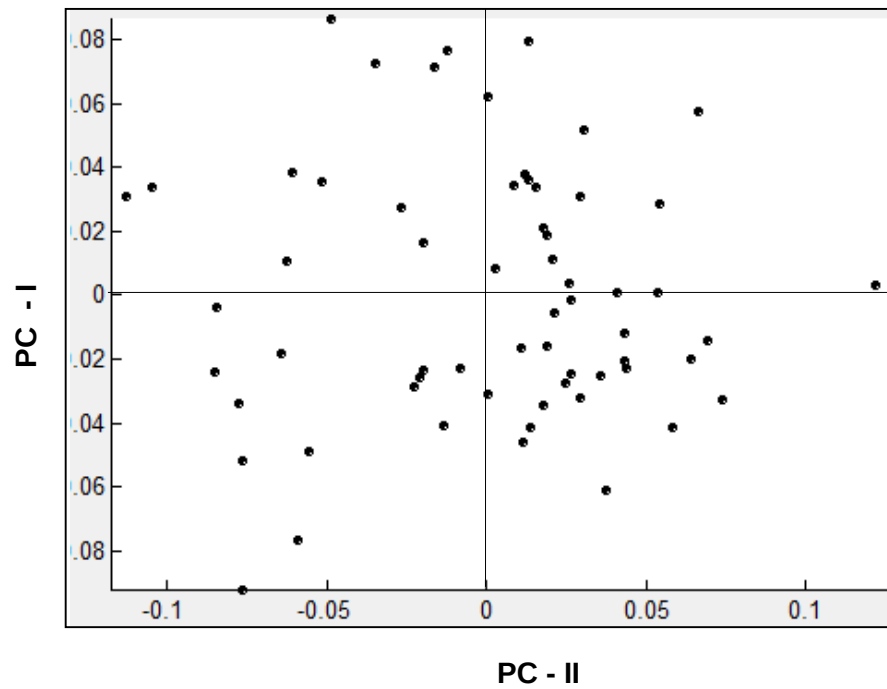


Figura 30. Análisis de componentes principales. Población La Ventana.

Varianza explicada = 55.63%

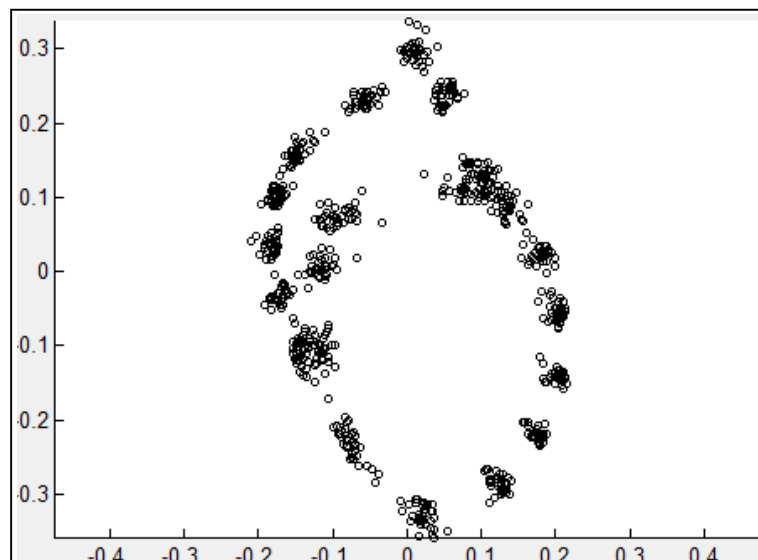


Figura 31. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población Arboletes.

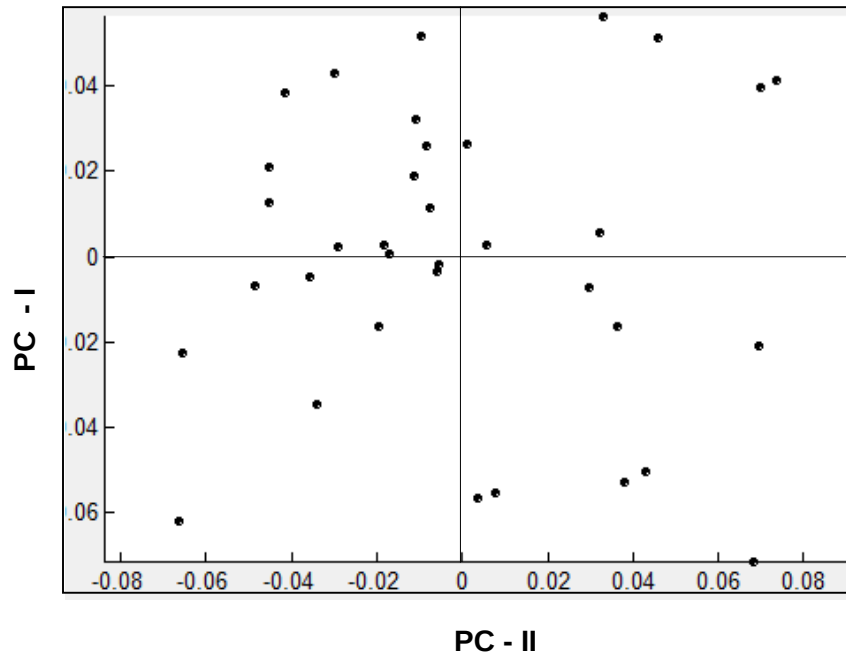


Figura 32. Análisis de componentes principales. Población Arboletes.

Varianza explicada = 41.44%

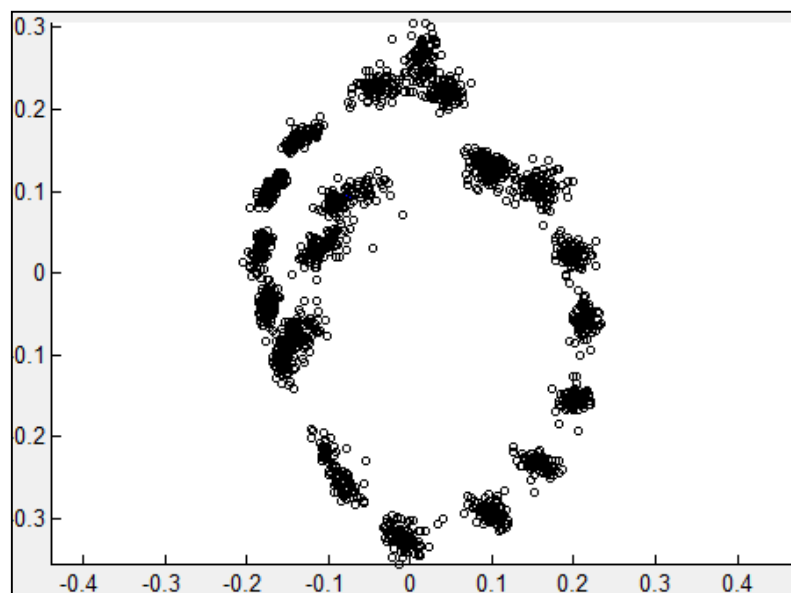


Figura 33. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población Tolú.

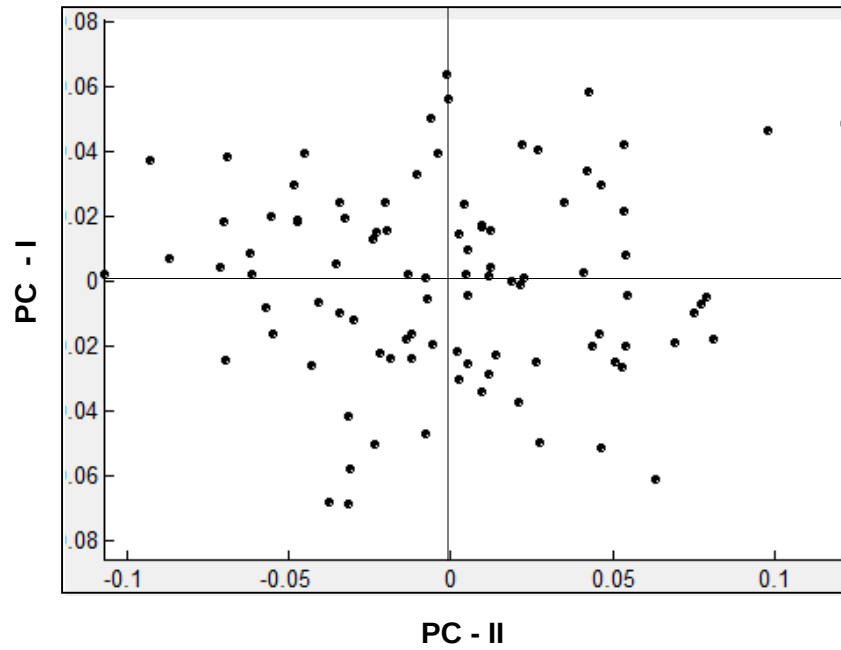


Figura 34. Análisis de componentes principales. Población Tolú.

Varianza explicada = 42.52%

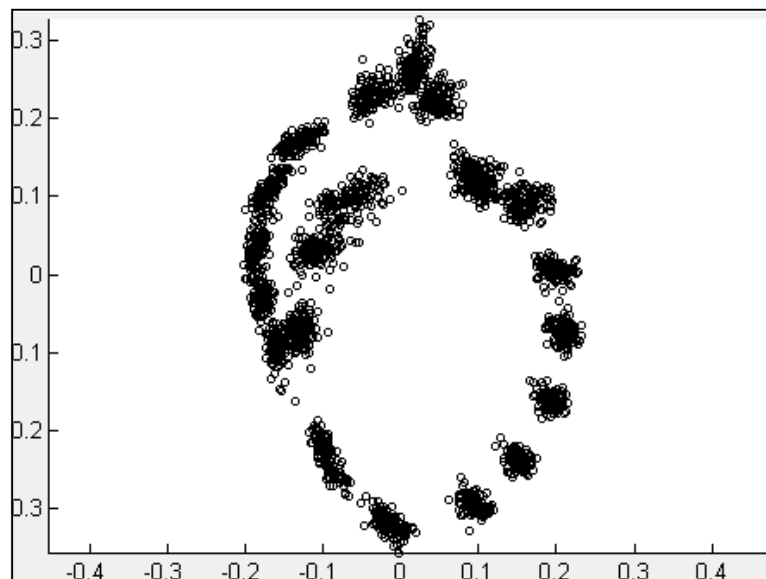


Figura 35. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población Boquetillo.

