



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Biología Evolutiva y Sistemática

Filogeografía de la Serpiente *Senticolis triaspis* (Squamata:Colubridae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Andrea Joanna Roth-Monzón

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Oscar Alberto Flores Villela
Facultad de Ciencias

COMITÉ TUTOR: Dra. Gabriela Parra Olea
Instituto de Biología

Dra. Blanca Estela Hernández Baños
Facultad de Ciencias

MÉXICO, D.F.

MAYO , 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Biología Evolutiva y Sistemática

Filogeografía de la Serpiente *Senticolis triaspis* (Squamata:Colubridae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO(A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Andrea Joanna Roth-Monzón

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Oscar A. Flores Villela
Facultad de Ciencias

COMITÉ TUTOR: Dra. Gabriela Parra Olea
Instituto de Biología

Dra. Blanca Estela Hernández Baños
Facultad de Ciencias

MÉXICO, D.F.

MAYO , 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/2011/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presenta

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de marzo de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del (la) alumno (a) **ROTH MONZÓN ANDREA JOANNA** con número de cuenta 405069479 con la tesis titulada "Filogeografía de la serpiente *Senticolis triaspis* (Squamata: Colubridae)", realizada bajo la dirección del (la) DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA:

Presidente: DRA. LILIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Vocal: DRA. MARISOL MONTELLANO BALLESTEROS
Secretario: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
Suplente: DRA. ELIA GIGORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Suplente: DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de Abril de 2013.

M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
Coordinadora del Programa



MCA/MMJFM/ASR:pp

Agradecimientos

Al programa del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar mis estudios de maestría. Asimismo la realización de este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo de una beca de excelencia otorgada por CONACYT (254420).

Agradezco también al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para la estancia de investigación en la Universidad de Texas en Arlington para la revisión de ejemplares de varias colecciones herpetológicas.

Al Dr. Eric Smith y Dr. Jonathan Campbell por permitirme realizar una estancia en University of Texas at Arlington y el acceso a su ejemplares de la colección herpetológica (UTA). De igual forma a Carl Franklin por su ayuda brindada en recibir ejemplares y empacarlos. A todas las colecciones que me concedieron prestamos y enviaron sus ejemplares para que pudiera revisarlos Dr. Darrel R. Frost (AMNH), M.C. Jens V. Vindum (CAS), M. C. Stephen Rogers (CMNH), M.C. Alan Resetar (FMNH), Dr. Rafe Brown (KU), Neftali Camacho (LACM), Dr. Jonathan Losos (MCZ), Dr. Carol Spencer (MVZ), Dr. Lee Fitzgerald (TCWC), Dr. Christy McCain (UCM), Dr. Ronald Nussbaum (UMMZ), Dr. Víctor Hugo Reynoso (CNAR), Dr. Oscar Flores Villela (MZFC).

A todas las personas que amablemente me donaron tejido de *Senticolis triaspis* para llevar acabo mis análisis, como fueron: Nadhya Campos, Eric Centenero, Israel Solano, Edgar Neri Castro, Dr. David Lazcano Villareal, Dr. Tom Devitt, Dr. Victor Hugo Reynoso, Dr. Oscar Flores Villela, Dr. Alejandro Carbajal Saucedo, Dr. Ricardo Castiglia, José Luis Barragán Ramírez, Elizabeth Beltrán Sánchez y Andrés Alberto Mendoza Hernández.

A mi tutor el Dr. Oscar Flores Villela por su ayuda en la realización de este proyecto, por sus múltiples revisiones a mis escritos que indudablemente resultaron en su mejoría, pero de igual forma por su apoyo durante la realización del proyecto, sin él no hubiera sido posible su culminación.

A mi comité tutorial, la Dra. Blanca Hernández Baños por sus sugerencias en los diferentes tutorales y sus comentarios en la revisión de mi manuscrito; la Dra. Gabriela Parra Olea por sus comentarios en los tutorales que mejoraron inmensamente mi trabajo y por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio, sin esto no hubiera sido posible la realización del presente proyecto.

A los miembros del jurado la Dra. Livia León Paniagua, Dra. Marisol Montellano Ballesteros y la Dra. Ella Vázquez Domínguez por sus varias sugerencias en mi manuscrito, así como ideas que mejoraron sustancialmente mi escrito y escritura.

Agradecimientos a título personal

Quiero agradecer a los estudiantes del laboratorio de la Dra. Gabriela Parra por sus enseñanzas y apoyo, así como las diversas conversaciones y comidas en la zona hippie. De manera especial a Jorge Sánchez Solís por tener la paciencia de enseñarme las técnicas de laboratorio y los usos y costumbres del Instituto de Biología. De igual forma a Mirna García Castillo por sus consejos cuando las secuencias no salían como se esperaba.

A mi compañera de oficina M. C. Belén Chávez Galván por su compañía, pláticas, amistad y por escucharme divagar ideas aún cuando no siempre comprendiera de que divagaba, sin ello no hubiera logrado acomodar mis ideas.

Al Dr. Tom Devitt por sus enseñanzas en cuestiones moleculares, su disposición a siempre ayudarme en lo que necesitará y sus discusiones académicas muchísimas gracias.

Al Dr. Mark Olson por su clase que fue sin duda una inspiración, pero a su vez por su amabilidad y disponibilidad, por que a pesar de estar en un millón de cosas siempre tiene un minuto para dedicar.

A mi familia por darme siempre su apoyo y por estar siempre a mi lado, ya sea con recomendaciones musicales, envíos de noticias relacionadas con cualquier cosa biológica, apoyo en computación y simplemente por siempre preocuparse por mi bienestar.

A mis amigas de toda una vida, por estar conmigo y acompañarme aún desde lejos en cada paso que doy, por su apoyo y amor incondicional, les agradezco infinitamente todos estos años Sol, Mili, Nora.

A Beto, por estar siempre a mi lado, por impulsarme a ser mejor cada día en todos los aspectos, por todo tu apoyo, ayuda, comprensión y amor. Sin ti no sería posible nada de esto.

Índice General

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Especie de Estudio	4
Objetivos	7
Capítulo 1. Variación genética de <i>Senticolis triaspis</i> mediante DNA mitocondrial.	8
1.1 Introducción	8
1.2 Métodos	9
1.3 Resultados	11
1.4 Discusión.....	14
Capítulo 2. Variación morfológica de <i>Senticolis triaspis</i> una aproximación desde la morfología tradicional y geométrica.	18
2.1 Introducción	18
2.2 Métodos	18
2.2.1 Morfología Tradicional.....	19
2.2.2 Morfología Geométrica.....	20
2.3 Resultados	21
2.3.1 Morfología Tradicional.....	21
2.3.2 Morfología Geométrica.....	25
2.4 Discusión.....	28
Discusión General	31
Conclusión	32
Literatura Citada	33
Apéndice 1. Número de catálogo de los 210 ejemplares revisados de colecciones nacionales e internacionales.	39

Lista de Figuras

Figura 1. Mapa de distribución de las subespecies de <i>Senticolis triaspis</i>	5
Figura 2. Fotografías de las subespecies de <i>Senticolis triaspis</i>	6
Figura 3. Árbol filogenético Bayesiano de <i>Senticolis triaspis</i>	13
Figura 4. Mapa presentando la distribución geográfica de los clados (1-8)..	14
Figura 5. Cabeza de <i>Senticolis triaspis</i> mostrando la ubicación de los 21 hitos morfológicos utilizados en la morfología geométrica.	21
Figura 6. Análisis de componentes principales de la morfología tradicional para hembras y machos.	23
Figura 7. Análisis canónico discriminante de la morfología tradicional para hembras y machos.....	23

Figura 8. Análisis de componentes principales de la morfología tradicional para las subespecies en machos y hembras.	24
Figura 9. Análisis canónico discriminante de la morfología tradicional para las subespecies en machos y hembras.	24
Figura 10. Análisis de componentes principales de la morfología geométrica para las subespecies con los sexos agrupados.	26
Figura 11. Análisis canónico discriminante de la morfología geométrica para las subespecies con los sexos agrupados.	26
Figura 12. Placas delgada de deformación de las comparaciones entre las subespecies de <i>S. triaspis</i> en magnitud 3.	27

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Distancias genéticas promedio entre los clados de <i>S. triaspis</i> del “neighbor joining”.	11
Cuadro 2. Lista de caracteres de escamación, cuantitativos y cualitativos morfológicos.	19
Cuadro 3 Medias por sexo y por subespecie para cada uno de los caracteres considerados en el estudio.	22
Cuadro 4. Número de ejemplares clasificados mediante el análisis canónico discriminante de la morfología tradicional en cada una de las categorías de subespecie y porcentaje correcto de la clasificación de los mismos.	26

Resumen

Diversas decisiones de conservación se toman considerando a las especies como unidad haciendo la delimitación de las mismas un trabajo importante, especialmente en aquellas con poca información y rangos de distribución amplios, los cuales podrían enmascarar especies crípticas. La serpiente *Senticolis triaspis* presenta un amplio rango de distribución que se extiende a través de varias barreras biogeográficas que en otros vertebrados han sido importantes para determinar diferencias a nivel de especie. Previo a este trabajo, sólo existe un estudio de morfología univariada, por lo que es necesario profundizar en otros aspectos de la especie. El presente estudio analiza la variación geográfica de *Senticolis triaspis* usando caracteres morfológicos y moleculares, a fin de elucidar la existencia de diferencias significativas entre las subespecies previamente reconocidas de este taxón.

Los análisis morfológicos se llevaron a cabo mediante el uso de morfología tradicional y geométrica, permitiéndonos abarcar una visión completa al analizar forma y tamaño. En cuanto a los análisis genéticos se utilizó el marcador mitocondrial ND4 y se realizaron análisis de Máxima Verosimilitud y de Inferencia Bayesiana. La estructura del árbol se comparó con la distribución geográfica de las subespecies. Se encontró que la morfología no permite diferenciar a las subespecies de manera significativa. Sin embargo la morfología geométrica encontró diferencias en la forma de cráneo que aunque no son significativas podría estar ligadas a adaptaciones de la dieta o microhábitat. Mientras que los análisis de DNA mitocondrial si mostraron la divergencia de las subespecies *S. t. triaspis* y *S. t. mutabilis*, además de una mayor variación genética dentro de *S. t. intermedia*, la cual presentó varias agrupaciones geográficas. En conclusión los análisis realizados no permiten elevar a especie a ninguna de las subespecies. Sin embargo, las subespecies si muestran patrones genéticos de diferenciación probablemente debido a barreras geográficas y/o ecológicas, por lo que se sugiere añadir análisis de modelado de nicho para determinar si *Senticolis triaspis* está compuesta de entidades discretas.

Abstract

Several conservation decisions are taken using the species as a unit, making it important to delimit species, especially those with little information and wide distributional ranges since they could mask cryptic species. The snake *Senticolis triaspis* has a wide distribution range, extending through several geographic barriers that have caused speciation in other vertebrates. Furthermore, only one morphological study exists in *Senticolis triaspis* in which unvaried statistics were used, so various aspects of the species still remain to be known. Hence the present study, analyses the geographic variation of *S. triaspis*, using morphological and molecular characters, to elucidate if significant divergence exists in the subspecies previously assigned.

The morphological analyses were done with traditional and geometric morphology, this allows us a complete vision analyzing shape and size. In terms of the genetic analyses we used the mitochondrial marker ND4 and performed maximum likelihood and Bayesian inference. The structure of the resulting trees was compared to the geographic distribution of the subspecies. The analyses showed that morphology can't differentiate the subspecies of *S. triaspis* significantly, however geometric morphology did find differences in the form of the head and even do they are not significant, these differences could be an adaptation to diet or microhabitat. While the mitochondrial DNA analyses did show genetic divergence for the subspecies *S. t. triaspis* and *S. t. mutabilis*, also in *S. t. intermedia* we found more genetic variation with several geographic subdivisions through its range. In conclusion none of the subspecies should be elevated to species level. The subspecies show patterns of genetic differentiation, probably due to geographical barriers and/or ecological factors, future research should be done incorporating ecological factors and I proposed ecological niche modeling.

Introducción

La especie, es de suma importancia en biología debido a que la mayoría de los estudios la utilizan como su unidad de estudio (Sites y Marshall, 2003, Camargo y Sites, 2013) y varias de las decisiones de conservación se toman con base en ella (Agapow et al, 2004, Mace, 2004, Mace et al, 2008). Sin embargo, entre los biólogos, no existe consenso acerca del concepto de especie, creando controversia en cómo definirlos y distinguirlos (Mayr, 1987, Rojas, 1992, Hudson y Coyne, 2002, Pigliucci, 2003). A pesar de lo anterior, se ha propuesto que entre los diferentes conceptos de especie hay una visión generalizada sobre ésta, la cual ha llevado a la propuesta de un único concepto de especie, el de linaje general (De Queiroz, 1998, De Queiroz, 2007). El problema se mantiene en la forma de delimitación de las mismas (De Queiroz, 2007), debido a varias perspectivas (taxonomía, filogenias, filogeografía, ecología) enfocadas en diferentes partes del proceso de especiación (De Queiroz, 2007, Sites y Marshall, 2003, Camargo y Sites, 2013).

