



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

ECOFISIOLOGIA DE LA
ANIDACIÓN DE *Sceloporus aeneus* EN CONDICIONES
DE ALTA MONTAÑA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:

M. en C. RODOLFO GARCIA COLLAZO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. FAUSTO R. MENDEZ DE LA CRUZ
INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNAM
COMITÉ TUTOR: Dra. MARICELA VILLAGRAN SANTA CRUZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM
Dr. HECTOR GADSDEN ESPARZA
INSTITUTO DE ECOLOGIA, A. C.

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por las facilidades otorgadas para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM por facilitar sus espacios y equipo para desarrollar mis experimentos de laboratorio.

Al laboratorio de herpetología del Instituto de Biología UNAM

A los miembros del Comité Tutorial por apoyarme desde el inicio de esta investigación:

Dr. Fausto Méndez de la Cruz
Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz
Dr. Héctor Gadsden Esparza

Al Dr. Fausto Méndez de la Cruz por su dirección al trabajo pero sobre todo por su amistad y paciencia.

A los Sinodales que con sus valiosos comentarios ayudaron a mejorar el trabajo:
Dr. José Jaime Zuñiga Vega, Dr. Hibraim A. Pérez Mendoza y
a la Dra. Norma Manríquez Morán

Al proyecto PAPIIT-213405 y 224208 por el apoyo económico para la traducción al inglés del artículo publicado.

Al permiso SEMARNAT-FAU 0074 para la colecta de lagartijas.

DEDICATORIA

A mí amada familia Rosario y Paola que me han apoyado en mi trabajo, pero sobre todo por su gran amor e infinita comprensión. Por siempre y para siempre.

A mi madre Inés y a mi padre Rodolfo quienes me apoyaron incondicionalmente desde que decidí estudiar Biología.

A todos y cada uno de mis profesores que me formaron. De quienes obtuve aprendizajes buenos y también malos que me ayudaron a madurar académicamente.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Niveles del Porcentaje de humedad en el sustrato del nido (barras), niveles de precipitación pluvial (líneas con triangulo) por mes y el periodo de anidación (líneas con rombos). Año 1999 (A) año 2001 (B) y 2002 (C).....**38**
- Figura 2. Relación entre volumen y peso del huevo de *S. aeneus* en los años 1999, 2001 y 2002. **40**
- Figura 3. Relación entre el estadio de desarrollo embrionario y peso del huevo de *S. aeneus* durante los años 1999,2001 y 2002 **40**
- Figura 4. Relación entre el estadio de desarrollo embrionario y el volumen del huevo de *S. aeneus* durante los años 1999, 2001 y 2002..... **41**
- Figura 5. Relación entre la TCV y TCP del huevo de *Sceloporus aeneus* durante el año 2002.....**42**
- Figura 6. Valores medios de la temperatura por hora en el nido, durante la incubación del huevo de *S. aeneus*. Temperaturas registradas con un termocople HOBO ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$). Los círculos representan el valor medio y la líneas verticales la desviación estándar..... **43**

INDICE

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
Descripción de la especie	10
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS PARTICULARES.....	12
DESCRIPCIÓN AREAS DE ESTUDIO.....	13
MILPA ALTA (MA).....	13
AJUSCO (Aj).....	13
NEVADO DE TOLUCA (Nv)	14
CAHUACÁN (Ca).....	15
AUTODROMO (Au).....	16
ESPAÑITA (Es)	17
LITETRATURA CITADA.....	18
CAPITULO I. Egg retention and intrauterine embryonic development in <i>Sceloporus aeneus</i> (Reptilia: Phrynosomatidae): implications for the evolution of viviparity.....	21
CAPITULO II. Hidratación del huevo y su relación con el desarrollo embrionario de <i>Sceloporus aeneus</i> en Nidos Naturales, en condiciones de alta montaña.....	30
RESUMEN.....	31
ASTRACT.....	32
INTRODUCCIÓN.....	33
MÉTODOS.....	34
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	46
LITERATURA CITADA	48

ECOFISIOLOGIA DE LA ANIDACION DE *Sceloporus aeneus* EN CONDICIONES DE ALTA MONTAÑA.

RESUMEN

Dentro del género *Sceloporus* se encuentran especies vivíparas en elevaciones superiores a los 1,500 metros. Se ha sostenido que en este género de lacertilios la vivíparidad ha evolucionado en climas fríos, debido a que la retención del huevo en el oviducto proporciona mejores condiciones de temperatura que aquellas prevalecientes en el nido. La retención intrauterina es muy favorable a la sobrevivencia de las crías y el posible paso intermedio hacia la evolución de la viviparidad. *Sceloporus aeneus* es una especie ovípara que se distribuye en la zona montañosa de la Faja Volcánica Transmexicana, en altitudes de entre 2,400 a 3,400 m en condiciones variables de temperatura y precipitación pluvial, a lo largo del año, lo cual permitió evaluar si la retención del huevo (ER) y el desarrollo embrionario intrauterino (IED) se presenta en esta especie y conocer cual condición ambiental o física promueve el IED. Se obtuvieron muestras de seis poblaciones para evaluar la influencia de la altitud, precipitación pluvial, temperatura y la filogenia en el IED. El presente estudio muestra que en *S. aeneus* la ER es un paso intermedio hacia la evolución de la vivíparidad. Los factores ambientales promueven el desarrollo a estadios avanzados de desarrollo embrionario intrauterino, se encontró que los estadios más avanzados se presentaron en elevaciones bajas y hábitats secos, contradiciendo la hipótesis del clima frío. Al ser el agua esencial en el desarrollo embrionario dentro del huevo de los reptiles se evaluó la hidratación del huevo y su relación con el desarrollo embrionario, cuantificando la tasa de crecimiento en las dimensiones de volumen y peso de los huevos y desarrollo embrionario en una población de *S. aeneus* a 3,200 m en el Nevado de Toluca, durante tres años. Se estableció que la temperatura no varía significativamente durante la incubación por lo que no se relaciona significativamente con el incremento del peso y volumen del huevo y con el desarrollo embrionario. Sin embargo, el agua en el sustrato incrementa el peso y volumen del huevo y por lo tanto es favorable para el desarrollo embrionario, confirmando el papel significativo de la hidratación en el desarrollo de los embriones en el nido.

ABSTRACT

Within the genus *Sceloporus* viviparous species are found mainly above 1500 meters of elevation. It has been proposed that viviparity in this genus of lizards has evolved in cold climates. The retention of egg in the oviduct provides better temperature conditions than those prevailing in the nest, which is favorable in cold climates. Intrauterine retention, instead of oviposition, is favorable to the survival of offspring and represents an intermediate step to the evolution of viviparity. *Sceloporus aeneus* is a species that is distributed in the mountainous Trans-mexican volcanic belt at altitudes between 2,400-3,400 m in changing environmental conditions of temperature and rainfall, which allowed us to assess whether the of egg retention (ER) and intrauterine embryonic development (IED) occurs in the species and meet environmental or physical condition which promotes IED. Six populations were studied to evaluate the influence of altitude, rainfall, temperature and phylogenetic effect leads to greater IED in the species. The present study shows that in *S. aeneus* the ER is an intermediate step towards the evolution of viviparity. Environmental factors promote advanced stages of intrauterine embryonic development. The more advanced stages were presented at low elevations and dry habitats, contradicting the theory of cold climate. Egg hydration and its relation to embryonic development was evaluated by quantifying the rate of growth in the dimensions of volume and weight of eggs and embryonic development in a population of *S. aeneus* to 3200 m in the Nevado de Toluca, for three years. It was established that temperature does not vary significantly during incubation so is not significantly related to increased weight and volume of the egg and embryo development. However, the availability of water in the substrate increases the weight and volume of the egg and therefore pro embryonic development, confirming the highly significant role in the hydration of embryo development in the nest.