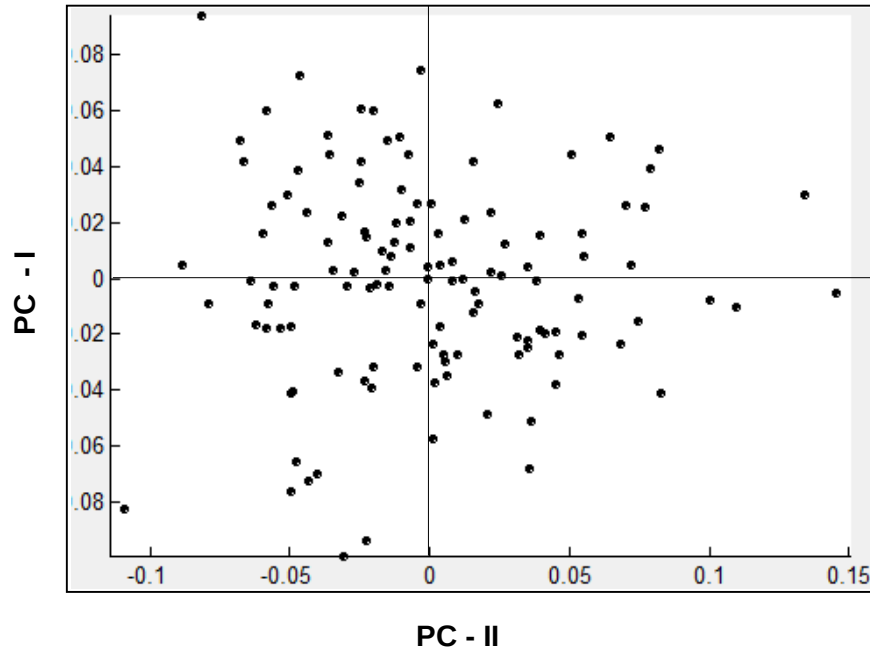


Figura 36. Análisis de componentes principales. Población Boquetillo.

Varianza explicada = 42.36%

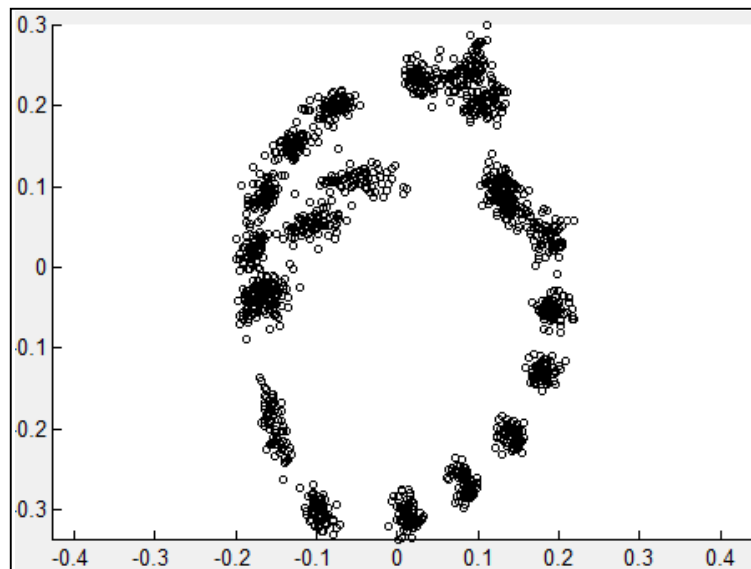


Figura 37. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población Bocagrande.

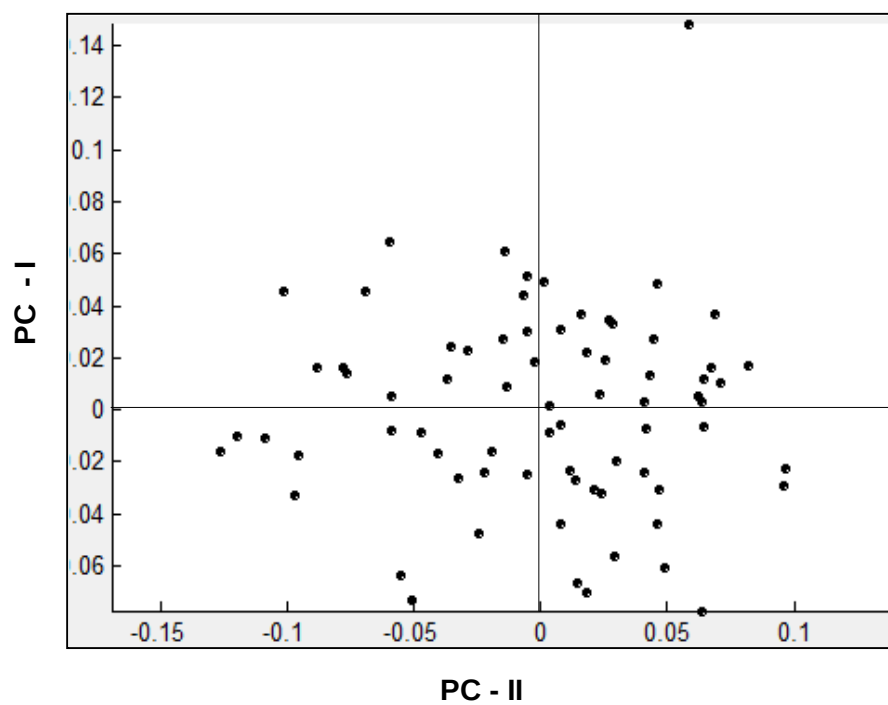


Figura 38. Análisis de componentes principales. Población Bocagrande.

Varianza explicada = 49.84%

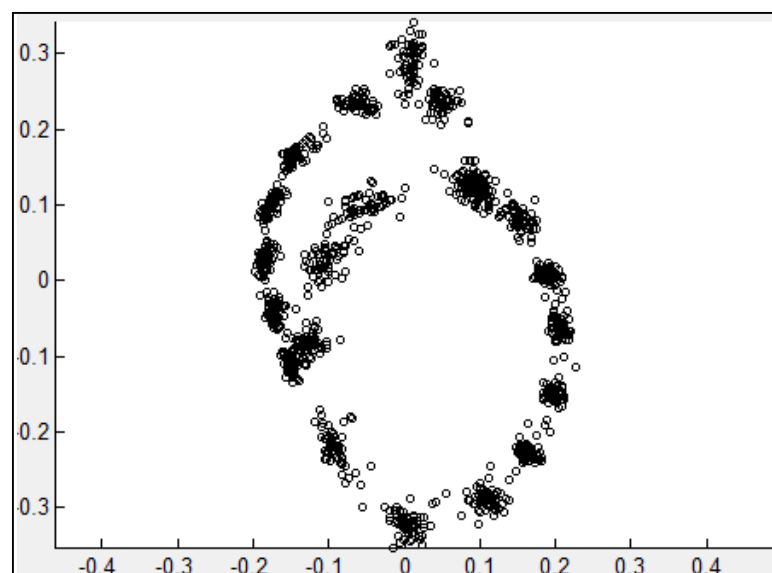


Figura 39. Superposición de hitos morfológicos. Método Procrustes. Población Barú.

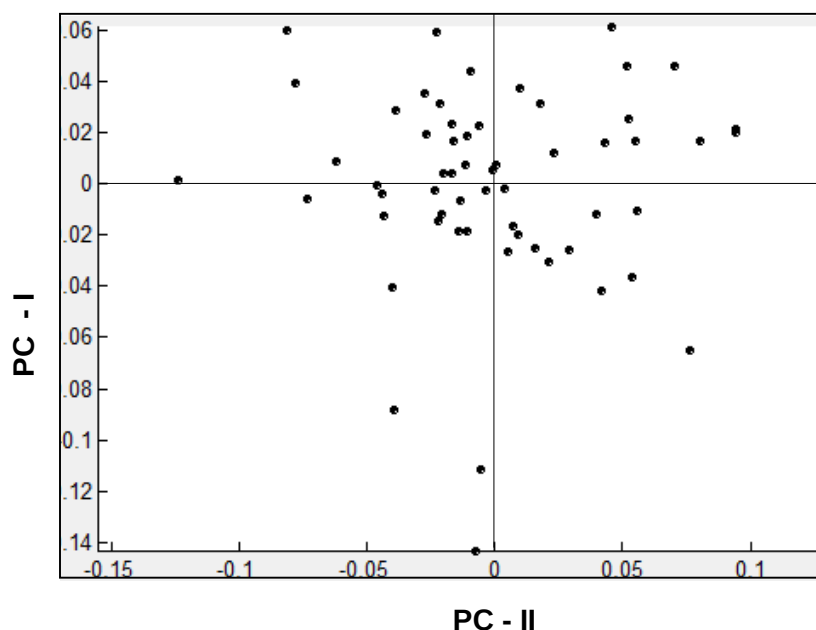


Figura 40. Análisis de componentes principales. Población Barú.

Varianza explicada = 42.37%

El método de superposición de hitos morfológicos, permite observar gráficamente la variabilidad al interior de cada población. El análisis de componentes principales es una herramienta útil para determinar qué porcentaje de la varianza intrapoblacional puede ser explicada por las 42 variables de la forma seleccionadas en este estudio. Para el caso de la población Arboletes, las variables de la forma explican un 41.44% de la variación intrapoblacional. Mientras que para la población de Isla Palma, logran explicar un 66.51%.

5.5 ESTUDIO INTERPOBLACIONAL DE LA FORMA

Con el fin de observar los patrones de variación de la forma, cuando se comparan todas las poblaciones en estudio, se efectuaron dos análisis canónicos discriminantes. El primero sin normalización del tamaño de las conchas y el segundo aplicando la normalización con base al tamaño en el cual se alcanza la madurez sexual (1.8 cm.). Los resultados se muestran en las Figuras 41 y 42, y en las Tablas 10 y 11.

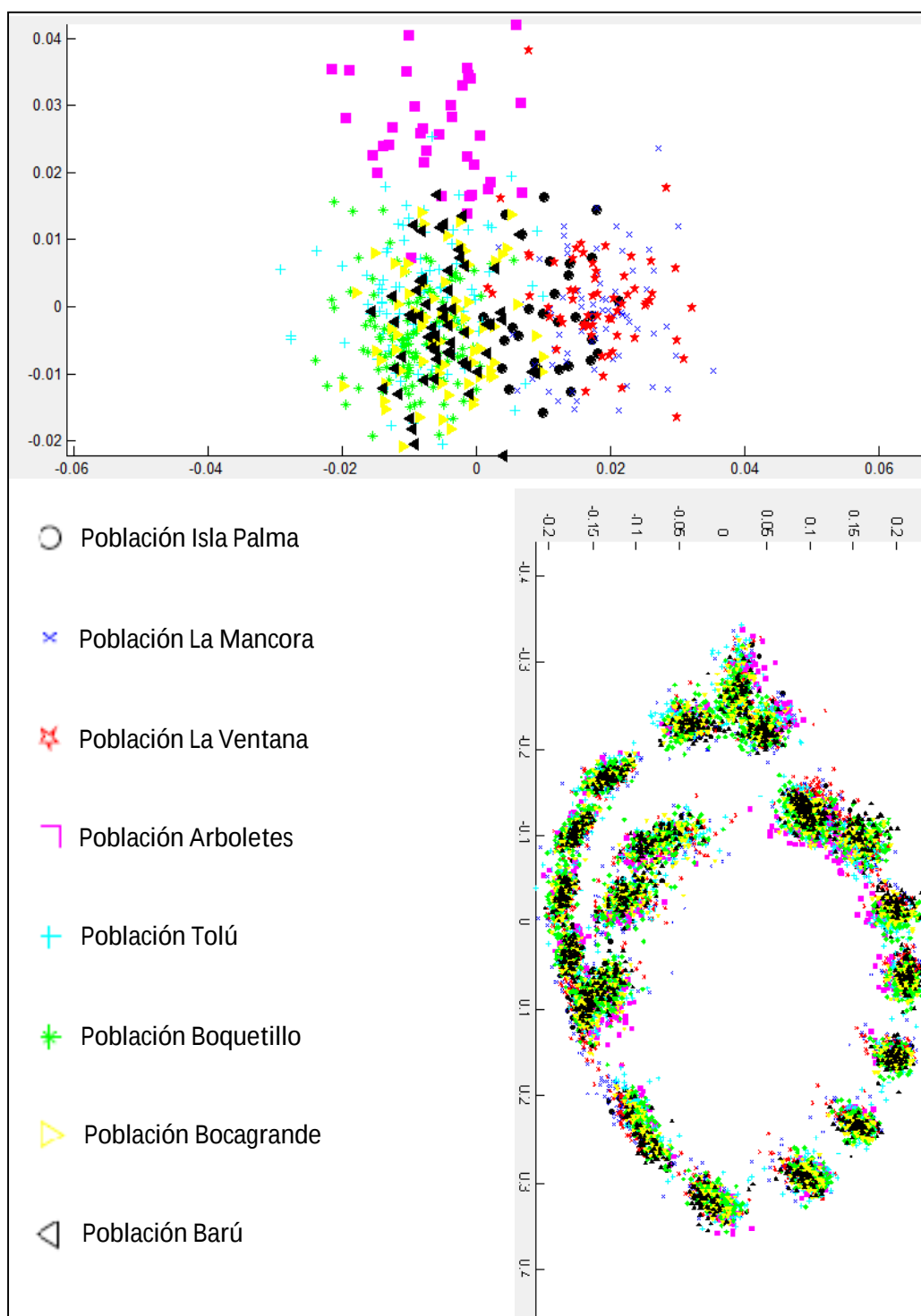


Figura 41. Análisis canónico discriminante sin normalizar el tamaño de las conchas (Arriba). Superposición de hitos morfológicos método Procrustes. Sin normalizar tamaño conchas (Abajo).