A fin de mejorar la delimitación de especies se ha sugerido la utilización de la taxonomía integrativa, la cual utiliza la mayor evidencia posible de las diferentes disciplinas (Dayrat, 2005, Padial et al, 2010, Yeates et al, 2011). Dentro de estas disciplinas se encuentra el estudio de la morfología y la filogeografía, ambas de gran utilidad en estudios en donde se cuenta con poca información de la especie, permitiendo una prospección inicial (Avila et al, 2006). La filogeografía es principalmente utilizada en estudios intraespecíficos, generalmente mediante el DNA mitocondrial y es de gran utilidad para descubrir especies crípticas (Avice, 2009). Por otro lado los estudios que utilizan caracteres morfológicos nos permiten una prospección de bajo costo y son los principales caracteres utilizados en la descripción de especies y además no sólo infiere la historia materna como el DNA mitocondrial (Camargo y Sites, 2003). Ambas permiten analizar no sólo la delimitación de las especies si no también la variación de la especie en un contexto geográfico e histórico.

La delimitación de especies es de principal importancia en especies con poca información, con rangos de distribución amplios o con varias subespecies asignadas. Este es el caso de varias especies de reptiles debido a que pueden representar especies crípticas (Padial et al, 2010). Además, los reptiles presentan especies con poca

vagilidad, morfológicamente conservadas y con alta sensibilidad a cambios ecológicos, lo cual también suele enmascarar especies crípticas (Böhm et al, 2013). Aunado a lo anterior, la delimitación de especies nos permite especificar el rango de distribución de las mismas, información que es utilizada en decisiones de conservación, por ejemplo para la IUCN el rango de distribución es uno de los criterios más utilizados en la categorización de riesgo (IUCN, 2012, Gaston y Fuller, 2009). Además, la distribución de una especie tiene implicaciones evolutivas, por lo que, conocerla es importante dado que nos permite entender los procesos evolutivos que la demarcan (Holt, 2003, Gaston y Fuller, 2009).

La serpiente monoespecífica *Senticolis triaspis* es una especie poco estudiada cuyo rango de distribución se extiende a través de varias barreras biogeográficas (Faja Volcánica Transmexicana, Depresión del Balsas, Tierras Altas de Guatemala, Istmo de Tehuantepec) que en otros vertebrados han sido factores de especiación (Mulcahy, 2008, Devitt, 2006, Zink, 2002). Además *S. triaspis* ocupa principalmente zonas áridas y semiáridas de los Estados Unidos y México, zonas en riesgo de perderse debido a efectos antropogénicos (cambio en uso de suelo, cambio climático, invasión de especies no nativas), lo que pone en peligro potencial a las especies que las habitan (Davies et al, 2012). Este riesgo de pérdida de hábitat es de principal importancia para los reptiles, debido a su sensibilidad al cambio de hábitat (Böhm et al, 2013). De tal manera que el presente estudio analiza la variación geográfica de *Senticolis triaspis* mediante morfología y DNA mitocondrial (DNAMt), a fin de elucidar la existencia de diferencias significativas entre las subespecies previamente descritas de este taxón.

Especie de Estudio

El género *Senticolis* fue propuesto y separado de *Elaphe* por Dowling y Fries (1987), con base en: 1) forma y morfología de los hemipenes, los cuales son sub-cilíndricos con ornamentación de cálices papilados distintivos y un par de ganchos curvados parabasales; 2) por poseer un mayor número de escamas dorsales y ventrales. Además el género ha sido incluido en otros estudios genéticos de serpientes ratoneras en los cuales se ha comprobado su monofilia y separación de *Elaphe*, así como su divergencia tardía en el Oligoceno (Burbrink y Lawson, 2007, Pyron y Burbrink, 2009). Este género posee solo una especie, *Senticolis triaspis*, con un amplio rango de distribución. Se distribuye desde Norteamérica en el suroeste de los Estados Unidos

extendiéndose a lo largo de la costa del Pacífico y parte de la costa del Atlántico en México, hasta Centroamérica al norte de Costa Rica (Fig. 1).

Esta amplia distribución abarca una gran diversidad de hábitats. En las zonas más al norte habita en regiones secas como matorrales espinosos y al sur en zonas con mayor humedad, como el bosque tropical caducifolio, bosque tropical subcaducifolio y bosque de coníferas, con excepción de la zona norte de la península de Yucatán en donde habita en matorrales tropicales (Schulz, 1996).

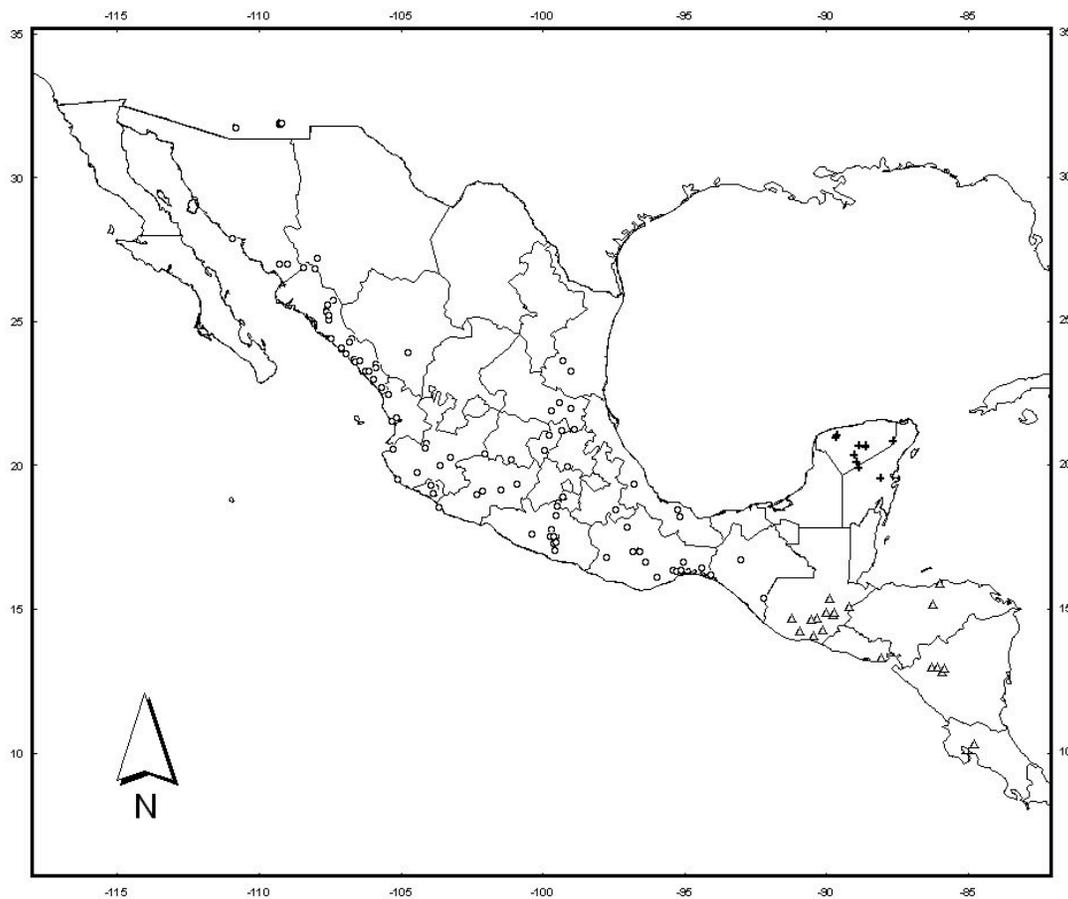


Figura 1. Mapa de distribución de las subespecies de *Senticolis triaspis*. ○ *S. t. intermedia*, + *S. t. triaspis*, △ *S. t. mutabilis*.

Senticolis triaspis presenta variación ontogénica, sexual y geográfica, específicamente en el número de escamas dorsales, ventrales, tamaño corporal y en el patrón de coloración (Dowling, 1960). Históricamente se han reconocido tres subespecies *S. t. triaspis*, *S. t. mutabilis* y *S. t. Intermedia*, las cuales se distinguen morfológicamente en los adultos y juveniles por el patrón de coloración (Fig. 2; Dowling, 1960). Sin embargo se han registrado individuos que presentan características de *S. t. mutabilis* y *S. t. triaspis* conjuntamente, por lo que se cree puede haber hibridación

(Dowling, 1960; Schulz, 1996). Además se ha sugerido una posible división dentro de *S. t. intermedia* entre las poblaciones de tierras altas y de tierras bajas de México por sus características morfológicas, no obstante las diferencias morfológicas encontradas no fueron significativas (Dowling, 1960).



Figura 2. Fotografías de las subespecies de *Senticolis triaspis*. De izquierda a derecha: *S. t. intermedia* adulto, *S. t. intermedia* joven, *S. t. mutabilis* adulto, *S. t. mutabilis* joven, *S. t. triaspis* adulto y joven. Tomado de Schulz (1996).

La distribución de las subespecies se ha mantenido desde el trabajo realizado por Dowling (1960), donde *S. t. intermedia* tiene el mayor rango de distribución ya que se encuentra desde el sur de Arizona abarcando la parte central de México y costas del Pacífico y Golfo de México, excepto la península de Yucatán. El rango de *S. t. triaspis* y *S. t. mutabilis* es considerablemente menor, distribuyéndose la primera

únicamente en la península de Yucatán y la segunda en Centroamérica, a partir de los Altos de Guatemala hasta el norte de Costa Rica (Fig. 1).

Objetivos

- Conocer la estructura genética a lo largo de la distribución de *Senticolis triaspis*, para determinar si existen diferencias significativas entre las subespecies.
- Determinar la variación morfológica de *S. triaspis* a lo largo de su distribución.
- Evaluar si existe correlación entre la morfología y la estructura genética a lo largo de la distribución geográfica de *S. triaspis*.

Capítulo 1. Variación genética de *Senticolis triaspis* mediante DNA mitocondrial.

1.1 Introducción

La utilización de DNA en la delimitación de especies se debe principalmente a su utilidad en la definición de especies crípticas, mismas que la morfología no permite delimitar (Avise, 2009, Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). La delimitación de unidades taxonómicas mediante DNA a nivel intraespecífico, considerando su distribución geográfica se ha realizado utilizando herramientas de la filogeografía (Avise, 2000). Una de las formas de hacerlo es evaluando la topología de las filogenias respecto a la distribución geográfica de los individuos, lo que nos permite comprender procesos de especiación ocurridos, así como comprobar si existen historias afines entre grupos (Vázquez-Domínguez, 2007, Avise, 2009, Hickerson et al, 2010).

Usualmente en el estudio de la variación genética a nivel intraespecífico se ha utilizado el DNA mitocondrial (DNAmt) debido a sus ventajas como son: su tasa de evolución rápida, su herencia exclusivamente materna y falta de recombinación (Avise et al, 1987, Avise, 2009, Camargo y Sites, 2013). Sin embargo dichas ventajas también pueden ser vistas como desventajas, pues nos cuentan la historia desde una única perspectiva, la materna (Ballard y Whitlock, 2004). A pesar de esto nos permite una prospección sobre la especie y sus posibles divisiones, y se pueden complementar con morfología y otros aspectos de la especie que resulten pertinentes.

En la especie *Senticolis triaspis* no existen estudios genéticos y sólo hay información morfológica de la misma. Además, como se ha mencionado anteriormente, esta especie presenta características (rango de distribución amplio, subespecies asignadas, poca vagilidad) que en otras especies de reptiles han sido indicadores de especies crípticas (Devitt, 2006, Castoe et al, 2009, Rodríguez-Robles et al, 1999b, Daza et al, 2010, Padial et al, 2010, Böhm et al, 2013,). Por lo anterior, el presente capítulo presenta un estudio de variación genética de la especie *Senticolis triaspis*, utilizando DNAmt a fin de analizar la validez de las subespecies y la variación geográfica existente.

1.2 Métodos

Se obtuvieron un total de 62 muestras de tejido a través de diferentes colecciones herpetológicas, donaciones personales y trabajo de campo, abarcando toda la distribución geográfica de la especie. El número de muestras para las subespecies *S. t. triaspis* (4) y *S. t. mutabilis* (3) es menor a la de *S. t. intermedia* (54) debido a la dificultad de obtener tejidos de la región de su distribución. Sin embargo, estas subespecies presentan un rango de distribución menor que *S. t. intermedia* y el número de muestras nos permite llevar a cabo el objetivo de analizar la validez de las subespecies y la variación genética de *S. triaspis*. No obstante, el número de muestras no permite el uso de métodos filogeográficos que analizan demografía poblacional mediante estadísticos de resumen, esto debido a que no se conocían a priori a estas poblaciones por lo que el presente estudio se limita a un análisis de variación genética y no profundiza en la filogeografía de *S. triaspis*.