INTRODUCCION GENERAL

En la reproducción de los escamados (orden Squamata) existen dos grandes modos reproductivos, el primero es la ovíparidad cuando las hembras producen huevos y la mayor parte del desarrollo embrionario se lleva a cabo fuera de la madre y segundo es la vivíparidad cuando el desarrollo embrionario se realiza completamente dentro del útero de la madre (Guillette, 1987). La vivíparidad es un derivado adaptativo que se da a partir de especies ovíparas sometidas a determinados factores ambientales. También, se ha encontrado poblaciones vivíparas y ovíparas en la misma especie (Shine, 1984).

La evolución de la vivíparidad ha sucedido más de 100 veces en Squamata (Blackburn, 1992, 2000; Shine, 1985) por lo que es un proceso que debe ser estudiado a nivel específico. El modelo de la baja temperatura ha sido ampliamente estudiado para explicar la evolución hacia la vivíparidad, porque la retención intrauterina provee al embrión una temperatura más estable que la que se puede tener en el microhábitat del nido (Andrews, 2000; Shine, 1985, 2004).

En especies vivíparas, el desarrollo embrionario intrauterino confiere ventajas al acelerar la embriogénesis que puede ser lenta en condiciones de baja temperatura en los nidos (Shine, 1980), la cual puede llegar a ser letal. A elevaciones altas, la disposición de oxígeno atmosférico es menor, lo cual también puede ser solucionado por la placentación (Guillette *et al.*, 1980). Por otro lado las especies ovíparas están expuestas a una serie de adversidades que pueden influir principalmente en la etapa de huevo en el nido, periodo muy vulnerable, entre las que se han descrito están: temperaturas extremas, desecación, exceso de agua, ataque de hongos y depredación (Packard *et al.*, 1977; Tinkle y Gibbons, 1977; Shine y Bull, 1979; Guillette, 1981; Shine 1983, 1984).

Si bien es cierto que el mayor porcentaje de especies de escamados vivíparos se localizan en sitios a altitudes y latitudes elevadas (Packard, *et al.*, 1977; Tinkle y Gibbons 1977 Shine y Bull 1979; Shine 1983), aunque no siempre aplica para la latitud (Guillette *et al.*, 1980; Méndez de la Cruz *et al.*, 1998; Lambert y Wiens, 2013). También se pueden localizar poblaciones de especies ovíparas que habitan en altitudes y latitudes grandes (Guillette *et al.*, 1980). Ejemplo de esto es *Sceloporus aeneus*, una especie ovípara que se encuentra en sitios a 3,000 msnm en la Sierra del Ajusco, D.F. y a 3200 en el Nevado de Toluca. Aunque se conocen las características reproductoras de algunas poblaciones de *S. aeneus* (Guillette, 1981; Manríquez-Morán, *et al.*, 2013), se desconoce cómo se lleva a cabo el desarrollo de los huevos en el nido, la cual es la etapa más vulnerable durante la reproducción.

Las condiciones y propiedades del nido están determinadas por las condiciones meteorológicas. La temperatura varía entre estaciones del año, e incluso puede variar durante el día, pudiéndose presentarse tanto momentos extremadamente calientes como otros muy fríos. La temperatura en el suelo varía con la profundidad, reduciéndose conforme aumenta la profundidad. Se ha visto que la iguana del desierto *Dipsosaurus dorsalis* presenta una distribución geográfica limitada debido a las condiciones físicas que requiere para anidar (Muth, 1980).

Con respecto a la cantidad de agua en el suelo esta es dependiente de la ubicación geográfica, la estación del año, de la temperatura del suelo (a mayor temperatura menor humedad y viceversa). A mayor profundidad en el suelo mayor disponibilidad de agua y la disponibilidad también puede estar determinado por el tipo de suelo (Aguilo *et al.*, 1991).

En altitudes elevadas el factor temperatura es una limitante muy importante para el desarrollo embrionario de los reptiles ovíparos, pero también el agua, se ha observado que el huevo puede incrementar dos veces o hasta tres veces su peso por efecto de hidratación que es importante en el proceso metabólico (Andrews y Sexton, 1981; Thompson, 1981; Warner *et al.*, 2011). Sin embargo, al acumular agua en el huevo también se incrementa la pérdida de agua por transpiración, posible consecuencia de una reducción o adelgazamiento del cascaron

durante la incubación (Andrews y Sexton, 1981), sobre todo al final de período de incubación (Tracy *et al.*, 1978).

Trabajos diversos se ha enfocado en los aspectos térmicos para explicar la evolución de la ovíparidad a la vivíparidad, si bien es cierto que es una fuerza selectiva muy poderosa, no es la única, la hidratación del huevo puede llegar a ser también una respuesta, por lo que su entendimiento nos puede ayudar a explicar el proceso evolutivo (Shine y Thompson 2006).

En virtud de que *S. aeneus* habita a una altitud elevada en un ambiente templado con fluctuaciones de temperatura y humedad y porque es simpátrico con lacertilios vivíparos, el presente estudio se enfoca en los factores que hacen posible la permanencia de esta especie en condiciones extremas para la anidación y su potencial evolución a la vivíparidad. El presente estudio busca corroborar la hipótesis que *S. aeneus* presenta una retención intrauterina prolongada del huevo y que esta es promovida por la disponibilidad de agua en el sustrato del nido.

Descripción de la especie

El lacertilio *Sceloporus aeneus* fue descrito por Wiegman en 1928. Es una lagartija de talla pequeña. Mide de 67 a 77 mm de longitud hocico cloaca (LHC), con variantes de color del café al verde olivo, con dos líneas dorsales de color beige y dos líneas dorsolaterales de igual color. Presenta una mancha negra en el hombro, bordeada de un color azul claro o blanco; en el extremo anterior de la mancha presenta un punto azul formado por cuatro a seis escamas. Las escamas de la cabeza son rugosas, tienen una escama cantal bien definida, una rostral seguida por dos escamas postrostrales alargadas, cuatro internasales, cinco prefrontales y una frontal dividida, de las cuales la anterior es más grande que la posterior (Castro-Franco y Bustos, 2006).

Es una especie endémica de México y se le encuentra en la Sierra Madre Occidental y en la parte oeste del Eje Neovolcánico Transversal. Habita en zonas con bosque de pino encino y

en áreas abiertas cubiertas por pastos amacollados (Castro-Franco y Bustos, 2006) en elevaciones de 2,300 a los 3, 100 metros sobre el nivel del mar (Gillette, 1981; Andrews *et al.*, 1999).

Es una especie de actividad diurna. Los individuos se encuentran en el suelo, sobre troncos muertos, tanto en la base como sobre ejemplares de pastos amacollados, sobre y debajo de rocas, en sembradíos de maíz y cerca de la casas habitación del hombre (Gillette, 1981; Castro-Franco y Bustos, 2006 y obs. personal).

Sceloporus aeneus es ovípara, las hembras tienen un patrón reproductor estacional primaveral, característico en representantes ovíparos del género que habitan zonas templadas. La hembra puede producir nidadas de 4 a 10 huevos y el tamaño de nidada no tiene relación con el tamaño de la hembra. La frecuencia de nidadas es de dos por año (Guillette, 1981; Manriquez-Morán, *et al.*, 2013) y las hembras anidan en montículos de tierra elaborados por tuzas ya sea en las zonas despejadas de arbolado o en los campos de cultivo (Sánchez-Herrera, 1980; Guillette, 1986; observación. personal).

OBJETIVO GENERAL

Describir los mecanismos ecofisiológicos asociados con la anidación de *Sceloporus aeneus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar el nivel de retención del huevo (ER) y desarrollo embrionario intrauterino (IED) en seis poblaciones de la especie.

Establecer cómo los factores ambientales (altitud, precipitación y temperatura de incubación) y la historia evolutiva de la especie intervienen en el desarrollo embrionario intrauterino

Establecer si el desarrollo embrionario intrauterino es un paso intermedio hacia la vivíparidad.