Tabla 10. Agrupamientos según la distancia de Mahalanobis sin normalizar el tamaño de las conchas. Grupos originales en las filas. Grupos del análisis discriminante en las columnas: **1.** Isla Palma, **2.** La Mancora, **3.** La Ventana, **4.** Arboletes, **5.** Tolú, **6.** Boquetillo, **7.** Bocagrande, **8.** Barú.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	25	4	1	0	0	0	1	0
2	7	42	18	0	0	1	0	3
3	6	13	41	1	0	0	1	0
4	0	0	0	34	0	0	1	0
5	2	1	1	2	63	13	9	3
6	2	0	0	4	18	65	20	16
7	3	1	0	1	4	10	44	10
8	1	0	1	1	3	3	4	45

De acuerdo a la Tabla 10, el error obtenido en la clasificación de los individuos fue del 34.6%. La población de Arboletes obtuvo el error más bajo (2.8%), mientras que el más alto (48%), se presentó en la población de El Boquetillo.

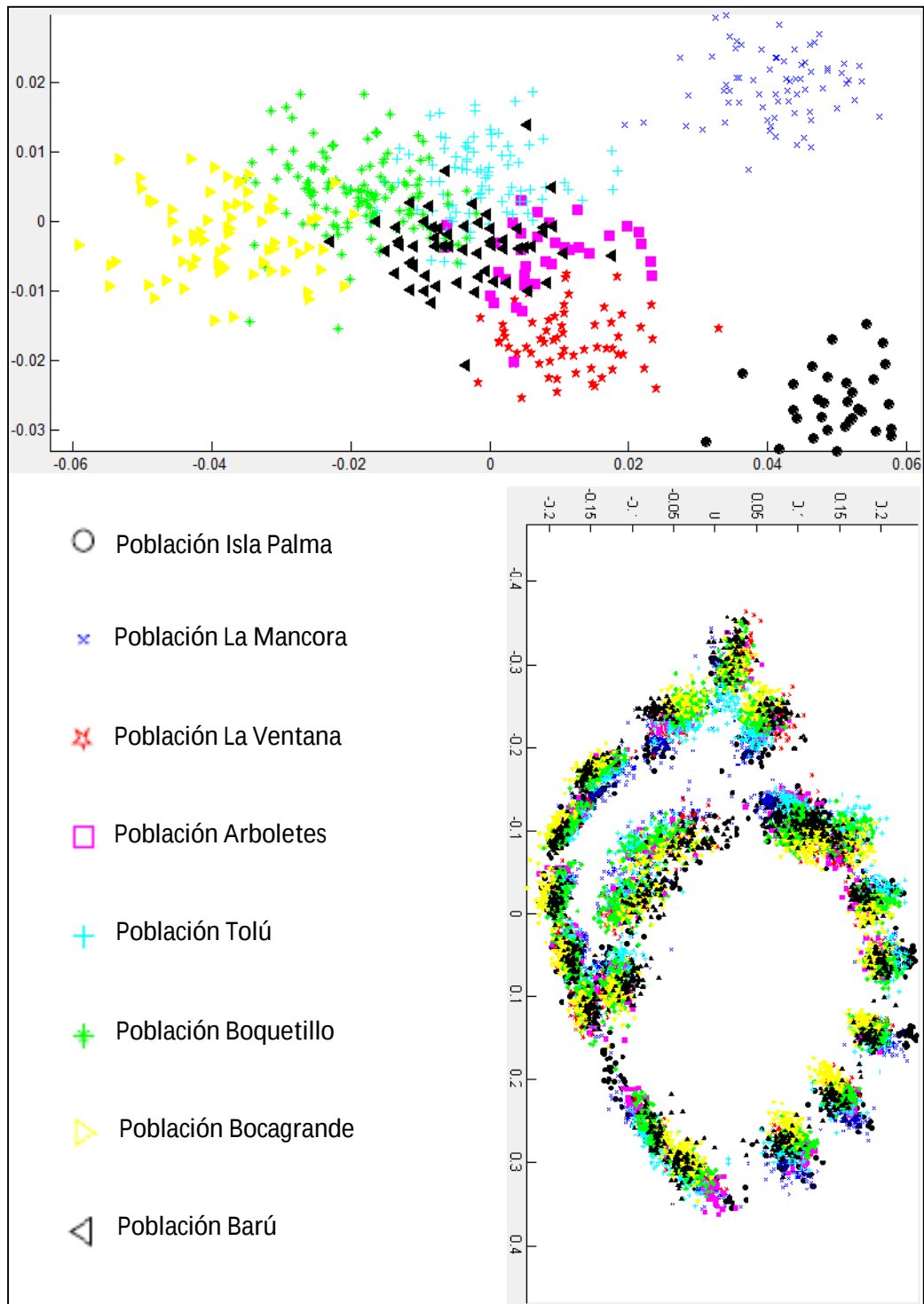


Figura 42. Análisis canónico discriminante normalizando el tamaño de las conchas (Arriba). Superposición de hitos morfológicos método Procrustes. Normalizando tamaño conchas (Abajo).

Tabla 11. Agrupamientos según la distancia de Mahalanobis normalizando el tamaño de las conchas. Grupos originales en las filas. Grupos del análisis discriminante en las columnas: **1.** Isla Palma, **2.** La Mancora, **3.** La Ventana, **4.** Arboletes, **5.** Tolú, **6.** Boquetillo, **7.** Bocagrande, **8.** Barú.

0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	31	0	0	0	0	0	0	0
2	0	71	0	0	0	0	0	0
3	0	0	62	0	0	0	0	0
4	0	0	1	34	0	0	0	0
5	0	0	0	1	92	1	0	0
6	0	0	0	0	2	123	0	0
7	0	0	0	0	0	0	73	0
8	0	0	0	0	0	0	0	58

De acuerdo a la Tabla 11, el error obtenido en la clasificación de los individuos fue del 0.9%. Las poblaciones de Isla Palma, La Mancora, La Ventana, Bocagrande y Barú, no presentaron errores en la clasificación de los individuos. Por otro lado, Arboletes, Tolú y El Boquetillo, presentaron errores del 2.8%, 2.1% y 1,6%, respectivamente.

Claramente se observa la influencia de la normalización del tamaño en los resultados obtenidos. Los valores elevados en los errores, cuando no se normaliza el tamaño, es debido a la gran influencia que este ejerce sobre las variables de la forma. Con este análisis, también se corrobora el crecimiento alométrico de estas especies.

5.5.1 DIFERENCIAS EN LA FORMA DE LAS CONCHAS

Para determinar si existen diferencias estadísticas significativas en la forma de las conchas, se efectuó un análisis de varianza multivariado no paramétrico. Los resultados mostraron diferencias en la forma de las conchas entre todas las poblaciones (Tabla 12).

Tabla 12. Manova no paramétrico y post Manova calculando las distancias de Bray – Curtis para determinar diferencias estadísticas significativas en la forma de las conchas entre poblaciones.

Suma de cuadrados totales = 0.1839; Suma de cuadrados entre grupos = 0.1613

F = 10.86; p = 0.0001

	PALMA	MANCORA	VENTANA	ARBOLETES	TOLU	BOQUETI	BOCAGRA	BARU
PALMA	0	1.65E-02	2.50E-07	0.00058	5.52E-17	1.22E-24	5.85E-18	1.14E-07
MANCORA	1.65E-02	0	1.92E-09	1.06E-01	2.18E-21	6.31E-27	1.33E-29	3.78E-09
VENTANA	2.50E-07	1.92E-09	0	1.29E-01	1.48E-22	1.54E-20	1.71E-19	6.69E-07
ARBOLETES	0.00058	1.06E-01	1.29E-01	0	6.24E-10	6.72E-07	1.21E-09	4.05E-02
TOLU	5.52E-17	2.18E-21	1.48E-22	6.24E-10	0	2.02E-08	1.40E-22	2.96E-16
BOQUETI	1.22E-24	6.31E-27	1.54E-20	6.72E-07	2.02E-08	0	2.42E-15	1.30E-23
BOCAGRA	5.85E-18	1.33E-29	1.71E-19	1.21E-09	1.40E-22	2.42E-15	0	3.24E-23
BARU	1.14E-07	3.78E-09	6.69E-07	4.05E-02	2.96E-16	1.30E-23	3.24E-23	0

5.6 VISUALIZACION GRÁFICA DE LAS DIFERENCIAS DE FORMA

Por medio de las aplicaciones PCAGEN 6 y CVAGEN 6 se generaron gráficas que representan el desarrollo ontogénico de cada población. Las variaciones en los hitos morfológicos se representan por medio de la longitud y dirección de los vectores, los patrones generales del cambio de forma se visualizan por las deformaciones presentes en la cuadrícula. Los resultados por localidad se muestran en las Figuras 43 - 50. La gráfica que representa las diferencias de forma entre las poblaciones estudiadas se muestra en la Figura 51.