Se aisló el DNA genómico de músculo, hígado, mudas y piel mediante el kit de tejidos Dneasy de Quiagen siguiendo el protocolo de los productores (Quiagen®, Valencia, CA). A partir de la extracción, se amplificó un fragmento de 817 pares de bases de DNA mitocondrial que comprende la subunidad cuatro del dinucleótido deshidrogenasa nicotidamida adenina (*Ndh4* o ND4) y tres genes adyacentes de ácidos ribonucleicos de transferencia (tRNA^{His} , tRNA^{Ser} , tRNA^{Leu}), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los primers ND4 (forward) y Leu (reverse) propuestos por Arévalo *et al.* (1994).

Las condiciones de la amplificación del PCR se realizaron con un volumen de 25 μl , compuesto de 2 μl de DNA, 0.2 μl de Taq polimerasa al igual que de dNTP's a 40 μM de concentración, 1 μl de cada uno de los primers a 10 μM de concentración, 1.6 μl de Buffer 10X y 1.6 μl de Cloruro de Magnesio, finalmente 17.4 μl de agua bidestilada esterilizada. Para realizar el PCR se utilizaron los siguientes parámetros: 94° C por 10 minutos, 94° C por 1 minuto, alineación 50° C por 2 minutos, extensión 72° C por 3 minutos, se repite a partir del paso dos 35 veces el ciclo, se realiza una última extensión de 72° C por 7 minutos y finalmente se mantiene a 4° C. El producto se corrió en un gel de agarosa al 1% con buffer 10x TBE con red gel para teñirlo y se observó bajo luz UV, a fin de tener el tamaño amplificado y asegurar que no existió contaminación usando un control negativo. El producto del PCR se purificó utilizando

ExoSAP-IT. Una vez purificado los productos de PCR se secuenciaron en un secuenciador automático ABI 3730 xl.

Las secuencias se editaron utilizando Geneious ProTM 5.0 (Drummond *et al*, 2010) en el cual se realizó un ensamble del “forward” y “reverse” de cada muestra, se revisaron a ojo y editaron las partes que así lo necesitaron al cotejar visualmente los electroferogramas. Posteriormente se alinearon todas las secuencias utilizando Muscle (Edgar, 2004) y se revisó el alineamiento a ojo. A fin de determinar las particiones se realizó la traducción de la secuencias a aminoácidos para vertebrados y se ubicaron los codones de terminación, igualmente se comparó el inicio y terminación de cada fragmento (ND4, tRNA^{His}, tRNA^{Ser}, tRNA^{Leu}) con una secuencia de GenBank. La validez de la partición de la secuencias se probó con el programa PartitionFinder, el cual estima la partición que mejor se ajusta a los datos y el modelo de evolución de cada partición (Lanfear et al, 2012). El modelo de evolución se obtuvo utilizando el criterio de información Bayesiana mediante una búsqueda heurística (Lanfear et al, 2012). Se obtuvieron tres particiones: la primera para la primera posición de base de ND4 y los tRNA asociados con el modelo TrN+G. La segunda para la segunda posición de base de ND4 con el modelo HKY. Finalmente para la tercera posición de base de ND4 con el modelo HKY+G. Esta partición y modelos fueron utilizado en los análisis de Máxima Verosimilitud y Análisis de Inferencia Bayesiana, los cuales utilizan métodos coalescentes basado en modelos para estimar un árbol de especies, a partir de árboles de genes individuales (Hillis et al, 1996; Knowles, 2009).

De manera preliminar se realizó una red de haplotipos mediante el programa TCS (Clement et al., 2000), se mantuvo el 95% de confianza para la unión de los haplotipos. Sin embargo, dado que la mayoría de los haplotipos difirieron por más del 95% (12 pasos), muchos haplotipos no lograron unirse. Por ello, se decidió construir un árbol de neighbor joining con el modelo de TrN en Geneious ProTM 5.0 (Drummond *et al*. 2010), dado que este también mide distancias génicas. No se utilizaron particiones de ningún tipo ya que este análisis no lo permite. Las distancias génicas se promediaron por clado, a fin de conocer las mayores diferencias.

El análisis Bayesiano se realizó con el programa MrBayes v3.1.2 con la modificación de las ramas de Dirichlet (Huelsenbeck y Ronquist, 2001, Zhang et al, 2012, Rannala et al, 2012). Para correr el análisis se emplearon los parámetros de default. Una

cadena fría y tres cadenas calientes fueron empleadas en el análisis de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC), iniciada con árboles al azar por 5×10^6 generaciones, siendo muestreadas cada 100 generaciones. Para determinar el “burn-in”, se graficaron los log-puntajes de máxima verosimilitud contra el número de generaciones en el programa Tracer v 1.5 y se removió el 25% de las generaciones como “burn in”. Se utilizó como grupo externo a *Elaphe flavirufa* que es una especie cercanamente emparentada con *S. triaspis* (Pyron y Burbrink, 2009). Mientras que el análisis de Máxima Verosimilitud se llevó a cabo en RAxLM gui (Silvestro, 2012), corriendo un bootstrap normal con 1000 replicas, de igual forma se utilizó como grupo externo a *Elaphe flavirufa*.

1.3 Resultados

Se obtuvieron dos grandes clados dentro de *S. triaspis* uno norte y otro sur separados significativamente. Dentro de estos clados se encontró estructura interior en todos los árboles y métodos utilizados. Los clados apoyaron las agrupaciones de dos de las subespecies *S. t. triaspis* y *S. t. mutabilis*. Sin embargo para *S. t. intermedia* se encontraron varias divisiones dentro de la misma. Debido a que todos los análisis presentaron consenso, resultando en árboles muy similares con diferencias menores dentro de los clados, se presenta el árbol de análisis Bayesiano con las probabilidades posteriores y el bootstrap proveniente del análisis de máxima verosimilitud (Fig 3). De igual forma los clados fueron apoyados por las distancias genéticas promedio entre clados obtenidas del análisis de “neighbor joining” (Cuadro 1).

Cuadro 1. Distancias genéticas promedio entre los clados de *S. triaspis* del “neighbor joining”.

		NORTE			SUR				
		Clado1 Δ	Clado2 \blacktriangle	Clado3 \triangle	Clado4 \odot	Clado5 \bullet	Clado6 \oplus	Clado7 $\opl�$	Clado8 \ominus
NORTE	Clado1 Δ	0							
	Clado2 \blacktriangle	0.075	0						
	Clado3 \triangle	0.078	0.044	0					
SUR	Clado4 \odot	0.15	0.151	0.151	0				
	Clado5 \bullet	0.161	0.166	0.154	0.082	0			
	Clado6 \oplus	0.174	0.179	0.178	0.1	0.051	0		
	Clado7 $\opl�$	0.151	0.163	0.156	0.075	0.068	0.075	0	
	Clado8 \ominus	0.155	0.171	0.164	0.093	0.108	0.109	0.107	0

Empezando desde la parte más basal del árbol la primera gran divergencia se encuentra entre el clado norte y el clado sur. Esta divergencia se da de manera general a la altura de la Depresión del Balsas y es la que presenta una distancia genética mayor difiriendo hasta un 17% entre el clado norte y el clado sur (Cuadro 1). Estos

clados mayores presentaron estructuración dentro de ellos con un soporte alto de ramas tanto por probabilidades posteriores como por el bootstrap, exceptuando la divergencia entre el clado 8 y los clados 5-7.

El clado norte se encuentra compuesto de tres clados (clados 1-3). El clado 1 se distribuye a partir de Arizona hacia el sur por la costa oeste de México justo hasta Nayarit, centro de Jalisco y Guanajuato, mientras que el clado 2 se encuentra principalmente en Jalisco y Colima, manteniéndose exclusivamente en las selvas secas de Jalisco y Colima y presenta además la menor distancia genética de todas las agrupaciones registradas con el clado 3. El clado 3 presenta una distribución disyunta encontrándose en Michoacán y el suroeste de Guerrero, y en el suroeste de Tamaulipas y la parte sureste de San Luis Potosí. El clado 3 se encontró principalmente en las laderas de cadenas montañosas de la Faja Volcánica Transmexicana (FVT) y la Sierra Madre Oriental, en altitudes menores a los 1750 msnm, en cuanto a vegetación ocupó selvas secas y matorrales xerófilos (Fig. 4).

El clado sur presentó cinco divisiones (clados 4-8). El clado más basal es el 4 que comprende el centro del país dentro del valle de Tehuacán y la parte superior de la Depresión del Balsas, ocupando selvas secas y matorrales xerófilos. El clado 5 se encuentra a partir de Istmo de Tehuantepec en las zonas costera del Golfo de México hasta el centro de Veracruz y hacia el lado del Pacífico, Oaxaca y Guerrero incluyendo la sierra madre del sur. A partir del clado 5 se obtuvo un menor soporte tanto en las probabilidades posteriores como en el bootstrap. El clado 7 está en el oeste de Chiapas en el Istmo de Tehuantepec, representado por un solo ejemplar. Este clado junto con los clados 1- 5 corresponden a la subespecie *S. t. intermedia*. El clado 6 que representa a la subespecie *S. t. triaspis* se encuentra restringido a la península de Yucatán. Finalmente el clado 8 que corresponde a la subespecie *S. t. mutabilis* se encuentra en Centroamérica llegando hasta el norte de Costa Rica. Este último clado presentó una divergencia genética entre los demás clados del sur de aproximadamente el 10%.

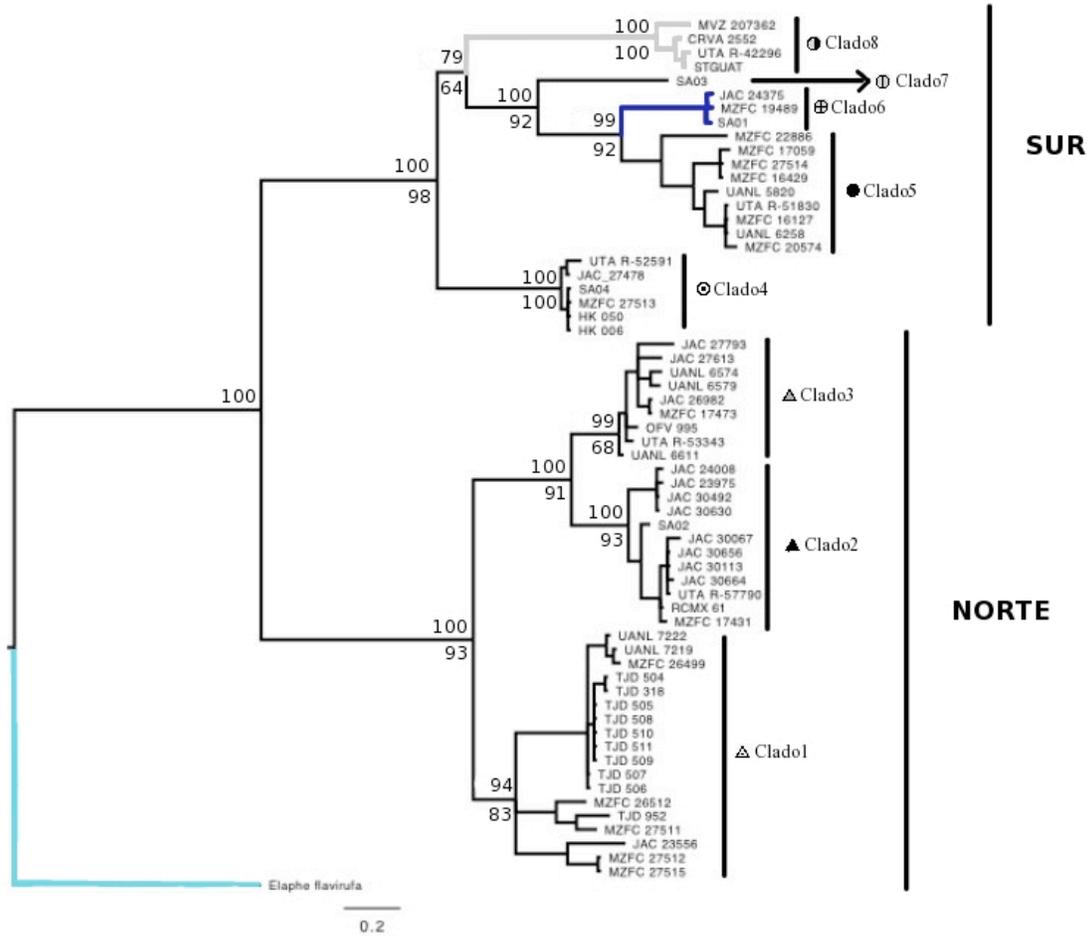


Figura 3. Árbol filogenético Bayesiano de *Senticolis triaspis*. En cada rama se presenta en la parte superior la probabilidad posterior y en la parte inferior el valor de bootstrap del análisis de Máxima Verosimilitud. Resaltado en azul claro el grupo externo *E. flavirufa*, en gris *S. t. mutabilis*, en azul oscuro *S. t. triaspis* y finalmente en negro *S. t. intermedia*.



Figura 4. Mapa presentando la distribución geográfica de los clados (1-8). Clado norte en triángulos compuesto por: \triangle Clado 1, \blacktriangle Clado 2, \triangle Clado 3; Clado sur en círculos, compuesto por: \oplus Clado 4, \bullet Clado 5, \oplus Clado 6, \odot Clado 7 y \odot Clado 8. Enmarcado en azul *S. t. triaspis* y en gris claro *S. t. mutabilis*.