Evaluar el proceso de hidratación del huevo en nidos naturales por medio de la tasa de crecimiento de volumen y tasa de crecimiento de peso.

Establecer la relación entre la hidratación y el desarrollo embrionario en el huevo.

Establecer la relación de la humedad del sustrato, temperatura del sustrato y cantidad de huevos en el nido en los niveles de hidratación del huevo.

DESCRIPCION AREAS DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en seis poblaciones de *Sceloporus aeneus* las cuales se describen a continuación.

MILPA ALTA (MA)

Se localiza en la Delegación Milpa Alta, al sureste del D.F. colindando con el municipio de Chalco, en el Estado de México, 19°11' de latitud norte y 99°01' de longitud oeste a una altura de 2400 msnm (INEGI, 1992).

SUELO. Es del tipo Andosol, derivado de cenizas volcánicas recientes, son muy ligeros con alta capacidad de retención de agua (Aguilera, 1989).

CLIMA. Es del tipo C (w₂) (w), templado subhúmedo, con lluvias en verano e invierno seco; la temperatura media anual es de 15°C y la precipitación anual de 717.8 mm. Durante el invierno hay incidencia de heladas (INEGI, 1992).

VEGETACION. En el estrato arbóreo predomina el Oyamel (*Abies sp.*) y el pino (*Pinus sp.*) y en el herbáceo pastos zacatonales (*Mulhenbergia sp.* y *Festuca sp.*) como los más predominantes.

AJUSCO (Aj)

Se ubica en la delegación de Tlalpan al sureste del Distrito Federal, en el parque nacional Cumbres del Ajusco, cerca de los límites con el Estado de México, entre los paralelos 19°13' de latitud norte y 99°17' longitud oeste. Con una altura que va de los 2,900 msnm (INEGI, 1997b).

SUELO. Los suelos son derivados de cenizas volcánicas recientes, conocidas como suelos de Andosol y están formados sobre lava o materia piroclástica (Castillo, 1976).

TOPOGRAFIA. Presenta relieve montañoso con una estratificación de planos horizontales, inclinados, colinas y valles alrededor y hay además porciones de roca desnuda en los picos más elevados (INEGI, 1997b).

CLIMA. Es C(w2) (w) (b') ig, semifrío con verano fresco y largo, la temperatura media anual oscila entre 5 y 12°C la del mes más caliente entre 6.5 y 22°C. Con régimen de lluvias de verano (mayo a octubre), la precipitación total anual es de 1,340mm, pero en invierno se recibe menos del 5% de este total anual. La diferencia de temperatura entre el mes más frío y el más caliente es menos de 5°C, el mes más caliente se presenta en mayo o junio (INEGI, 1997b).

VEGETACION. En el estrato arbóreo dominan: *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*. El estrato arbustivo está conformado generalmente por algunas especies como: *Fuchsia microphyla*, *Salix paradoxa*, *Esencia angulifonius* y *Senecio barbajohannis*. En el estrato herbáceo se encuentran: *Archemilla promilla procumbres*, *Didinea mexicana*, *Eupatorium saltivari*, *Eupatorium glabratum protasflerum*, *Fetuca amplissima* y *Perneti ciliata* (Castillo, 1976).

NEVADO DE TOLUCA (Nv)

El sitio de estudio se encuentra en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, a 22 Km del suroeste de la ciudad de Toluca en el Estado de México, a los 3200 msnm. Localizándose entre los Paralelos 19° 11' 51" y 99° 50' de longitud oeste.

El terreno es accidentado con alto número barrancas y cañadas que los escurrimientos han labrado en los flancos de la montaña, sobre todo en sus caras sur y este, que es por donde el acceso a la montaña se hace más difícil debido a lo inclinado de las pendientes (Salcedo-Vargas, 1986).

SUELO. Varían de medianamente profundos, generalmente de capas de un metro predominando los colores oscuros como el café grisáceo oscuro principalmente en la superficie, presenta un pH ligeramente ácido con valor de 4.4. En general, el contenido de

materia orgánica, es elevado por lo que los suelos son clasificados dentro del orden del Inceptisol y en el suborden Andept (Salcedo-Vargas, 1986).

CLIMA. De acuerdo con el sistema Köppen modificado por García (1973) se han determinado los siguientes tipos y subtipos de climas para el nevado de Toluca. La parte baja y media del Parque prevalece un clima de templado a frío, alcanza precipitaciones medias de 1,200 a 1,500 mm anuales y una oscilación de la temperatura entre 4 y 7°C.

VEGETACION: En el área de interés se localiza: Bosque de Pino, con especies de *Pinus montezumae*, *Pinus pseudostrobus* y *Pinus ayacahuite* característicos de los 2,800 a 3,200 m de elevación (Guzmán, 1958).

CAHUACÁN (Ca)

Pertenece al municipio de Villa Nicolás Romero, Estado de México, se localiza al noroeste del Distrito Federal, con coordenadas 19°37' latitud norte y 99°25' longitud oeste, a una elevación que oscila entre los 2,750 msnm.

SUELO. El tipo de suelo corresponde a un Luvisol Crómico, caracterizado por presentar colores rojos o amarillentos en el subsuelo, debido a un enriquecimiento de arcilla de dicha capa. Son suelos de fertilidad moderada muy susceptible a la erosión.

FISIOGRAFIA. El ejido de Cahuacán pertenece a la subprovincia de los Lagos y Volcanes de Anáhuac, la cual cubre la Cuenca de México y está constituida por grandes Sierras Volcánicas o conos individuales. La zona se ubica en la intersección de la Sierra de las Cruces y la Sierra de Tepotzotlán, caracterizándola una serie de Montañas entre las que existe una zona de cañadas y montes con pendientes no mayores a los 30°.

CLIMA. El clima dominante según García (1973), es el de tipo C(w2) (w) b (g) que corresponde a un templado subhúmedo, con lluvias en verano y un porcentaje de lluvia invernal menor a los 5mm. La temperatura media anual varía entre los 18 y 20°C siendo el

mes más caliente mayo, con temperaturas de 15 a 20°C, y el mes más frío enero, con temperaturas que van de 7 a 12°C.

VEGETACIÓN. Caracterizada bosque de Encino-Pino de 20 a 30 m de altura. En el estrato arbóreo las especies dominantes son: *Quercus obtusata*, *Pinus motezumae* y *Pinus leiophylla*, estas especies conforman un bosque semiperturbado, que se intercala con zacatonales de las especies: *Commelina coelestis*, *Achillea millifelium*, *Tagetes lucida*, *Sycios angulatus* y *Tacaxacum officinales*, y en la zona de vegetación abierta con especies anuales y algunos abustos tales como *Arbutus xalapensis*, *Acctostaphylus arguta* y *Symporio cacpus mirrophyllus*.

AUTÓDROMO (Au)

Pertenece al municipio de Tulancingo de Bravo, en el Estado de Hidalgo, con coordenadas y 20°05' latitud norte y 99° 25' longitud oeste, a una elevación de 2450 m (INEGI, 1997a).

SUELO. El tipo de suelo corresponde a un Andosol, caracterizado por presentar colores rojos o amarillentos en el subsuelo, debido a un enriquecimiento en arcilla de dicha capa. Son suelos de fertilidad moderada muy susceptible a la erosión (INEGI, 1997a).

FISIOGRAFIA. Pertenece a la subprovincia de los Lagos y Volcanes de Anáhuac (INEGI, 1997a).

CLIMA. El clima dominante según García (1973), es el de tipo C(E) (w) que corresponde a un semifrío subhúmedo, con lluvias en verano y un porcentaje de lluvia invernal menor a los 5mm. La temperatura media anual es de 14°C y la precipitación media anual es de 700 mm (INEGI, 1997a).

VEGETACIÓN. La vegetación arbórea se constituye por especies del género *Pinus patula*, *Abies religiosa*, *Quercus crassifolia* y *Q. laurina* (INEGI, 1997a).