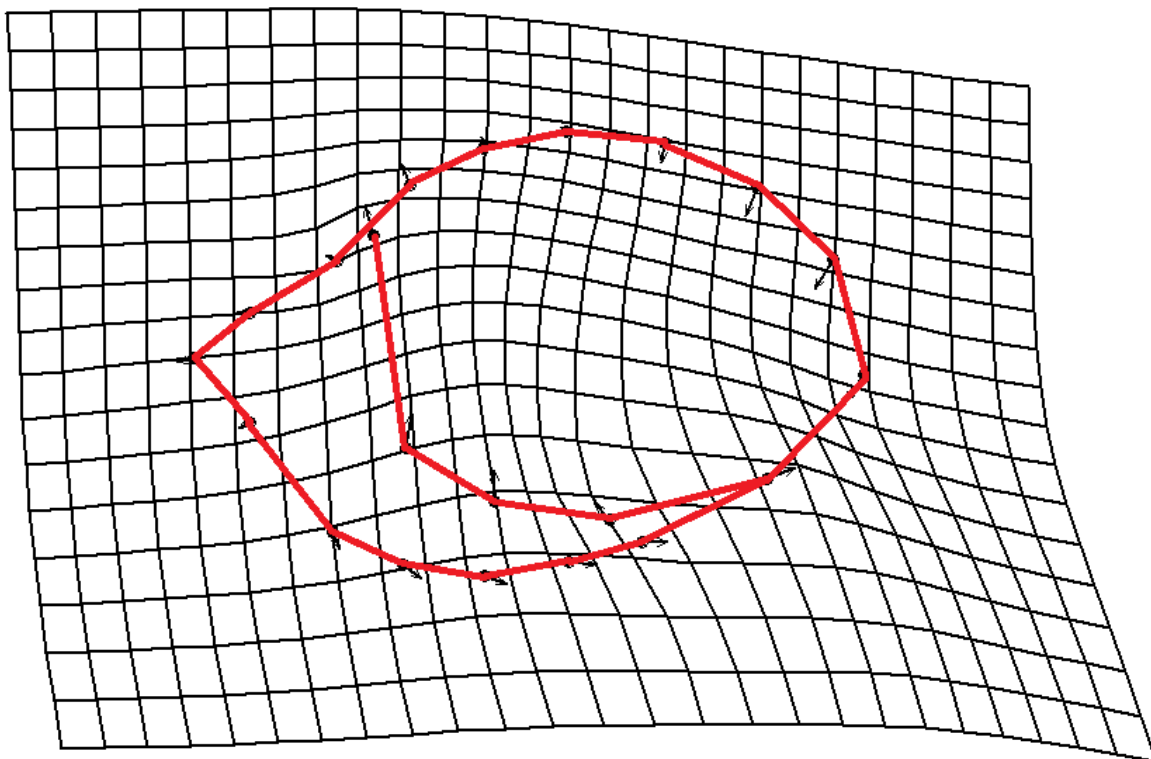


Figura 43. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población Isla Palma.

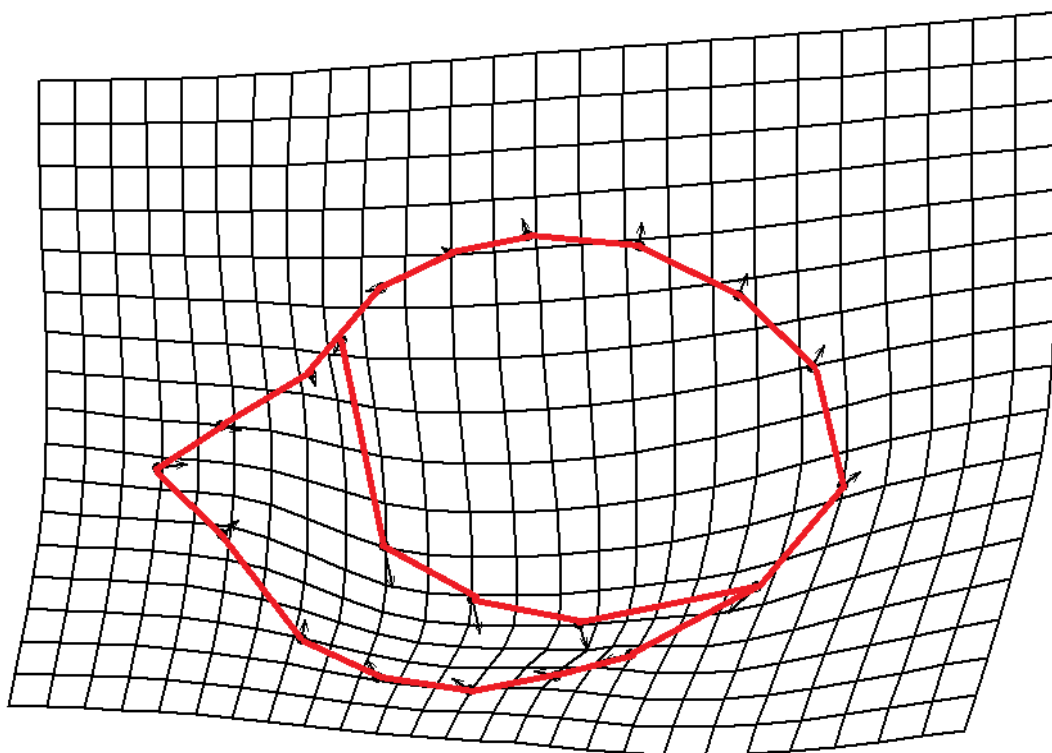


Figura 44. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población La Mancora.

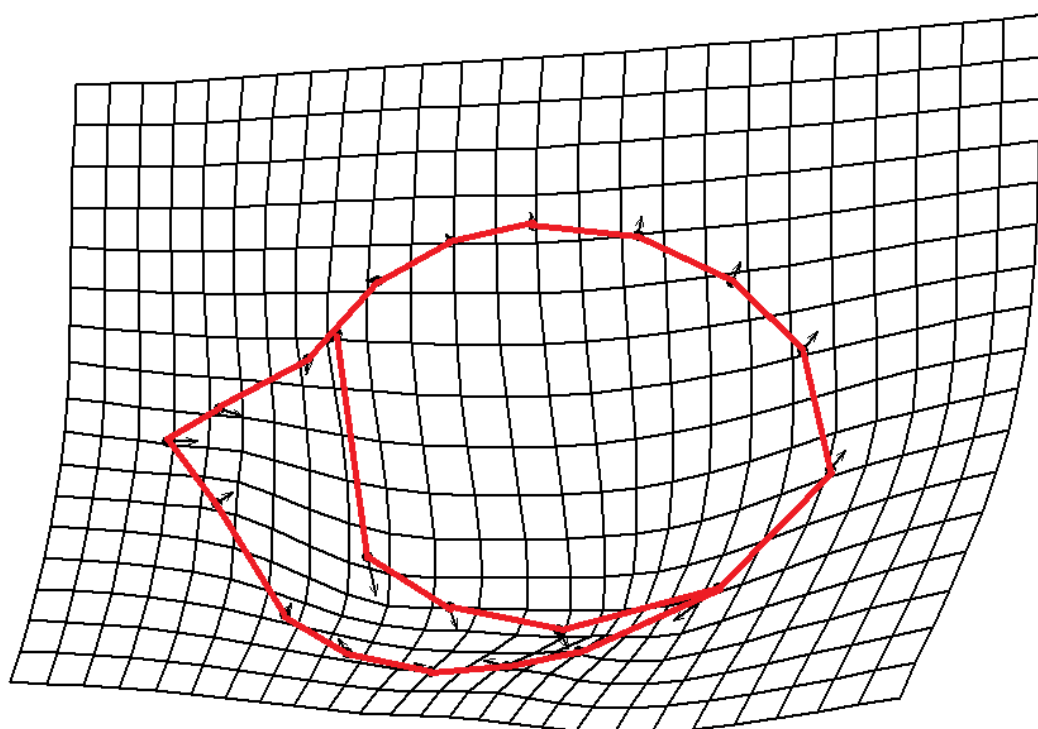


Figura 45. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población La Ventana.

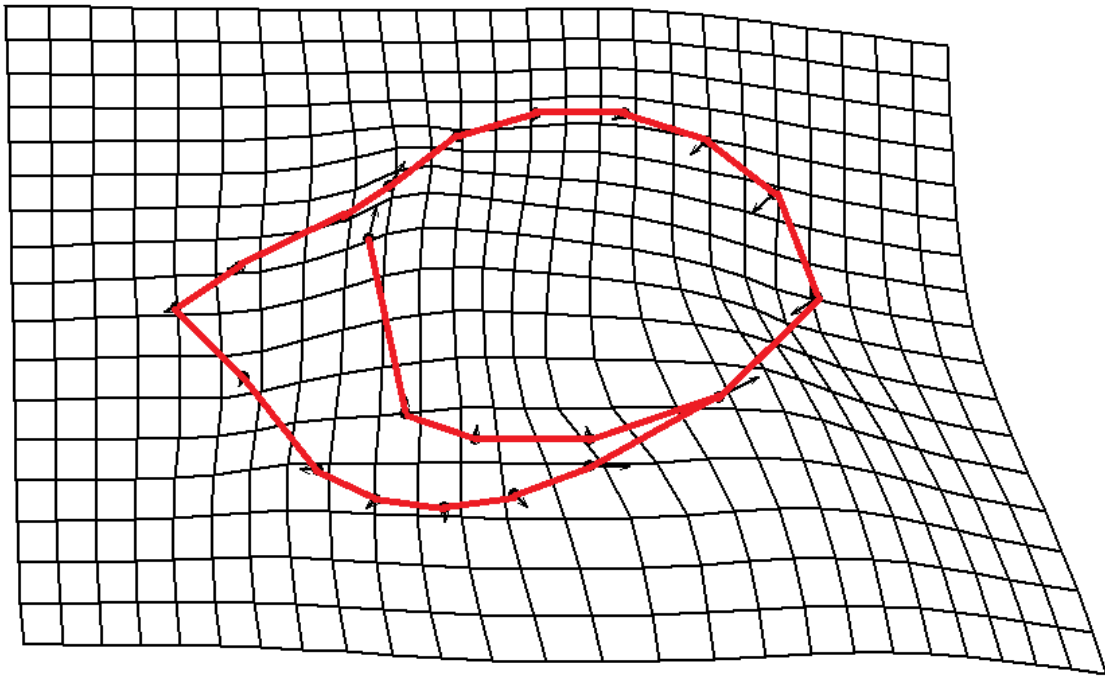


Figura 46. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población Arboletes.

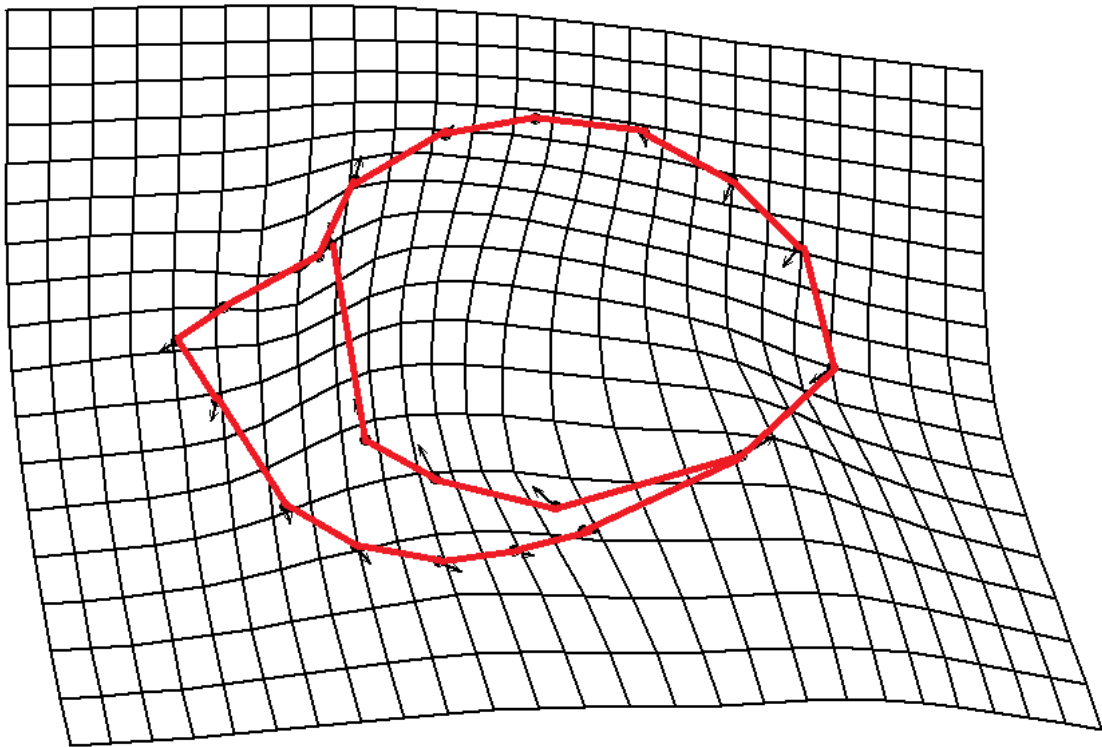


Figura 47. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población Tolú.