1.4 Discusión

El análisis genético indica que las subespecies *S. t. triaspis* y *S. t. mutabilis* están genéticamente diferenciadas y ambas subespecies presentan concordancia geográfica. La subespecie *S. t. triaspis* (clado 6) se encuentra exclusivamente en la provincia de la península de Yucatán, esta población parece encontrarse aislada de las demás subespecies ya que la distribución general y los ejemplares de referencia de museos no muestran ejemplares que se distribuyan entre la península de Yucatán y Chiapas o Centroamérica (Fig. 1). Además *S. t. triaspis* presenta una coloración particular que permite diferenciarla de las demás subespecies, motivo por el cual fue propuesta como subespecie (Dowlings, 1960). Por otro lado *S. t. mutabilis* (clado 8) se encuentra separada probablemente por los Altos de Guatemala, patrón que ha sido encontrado en otras especies de serpientes (Devitt, 2006, Castoe et al, 2009, Daza et al, 2010) y aves (Barrera-Guzmán et al, 2012). Finalmente en el caso de *S. t. intermedia* se encontró que esta subespecie alberga mayor variación genética, teniendo varias divisiones dentro de ella. *S. t. intermedia* es la subespecie con el

mayor rango de distribución, a lo largo de la cual atraviesan diferentes barreras geográficas, lo cual podría asociarse con la variación genética observada.

La mayoría de las divisiones encontradas no presentaron barreras geográficas separándolas, sin embargo, aparentemente, no existen subespecies en simpatria pero si en cercanía. Existen dos posibles explicaciones para estos casos. La primera explicación sugerida por diversos autores implica una divergencia genética causada por cambios climáticos anteriores (Plioceno, Pleistoceno) los cuales pueden acompañarse posteriormente de dispersión, lo cual habría permitido superar barreras, este patrón se ha sugerido con base a la datación de la divergencia genética de otras especies de reptiles y aves (reptiles: Rodríguez-Robles et al, 1999b, Bryson et al, 2011, Bryson et al, 2011, aves: Barrera-Guzmán et al, 2012). La segunda implica la posibilidad que sean barreras ecológicas las causantes de estas divergencias y no las barreras geográficas (Raxworthy et al, 2007, Rissler y Apodaca, 2007, Wang et al, 2013). Wang (2013) calculó, por medio de modelos utilizando lagartijas del género *Anolis* en las Antillas Mayores, la influencia de las barreras geográficas contra las ecológicas en la divergencia genética, encontrando un mayor impacto de las barreras geográficas en el proceso de especiación (36.3%). Sin embargo existió al menos un caso en el que aspectos ecológicos (17.9%) fueron los causantes de la divergencia. En nuestro estudio la segunda opción es más viable, debido a que *S. triaspis* es una especie en general de altitudes bajas y de vegetaciones de selva seca y matorral xerófilo. De tal manera que sería posible que el hábitat sea un factor limitante en *S. triaspis*. Todos estos factores podrían estar limitando la distribución y especiación de *S. triaspis*, no obstante, como se comentó anteriormente existe poca información sobre la ecología de esta especie.

Dentro de los clados que parecen tener una explicación mayormente ecológica tenemos al clado 2 y el clado 5. El clado 2 se distribuye exclusivamente en las selvas secas de Jalisco y Nayarit, las cuales se encuentran completamente bordeadas por bosque de coníferas de la FVT, pudiendo ser el hábitat de la FVT el factor limitante para esta agrupación. El clado 5 se encontró principalmente en las selvas secas de las costas del Pacífico y parte de la Planicie Costera del Golfo de México, sin embargo sí presentó algunas muestras en bosque de coníferas, aún así su separación de los demás clados puede deberse a factores ecológicos como la altitud, dado que su distribución fue en zonas costeras de altitud baja. Otros clados presentan patrones de divergencia

inusuales y de los que es difícil encontrar una relación directa con la poca información ecológica con la que se cuenta, tales como el clado 3, 4 y 7. Estos clados no presentan congruencia con las distribuciones de otros reptiles de hábitats semiáridos (Devitt, 2006, Bryson et al, 2011), ni con barreras geográficas aparentes.

Entre aquellos clados que presentaron congruencia geográfica se encuentra la divergencia entre el norte y el sur. Esta divergencia se encontró en una posición geográfica inusual, puesto que la mayoría de los trabajos registran a la FVT como la causante de este patrón (Devitt, 2006, Bryson et al, 2011, Bryson et al 2012, Barrera-Guzmán et al, 2012). Sin embargo, la Depresión del Balsas parece ser la principal causante de esta divergencia, a pesar de que existió una muestra del clado 3 que sobrepasó esta barrera. Es posible que la Depresión del Balsas actuará como una barrera geográfica posterior a barreras ecológicas causando una separación geográfica incompleta, por lo que algunos individuos pudieran sobrepasarla. La Depresión del Balsas ha actuado como barrera geográfica en la divergencia genética de otras especies de serpientes (Bryson et al, 2011), sin embargo no se ha reportado como la barrera geográfica causante de la divergencia genética mayor entre norte y sur de México, pues esta divergencia genética usualmente se localiza y se debe a la FVT (Devitt, 2006, Bryson et al, 2011, Bryson et al 2012, Barrera-Guzmán et al, 2012). El clado 1 se encuentra separado por la FVT la cual como se indicó anteriormente es una fuerte barrera y causa de especiación.

En conclusión las subespecies *S. t. triaspis* y *S. t. mutabilis* presentaron divergencia genética congruente con su distribución geográfica. Mientras que la subespecie *S. t. intermedia* presenta una mayor diversidad genética con varias agrupaciones dentro de ella. En el presente estudio se utilizó un único marcador mitocondrial, como se refirió anteriormente esto presenta ventajas y desventajas, por lo que la inclusión de marcadores nucleares a fin de registrar evidencia de ambos sexos sería importante. Además un muestreo dirigido a las agrupaciones presentadas en la hipótesis de este estudio, aumentando el número de muestra de las poblaciones, permitiría obtener la filogeografía de la especie y comprender los patrones poblacionales. Debido a que se sospecha que algunas divergencias genéticas se deben a factores ecológicos, se sugiere incorporar análisis de nicho ecológico, a fin de determinar la delimitación en *S. triaspis* con un factor que parece ser importante en las divergencias encontradas y

que podría esclarecer las causas de las divergencias genéticas de *S. triaspis* (Hickerson et al, 2010, Raxworthy et al, 2007).

Capítulo 2. Variación morfológica de *Senticolis triapsis* una aproximación desde la morfología tradicional y geométrica.

2.1 Introducción

La morfología es de vital importancia por ser el carácter diagnóstico utilizado en las descripciones oficiales de una especie (Camargo y Sites, 2013) y porque permite la determinación de especies de manera directa mediante claves sin necesidad de otros análisis. Además la taxonomía morfológica ha tenido grandes avances, pasando de ser sólo la observación de caracteres a una cuantificación más rigurosa para diferenciar especies (Gamboa y Arrivillaga, 2010). Asimismo contamos con más herramientas que nos permiten analizar la morfología desde otras perspectivas, entre ellas la morfología tradicional y la morfología geométrica (Toro et al, 2010).

La morfología tradicional se centra en el estudio de los caracteres morfológicos y su variación en cuanto a tamaño y forma mediante el análisis estadístico univariado y multivariado. En ésta se han utilizado tanto morfometría como caracteres cualitativos, sin embargo, aspectos de la medición de la forma se pierden usando morfología tradicional, por lo que surge como alternativa la morfología geométrica a fin de cuantificar la forma y resolver este problema (Adams et al, 2004).

Dentro de la especie *S. triaspis* se han realizado únicamente análisis morfológicos univariados, con base en éstos se han propuesto tres subespecies por sus diferencias morfológicas y su estructura geográfica (Dowling, 1960). Debido a lo anterior, el presente capítulo presenta el estudio de la variación morfológica de *Senticolis triaspis* y se analiza la validez de sus subespecies y la variación morfológica a lo largo de su distribución geográfica, mediante el uso de la morfología tradicional y geométrica.

2.2 Métodos

Se revisaron un total de 210 ejemplares de dos colecciones nacionales y 12 colecciones internacionales (Apéndice 1). Todos los organismos revisados fueron adultos y se determinó el sexo de los mismos, utilizando los datos provenientes de las colecciones, características de talla y por disección en los casos en que las colecciones otorgaron su autorización. De igual forma se realizó la determinación de subespecie para cada ejemplar utilizando la distribución y los datos de las colecciones. Además de registrar lo anterior para cada ejemplar se realizó la georeferencia mediante

GoogleEarth, Mapas y Biogeomancer (Guralnick et al, 2006). Los ejemplares fueron analizados utilizando morfología tradicional y morfología geométrica.

2.2.1 Morfología Tradicional

Se consideraron un total de 35 caracteres de escamación, cuantitativos y cualitativos (Cuadro 2). Se realizó una ANOVA de dos vías utilizando como factores el sexo y la subespecie con cada uno de los caracteres para determinar si las diferencias de acuerdo al sexo y subespecie entre las medias eran significativas. Se consideraron los resultados de las ANOVAS realizadas, así como el estudio previamente realizado por Dowling (1960), el cual indica una diferencia entre sexos, por lo que los análisis multivariados se llevaron a cabo por separado. A fin de elucidar la posible diferenciación sexual se realizaron análisis multivariados considerando este factor. En total se tuvieron 150 machos (*S. t. intemedia*=108, *S. t. triapis*=27, *S. t. mutabilis*=15) y 60 hembras (*S. t. intemedia*=39, *S. t. triapis*=17, *S. t. mutabilis*=4) para el análisis.

Cuadro 2. Lista de caracteres de escamación, cuantitativos y cualitativos morfológicos.

Núm. Caracter	Característica medida
1-3	Número de hileras de escamas dorsales anteriores (ESDANT), mitad del cuerpo (ESDMC) y posteriores (ESDPOST).
4	Número de escamas ventrales (VENT).
5	Número de escamas subcaudales (SBCAD).
6-7	Número de supralabiales del lado derecho (SUPRAD) y lado izquierdo (SUPRAI).
8-9	Número de infralabiales del lado derecho (INFRAD) y lado izquierdo (INFRAI).
10	Número de supralabiales en contacto con el área ocular (SUPRACOC).
11	Número de supralabiales anteriores al área ocular (SUPRAANTOC).
12	Número de Infralabiales en contacto con escudo genial anterior (INFRACGENA).
13	Número de infralabiales en contacto con escudo genial posterior (INFRACGENP).
14-15	Número de preoculares del lado derecho (PREOCD) y lado izquierdo (PREOCI).
16-17	Número de loreales del lado derecho (LORD) y lado izquierdo (LORI).
18	Número de escamas parietales (PAR).
19	Número de escamas internasales (INTERNA).
20	Número de escamas prefrontales (PREFRONT).
21-23	Número de escamas temporales primarias derechas (TEMPPRIMD), temporales secundarias derechas (TEMPSECD) y temporales terciarias derechas (TEMPTERCD).
24-26	Número de escamas temporales primarias izquierdas (TEMPPRIMI), temporales secundarias izquierdas (TEMPSECI) y temporales terciarias izquierdas (TEMPTERCI).
27-28	Número de escamas temporales anteriores en contacto con ocular derecha (TEMPANTCOCD) e izquierda (TEMPANTCOCI).
29	Número de escamas gulares (GUL).
30	Longitud hocico-cloaca (LHC).
31	Longitud de la cola (LC).
32	Ancho de la base de la cola (ABC).
33	Longitud de la cabeza (LCA).
34	Ancho de la cabeza (ACA).
35	Diámetro del ojo (DIMO).
36	Patrón de coloración en adultos (PCO; 0=Color sólido, 1=Manchas).

El análisis multivariado incluyó el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis canónico discriminante (CVA), para este último se requiere la determinación de grupos a priori para lo cual se utilizaron las subespecies o el sexo ya determinados previamente. Además dentro del análisis canónico discriminante se realizó la predicción de categoría para los datos ha fin de conocer la precisión de colocación en cada una de las agrupaciones. Todos los análisis realizados se llevaron acabo en R versión 2.13.1 (R Development Core Team, 2011).

2.2.2 Morfología Geométrica

Se fotografió la vista dorsal de la cabeza de cada uno de los ejemplares, mediante una cámara digital con el lente perpendicular al ejemplar, mientras el ejemplar se colocó en posición a mano. Todas las fotografías fueron tomadas por la misma persona, a fin de evitar mayor variación. Se excluyeron las fotografías de 53 ejemplares (39 machos y 14 hembras) de los análisis debido a el estado de preservación que impidió una fotografía apropiada, quedando 111 machos (*S. t. intemedia*=78, *S. t. triapis*=20, *S. t. mutabilis*=13) y 46 hembras (*S. t. intemedia*=31, *S. t. triapis*=12, *S. t. mutabilis*=3).