ESPAÑITA (Es)

Pertenece al municipio de Calpulalpan, en el Estado de Tlaxcala, con coordenadas 19° 35' y latitud norte y 98° 33' longitud oeste, a una elevación de 2450 msnm (INEGI, 1997c).

SUELO. El tipo de suelo corresponde a un Andosol, caracterizado por presentar colores rojos o amarillentos en el subsuelo, debido a un enriquecimiento de arcilla en dicha capa. Son suelos de fertilidad moderada muy susceptible a la erosión (INEGI, 1997c).

FISIOGRAFIA. Pertenece a la subprovincia de los Lagos y Volcanes de Anáhuac, la cual cubre la Cuenca de México y pertenece a la Cuenca hidrológica del Río Moctezuma (INEGI, 1997c).

CLIMA. El clima dominante según García (1973), es el de tipo C(w) que corresponde a un templado subhúmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 14°C y la precipitación media anual alrededor de los 700 mm (INEGI, 1997c).

VEGETACIÓN. Se conforma de un Bosque de *Pinus teocote*, *Juniperus deppeana*, *Abies religiosa* y *Quercus laurina* (INEGI, 1997c).

LITERATURA CITADA

- Aguilera, M.N. 1989. Tratado de Edafología de México: Tomo I. Facultad de Ciencias, UNAM. México 222 págs.
- Aguilo A.M., Aramburu M.M., Ayusco C.E., Blanco A.A., Clatayud P.L; Ceñal G.F; Cifuentes V.P; Escribano B.R; Francés A.E; Glaría G.G; González A.S; Lacoma M. E; Muñoz R. C; Ortega H.A; Otero P.I; Ramos F.A; y Sáiz O.M; 1991. Guía para la elaboración de estudios de medio físico: contenido y metodología. 3a ed. Ministerio de obras públicas y transporte España. 572 páginas.
- Andrews, R.M. 2000. Evolution of viviparity in squamata reptiles (*Sceloporus* spp.) a variation of the cold-climate model. *Journal of Zoology (London)* 250:243-253.
- Andrews, R.M. y Sexton, O.J. 1981. Water relations of the eggs of *Anolis auratus* and *Anolis limifrons*. *Ecology* 62:556-562
- Andrews R.M., Mathies, T., Qualls, C.P. y Qualls, F.J. 1999. Rates of embryonic development of *Sceloporus* lizards: do cold climates favor rapid development? *Copeia* 1999:691–699.
- Blackburn, D.G. 1992. Evolutionary origins of viviparity in the Reptilia. I. Sauria. *Amphibia-Reptilia* 5:259–291.
- Blackburn, D.G. 2000. Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Comparative Physiology* 127:391–401.
- Castillo, T.Z.I. 1976. Algunos aspectos del impacto ambiental en el Parque Nacional del Ajusco. Tesis de Lic. Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Castro-Franco, R. y Bustos M. G. 2006. Herpetofauna de las áreas naturales protegidas corredor Biológico Chichinautzin y la sierra de Huahutla, Morelos, México. Publicación especial No. 1 Nov. 2006. Universidad Autónoma de Morelos. 109 págs.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía UNAM. México.
- Guillette, L.J. Jr., Trichard, E.R., Fitzgerald, J., Kevin T. y Smith, H.M. 1980. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. *Herpetology*, 27 2:168-174.
- Guillette, L.J. Jr., 1981. Reproductive strategies and the evolution of viviparity in two allopatric populations of the Mexican lizard *Sceloporus aeneus*. Thesis Doctoral Physiology University of Colorado. 120 pp.
- Guillette, L.J.Jr. y Lara-Gongora, G. 1986. Notes on oviposition and nesting in the high elevation lizard, *Sceloporus aeneus*. *Copeia* 1986:232-233
- Guillette, L.J.Jr. 1987. Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles. David O. Norris & Richard E. Jones. (Eds.) Plenum Publishing Corporation. 523-562.

Guzmán H. G. 1958. El hábitat de *Psicolobybe muliercula* Singer y Smith (= *wassonii* Heim). Agarigáceo alucinógeno mexicano. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. 19 (14).

INEGI. 1992. Milpa Alta. Cuaderno de información básica delegacional. INEGI. México. 74 págs.

INEGI. 1997a. Anuario estadístico del Estado de Hidalgo.

INEGI. 1997b. Anuario estadístico del Estado de México.

INEGI. 1997c. Anuario estadístico del Estado de Tlaxcala.

Lambert, S. M., y Wiens, J. J. 2013. Evolution of viviparity: a phylogenetic test of the cold-climate hypothesis in phrynosomatid lizards. *Evolution* 67(9), 2614-2630.

Manríquez-Morán N.L., Villagrán-Santa Cruz, M. y Méndez-de la Cruz. F.R. 2013. Reproductive Activity in Females of the Oviparous Lizard *Sceloporus aeneus*. *The Southwestern Naturalist*, 58:325-329. 2013.

Méndez-de la Cruz F.R., Villagrán-Santa Cruz M. y Andrews, R.M. 1998. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. *Herpetologica* 54:521-532.

Muth, A. 1980. Physiological ecology of desert iguana (*Dipsosaurus dorsalis*) eggs: temperature and water relations. *Ecology* 61:1335-1343.

Packard, G.C., Tracy, C.R. y Roth, J.J. 1977. The physiological ecology of reptilian eggs and embryos, and evolution of viviparity within the class Reptilia. *Biological Review*. 52: 71-105.

Rand, S.A. 1972. The temperatures of iguana nests and their relation to incubation optima and to nesting sites and season. *Herpetologica* 28:252-253

Rand, S.A., y Greene, H. 1982. Latitude and climate in the phenology in the green iguana (*Iguana iguana*). In: Burghardt M., Gordon and A. Stanley Rand (Eds.), *Iguanas of the World. Their behavior, ecology and conservation*. Notes Publ. Park Ridge. New Jersey. 42-49 pp.

Salcedo-Vargas, M. A. 1986. Herpetofauna del Parque Nacional Nevado de Toluca Guía de Campo. Tesis (licenciatura). Depto. de Biología Experimental, Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Unidad Iztacala, U.N.A.M. México.

Sánchez-Herrera, O. 1980. Herpetofauna of the Pedregal de San Ángel, DF, México. *Bulletin of the Maryland Herpetological Society* 16:9-18

Shine, R. 1980. Costs of reproduction in reptiles. *Oecología* 46:92-100.

Shine, R. 1983. Reptilian viviparity in colds climates: testing the assumption of an evolutionary hypothesis. *Oecologia* 57: 397-405.

Shine, R. 1984. Physiological and ecological question on the evolution of reptilian viviparity. In Seymour, R.S., (Ed.) Respiration and metabolism of embryonic vertebrates. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht/Boston/London.

Shine, R. 1985. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. In C. Gans and F. Billet. (Ed.) Biology of the Reptilia, Vol. 15, Development, Pp. 605–694. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Shine, R. 2004. Does viviparity evolve in cold climate reptiles because pregnant females maintain stable (not high) body temperatures? *Evolution* 58:1809–1811.

Shine, R. y Bull, J.J. 1979. The evolution of live-bearing in lizards and snakes. *The American Naturalist* 113: 905-923.

Shine, R. y Thompson, M. B. 2006. Did embryonic responses to incubation conditions drive the evolution of reproductive modes in squamate reptiles?. *Herpetological Monographs* 20, 2006, 159–171.

Thompson, J. 1981. A study of source of nutrients for embryonic development in a viviparous lizard *Sphenomorphos quoyii*. *Comparative Biochemistry Physiology* 70A: 509-518.

Tinkle, D. W. y Gibbons, J.W. 1977. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous Publications. Museum Zology University of Michigan* 154: 1-55.

Tracy, C.R; Packard, G. C. y Packard, M. J. 1978. Water relations of chelonian eggs. *Physiological Zoology* 51: 378-387.