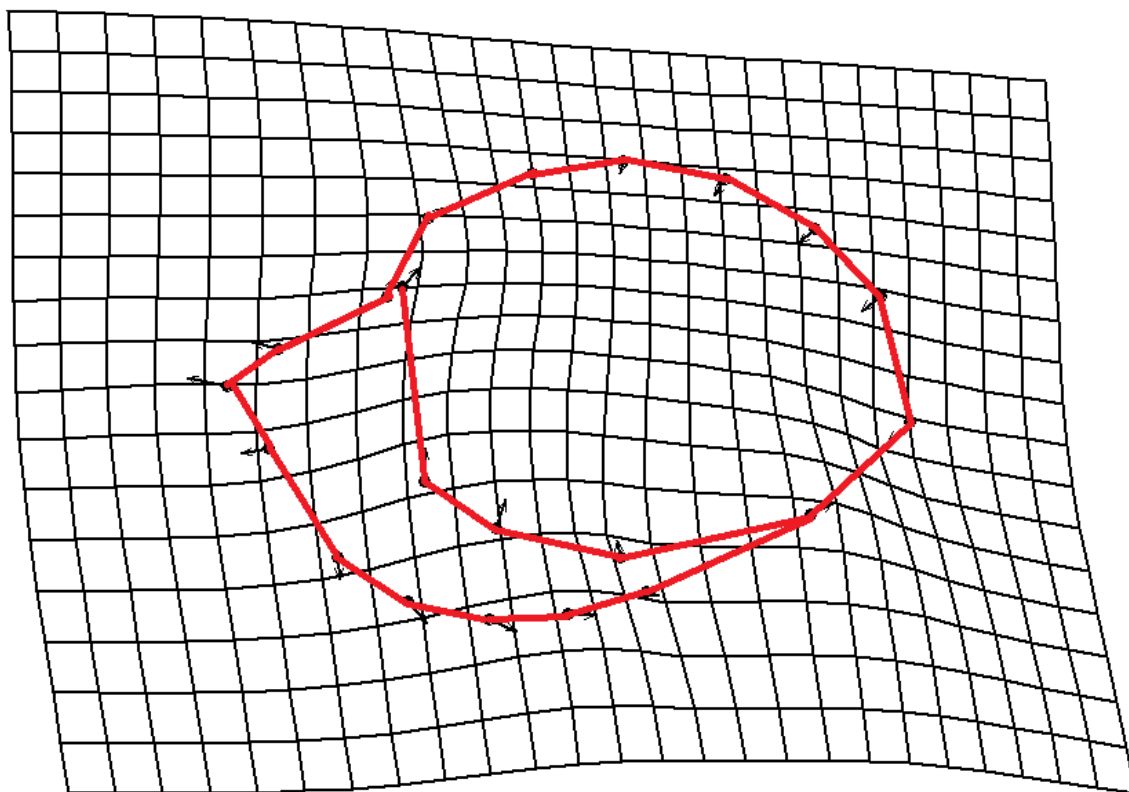


Figura 48. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población Boquetillo.

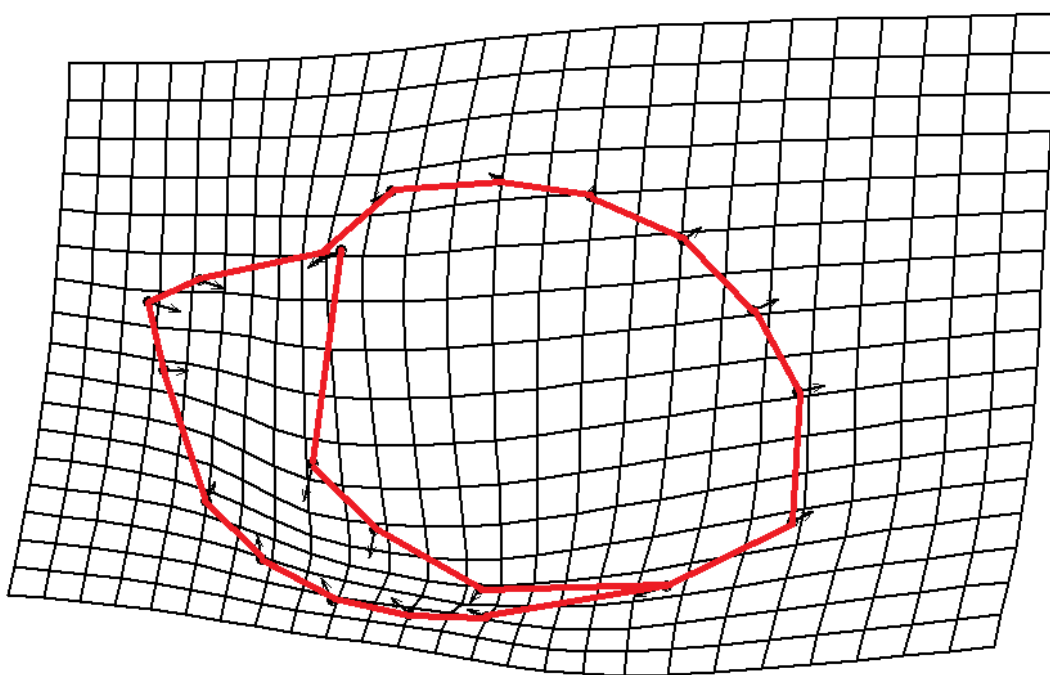


Figura 49. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población Bocagrande.

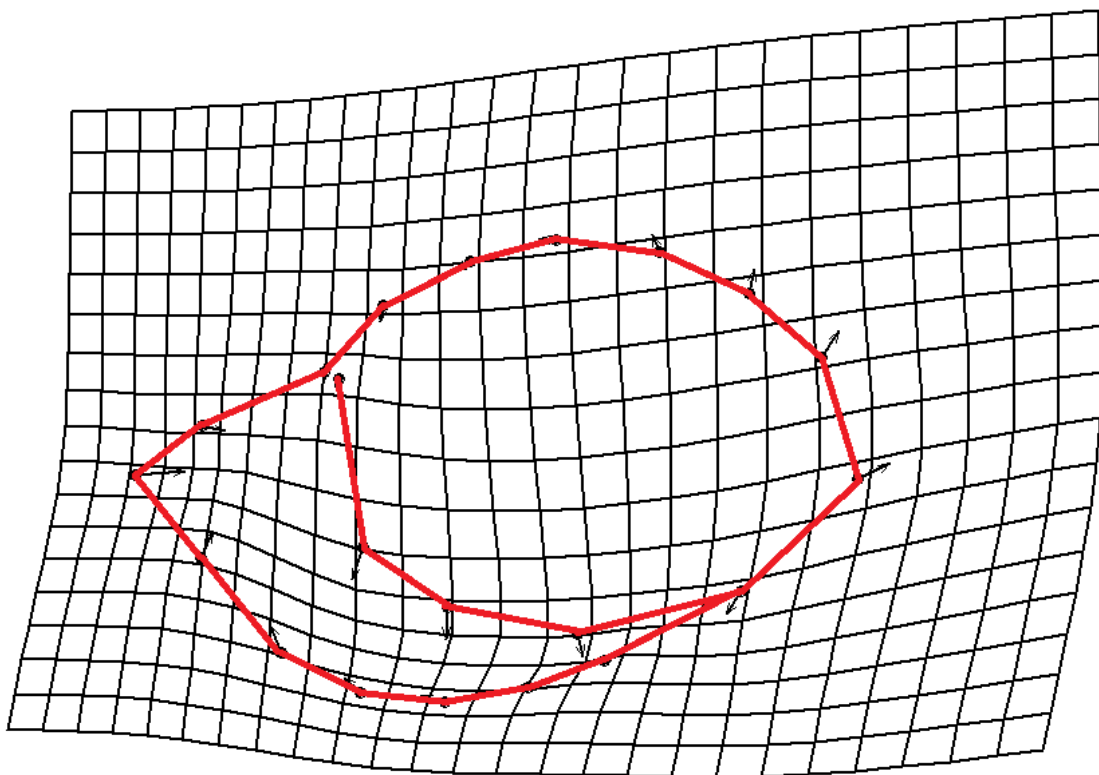


Figura 50. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en la población Barú.

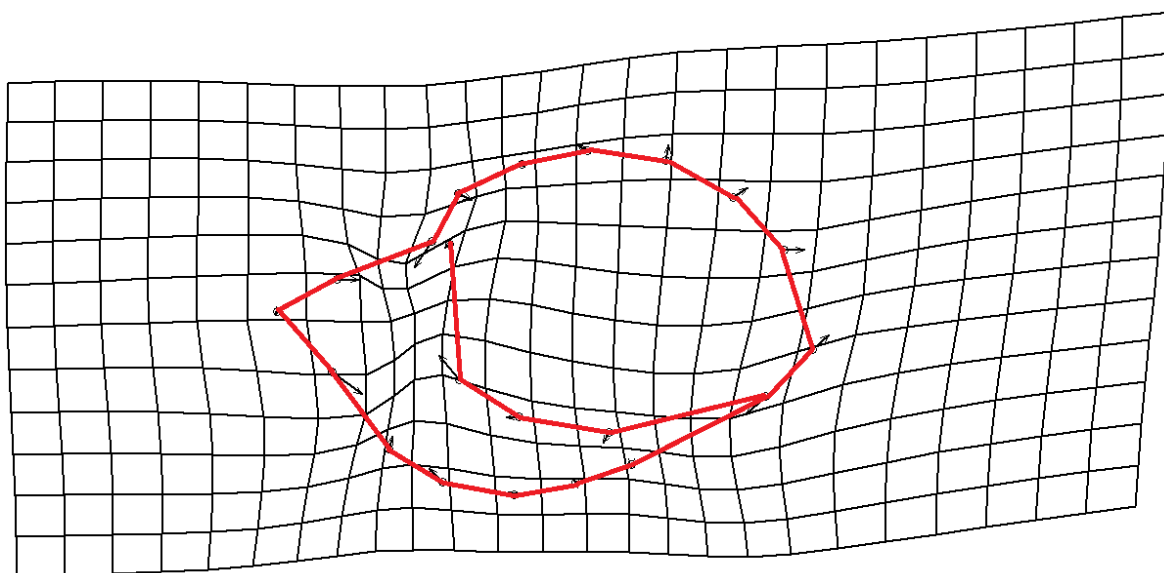


Figura 51. Representación del desarrollo ontogénico de la forma en poblaciones Colombianas.