Se tomaron un total de 21 hitos morfológicos todos ellos de la parte superior de la cabeza, en puntos fácilmente ubicables por la intersección de varias escamas (Fig. 5). Los hitos se digitalizaron en el programa tpsDig (Rohlf, 2008). Se llevó acabo un análisis generalizado de Procrustes (GPA) en donde se removió el efectos de locación, orientación y escala. El tamaño de la cabeza fue calculado mediante el tamaño del centroide y para resumir la forma de la cabeza se realizó un análisis de componentes principales con los datos del GPA utilizando la matriz de covariación de residuos la cual se obtiene al restar la forma consenso a cada configuración (Dryden y Mardia, 1998). Tomando en cuenta el primer componente principal se realizó una ANOVA con los dos factores sexo y subespecie a fin de comprobar la pertinencia de realizar los análisis en conjunto. De igual forma se realizó un análisis canónico discriminante (CVA) con los componentes principales obtenidos y la predicción de asignación de clase para las que se tomó a las subespecies, para definir la fortaleza del CVA. Finalmente para visualizar las diferencias en la forma se obtuvo las placas delgadas de deformación mediante la interpolación entre una forma y otra, en los diferentes casos. Todos los análisis realizados se llevaron acabo en R versión 2.13.1 utilizando el paquete “Statistical Shape Analysis” (SHAPES; Dryden, 2012).

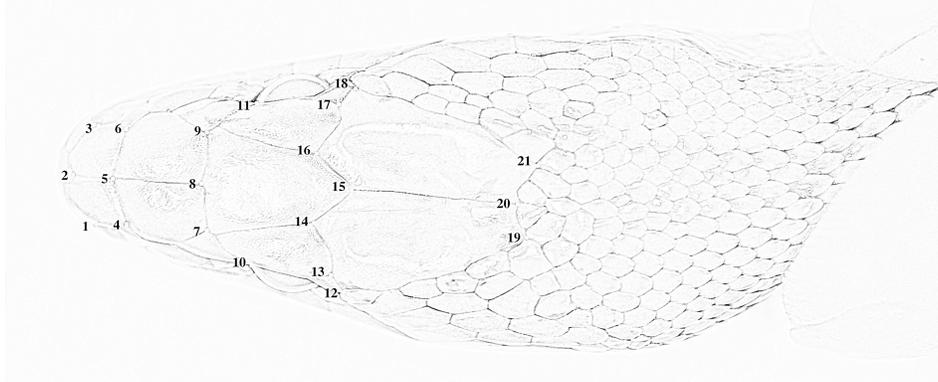


Figura 5. Cabeza de *Senticolis triaspis* mostrando la ubicación de los 21 hitos morfológicos utilizados en la morfología geométrica.

2.3 Resultados

2.3.1 Morfología Tradicional

La mayoría de las ANOVAS entre las diferentes características mostraron diferencias significativas entre machos y hembras, así como entre las subespecies. Sin embargo en algunos caracteres no existió diferencia entre las medias (Cuadro 3), pero no se excluyeron de análisis posteriores, dado que aunque la media no haya variado aún puede tener variación importante para la diferenciación entre sexos y subespecies.

En el caso de los análisis multivariados por sexo tanto el análisis de componentes principales (PCA) como el análisis canónico discriminante (CVA) mostraron dos agrupaciones pero con un área grande de traslape (Figs. 6 y 7). En componentes principales el primer componente abarcó el 62% de la variación y el segundo el 32 %, se obtuvo de esta forma en los dos primeros componentes el 94% de la variación, la variación explicada por los demás componentes fue menor del 1%. El primer componente principal tuvo mayor carga de las escamas ventrales (SBCAD 0.64, VENT 0.75). De igual forma el segundo componente obtuvo su mayor carga de las escamas ventrales (SBCAD 0.76, VENT 0.64). Los demás caracteres presentaron cargas menores en la formación de las dos agrupaciones.

Cuadro 3 Medias por sexo y por subespecie para cada uno de los caracteres considerados en el estudio. Se muestra en que agrupaciones se tuvo significancia en la ANOVA realizada. S= sexo, Sp= subespecie, SySp= Interacción entre sexo y subespecie.

Carácter	HEMBRA			MACHO			Significativo
	intermedia	mutabilis	triaspis	intermedia	mutabilis	triaspis	
LHClog	2.92	2.98	2.91	2.84	2.88	2.85	S,Sp
LClog	2.28	2.36	2.26	2.31	2.32	2.28	S,Sp
LCAlog	1.46	1.51	1.45	1.43	1.42	1.42	S
ABClog	0.98	0.96	0.95	0.96	0.94	0.91	S,Sp
ACAlog	1.19	1.18	1.19	1.12	1.11	1.16	S
DIMOlog	0.56	0.59	0.53	0.54	0.58	0.54	Sp
ESDANT	29.46	29.75	30.47	29.04	26	29.26	S,Sp, SySp
ESDMC	34.18	33.25	34.88	32.85	31.8	33.85	S,Sp
ESDPOST	22.77	22.75	23.94	22.22	22.4	22.96	S,Sp
VENT	270.67	274.25	271.41	258.27	265.33	259.96	S,Sp
SBCAD	92.31	97	89.59	107.88	102.2	100.89	S,Sp
SUPRAD	8.41	8.25	8.88	8.34	8	8.74	Sp
SUPRAI	8.41	8.25	8.59	8.34	8	8.52	Sp
NUMSUPRACOC	2	2	2	2	2	2	
NUMSUPRAANTOC	3.26	3.25	3.41	3.28	3.07	3.44	Sp
INFRAD	9.54	10	9.94	9.65	9.53	9.96	Sp
INFRAI	9.49	10.5	10	9.69	9.4	10.04	Sp, SySp
INFRACGENA	4.49	4.75	4.12	4.52	4.73	4.26	Sp
INFRACGENP	2.08	2	2.12	2.03	2	2	S
PREOCD	1.21	1	1	1.03	1	1.04	S,SySp
PREOCI	1.15	1	1.18	1.02	1	1	S
LORD	1	1.25	1.12	1	1.07	1.11	Sp
LORI	1	1.25	1.06	1.02	1.07	1.07	Sp
INTERNA	2	2	2	2	2	2	
PREFRONT	2	2	2.06	2	2	2	SySp
PAR	2	2	2	2	2	2	
TEMPPRIMD	3.03	3	2.94	2.86	2.8	2.89	S
TEMPPRIMI	2.95	3	3	2.93	2.8	3	
TEMPSECD	3.74	4	3.88	3.78	3.47	3.81	
TEMPSECI	3.79	3.75	3.65	3.7	3.33	3.56	
TEMPTERCD	4.92	5.25	5.06	4.71	4.27	4.67	S
TEMPTERCI	4.82	5	4.88	4.61	4.73	4.81	
TEMPANTCOCD	1.28	1.25	1.65	1.35	1.33	1.26	
TEMPANTCOCI	1.36	1.25	1.24	1.32	1.33	1.15	
NUMTEMPANTCOC	1.82	1.75	1.41	1.69	1.67	1.74	SySp

En el análisis de CVA por sexo se obtuvo una mayor carga de los caracteres de longitudes (LHClog 20.26, LClog 7.91, LCAlog 4.55, DIMOlog 3.37) relacionados con el tamaño y con una menor contribución de algunos caracteres de escamación (PREFRONT 2.53, PREOCI 1.02, SUPRACOC 0.74, TEMPRIMI 0.65, SUPRAD 0.58, INFRACGENP 0.57, ESDPOST 0.33, LORI 0.24). Al realizar la predicción de clasificación el porcentaje de ejemplares clasificados correctamente fue bajo con un total de 83.73%. Sin embargo el porcentaje de clasificación por agrupación fue mayor para machos con un 88.66 % que para hembras 71.18 %.

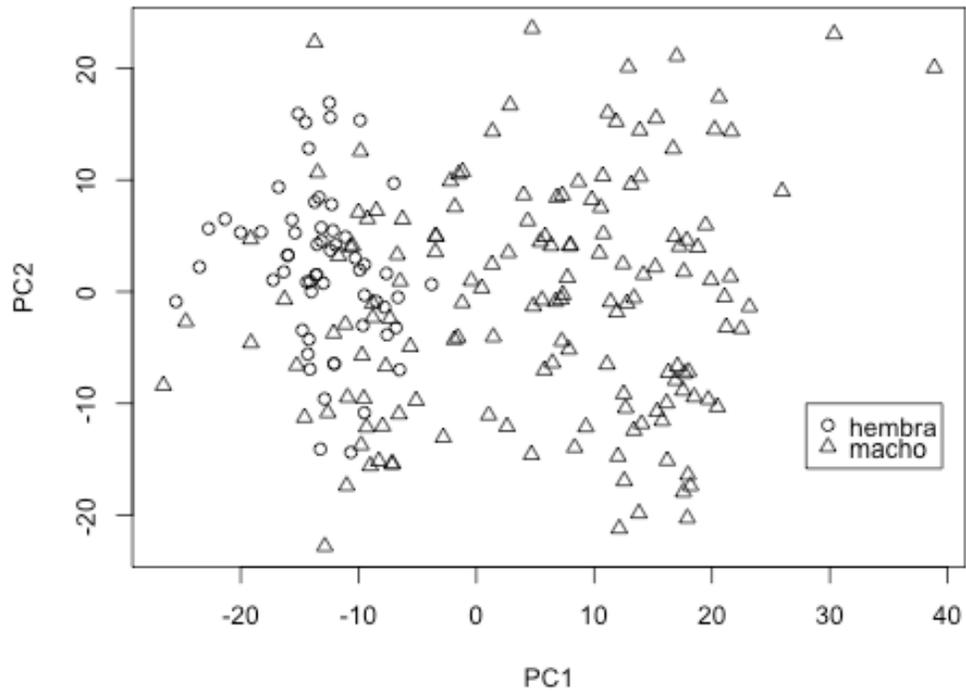


Figura 6. Análisis de componentes principales de la morfología tradicional para hembras y machos. Se presenta el componente principal uno y dos.

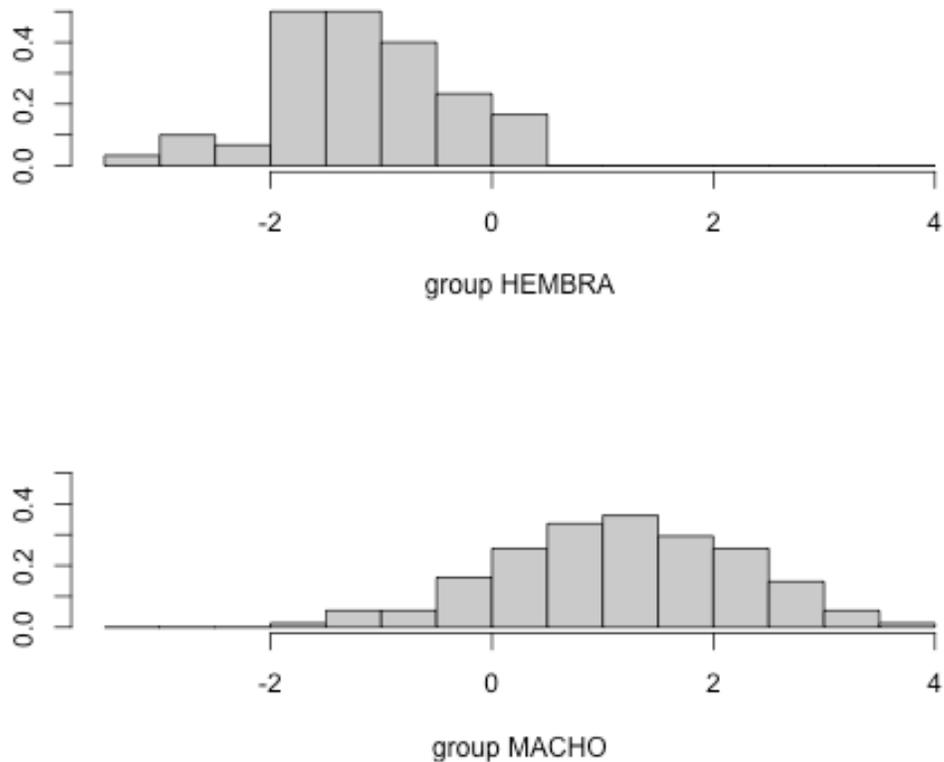
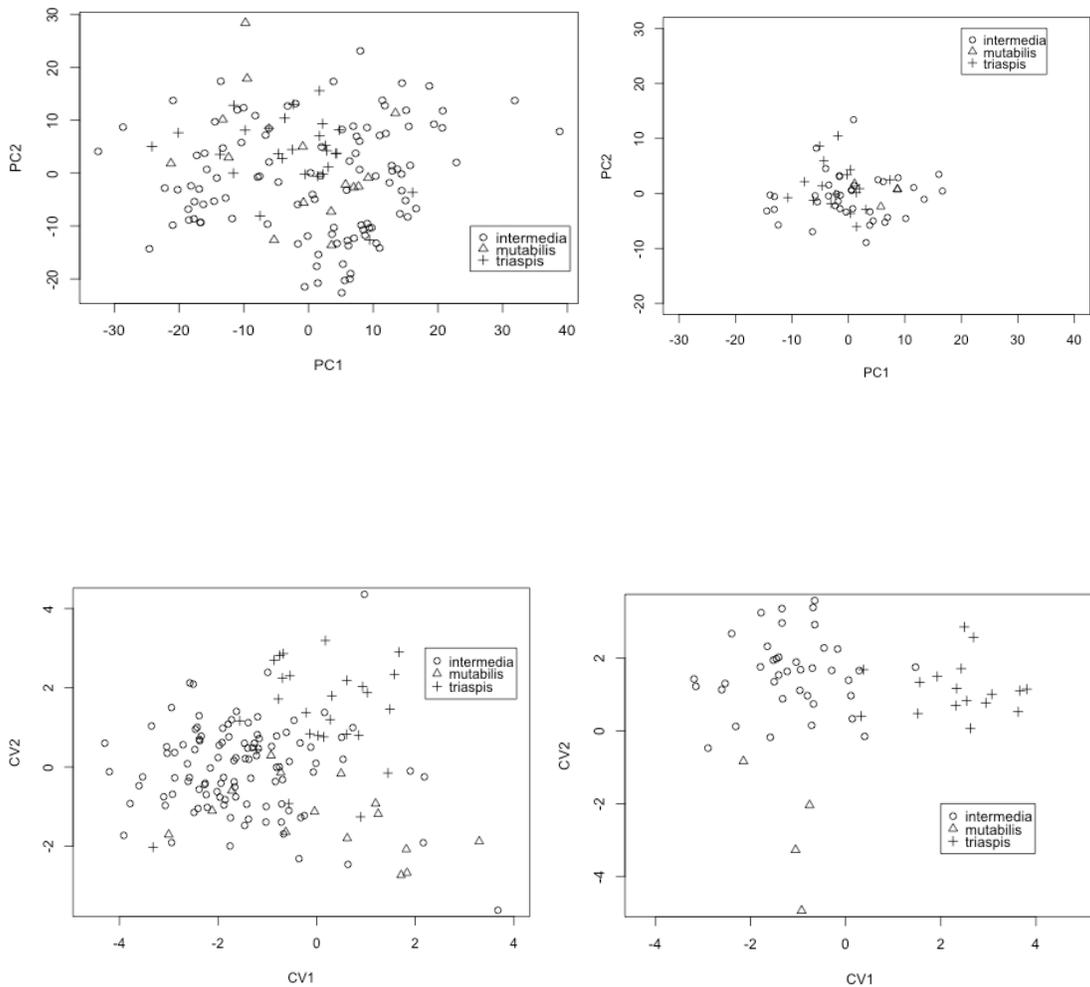