Warner, D. A., Moody, M. A. y Telemeco, R. S. 2011. Is water uptake by reptilian eggs regulated by physiological processes of embryos or a passive hydraulic response to developmental environments?. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 160: 421–425.

CAPITULO I

Egg retention and intrauterine embryonic development in *Sceloporus aeneus* (Reptilia: Phrynosomatidae): implications for the evolution of viviparity.

(Revista Mexicana de Biodiversidad 83: 802-808 2012)



Egg retention and intrauterine embryonic development in *Sceloporus aeneus* (Reptilia: Phrynosomatidae): implications for the evolution of viviparity

Retención de huevos y avance embrionario intrauterino en *Sceloporus aeneus* (Reptilia: Phrynosomatidae): implicaciones para la evolución de la viviparidad

Rodolfo García-Collazo¹, Maricela Villagrán-Santa Cruz², Eduardo Morales-Guillaumin³, Rubi Nelsi Meza Lázaro^{4,5}, and Fausto R. Méndez-de la Cruz^{4ES}

¹Laboratorio de Zoología, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. de los Barrios No. 1 Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Estado de México, México.

²Laboratorio de Biología de la Reproducción Animal, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, D. F., México.

³Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. Liga Periférico - Insurgentes Sur; Núm. 4903, Col. Parques del Pedregal, Delegación Tlalpan, 14010 México, D. F., México.

⁴Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-153, 04510 México, D. F., México.

⁵Present address: Laboratorio de Herpetología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado postal 70-399, 04510 México, D. F., México.

✉ faustor@ibiologia.unam.mx

Abstract. Egg retention (ER) and intrauterine embryonic development (IED) have been considered intermediate steps in the evolution from oviparity to viviparity. *Sceloporus aeneus* is an oviparous lizard that is closely related to the viviparous species (*Sceloporus bicanthalis*). The present study addresses the following 2 questions: 1) Are intermediate stages of egg retention (ER and IED) present in populations of *Sceloporus aeneus*? and 2) Are ER and/or IED explained by elevation, precipitation or phylogenetic effects? Results indicate that in *S. aeneus*, ER differs among populations. ER was negatively related to altitude and pluvial precipitation, whereas average environmental temperature had no effect on ER or IER. In contrast to previous observations of oviparous species related to viviparous species, populations of *S. aeneus* with advanced IED are associated with environmental factors such as low elevation and aridity instead of high elevation and cold climate, whereas the comparative analysis shows that there are no significant evolutionary changes throughout the phylogeny, which means that the altitude has no effect on the transition to the evolution of viviparity in *S. aeneus*-*S. bicanthalis*.

Key words: reproductive mode, oviparity-viviparity evolution, environmental factors.

Resumen. La retención de huevos (ER) y el desarrollo embrionario intrauterino (IED) han sido considerados pasos intermedios hacia la viviparidad. *Sceloporus aeneus* es un lacertilio ovíparo estrechamente relacionado a una especie vivípara (*Sceloporus bicanthalis*). El presente estudio derivó de las preguntas: ¿El ER y el IED presentes en las poblaciones de *S. aeneus* son estadios intermedios a la viviparidad? ¿ER y/o IED son explicados por la temperatura, altitud, precipitación pluvial o son un efecto filogenético? En *S. aeneus*, el ER y el IED fueron diferentes entre poblaciones. Los resultados indicaron que la ER se relacionó negativamente con la altitud y la precipitación pluvial, mientras que no se encontró efecto con la temperatura ambiental. En contraste con observaciones previas en especies emparentadas con las especies vivíparas, los resultados de la presente investigación indican que en las poblaciones de *S. aeneus* estudiadas, el mayor avance en el IED lo presentaron los organismos que habitan en baja elevación y áreas secas en lugar de alta elevación y climas fríos. Por otro lado, el análisis comparativo mostró que no existen cambios evolutivos significativos en los valores a lo largo de la filogenia, lo que significa que la altitud no tiene un efecto significativo en la transición hacia la viviparidad en *Sceloporus aeneus*-*S. bicanthalis*.

Palabras clave: modo reproductor, evolución oviparidad-viviparidad, factores ambientales.

Introduction

Squamata represents a good model to understand the evolution of viviparity as it has evolved more than 100

times independently within this group (Blackburn, 2000). In general, viviparity is considered an adaptation to cold climates (Shine, 1985a, 2004). In the genus *Sceloporus*, most of viviparous lizards inhabit elevations greater than 1 500 m (Guillette et al., 1980). The generally cooler temperatures at high elevations reduce the probability of

Recibido: 12 agosto 2010; aceptado: 17 febrero 2012

successful egg incubation (Andrews, 1997). Viviparous species have been considered to evolve in cold climates, because retaining the eggs in the oviduct offers better opportunities to incubate eggs at higher or at least more constant temperatures than in the nest (Andrews, 2000; Andrews and Mathies, 2000). Therefore, the cold climate model for the evolution of viviparity was supported by evidence of prolonged egg retention in oviparous reptiles (Qualls, 1996).

The advantages of egg retention (ER) and intrauterine embryonic development (IED) may result from eggs remaining less time in the nest, which has been considered the most vulnerable stage of the organism. Although prolonged egg retention is costly for the mother, because the female is exposed for a longer time to predators while she is burdened with eggs (Shine, 1985b).

In the genus *Sceloporus*, viviparity has evolved at intermediate latitudes, because oviparous species have morphological and physiological features that facilitate the prolonged retaining of the egg in the oviduct (Shine, 1985a; Shine and Guillette, 1988; Guillette, 1993; Andrews, 1997; Méndez-de la Cruz et al., 1998). Viviparity, and extended ER-IED requires morphological and physiological features that facilitate the prolonged retaining of the egg in the oviduct, such as thin eggshell, increases of the oviduct vascularity, placentation, and modification in the hormonal system (Shine, 1985a; Shine and Guillette, 1988; Guillette, 1993; Andrews, 1997; Méndez-de la Cruz et al., 1998). In fact ER and IED have been poorly studied within squamata and this offers a different scenario for the evolution of viviparity.

Oviparous species closely related to the viviparous ones can offer insight into the evolution of viviparity, as in *Sceloporus spinosus*, which is related to the viviparous *S. formosus* group (Wiens and Reder, 1997). In *S. spinosus* maximum stage at oviposition varied within clutches from the same locality, as well as among localities. Also, the variation in maximum embryonic stage at oviposition among different study populations suggested that the invasion of high elevations was associated with an enhanced potential for longer periods of egg retention (Calderón-Espinosa et al., 2006).

Another species that may offer information related to the evolution of viviparity is *Sceloporus aeneus*, considered a sibling species of the viviparous *S. bicanthalis* (Benabib et al., 1997). *Sceloporus aeneus* is distributed throughout the mountainous region and exhibits both ER and IED (Andrews, 2000), a trait similar to that observed in *S. spinosus*. Besides being oviparous, *S. aeneus* inhabits a wide altitudinal gradient that ranges from 2 400 to 3 400 m, with wide ranges of yearly pluvial precipitation and environmental temperatures, which allows to test if the

ER and IED is present and what environmental or physical conditions promote more advanced stages of IED.

The present study of ER in *S. aeneus* documents the variability of IED among 6 populations and tests the influence of the environment (altitude, precipitation, and temperature) and phylogenetic effects that may drive the maximum stage of intrauterine embryonic development as an intermediate step toward viviparity.