5.7 APLICACIÓN DEL SOFTWARE INTEGRATED MORPHOMETRICS PROGRAMS (IMP) PARA CLASIFICAR ESPECÍMENES DESCONOCIDOS (COLECCIÓN UNIVALLE)

Se conformaron 2 grupos, el primero representado por todos los individuos pertenecientes a las poblaciones del Pacífico (*Plicopurpura pansa*) y el segundo por todos los individuos del Caribe (*Plicopurpura patula*). Se llevó a cabo un análisis canónico discriminante sobre las 2 poblaciones normalizando el tamaño de las conchas, los resultados se observan en la figura 52 y tablas 13 y 14.

Posteriormente, se aplicó la herramienta computacional ofrecida por el software IMP con el fin de clasificar los especímenes de la colección Universidad del Valle en uno de los dos grupos: *Plicopurpura pansa* ó *Plicopurpura patula*. Los resultados se muestran en la figura 53 y tabla 15.

La finalidad de este procedimiento consiste en obtener una aplicación computacional que clasifique correctamente los especímenes ingresando solamente una imagen digital. Para evaluar la efectividad de la aplicación se emplearon los especímenes de la colección Universidad del Valle, suponiendo que no se sabe a qué especie pertenecen.

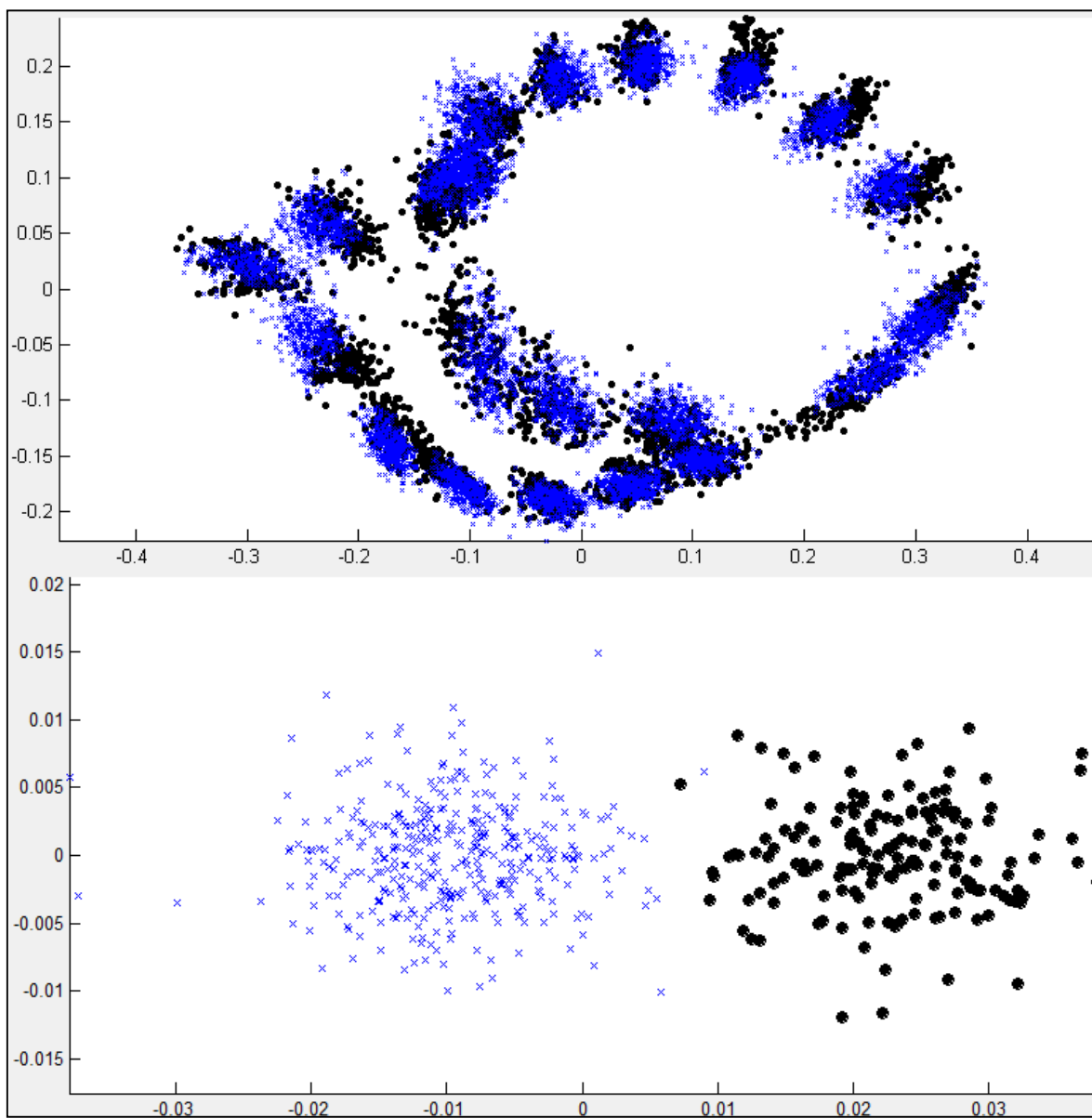


Figura 52. Superposición de hitos morfológicos método Procrustes (Arriba). Análisis canónico discriminante (Abajo). Individuos *Plicopurpura pansa* (Negro). Individuos *Plicopurpura patula* (Azul).

Tabla 13. Agrupamientos según la distancia de Mahalanobis normalizando el tamaño de las conchas. Grupos originales en las filas. Grupos del análisis discriminante en las columnas: **1.** *Plicopurpura pansa*. **2.** *Plicopurpura patula*.

	0	1	2
1		164	0
2		1	384

Tabla 14. Prueba F basada en remuestreo estadístico (Bootstraps = 1600) para validar diferencias en la forma de las conchas de *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura patula*.

F = 75.37; Nivel de significancia: $p = 0.0006$; Bootstraps = 1600; Distancia entre medias = 0.0868
--

Los resultados anteriores corroboran la efectividad del análisis discriminante para clasificar efectivamente las especies de *P. pansa* y *P. patula*. Además, es posible afirmar que dichas especies presentan diferencias estadísticas significativas en la forma de sus conchas.

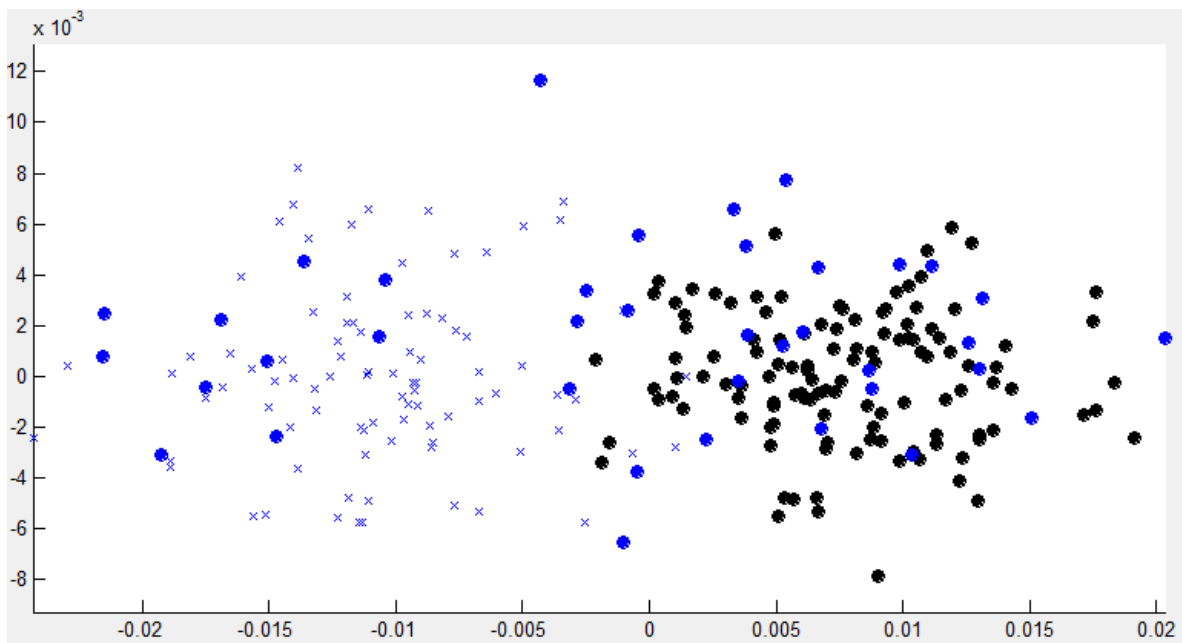


Figura 53. Análisis canónico discriminante para clasificar especímenes desconocidos (Colección Univalle – círculos azules). *Plicopurpura pansa* (Círculos negros). *Plicopurpura patula* (cruces azules).

Tabla 15. Agrupamientos según la distancia de Mahalanobis normalizando el tamaño de las conchas. Grupos originales en las filas. Grupos del análisis discriminante en las columnas: **1.** *Plicopurpura pansa*. **2.** *Plicopurpura patula*. **u.** Colección Univalle.

	0	1	2
1		118	3
2		4	84
u		24	14

Efectivamente, la colección Univalle cuenta con 24 especímenes de *P. pansa* y 14 de *P. patula*, lo que significa que la aplicación fue efectiva en la clasificación de los especímenes a partir de una fotografía digital con las especificaciones indicadas.

6. DISCUSION

La técnica de morfometría geométrica en combinación con los análisis estadísticos multivariados, resultaron ser una herramienta efectiva en la diferenciación morfológica de las especies *P. pansa* y *P. patula*. Los análisis canónicos discriminantes lograron separar claramente todas las poblaciones y también las dos especies. Además, fue posible clasificar individuos desconocidos dentro de una u otra especie sin necesidad de sacrificarlos; solamente fue necesaria la adquisición de una imagen fotográfica acorde a las especificaciones de este estudio.

Según los resultados de los análisis discriminantes, estas especies difieren principalmente en la base de la espira, justo encima de la abertura. A esta conclusión se llega al observar las deformaciones que presenta la cuadrícula justamente en esa zona. Estas diferencias puntuales y otras más sutiles, permiten separar las dos especies con una precisión del 99.1%. A nivel poblacional, estas diferencias también influyen significativamente, generando una distribución de las poblaciones que coincide con su cercanía geográfica. Es decir, poblaciones vecinas son más parecidas morfológicamente que poblaciones alejadas entre sí.

Observando los resultados de los estudios intrapoblacionales se nota que los valores de las varianzas explicadas en las pruebas de análisis de componentes principales, son menores para las poblaciones de Arboletes, Boquetillo, Tolú y Barú. En estas poblaciones los individuos presentan menor promedio en el tamaño de sus conchas, lo cual podría estar asociado con la edad de la población. Es decir, poblaciones jóvenes o con mayor número de juveniles, presentan mayor variabilidad en el tamaño que poblaciones maduras o con mayor número de individuos adultos.

Aunque las especies fueron diferenciadas estadística y gráficamente por medio de la técnica de morfometría geométrica, no fue posible descifrar de manera empírica en las imágenes fotográficas las diferencias conquiliológicas entre ellas. Esto coincide con la definición de especies crípticas, las cuales están aisladas reproductivamente pero las diferencias morfológicas no se presentan o son tan sutiles que no se observan a simple vista (Mayr 1996).