Figura 7. Análisis canónico discriminante de la morfología tradicional para hembras y machos.

Figura 8. Análisis de componentes principales de las variables morfométricas en las subespecies machos y hembras.

En los análisis de componentes principales por subespecie por sexos separados no se encontró ninguna agrupación en los datos ni para machos ni para hembras (Fig. 8). En los machos el primer componente explicó el 57.69 % de la variación y el segundo el 37.02 %, teniendo entre los dos el 94.71 % de la variación. Mientras que en el caso de las hembras se tuvo menor variación explicada, teniendo en el primer componente el 60.8 % y en el segundo el 21.3 % en conjunto el 82 % de la variación, en este caso no se llega al 94% hasta el componente seis. A pesar de lo anterior ambos análisis presentaron en su primer y segundo componente cargas importantes en las escamas ventrales (Machos PC1 VENT= 0.93, SBCAD=0.34, PC2 VENT=0.34, SBCAD=0.93; Hembras PC1 VENT=0.50, SBCAD=0.86, PC2 VENT=0.85, SBCAD=0.50).



El análisis canónico discriminante solo arrojó de manera vaga la agrupación de la subespecie *S. t. triaspis*, mientras que las otras subespecies se agruparon juntas (Fig. 9), aún cuando en hembras se nota una mayor separación de las otras dos subespecies, esta no es significativa pues se tuvo un bajo número de ejemplares especialmente en *S. t. mutabilis*. Los caracteres que presentaron mayor carga fueron de longitud, principalmente la LHC pero las demás medidas influyeron también dentro del CVA. Dentro de este análisis discriminante se excluyó el carácter de coloración pues este causaba la agrupación fuertemente de *S. t. triaspis* y quitaba la aportación de los demás caracteres. La predicción de clases fue extremadamente baja teniendo en total para las subespecies en los análisis de machos el 71% y en la hembras el 56%. Además las agrupaciones de subespecies tanto en machos como hembras estuvieron por abajo del 50% exceptuando para machos pertenecientes a la subespecie *intermedia* (80%).

2.3.2 Morfología Geométrica

La ANOVA realizada no mostró significancia de acuerdo al sexo ($F=0.58$ $P=0.45$) ni en la interacción entre sexo y subespecie ($F=.43$, $P=0.65$), de igual forma no existió significancia en las subespecies ($F=1.7$, $P=0.19$). Considerando el resultado de esta ANOVA y la falta de estudios que indiquen la posibilidad de diferencias previas en la forma, como se comentó anteriormente, los análisis se realizaron con hembras y machos juntos.

El análisis de componentes principales realizado no muestra agrupación alguna considerando las subespecies (Fig. 10). El primer componente explicó el 43.28% de la variación, el segundo el 12.05% y el tercero el 7.80%, a partir de éstos los demás componentes explicaron porciones menores de 5%. Sin embargo, al realizar el análisis canónico discriminante éste sí mostró agrupaciones coincidiendo con las subespecies especificadas al inicio del análisis (Fig. 11). La variación en el primer componente canónico, observada mediante la placa delgada de deformación, mostró una depresión de los hitos 12 a 18 correspondientes a las escamas supraoculares y frontal, mientras que los hitos 19 a 21 mostraron un ensanchamiento y en la parte anterior de la cabeza los hitos 4 a 6 una depresión. El segundo componente canónico mostró menor variación con una depresión en los hitos 12 a 21 (Fig. 11). En cuanto a la predicción por clases se tuvo un porcentaje del 86.7% correctamente predicho, existiendo diferencias en cuanto a los porcentajes de predicción de las subespecies. Los mayores

porcentajes de correcta clasificación se obtuvieron en *intermedia* y *trispis* con el 90.9% y 90.62% respectivamente, el menor porcentaje de predicción fue para *mutabilis* con sólo un 50% predicho correctamente, esta última subespecie fue en su mayoría mal clasificada como intermedia (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de ejemplares clasificados mediante el análisis canónico discriminante de la morfología tradicional en cada una de las categorías de subespecie y porcentaje correcto de la clasificación de los mismos.

Subespecie	intermedia	trispis	mutabilis	total	% correcto
intermedia	100	4	6	110	90.9
trispis	1	29	2	32	90.62
mutabilis	7	1	8	16	50

Figura 11. Análisis canónico discriminante de la morfología geométrica para las subespecies con los sexos agrupados. Se utilizó la variación de la forma de la cabeza para cada componente discriminante mediante la placa delgada de deformación ampliada 3 veces.

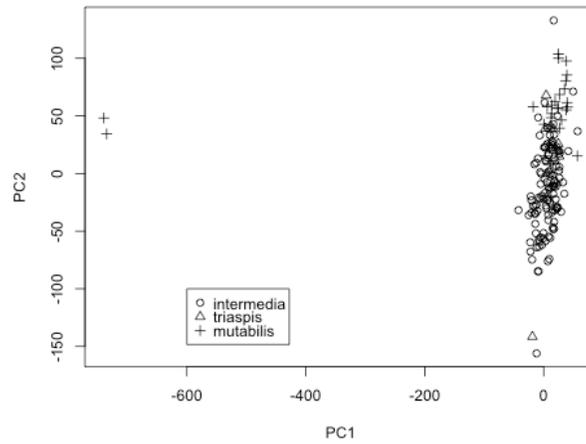
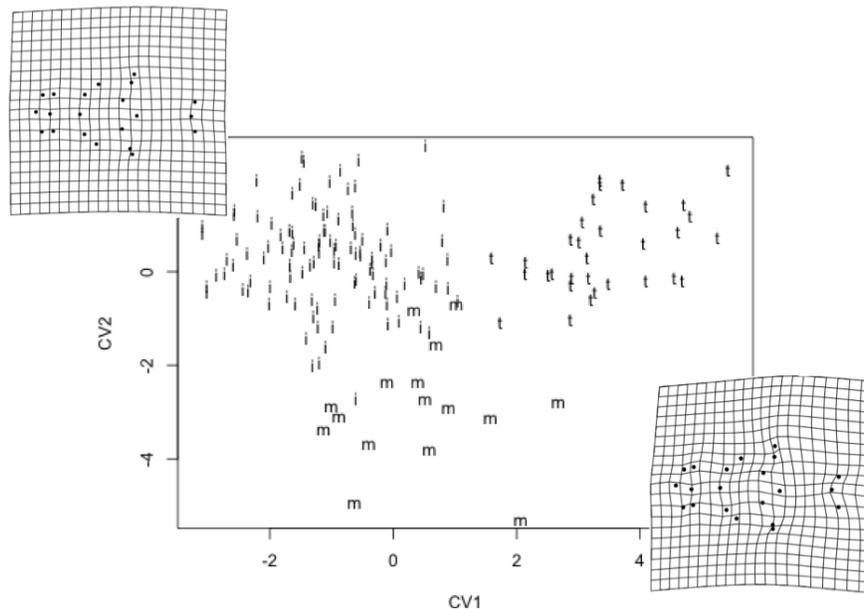


Figura 10. Análisis de componentes principales de la morfología geométrica para las subespecies con los sexos agrupados.



Se realizó la comparación entre las formas de la cabeza de las subespecies utilizando placas delgadas de deformación (Fig. 12). En la comparación de *S. t. mutabilis* contra *S. t. triaspis* se observa una depresión en los hitos 10 a 11 lo que causa un acercamiento del hito 10 con 7 y 11 con 9, además de causar su alineación, en el resto de los hitos se aprecia una expansión que causa el ensanchamiento de la parte posterior y anterior de la cabeza. De manera similar *S. t. intermedia* contra *S. t. triaspis* presenta la misma depresión en los hitos 10 a 11 y la alineación mencionada pero de manera más extrema quedando casi imperceptible el espacio entre los hitos 10 con 7 y 11 con 9, causando una depresión a la mitad de la cabeza y un ensanchamiento de la parte anterior de la cabeza. Entre *S. t. mutabilis* y *S. t. intermedia* los hitos 7 a 9 se expanden causando su separación de los hitos 10 y 11, así como una diagonal entre estos, lo cual provoca un angostamiento a la altura de las escamas prefrontales.

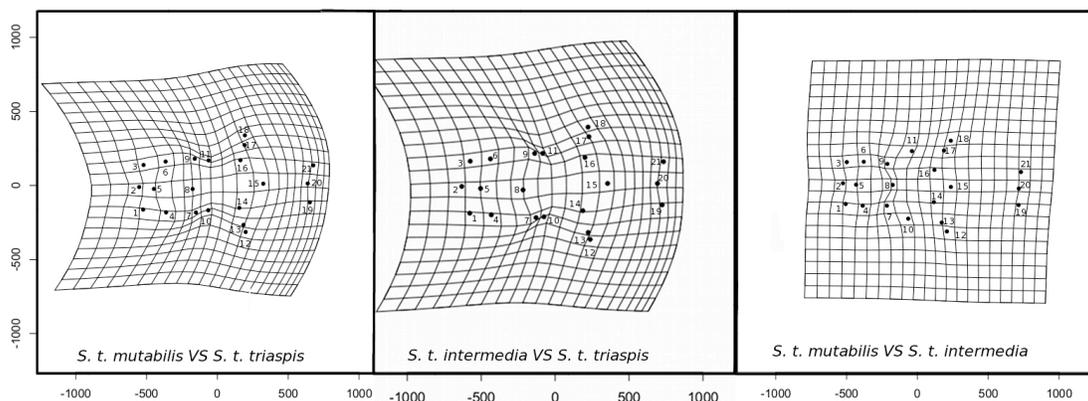


Figura 12. Placas delgada de deformación de las comparaciones entre las subespecies de *S. triaspis* en magnitud 3.

Los análisis discriminantes resultaron más efectivos en la separación de agrupaciones tanto en la morfología geométrica como tradicional, esto posiblemente por dos motivos. Primeramente los análisis discriminantes buscan juntar la información de aquellos caracteres que permitan la separación óptima de las agrupaciones dadas por pequeña que esta separación sea (Arias, 1999). Segundo por que la variación encontrada dentro de *S. triaspis* parece ser pequeña pues pudo ser resumida en pocos componentes principales y existió un amplio traslape en los caracteres mostrado por las ANOVAS. De igual forma la morfología geométrica resultó más efectiva en realizar la separación de las agrupaciones, esta mayor resolución se ha encontrado en

varios estudios en peces, principalmente en aquellos a nivel intraespecífico o en los que la variación morfológica es sutil (Parsons et al, 2003, O'Reilly y Horn, 2004).