Materials and methods

To evaluate the capability of females to extended ER and IED during June 1998, we obtained a total of 57 gravid females of the oviparous lizard *S. aeneus* from 6 locations in the Transversal Neo-Volcanic mountain range in Mexico: 14 females from Milpa Alta, D. F. (MA; 19°11' N, 99°01' W, 2 400 m); 9 females from Ajusco, D. F. (Aj; 19°13' N, 99°17' W, 2 900 m); 14 females from Cahuacán, Mexico (Ca; 19°37' N, 99°25' W, 2 750 m); 11 females from Autódromo, Hidalgo (Au; 20°05' N, 99°25' W, 2 450 m); 9 females from Españita, Tlaxcala (Es; 19°35' N, 98°33' W, 2 450 m) and 7 from Nevado de Toluca, México (Nv; 19°11' N, 99°50' W, 3 200 m). As an external group to root the tree, we used *S. scalaris* (Mathies and Andrews, 1996) and *S. graciosus* (Shine, 1983).

Both analyzed parameters (ER and IED) were considered capable of evolving toward viviparity. To evaluate the ER and IED from each collected female, the females were maintained on a dry substrate to promote egg retention (Andrews and Mathies, 2000), with relative moisture of $12\% \pm 2.0$ inside a terrarium consisting of a plastic container (30 x 18.5 x 15 cm) with 3 cm of soil. We kept the environmental temperature between 22 to 24° C with an incandescent lamp with a photoperiod of 12L:12D. We fed the lizards daily with crickets, and water was supplied every day in the morning by wetting the wall of the terrarium.

Each terrarium was checked daily to detect oviposition, as evidenced by the flaccidity of the female's abdomen or by observation of the eggs in the terrarium. To establish the degree of retention, 1 egg from each nest was fixed in 10% formaldehyde to determine the development stage according to Dufaure and Hubert (1961). Embryonic development of lizards has been divided into 40 stages, each characterized by anatomical features (Dufaure and Hubert, 1961). Squamate species laid eggs within a wide range of development stages, from gastrula (8/40) to almost complete or full development (39/40), but most of them laid at stages 25-33/40 (Blackburn, 1995).

We evaluated the effects of environmental factors using correlations between the maximum stage of development in every population and the altitude, average environmental

temperature, and precipitation from each collected site. We reconstructed ancestral states of the characters (maximum stage of development from each population) using maximum parsimony unordered after Mesquite (Madisson and Madisson, 2008) and a comparative analysis with Compare 4.6b (Martins, 2004) according to phylogeny described by Meza-Lázaro (2008) and using *S. scalaris* and *S. graciosus* as the outgroups.

Results

Considerable intrapopulation variation in the maximum stage of oviposition was observed among study populations (Fig. 1). Wide variation in the stage of oviposition was observed in the Nevado de Toluca, Milpa Alta and Cahuacán populations (32-38, 33-39, 31-37, respectively), narrow variation in Autódromo and Española (34-39, 35-39, respectively) and the narrowest variation was observed in the Ajusco population (36-38, Fig. 1). In all 6 localities, some embryos reached stages close to full development, but some lizards from Autódromo, Española and Milpa Alta reached the most advanced developmental stages (39 of 40). However, there was no significant difference in the average stage of embryonic development among localities ($F_{5, 39} = 1.72, p = 0.152$).

Analyses of association between environmental factors and maximum embryonic development showed no correlation between embryo stage and temperature, but a negative correlation was found with altitude and

precipitation in the populations studied (Figs. 2A, B, C). Also, minimum stages of development (Fig. 1) were found to be more advanced (Au, MA, and Es) in low and arid habitats (50.1, 72.2 and 10.2 mm of pluvial precipitation) than in high elevations, as well as mesic ones (Ca and NT with 88.7 and 111 mm of pluvial precipitation respectively).

The reconstruction of ancestral states of maximum embryonic development in the studied populations (Fig. 3) shows that the ability to develop embryos in the uterus also occurs in the species used as the outgroups: *S. graciosus* (30/40) and *S. scalaris* (39.5/40). Also, advanced stages appear throughout the remaining populations of *S. aeneus*: the Cahuacán population had the lowest average stage (37/40), Ajusco and Nevado de Toluca (38/40), Autódromo and Española (38.5/40), and Milpa Alta with (39/40), whereas the viviparous species *S. bicanthalis* shows the maximum stage (40/40). According to COMPARE (Martins, 2004), the estimated ancestral state analysis shows that there are no significant evolutionary changes throughout the phylogeny (Fig. 4)

Discussion

According to the cold climate hypothesis, viviparity has evolved in high elevations or latitudes (Tinkle and Gibbons, 1977; Shine, 1985a, 2004) in response to cold environmental temperatures. In the genus *Sceloporus*, this idea was supported by the evidence that most viviparous species occur at elevations higher than

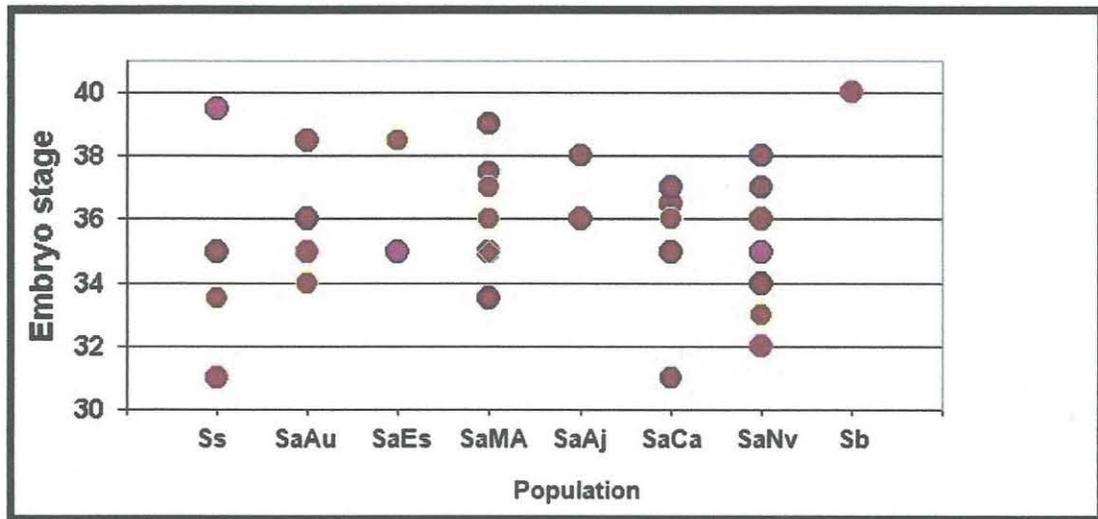


Figure 1. Stage of embryos retained intrauterine found in the different species Ss= *Sceloporus scalaris*, SaAu= *S. aeneus* from Autódromo, SaEs= *S. aeneus* from Española, SaMA= *S. aeneus* from Milpa Alta, SaAj= *S. aeneus* from Ajusco, SaCa= *S. aeneus* from Cahuacán, SaNv= *S. aeneus* from Nevado de Toluca, Sb= *S. bicanthalis*.

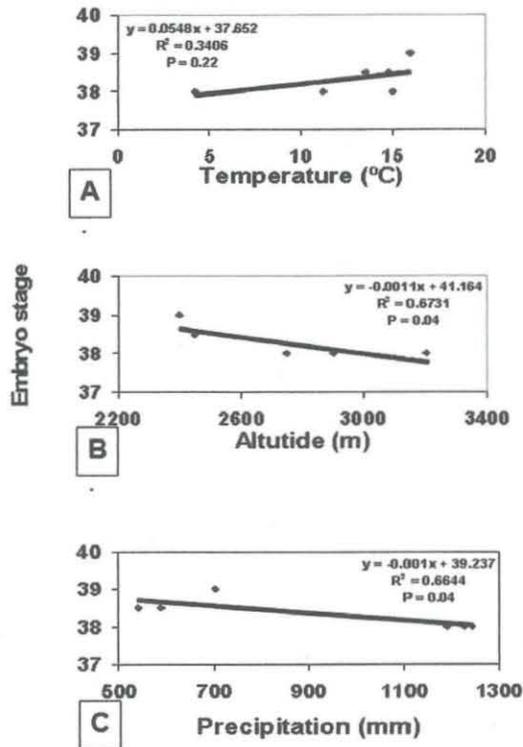


Figure 2. Correlations between maximum embryonic stage at oviposition time from the studied populations and environmental factors (temperature, altitude and precipitation).