Al analizar las gráficas generadas en el estudio de la forma de cada población, puede entenderse las variaciones que ocurren en las conchas de *P. pansa* y *P. patula*. En ambas especies y en todas las poblaciones estudiadas se encontraron dos morfotipos bien diferenciados, esta circunstancia no es exclusiva de esta especie y ni siquiera de otras especies de la misma familia, también se encuentra

como resultado de otros estudios, como los realizados en la especie *Littorina saxatilis* en costas de Gran Bretaña (Carvajal et al. 2005; Conde et al. 2007).

En las dos especies de *Plicopurpura*, uno de los morfotipos presenta la concha con mayor abertura y espira corta, el otro morfotipo muestra un patrón contrario; abertura angosta y espira larga (Fig. 54). Una posible explicación a este hecho, podría ser el grado de exposición al oleaje. Los individuos sometidos a oleaje fuerte presentan conchas con aberturas grandes para asirse mejor al sustrato; por otro lado, los individuos presentes en zonas con poco oleaje muestran un patrón conquiliológico de abertura pequeña para evitar la desecación y ataque de depredadores.

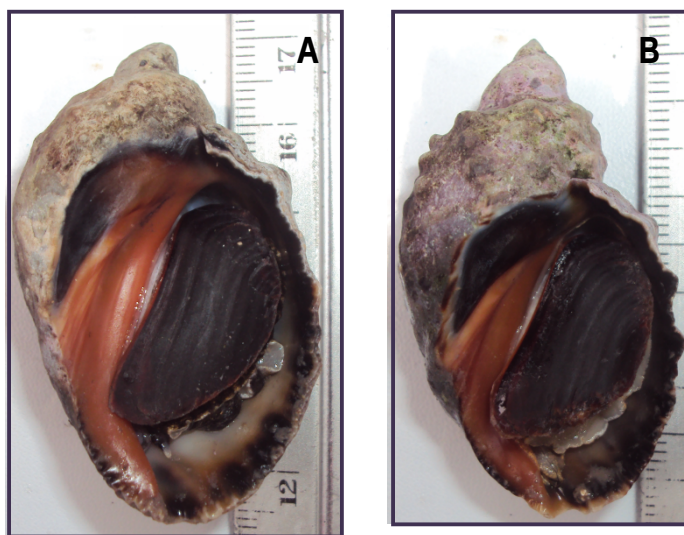


Figura 54. Morfotipos de *P. patula* en Barú. (A) Mayor abertura y espira corta. (B) Abertura angosta y espira larga.

En cuanto al tamaño de las conchas de las especies estudiadas, se analizaron los tamaños promedios obtenidos en Colombia y al compararlos con los resultados obtenidos en costas de México, Ecuador y Panamá (Ramírez y Naegel, 2003; Ibáñez et. al, 2004; Wellington – Kuris, 1983), se observa claramente la tendencia de disminuir los tamaños promedio a medida que se incrementa la latitud (Galápagos - Ecuador = 49 mm, Gorgona – Pacífico Colombiano = 47.2 mm, Barú – Caribe Colombiano = 35.1 mm, Punta Perico - México = 32.5mm).

Por otro lado, las poblaciones de *P. pansa* pertenecientes al Pacífico, presentan mayores tamaños que su congénere *P. patula* perteneciente al Caribe. Estos resultados coincidieron en las dos metodologías aplicadas, morfometría geométrica y morfometría tradicional. Estos resultados también coinciden con otras investigaciones enfocadas al estudio del tamaño de Bivalvos y Briozoarios y su relación con el Istmo de Panamá. Es decir, mayor tamaño corporal en las poblaciones del Pacífico en relación con las del Caribe (O’dea et. al, 2004; Anderson, 2001).

Existe una teoría que concuerda con los resultados anteriores. Ella plantea la aparición de cambios extremos en la geología, la oceanografía y el clima del trópico americano durante el Neógeno. Este suceso se encuentra relacionado con la aparición del Istmo de Panamá, con los cambios en los niveles de productividad y la intensidad de predación (Anderson, 2001). Los mayores niveles de

productividad que presenta el Pacífico en comparación con el Caribe, están asociados con el fenómeno de surgencia en la zona de convergencia intertropical reportado en la cuenca del Pacífico Colombiano (Rodríguez y Giraldo, 2001; Díaz et. al, 2011).

Sin embargo, para llegar a explicaciones más acertadas sobre el porqué es mayor el tamaño promedio de la especie *P. pansa* que el de su congénere *P. patula*. Es necesario realizar estudios que involucren factores de tipo Ecológico y genético. Esta investigación solo comprueba que las dos especies presentan diferencias estadísticamente significativas tanto en el tamaño como en la forma. Además, aporta una herramienta informática para la diferenciación de estas dos especies crípticas de difícil reconocimiento taxonómico. Herramienta que debe ser validada en futuras investigaciones.

7. CONCLUSIONES

- Los resultados del estudio de tamaño de las conchas fueron similares en los dos métodos empleados, morfometría geométrica y morfometría tradicional.
- Dos de las tres poblaciones de *P. pansa* estudiadas en el Pacífico Colombiano presentan conchas significativamente más grandes que las cinco poblaciones de *P. patula* estudiadas en el Caribe. Además, la población de *P. pansa* que no alcanza a ser estadísticamente más grande, si lo es numéricamente.
- Cuando se agrupan las poblaciones estudiadas en el Pacífico formando un solo conjunto (*P. Pansa*) y se hace lo mismo con su congénere *P. patula* en el Caribe, se encuentran diferencias de tamaño estadísticamente significativas entre las dos especies. Las conchas de *P. pansa* son más grande que las de *P. patula* en las poblaciones estudiadas.
- La forma de las conchas de *P. pansa* y *P. patula* depende del tamaño de las mismas. Es decir, presentan crecimiento alométrico.

- Al interior de todas las poblaciones estudiadas de *P. pansa* y *P. patula* se observaron dos morfotipos diferentes. Uno de los morfotipos presenta la concha con mayor abertura y espira corta, el otro morfotipo muestra un patrón contrario; abertura angosta y espira larga.
- Al comparar la forma de las conchas de todas las poblaciones, se encontraron diferencias estadísticas entre ellas. Cada población presenta un patrón en la forma de las conchas que las diferencia de las demás. Sin embargo, estas diferencias no se pudieron detectar a simple vista, para diferenciar la forma de las conchas en cada población fue necesario emplear técnicas de morfometría geométrica en compañía de un análisis discriminante. Estas dos técnicas si permitieron hacerlo.
- Cuando se agrupan todas las poblaciones del Pacífico formando un solo conjunto (*P. Pansa*) y se hace lo mismo con su congénere *P. patula* en el Caribe, se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la forma de las conchas. Aunque se logró ubicar el sitio de la concha donde ocurren las mayores deformaciones (Base de la espira, justo encima de la abertura), no fue posible a simple vista identificar las diferencias de forma entre las dos especies. Por esta razón, se concluye que las especies *P. pansa* y *P. patula* son un caso más de especies gemelas o especies crípticas.

- La técnica de morfometría geométrica acompañada de pruebas univariadas y multivariadas resultó ser altamente efectiva en la diferenciación del tamaño y la forma de las especies *P. pansa* y *P. patula*. Se recomienda comprobar con otras muestras la funcionalidad de la aplicación generada en este estudio para diferenciar las especies *P. pansa* y *P. patula*, como se efectuó con los especímenes de la colección Universidad del Valle, obteniendo un éxito del 100%.
- El siguiente paso en relación con la diferenciación de las especies *P. pansa* y *P. patula*, es realizar investigaciones en el área molecular. Es evidente el aporte que brinda la biología molecular en la resolución de problemas de esta índole, más aún si se contrastan con los resultados que se obtuvieron en este estudio. También sería útil efectuar pruebas de cruzamiento entre ambas especies, con el fin de determinar si existe aislamiento reproductivo y así poder afirmar con certeza la existencia de dos especies biológicas reales.

8. AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi madre: Gladys Carrillo.

Mon amour: Amira.

A todos mis familiares y amigos que hicieron posible este sueño.

Agradezco especialmente al profesor Jaime Ricardo Cantera, director de la tesis y un ser humano que aportó enormemente a mi formación académica.

A mis profesores: Edgardo Londoño, Inge Ambrecht, Alba Marina Torres, Fernando Zapata, Heiber Cárdenas, Alan Giraldo, Mercedes Andrade, Jaime Ernesto Díaz; siempre dispuestos a colaborar.

A todo el apoyo logístico en las salidas de campo brindado por la Universidad del Valle y la Universidad de Cartagena, en especial al profesor Gabriel Navas.

A mis compañeros de estudio: Manolo, Silvana, Zuleima, Francisco, Vladimir, Sergio, Cristian, Janine, Jesica, Willy, Luz Ángela, Ángel, Carolina, Julio, Selene, Leonardo, Miguel, Elizabeth y Evelyn.

A todos los que aportaron en mi formación intelectual y más aún a los que me enseñaron a ser un mejor ser humano.

“Quien enseña siembra, quién aprende cosecha”.

9. LITERATURA CITADA

Abbott, R. T. (1974). American seashells. Editorial Advisory board. New york. 541 p.

Acevedo, G. J. y Hernández, C. E. (1987). Aspectos poblacionales y etnobiológicos del caracol *Purpura pansa* (Gould 1853) en la costa de Oaxaca. Tesis de licenciatura, Universidad nacional autónoma de México. 146 p.

Álvarez, A. (1989). Relaciones ecológicas y algunos aspectos poblacionales del caracol *Purpura pansa* (Gould 1853), en la costa del estado de Michoacán, México. Tesis de licenciatura, Universidad Michoacana, San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México. 123 p.

Anderson, L. C. (2001). Temporal and geographic size trends in Neogene Corbulidae (Bivalvia) of tropical America: using environmental sensitivity to decipher causes of morphologic trends. *Palaeogeografia. Palaeoclimatología. Palaeoecologia*. 166:101–20.

Arias, L.; González, J. P.; Fletes, H.; Rodríguez, L. E. y Del Valle, G. (2007). Cariotipos de los caracoles de tinte *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura columellaris* (Gastropoda: Muricidae). Revista de Biología Tropical. Vol. 55 (3 – 4): 853 – 866.

Arnold, S. J. y Phillips, P. C. (1999). Hierarchical comparison of genetic variance–covariance matrices. II. Coastal-island divergence in the garter snake, *Thamnophis elegans*. Evolution, 53, 1516–1527.

Avilés, A., Muciño, M. y Peña, I. (1990). Sinopsis de la biología del caracol púrpura del Pacífico. Instituto Nacional de la Pesca. Serie: Documentos de Trabajo, Año II. No. 24. 10 p.

Barrera, R.; Marín, L. y Posada, B. (2012). Geología y geomorfología del Golfo de Morrosquillo (Rada – Tolú). INGEOMINAS. 19 p.

Bookstein, F. L. (1996). Combining the tools of geometric morphometrics. In Advances in Morphometrics (L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy et al., eds) Plenum Press. 131–151.

Bookstein, F. L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press.

Bookstein, F. L. (1989). Size and shape: A comment on semantics. *Systematic Zoology*, 38, 173–190.

Bookstein, F. L., Chernoff, B., Elder, R. et al. (1985). *Morphometrics in Evolutionary Biology*. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia.

Caley, K.; Grahame, J. y Mill, P.J. (1995). A geographically based study of shell shape in small rough periwinkles. *Hydrobiologia*, 309: 181–193.