2.4 Discusión

Los análisis de componentes principales tanto en la morfología tradicional y geométrica mostraron que no existen agrupaciones dentro de *S. triaspis*. Mientras que en los análisis canónicos discriminantes se obtuvieron agrupaciones correspondientes a algunas de las subespecies, sin embargo el nivel de asignación correcta de las subespecies no fue significativo tanto en la morfología geométrica como tradicional, por lo que no es posible distinguir a las subespecies con base en caracteres morfológicos. Dentro de los caracteres morfológicos considerados en el presente estudio se excluyó la coloración debido a que se trabajó con ejemplares preservados y valorar la coloración resulta complejo, sin embargo se han realizado estudios con coloración analizando la cantidad de melanina en ejemplares preservados y se han observado clinas y posibles adaptaciones ecológicas de acuerdo a los mismos (Burt e Ichida, 2004, Allsteadt et al, 2006, Spencer, 2008), por lo que agregar este tipo de caracteres podría ayudar a comprender las relaciones dentro de *Senticolis triaspis*.

La morfología geométrica tuvo mejores valores de predicción para dos de las subespecies *S. t. intermedia* y *S. t. triaspis*, aunque aún no fueron significativos. Las diferencias morfológicas fueron mayores entre *S. t. triaspis* y las otras subespecies, mientras que fueron más sutiles entre *S. t. intermedia* y *S. t. mutabilis*. Las diferencias en la forma de la cabeza se ha encontrado asociada a adaptaciones por hábitos alimenticios (Rodríguez-Robles, 1999, Rodríguez-Robles y Greene, 1999, Adams y Rohlf, 2000, Stayton, 2005) o especialización en la utilización del hábitat (Manier, 2004, Barros et al, 2011) en estudios de anfibios y reptiles o su diferenciación sexual en serpientes (Meik et al, 2012). Dado que *S. triaspis* no parece tener indicios de diferenciación sexual en la forma y no se conoce hasta el momento un uso especializado de microhábitat, se cree de hábitos terrestres o arborícolas (Dowling, 1960), es más probable que la diferenciación de la cabeza sea debido a diferencias en la dieta de las subespecies. Sin embargo, no existe más que un estudio de ecología de *S. triaspis* (Radke y Malcom, 2009) y ninguno sobre la dieta, aunque se ha indicado que se alimentan de ratones y pájaros pequeños (Price, 1991), por lo que no es posible concluir que la dieta es la causante de las diferencias encontradas.

Morfológicamente *S. triaspis* es una sola especie dado que las diferencias encontradas no son significativas. Generalmente se piensa que cuando una especie se encuentra morfológicamente conservada es debido a un tiempo de especiación reciente que no ha permitido la acumulación de caracteres morfológicos (Bickford et al, 2006, Spencer, 2008). Sin embargo en estudios con culebras ratoneras se ha encontrado, utilizando reloj molecular calibrados con fósiles, que el género *Senticolis* tuvo una divergencia en el Oligoceno tardío (Burbrink y Lawson, 2007, Pyron y Burbrink, 2009), divergencia tardía por lo que habría tiempo suficiente para la acumulación de cambios morfológicos. Existen otras tres posibles explicaciones para la falta de diferenciación morfológica: 1) la selección natural o sexual actuando en caracteres que no están correlacionados con la morfología, como fisiológicos o acústicos (Bickford et al, 2006); 2) la selección promoviendo estasis morfológica, esto se ha encontrado en especies de ambientes extremos o microhabitats específicos para los cuales existen pocas características morfológicas que permiten la existencia (Bickford et al, 2006); 3) la existencia de un alto flujo génico entre las poblaciones que cause variación en la especie por lo que no se puedan diferenciar las agrupaciones (Allsteadt et al, 2006, Spencer, 2008). Todas las explicaciones son posibles en *S. triaspis* requiriéndose más estudios de ecología, fisiología y genéticos que permitan entender mejor la falta de variación morfológica.

Se encontró diferenciación sexual dentro de *S. triaspis* principalmente en los caracteres morfométricos dado que de manera general las hembras son de talla más grande que los machos. Este patrón se ha encontrado en diversas especies de vertebrados terrestres, especialmente cuando no existe evidencia de combate entre los machos (Shine, 1989, Rivas y Burghardt, 2001). Sin embargo, dentro del grupo Colubridae se ha encontrado con frecuencia que los machos son de mayor talla que las hembras, salvo algunas excepciones en las cuales no se encontró evidencia de combate por los machos (Fitch, 1981). A pesar de que se encontró una mayor talla en hembras que en machos, se observó una zona de solapamiento. De manera que no es posible distinguir entre machos y hembras considerando el tamaño de los organismos, pero si se tiene una tendencia importante en cuanto al tamaño que podría implicar la existencia de selección sexual.

En conclusión existe una diferenciación sexual, pero esta diferenciación no permite distinguir los sexos, por el grado de solapamiento de los caracteres. En cuanto a las

subespecies sólo la subespecie nominal *S. t. triaspis* presenta diferenciación morfológica tradicional y geométrica, aunque no es significativa. Mientras que las demás subespecies sólo se diferencian por su morfología geométrica, la cual es probable se encuentre asociada a hábitos alimenticios. Debido a lo anterior se requieren estudios sobre la historia natural de este taxón que nos permitan entender si la diferenciación encontrada se debe a adaptaciones a su alimentación o ecología.

Discusión General

Los análisis de la variación genética y morfológica en *S. triaspis* no mostraron concordancia. Sin embargo el patrón mostrado por la morfología podría indicarnos que *S. triaspis* pudiera estar compuesta por más de una especie críptica, puesto que genéticamente se encontraron diversas agrupaciones con alto soporte de ramas. El patrón de especies crípticas se ha encontrado en diversos estudios y se ha sugerido se debe a especies de divergencia temprana, selección no asociada a la morfología o estasis morfológica (Bickford et al, 2006, Spencer, 2008). En el caso de *S. triaspis* existen hipótesis previas que indica que el género existe desde el Oligoceno tardío, por lo que la divergencia reciente no parece plausible (Burbrink y Lawson, 2007, Pyron y Burbrink, 2009), aunque debe recordarse que estas hipótesis se basan en relojes moleculares que consideran varios supuestos (tasa de mutación constante, calibración correcta, edad mínima) por lo que deben considerarse a fondo (Kumar, 2005).

A pesar de haber encontrado divergencia génica en *S. triaspis*, ésta se encuentra basada en un solo marcador mitocondrial y aunque se ha propuesto la posibilidad de delimitar especies usando sólo DNA mitocondrial (Wiens y Penkrot, 2002), usualmente se sugiere tener consenso de más evidencia (morfológica, ecológica, DNA nuclear, fisiológica) para delimitar a una especie (Sites y Marshall, 2003, Moritz y Cicero, 2004, Dayrat, 2005). Lo anterior debido a que los marcadores mitocondriales podrían estar sesgados y considerar divisiones aún cuando no son existentes, pues representan sólo la evolución materna y de rápida divergencia (Ballard y Whitlock, 2004, Moritz y Cicero, 2004). Se debería considerar la posibilidad de agregar algún marcador nuclear, a este estudio, dado que éstos consideran la evolución de ambos padres y presentan una tasa de evolución diferente, sin embargo debido a la tasa de evolución del DNA nuclear es necesario encontrar un marcador que permita resolución a la escala intraespecífica. De igual forma un aumento en el número de muestras basado en los clados encontrados, permitiría análisis filogeográficos completos a fin de conocer la dinámica de las poblaciones.

El patrón encontrado en *S. triaspis* tanto morfológicamente como genéticamente no coincide en todos los aspectos con otras especies (Devitt, 2006, Bryson et al, 2011a, Bryson et al 2012, Barrera-Guzmán et al, 2012). Sin embargo no debería resultar

extraño que algunos patrones de divergencia coinciden y otros no, pues los procesos geológicos en México son diversos y complejos, dada la complejidad en la historia geológica y biogeográfica del país (Flores-Villela y Martínez-Salazar, 2009). Además el patrón encontrado indica la probable influencia de aspectos ecológicos en las divergencias, ya sea en adaptaciones a microhábitat, dieta o por barreras ecológicas. La importancia ecológica en esta especie pudiera probarse con el uso de modelos de nicho ecológico (Raxworthy et al, 2007, Rissler y Apodaca, 2007), considerando la falta de información ecológica de esta especie.

Conclusión

El presente estudio encontró falta de evidencia morfológica que permita de manera significativa la separación de las subespecies de *S. triaspis*, sin embargo se encontró estructura genética entre diferentes poblaciones de *S. triaspis*, por lo que ésta pudiera estar conformada por más de una especie críptica. Debido a que la evidencia encontrada no es congruente (morfolología y mtDNA) y considerando que delimitar especies con sólo DNA mitocondrial no eslo más adecuado, se considera a *S. triaspis* como una sola especie con un rango de distribución amplio hasta que se agregue nueva evidencia que corrobore lo opuesto. Además se encontró una estructura genética geográfica inusual que posiblemente responde a factores ecológicos y geográficos, por lo que se recomienda incorporar estudios ecológicos a fin de elucidar estos procesos. Este estudio representa la primera hipótesis genética de la relación intraespecífica de *S. triaspis* y la revaloración de la morfolología, por lo que sienta la base para futuros estudios con otros marcadores genéticos e inclusión de datos ecológicos a los que parece responder la especie.

Literatura Citada

- Adams, D., y J. Rohlf. 2000. Ecological character displacement in *Plethodon*: Biomechanical differences found from a geometric morphometric study. *Proceedings of the National Academy of Science* 97 (8): 4106-4111.
- Adams, D., J. Rohlf, y D. Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the "revolution". *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Agapow, P.-M., O. Bininda-Emons, K. Crandall, J. Gittleman, G. Mace, J. Marshall, y A. Purvis. 2004. The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology* 79 (2): 161-179.
- Allsteadt, J., A. H. Savitzky, C. E. Petersen y D. N. Naik. 2006. Geographic variation in the morphology of *Crotalus horridus* (SERPENTES: VIPERIDAE). *Herpetological Monographs* 20: 1-63.
- Arias, M. R. 1999. El análisis multivariante en la investigación científica. La Muralla, Hespérides. Madrid. pp. 143.
- Arévalo, E., S. K. Davis y J. W. Sites. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology* 43 (3): 387-418.
- Avila, L. J., M. Morando, y J. W. Sites. 2006. Congeneric phylogeography: hypothesizing species limits and evolutionary processes in Patagonia lizards of the *Liolaemus boulengerie* group (Squamata: Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society* 89: 241-275.
- Avise, J., J. Arnold, R. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, C. Reeb, y N. Saunders. 1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 18: 489-522.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography the history and formation of species*. Harvard university press. London, England. pp. 447.
- Avise, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15.
- Ballard, J., y M. Whitlock. 2004. The incomplete natural history of the mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744
- Barrera-Guzmán, A. B. Milá, L. A. Sánchez-González, y A. G. Navarro-Sigüenza. 2012. Speciation in avian complex endemic to the mountains of Middle America (*Ergaticus*, Aves: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 907-920.
- Barros, F. C., A. Herrel y T. Kohlsdorf. 2011. Head shape evolution in *Gymnophthalmidae*: does habitat use constrain the evolution of cranial design in fossorial lizards. *Journal of Evolution* 24: 2423-2433.

Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. L. Ng, R. Meier, K. Winker, K. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution* 22 (3): 148-155.

Böhm, M. et al. 2013. The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation* 157: 372-385.

Bryson, R. W., R. W. Murphy, A. Lathrop y D. Lazcano-Villareal. 2011. Evolutionary drivers of phylogeographic Diversity in the highlands of Mexico: a case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *Journal of Biogeography* 38: 697-710.

Bryson, R. W. , U. García-Vázquez y B. Riddle. 2011. Phylogeography of Middle America gophersnakes: mixed responses to biogeographical barriers across the Mexican Transition zone. *Journal of Biogeography* 38: 1570-1584.

Bryson, R. W. , U. García-Vázquez y B. Riddle. 2012. Relative roles of Neogene vicariance and Quaternary climate change on the historical diversification of bunchgrass lizards (*Sceloporus scalaris* group) in Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 447-457.

Burbrink, F. T. y R. Lawson. 2007. How and when did old world ratsnakes disperse into the new world?. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 173-189.

Burt E. H. y J. M. Ichida. 2004. Gloger's rule, feather-degrading bacteria, and color variation among song sparrows. *The Condor* 106: 681-686.

Camargo, A. y J. Sites. 2013. Species Delimitation: A Decade After the Renaissance. In: *The Species Problem - Ongoing Issues*. Pavlinov I. (ed.). ISBN: 978-953-51-0957-0. InTech, DOI: 10.5772/52664.

Castoe, T., J. Daza, E. Smith, M. Sasa, U. Kuch, J. Campbell, P. Chippindale y C. Parkinson. 2009. Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle America highland biogeography. *Journal of Biogeography* 36: 88-103.

Clement, M., D. Posada, y K. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1660.

Davies, J., L. Poulsen, B. Schulte-Herbrüggen, K. Mackinnon, N. Crawhall, W. D. Henwood, N. Dudley, J. Smith, y M. Gudka. 2012. *Conserving Dryland Biodiversity*. pp. 84.

Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407-415.

Daza, J. M., T. A. Castoe y C. L. Parkinson. 2010. Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography* 000: 000.

De Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. in *Endless Forms: Species and Speciation*, D. J. Howard and S. H. Berlocher (eds.). Oxford University Press, Oxford, England. pp. 470

- De Queiroz, K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* 56 (6): 879-886.
- Devitt, T. J. 2006. Phylogeography of the western lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Neartic-Neotropical transition. *Molecular Ecology* 15: 4387-4407.
- Dowling, H. G. 1960. A taxonomic study of the ratsnake, genus *Elaphe* Fitzinger. VII. The *Triaspis* section. *Zoologica* 45: 53-80.
- Dowling, H.G. y I. Fries. 1987. A taxonomic study of the ratsnakes. VIII. A proposed new genus for *Elaphe triaspis* (Cope). *Herpetologica* 43 (2): 200-207
- Domínguez-Domínguez, O. y E. Vázquez-Domínguez. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity Conservation* 32 (1): 59-70
- Drummond, A. J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, C. Duncan, M. Field, J. Heled, M. Kearse, S. Markowitz, R. Moir, S. Stone-Havas, S. Sturrock, T. Thierer, A. Wilson. 2010. Geneious v5.0. Disponible en <http://www.geneios.com>.
- Dryden, I., y K. Mardia. 1998. *Statistical Shape Analysis*. John Wiley. Chichester. pp. 376
- Dryden, I. 2012. *Statistical Shape Analysis*. R Packaged version 1.1-5. <http://www.R-project.org/>.
- Edgar, R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5):1792-1797.
- Fitch, H. S. 1981. Sexual size differences in Reptiles. *Miscellaneous Publications of the University of Kansas Museum of Natural History* 70: 1-72.
- Flores-Villela, O. y E. Martínez-Salazar. 2009. Historical explanation of the origin of the Herpetofauna of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80 (3): 817-833.
- Gamboa, M. y J. Arrivillaga. 2010. Análisis morfométrico de cuatro especies simpátricas del género *Anacroneuria* (Plecoptera:Perlidae). *Limnetica* 29 (2):247-256.
- Gaston, K. y R. Fuller. 2009. The size of species' geographic ranges. *Journal of Applied Ecology* 46 (1): 1-9.
- Guralnick, R. P., J. Wieczorek, R. Beaman, R. J. Hijmas. 2006. BioGeomancer: Automated Georeferencing to Map the World's Biodiversity Data. *PLOS Biology* 4(11): e381. doi:10.1371/journal.pbio.0040381.
- Hickerson, M. J., B. C. Carstens, J. Cavender-Bares, K. A. Crandall, C. H. Graham, J. B. Johnson, L. Rissler, P. F. Victoriano, y A. D. Yoder. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 year after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291-301.
- Hillis, D. M., C. Moritz and B. K. Mable. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass. USA. pp. 655

- Holt, R. 2003. On the evolutionary ecology of species' ranges. *Evolutionary Ecology Research* 5: 159-178.
- Huelsenbeck, J. y F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Hudson, R. y R. Coyne. 2002. Mathematical consequence of the genealogical species concept. *Evolution* 56 (8): 1557-1565.
- IUCN. 2012. IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Segunda edición. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN. pp. 32.
- Knowles, L. 2009. Statistical Phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 40: 593-612.
- Kumar, S. 2005. Molecular clocks: four decades of evolution. *Nature Review Genetics* 6: 654-662.
- Lanfear, R., B. Calcott, S. Y. W. Ho y S. Guindon. 2012. PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetics analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29 (6): 1695- 1701.
- Mace, G. 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 359: 711-719.
- Mace, G., N. Collar, K. Gaston, C. Hilton-Taylor, H. Akçakaya, N. Leader-Williams, E. Milner-Gulland, y S. Stuart. 2008. Quantification of extinction risk: IUCN's system for classifying threatened species. *Conservation Biology*, 22 (6): 1424-1442.
- Manier, M. 2004. Geographic variation in the long-nosed snake *Rhinocheilus lecontei* (Colubridae): beyond the subspecies debate. *Biological Journal of the Linnean Society* 83:65-85.
- Mayr, E. 1987. The ontological status of species: Scientific progress and philosophical terminology. *Biology and Philosophy* 2: 145-166.
- Meik, J., K. Setser, E. Mociño-Delayoa, y M. Lawing. 2012. Sexual difference in head form and diet in a population of Mexican lance-headed rattlesnakes, *Crotalus polistictus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 633-640.
- Moritz, C. y C. Cicero. 2004. DNA Barcoding: Promise and Pitfalls. *PloS Biology* 2 (10): 1529-1531.
- Mulcahy, D. 2008. Phylogeography and species boundaries of the western North American Nightsnake (*Hypsiglena torquata*): Revisiting the subspecies concept. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 1095-1115.
- O'Reilly, K. y M. Horn. 2004. Phenotypic variation among populations of *Atherinops affinis* (Atherinopsidae) with insights from a geometric morphometric analysis. *Journal of Fish Biology* 64:1117-1134.
- Padial, J., A. Miralles, I. De la Riva, y M. Vences. 2010. The integrative future of Taxonomy. *Frontiers in Zoology* 7 (16): 10.1186/1742-9994-7-16.

- Parsons, K., B. Robinsons, y T. Hrbek. 2003. Getting into shape: An empirical comparison of traditional truss-based morphometric methods with a newer geometric method applied to New World cichlids. *Environmental Biology of Fishes* 67: 417-431.
- Pigliucci, M. 2003. Species as family resemblance Concepts: the (dis-) solution of the species problem ?. *BioEssays* 25 (6): 596-602.
- Price, R. M. 1991. *Senticolis*, *S. triaspis*. Catalogue of American Amphibians and Reptiles 525:1-4.
- Pyron, R. y F. Burbrink. 2009. Neogene diversification and taxonomic stability in the snake tribe Lampropeltini (Serpentes: Colubridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 524-529.
- Radke, R. y J. Malcom. 2009. Notes on the ecology of green Ratsnakes (*Senticolis triaspis*) in southeastern Arizona. *Herpetological Conservation and Biology* 4 (1): 9-13.
- Rannala, B., T. Zhu, y Z. Yang. 2012. Tail paradox, partial identifiability and influential priors in Bayesian branch length inference. *Molecular Biology and Evolution* 29: 325-335.
- Raxworthy, C., C. Ingram, N. Rabibisoa y R. Pearson. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: a review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology* 56 (6): 907-923.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, <http://www.R-project.org/>.
- Rissler, L. y J. Apodaca. 2007. Adding more ecology into species delimitation: ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the Black Salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology* 56 (6): 924-942.
- Rivas, J. y G. Burghardt. 2001. Understanding sexual size dimorphism in snakes: wearing the snake's shoes. *Animal Behaviour* 62 (3): 10.1006/anbe.2001.1755.
- Rodríguez-Robles, J. A., C. J. Bell y H. W. Greene. 1999. Food habits of the Glossy Snake, *Arizona elegans*, with comparisons to the diet of sympatric Long-nosed Snakes, *Rinocheilus lecontei*. *Journal of Herpetology* 33 (1): 87-92.
- Rodríguez-Robles, J. A. y H. W. Greene. 1999. Food habits of the Long-nosed Snake (*Rinocheilus lecontei*) a "specialist" predator?. *Journal of Zoology (London)* 248: 489-499.
- Rodríguez-Robles, J.A., D. F. Denardo y R. E. Staubs. 1999. Phylogeography of the California mountain kingsnake, *Lampropeltis zonata* (Colubridae). *Molecular Ecology* 8: 1923-1934.
- Rohlf, J. 2008. tpsDig version . Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook, New York.

- Rojas, M. 1992. The species problem and conservation: What are we protecting. *Conservation Biology* 6 (2): 170-178.
- Schulz, K-D. 1996. A monograph of the colubrid snakes of the genus *Elaphe* Fitzinger. Koeltz Scientific Books. Alemania. pp. 439.
- Shine, R. 1989. Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: A review of the evidence. *The Quarterly Review of Biology* 64 (4): 419-461.
- Silvestro, M. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution* 12, 335-337. DOI: 10.1007/s13127-011-0056-0.
- Sites, J. y C. Marshall. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* 18 (9): 462-470.
- Spencer, C. L. 2008. Geographic variation in Western Diamond-Backed Rattlesnake (*Crotalus atrox*) morphology. pp. 55-78. En: Hayes, W. K., K. R. Beaman, M. D. Cardwell y S. P. Bush(eds.). *The biology of rattlesnakes*. Loma Linda University Press, Loma Linda, California. pp. 606.
- Stayton, C. 2005. Morphological evolution of the lizard skull: A geometric morphometrics survey. *Journal of Morphology* 263: 47-59.
- Toro, I. M. V., S. G. Manriquez y G. I. Suazo. 2010. Morfometría geométrica y el estudio de las formas biológicas: De la morfología descriptiva a la morfología cuantitativa. *International Journal of Morphology* 28 (4): 977-990.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. p.441-466. En Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre (comps.). *Ecología molecular*. Conabio, INE. México. pp. 594.
- Wang, I., R. Glor y J. Losos. 2013. Quantifying the roles of ecology and geography in spatial genetic divergences. *Ecology letters* 16: 175-182.
- Wiens, J. J. y T. A. Penkrot. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51 (1): 69-91.
- Yeates, D., A. Seago , L. Nelson, S. Cameron, L. Joseph y J. Trueman. 2011. Integrative taxonomy or Iterative taxonomy?. *Systematic Entomology* 36: 209-217.
- Zhang, C., B. Rannala, y Z. Yang. 2012. Robustness of compound Dirichlet priors for Bayesian inference of branch lengths. *Systematic Biology* 61: 779-784.
- Zink, R. M. 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology* 42: 953-959.

Apéndice 1. Número de catálogo de los 210 ejemplares revisados de colecciones nacionales e internacionales.

Subespecie	AMNH	CAS	CM	CNAR	FMNH	KU	LACM	MCZ	MVZ	MZFC	TCWC	UCM	UMMZ	UTA			
<i>S. t. intermedia</i>	R65738	R100629	134052	48468	10210	106003	35094	6820	103767	37156	146951	17059	11617	41171	117768	12280	
	R65891	R101059	143150	69057	12983	38293	63735	6821	103796	42656	177771	17473	12650	42307	118944	12281	
	R73743	R107356	169556	69058	15456	38294	73503	6823	103797		229700	21889	12651	52561	119774	4669	
	R74724	R107357	191060		15459		73504	6824	103798		45081	22886	17182	9104	80210	4896	
	R80591	R111179	23828		1958		78938	6826	103799		57261	5085	21381		82570	52973	
	R80808	R117985	23829		3196		80749	6827	103800		67919	8630	28945		99759	53343	
	R80809	R133354	23830		4297		80750	6828	103801		72195		32906		99891	53495	
	R85010	R133355	23831		5002		87744	6829	125569		72609		59964			53846	
	R87588	R138483	95827		521			6830	127781		76132		7432			57660	
	R88658	R138485			522			6831	133851		76657		7501			57785	
	R91590	R143048			523			6832	136919		78016					57786	
	R91616	R158420						6833	155094							57792	
	R94848	R158421						8481	27740							57793	
	R94849	R64501							64447							57795	
	R96621	R65118															
	R98478	R65119															
<i>S. t. triaspis</i>	R38843	154148	44469	46873		153500	171715						40229	113601			
	R38844		45296	46874		153517							41689	113602			
			45701	46998		153525							41690	68234			
			45702	47036		20624							41691	68235			
			45704	49070		36105							41692				
			45709	49094		36109											
			46825	49137		36117											
			46826	49168		36121											
			46827	49639													
			46871	49644													
		46872	49646														
			49647														
<i>S. t. mutabilis</i>			69059			174182	150523			40414		17181		102561	25377		
						174183								116511	28486		
						86192									28489		
															33065		
															33066		
														37231			
														37232			
														38150			
														45873			
														5567			

AMNH- American Museum of Natural History, New York, NY, USA; CAS- California Academy of Science, San Francisco, CA, USA; CM- Carnegie Museum of Natural History, Pittsburgh, PA, USA; CNAR- Colección Nacional de Anfibios y Reptiles, Distrito Federal, DF, México; FMNH- The Field Museum of Natural History, Chicago, IL, USA; KU- The University of Kansas Natural History Museum, Lawrence, KS, USA; LACM- Natural History Museum of Los Angeles County, Los Angeles, CA, USA; MCZ- Museum of Comparative Zoology at Harvard, Cambridge, MA, USA; MVZ- Museum of Vertebrate Zoology at Berkeley, Berkeley, CA, USA; MZFC- Museo de Zoología Facultad de Ciencias, UNAM, Distrito Federal, DF, México; TCWC- Texas Cooperative Wildlife Collection, College station, TX, USA; UCM- University of Colorado Museum of Natural History, Boulder, CO, USA; UMMZ- University of Michigan Museum of Zoology, Ann Arbor, MI, USA; UTA- University of Texas at Arlington, Arlington, TX, USA.