1 500 m (Guillette et al., 1980). Several physiological or morphological modifications have been considered as intermediate steps toward viviparity (Blackburn, 2006). For example, some of the traits that are considered intermediate steps toward viviparity are diminished egg shell thickness, prolonged presence of the corpus luteum, increased uterine vascularization, ER and IED (Guillette, 1993; Shine, 2004, and Blackburn, 2006). A recent study has shown that populations of the oviparous lizard *S. spinosus* from low elevations oviposit at relatively early embryonic stages (Chamela, population: 31-32.5), whereas populations from high elevations oviposit at more advanced stages (30-35). Also, when clades containing species capable of prolonged egg retention and reinvade low elevations, they conserve the maximum stages reached by their high-elevation ancestors. Also, high levels of intrapopulation variation were observed in the maximum stage of oviposition (Calderón-Epinosa et al., 2006).

In *S. scalaris*, evidence has shown that populations from high elevations retain intrauterine embryos to more advanced stages than those from low elevations (33-38 vs 31-33.5, respectively (Mathies and Andrews, 1995). The same phenomenon occurs in *Lerista bouganvillii*, where altitude is correlated with maximum stage of embryonic development (Qualls, 1997), and high-elevation populations are viviparous. These studies support the idea that high altitudes promote intermediate stages toward viviparity (Blackburn, 1995). Contrasting with the previous evidence, *S. aeneus* does not show the same pattern, as the low-elevation populations retain the eggs in the oviduct to more advanced stages than high elevation populations. The 3 populations with most advanced stages of development were Española (2 450 m) and Autódromo (2 450 m), (embryo stage: 38.5/40), whereas lizards from Milpa Alta (2 400 m) retained embryos until stage 39/40. These populations also present low precipitation values (Española: 589 mm, Autódromo: 543 mm and Milpa Alta: 705 mm). On the other hand, in the high-elevation mesic populations such as Nevado de Toluca (with 3 200 m altitude and 1 243 mm precipitation) and Ajustco (2 900 m altitude and 1 226 mm precipitation) the maximum stage was 38, whereas lizards from Cahuacán (2 750 m elevation and 1 192 mm precipitation) retain eggs until stage 37/40. In contrast, evidence from *S. spinosus* and *S. scalaris* supports the cold climate hypothesis. In *S. spinosus*, low-elevation populations oviposit at relatively early stages of development (31-32.5), whereas high elevation populations oviposit at relatively advanced stages (30-35). After high elevation populations reinvade low-elevation environments, they maintain the same capacity to retain eggs to advanced stages as high-elevation populations (Calderón-Espinosa et al., 2006). On the other hand, according to Mathies and Andrews (1995), *S. scalaris* showed that altitude determines the maximum stage of embryonic development attained in utero, as high altitude populations oviposit embryos at more advanced stages of development than those from a lower altitude (35.5-37 vs 31.0-33.5, respectively). Nevertheless, in *S. aeneus*, the populations that inhabit low elevations are associated with low precipitation and also oviposit at advanced stages of embryonic development. Populations from high elevations laid eggs at earlier stages of embryonic development, contrary to the cold climate hypothesis. Even though no significant differences in maximum stages of embryonic development were found among the studied populations, more experiments should be conducted to determine which factors promote maximum stages of ER.

In oviparous species, retaining the egg demands 2 fundamental things from the mother: oxygen and water (Andrews, 1997). In *S. scalaris*, the oxygen required for

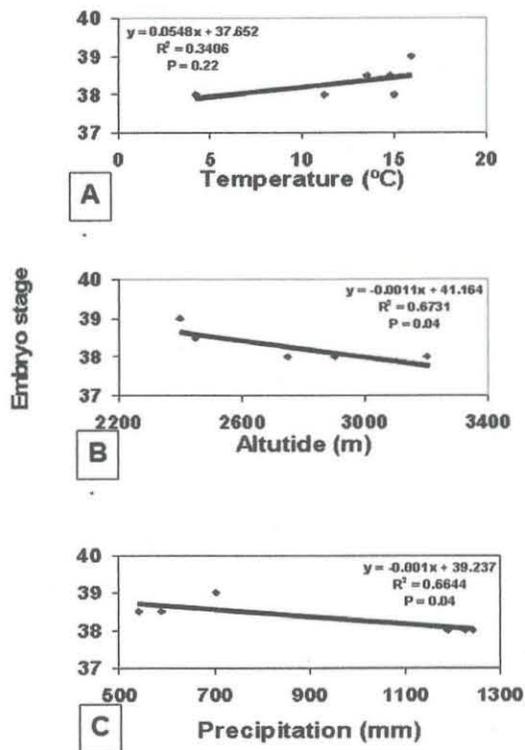


Figure 2. Correlations between maximum embryonic stage at oviposition time from the studied populations and environmental factors (temperature, altitude and precipitation).

1 500 m (Guillette et al., 1980). Several physiological or morphological modifications have been considered as intermediate steps toward viviparity (Blackburn, 2006). For example, some of the traits that are considered intermediate steps toward viviparity are diminished egg shell thickness, prolonged presence of the corpus luteum, increased uterine vascularization, ER and IED (Guillette, 1993; Shine, 2004, and Blackburn, 2006). A recent study has shown that populations of the oviparous lizard *S. spinosus* from low elevations oviposit at relatively early embryonic stages (Chamela, population: 31-32.5), whereas populations from high elevations oviposit at more advanced stages (30-35). Also, when clades containing species capable of prolonged egg retention and reinvade low elevations, they conserve the maximum stages reached by their high-elevation ancestors. Also, high levels of intrapopulation variation were observed in the maximum stage of oviposition (Calderón-Epinosa et al., 2006).

In *S. scalaris*, evidence has shown that populations from high elevations retain intrauterine embryos to more advanced stages than those from low elevations (33-38 vs 31-33.5, respectively (Mathies and Andrews, 1995). The same phenomenon occurs in *Lerista bouganvillii*, where altitude is correlated with maximum stage of embryonic development (Qualls, 1997), and high-elevation populations are viviparous. These studies support the idea that high altitudes promote intermediate stages toward viviparity (Blackburn, 1995). Contrasting with the previous evidence, *S. aeneus* does not show the same pattern, as the low-elevation populations retain the eggs in the oviduct to more advanced stages than high elevation populations. The 3 populations with most advanced stages of development were Española (2 450 m) and Autódromo (2 450 m), (embryo stage: 38.5/40), whereas lizards from Milpa Alta (2 400 m) retained embryos until stage 39/40. These populations also present low precipitation values (Española: 589 mm, Autódromo: 543 mm and Milpa Alta: 705 mm). On the other hand, in the high-elevation mesic populations such as Nevado de Toluca (with 3 200 m altitude and 1 243 mm precipitation) and Ajusco (2 900 m altitude and 1 226 mm precipitation) the maximum stage was 38, whereas lizards from Cahuacán (2 750 m elevation and 1 192 mm precipitation) retain eggs until stage 37/40. In contrast, evidence from *S. spinosus* and *S. scalaris* supports the cold climate hypothesis. In *S. spinosus*, low-elevation populations oviposit at relatively early stages of development (31-32.5), whereas high elevation populations oviposit at relatively advanced stages (30-35). After high elevation populations reinvade low-elevation environments, they maintain the same capacity to retain eggs to advanced stages as high-elevation populations (Calderón-Espinosa et al., 2006). On the other hand, according to Mathies and Andrews (1995), *S. scalaris* showed that altitude determines the maximum stage of embryonic development attained in utero, as high altitude populations oviposit embryos at more advanced stages of development than those from a lower altitude (35.5-37 vs 31.0-33.5, respectively). Nevertheless, in *S. aeneus*, the populations that inhabit low elevations are associated with low precipitation and also oviposit at advanced stages of embryonic development. Populations from high elevations laid eggs at earlier stages of embryonic development, contrary to the cold climate hypothesis. Even though no significant differences in maximum stages of embryonic development were found among the studied populations, more experiments should be conducted to determine which factors promote maximum stages of ER.