Cantera, J. R.; Neira, R. y Ricaurte, R. (1998). *Bioerosión en la costa pacífica colombiana. Un estudio sobre la biodiversidad, la ecología y el impacto humano de los animales destructores de los acantilados rocosos*. Universidad del Valle, departamento de biología, sección de biología marina. Fondo FEN Colombia. Colombia. 150 p.

Carvajal, A.; Conde, P. y Rolán, E. (2005). Decomposing shell form into size and shape by geometric-morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies*, 71: 313–318.

Castillo, Z. G. (1992). Combinatio nova de *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) (Prosobranchia: Muricoidea). *Anales del instituto de ciencias del mar y limnología. UNAM*. 19: 103 – 111.

Castillo, Z. G. y Amezcua, F. (1992). Biología y aprovechamiento del caracol morado *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) (Gastropoda: Neogastropoda) en la costa de Oaxaca, México. *Anales del instituto de ciencias del mar y limnología. UNAM*. 9: 223 – 234.

Castillo, Z. G. (1982) Informe de las actividades de la Compañía Imperial sobre el caracol *Purpura pansa* (Gould, 1853), en la costa de Oaxaca. Instituto Nacional de la Pesca, SEPESCA. 1-12.

Chapman, R. E. (1990). Conventional Procrustes methods. In *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop* (F. J. Rohlf and F. L. Bookstein, eds) University of Michigan Museum of Zoology. 251–267.

Clench, W. J. (1947). The genera *Purpura* and *Thais* in the western Atlantic. *Johnsonia*, 2 (23): 61 – 75.

Conde, P.; Grahame, J.W. y Rolán, E. (2007). Detecting shape differences in species of the *littorina saxatilis* complex by morphometric analysis. *Journal of Molluscan Studies Advance*. 1 – 8.

Corti, M.; Fadda, C.; Simson, S. y Nevo, E. (1996). Size and shape variation in the mandible of the fossorial rodent *Spalax ehrenbergi*. In *Advances in Morphometrics* (L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy et al., eds). 303–320.

Díaz, D. C.; Villegas, N. y Málikov, I. (2011). Análisis de la convergencia y la divergencia de Ekman en el Pacífico colombiano. *Revista colombiana de física*, Vol. 43, No. 3 de 2011.

Domínguez, D.; González, H.; Nieto, J. T. y Ruiz, J. M. (2009). Aspectos biológicos de los caracoles *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura columellaris* mediante observaciones en condiciones de laboratorio. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*. Vol. 10, Nº 2. 1 – 7.

Duque, H. (1984). Estilo estructural, diapirismo y episodios de acrecimiento del terreno Sinú - San Jacinto en el Noroccidente de Colombia. Boletín Geológico INGEOMINAS. 27, (2) 1-29.

Fink, W. L. y Zelditch, M. L. (1995). Phylogenetic analysis of ontogenetic shape transformations: a reassessment of the piranha genus *Pygocentrus* (Teleostei). Systematic Biology, 44, 343–360.

García, F. A y Naegel, L. C. (2006). Reproductive cycle of the purple snail *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) from two locations at Baja California Sur, Mexico. Journal of shellfish research, Vol. 25, No. 3, 925 – 933.

Good, P. (1994). Permutation Tests: A Practical Guide to Resampling Methods for Testing Hypotheses. Springer-Verlag. 270 p.

Gould S.J. (1966). Allometry and Size in Ontogeny and Phylogeny. Biological Reviews 41: 587-640.

Guralnick, R.P. y Kurpius, J. (2001). Spatial and temporal growth patterns in the phenotypically variable *Littorina saxatilis*: surprising patterns emerge from chaos. In Beyond heterochrony, (M. Zeldich, ed.), John Wiley and Sons, New York. 195–228.

Hingst-Zaher, E.; Marcus, L. F. y Cerqueria, R. (2000). Application of geometric morphometrics to the study of postnatal size and shape changes in the skull of *Callomys expulsus*. *Hystrix*, 11, 99–113.

Houle, D.; Mezey, J. y Galpern, P. (2002). Interpretation of the results of Common Principal Components Analysis. *Evolution*, 56, 433–440.

Huxley, J. S. (1932). Problems of Relative Growth. Mac Veagh. 276 p.

Ibáñez, S.; Flórez, R.; Flórez, P. y Valdés, A. (2004). Densidad y tallas de *Plicopurpura patula pansa* relacionadas con el sustrato y oleaje en la costa rocosa de Guerrero, México. Universidad Autónoma metropolitana de Iztapalapa distrito federal México. *Hidrobiológica*, noviembre, año / Vol. 14, número 002. 127 – 133.

Keen, A. M. (1965). *Purpura, Ocenebra y Muricanthus* (Gastropoda): request for clarification of statuts. Bulletin of zoological nomenclature, 21 (3): 235 – 239.

Keen, A. M., (1971). Seashells of Tropical West America Marine Mollusks from Baja California to Peru. Stanford University Press, 2a. ed. California 1064 p.

Kendall, D. (1977). The diffusion of shape. Advances in Applied Probability, 9, 428–430.

Kingsolver, J. G. y Wiernasz, D. C. (1991). Development, function, and the quantitative genetics of wing melanin pattern in *Pieris* butterflies. Evolution, 45, 1480–1492.

Klingenberg, C. P., Badyaev, A. V., Sowry, S. M. y Beckwith, N. J. (2001). Inferring developmental modularity from morphological integration: analysis of individual variation and asymmetry in bumblebee wings. American Naturalist, 157, 11–23.

Knowlton, N. (1993). Sibling Species in the Sea. Annual Reviews in Ecology and Systematics 24 (1): 189–216.

Kool, S. P. (1988). Aspects of the anatomy of *Plicopurpura patula* (Prosobranchia: Muricoidea: Thaidinae), new combination, with emphasis of the reproductive system. *Malacología* 29: 373 – 382.

Kool, S. P. (1987). Significance of radular characters for reconstruction of thaidid phylogeny (neogastropoda: Muricacea). *The Nautilus*, 101 (3): 117 – 131.

León, H. (1989). Estructura poblacional, producción y tiempo de recuperación del tinte de *Purpura pansa* (Gould, 1853) (Gastropoda: thaididae) en algunas playas rocosas de la Bahía de Cuastecomate, San Patricio Melaque, Jalisco, México. Tesis de licenciatura, Universidad de Guadalajara. 107 p.

Lessios, H.A. (2008). The Great american schism: Divergence of marine organisms after the rise of the central american isthmus. *Annual review of ecology, evolution and systematic*. 39:63–91.

Marsh, A.C.; Ribbink, A.J y Marsh, B.A. (1981). Sibling species complexes in sympatric populations of *Petrotilapia trewavas* (Cichlidae, Lake Malawi). *Zoological journal of the Linnean society* 71 (3): 253–264.

Mayr, E. (1996). What is a Species, and What is Not? *Philosophy of science* 63 (2): 262.

Mayr, E. (1970). *Populations, species, and evolution*. Cambridge, MA: Harvard University press. 453 p.

Mayr, E. (1963). *Animal species and evolution*. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass. 797 p.

Morfín, J. E.; Chávez, E. A. y González, L. (2002). Estructura de la población, esfuerzo y rendimiento de tinte del caracol *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) en el Pacífico Mexicano. *Ciencias marinas* 28: 357 – 368.

Naegel, L. C. (2004). Laboratory spawning of the purple snail *Plicopurpura pansa* (Gastropoda: Muricidae). *Revista de biología tropical*. 52: 57 – 65.

O'Dea, A.; Herrera, A.; Fortunato, H. y Jackson, J. (2004). Life history variation in cupuladriid bryozoans from either side of the Isthmus of Panama. *Marine ecology progress series* Vol. 280: 145– 161.

Palopoli, M.F. y Wu, C.I. (1994). Genetics of hybrid male sterility between drosophila sibling species: A complex web of epistasis is. *Genetics* 138 (2): 329–341.

Ramírez, M. y Naegel, L. C. (2003). Crecimiento del caracol de tinte *Plicopurpura pansa* en baja California sur, México. *Ciencias marinas* 29: 283 – 290.

Res, C.G. (2002). Patterns of karyotype evolution in complexes of sibling species within three genera of African murid. *Logo* (96): 1-4.

Ríos, E.; León, H. G.; Lizárraga, L. y Michel, J. E. (1994). Producción y tiempo de recuperación del tinte de *Plicopurpura patula pansa* (Neogastropoda: Muricidae) en Jalisco, México. *Revista de biología tropical*. 42: 537 – 545.

Rodríguez, E. y Giraldo, A. (2001). Surgencia oceánica en el Pacífico Colombiano durante febrero –marzo de 1997: aproximación oceanográfica utilizando sensores remotos. IX congreso latinoamericano sobre ciencias del mar San Andrés Isla, Colombia. Resumen ampliado. 1 – 5.

Rohlf, F. J. (1990). Rotational fit (Procrustes) methods. In proceedings of the michigan morphometrics workshop (F. J. Rohlf and F. L. Bookstein, eds) University of Michigan museum of zoology. 227–236.

Roth, V. L. (1993). On three-dimensional morphometrics, and on the identification of landmark points. In Contributions to morphometrics (L. F. Marcus, E. Bello and A. García-Valdecasas, eds). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. 41–62.

Serrano, L. M. (2009). Origen de la isla Gorgona (Colombia) y su relación con el plateau del Caribe. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 135 p.

Shea, B. T. (2002) Are some heterochronic transformations likelier than others? In human evolution through developmental change (N. Minugh-Purvis and K. J. McNamara, eds). Johns Hopkins Press. 79–101.

Siegel, A. F. y Benson, R. H. (1982). A robust comparison of biological shapes. Biometrics, 38, 341 – 350.

Sonneborn, T.M. (1975). The *Paramecium aurelia* complex of fourteen sibling species. Transactions of american microscopic society 94 (2): 155–178.

Stone, J.R. (1998). Landmark-based thin-plate spline relative warp analysis of gastropod shells. Systematic Biology, 47: 254–263.

Turok, M.A.; Sigler, M.E.; Hernández, C. E.; Acevedo, G. J.; Lara, R. C. y Turcott, V. (1988). El caracol *Purpura* una tradición milenaria en Oaxaca. Dirección general de culturas populares, SEP, México. 164 p.

Universidad de Cartagena. (2010). Diagnostico del distrito de Cartagena en materia de ordenamiento territorial. Alcaldía Mayor de Cartagena de Indias. 116 p.

Vermeij, G. J. (1978). Patterns of marine life. Biogeography and adaptation. Harvard University Press. 332 p.

Wagner, P. J. (1995). Testing evolutionary constraint hypotheses with early Paleozoic gastropods. Paleobiology, 21, 459–470.

Wellington, G. M. y Kuris, A. (1983). Growth and shell variation in the tropical Eastern Pacific intertidal gastropod genus *Purpura*: Ecological and evolutionary implications. *Biological bulletin*. 164: 518 – 535.

Zelditch, M. L.; Swiderski, D. L.; Sheets, H. D. y Fink, W. L. (2004). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Elsevier (USA). 443 p.

Zelditch, M. L.; Bookstein, F. L. and Lundrigan, B. L. (1992). Ontogeny of integrated skull growth in the cotton rat *Sigmodon fulviventer*. *Evolution*, 46, 1164–1180.