In oviparous species, retaining the egg demands 2 fundamental things from the mother: oxygen and water (Andrews, 1997). In *S. scalaris*, the oxygen required for

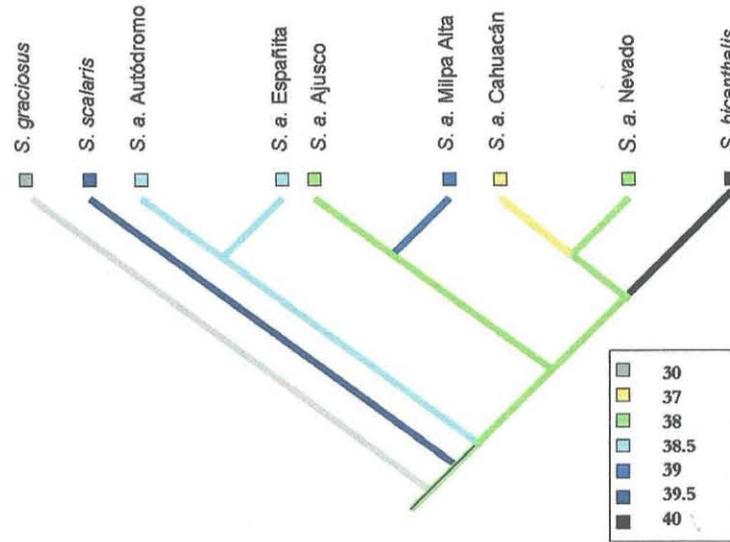


Figure 3. Reconstruction of ancestral stages (maximum parsimony) considering maximum stage of embryonic development at oviposition (see text for explanation).

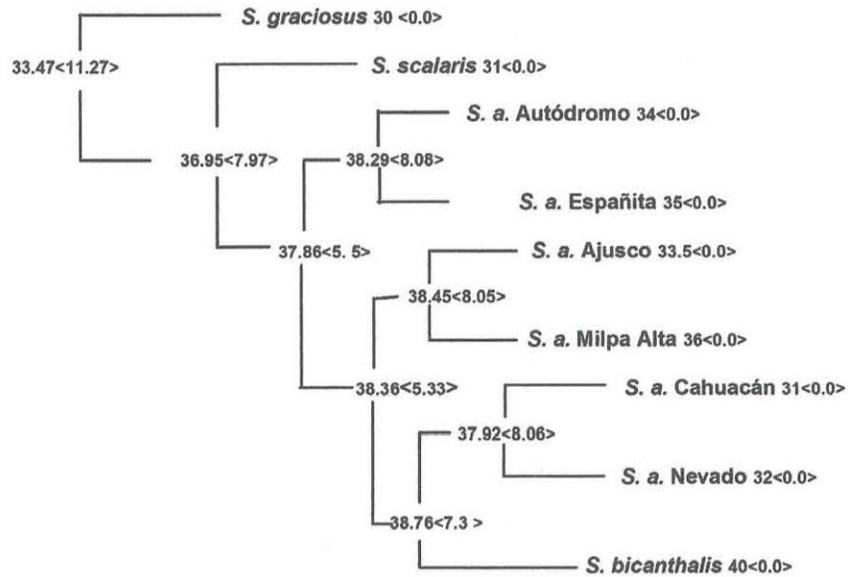


Figure 4. Ancestor state reconstruction (Martin, 2004) for intrauterine egg development stage in *Sceloporus aeneus* (*S. a.*), *S. bicanthalis*, *S. scalaris* and *S. graciosus* (see text for explanation).

the adequate development of the embryo in the oviduct does not seem to be limiting (Parker and Andrews, 2006). Also, the early development of the chorio-alantois may enhance oxygen delivery to the embryo during egg retention (Andrews, 1997). Considering that *S. scalaris* and *S. aeneus* have a close phylogenetic relationship, the same mechanism may facilitate intra-uterine development in *S. aeneus*.

The capability to retain the eggs and develop embryos until stage 39 (stage 40 is total development according to Dufaure and Hubert, 1961) inside the oviduct, in response to hydric stress, is a feature of *S. scalaris* (Mathies and Andrews, 1996). This capability was retained in the derived species *S. aeneus* (Wiens and Reeder, 1997), as observed in the population of Milpa Alta (39), and nearly observed in Española and Autódromo, with stage 38.5. According to our results the stage of retention cannot be explained by a phylogenetic effect (Figs. 3, 4). Even though lower states were present in populations with greater amounts of precipitation and higher elevations, in contrast, in the dry, low elevation environments the females oviposit at more advanced embryo stages compared to moister, high elevation environments. Also, shorter periods of retention seem to be determined by the amount of precipitation during the month of oviposition. Populations with low precipitation values oviposit at more advanced embryo stages: in Autódromo (34), Milpa Alta (33.5) and Española (35) during the month of oviposition (May) precipitation levels were 50.1, 73.2 and 10.2 mm respectively, whereas populations with lower minimum stages were Cahuacán (31), Nevado de Toluca (32) and Ajusco (36), which experience more rainfall (88.7, 111, 116 mm, respectively). Results indicate that higher habitats also receive more precipitation during oviposition months, causing females to exhibit low minimum retention stages, whereas in lower-altitude populations, the females acquire the capability to develop eggs to more advanced stages. In *S. aeneus*, retention capabilities appear different in populations that occur in higher and more mesic areas, even though this is considered a young species (3.2-4.9 mya according to Benabib et al., 1997) in contrast to the older species *S. spinosus* (4.2-6.5 mya), in which low-elevation clades retain the capability to advance embryos that was acquired by high-elevation clades (Calderón-Espinosa et al., 2006). The comparative analysis (Martins, 2004) determines that there are no significant evolutionary changes throughout the phylogeny. This implies also that the elevation seems to have no effect on the evolution of viviparity in the *S. aeneus*-*S. bicanthalis*.

In general, considering that prolonged egg retention is an intermediate step toward the evolution of viviparity, *S. aeneus* appears to be a key species to understand the

environmental factors that promote advanced intrauterine embryo stages. Nevertheless, the present study shows that more advanced embryonic stages were not found in the populations that occur in high-elevation habitats with cold climate, but rather in populations that occur in lower elevations and dryer habitats.

Acknowledgements

To projects PAPIIT-UNAM 213405 and 224208 for financial support; to Elizabeth Bastiaans for the English translation of this text. Lizards were collected under permit SEMARNAT-FAUT 0074.

Literature cited

- Andrews, R. M. 1997. Evolution of viviparity: Variation between 2 sceloporine lizards in the ability to extend egg retention. *Journal of Zoology (London)* 243:579-595.
- Andrews, R. M. 2000. Evolution of viviparity in squamata reptiles (*Sceloporus* spp.) a variation of the cold-climate model. *Journal of Zoology (London)* 250:243-253.
- Andrews, R. M. and T. Mathies. 2000. Natural History of Reptilian Development Constraints on the Evolution of viviparity. *BioScience* 50:227-238.
- Benabib, M., K. M. Kjer and J. W. Sites. 1997. Mitochondrial DNA sequence based phylogeny and the evolution of viviparity in the *Sceloporus scalaris* group (Reptilia, Squamata). *Evolution* 51:1262-1275.
- Blackburn, D. G. 1995. Saltationist and punctuated equilibrium models for the evolution of viviparity and placentation. *Journal of Theoretical Biology* 174:199-216.
- Blackburn, D. G. 2000. Reptilian viviparity: past research, future directions, and appropriate models. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology* 127:391-401.
- Blackburn, D. G. 2006. Squamate reptiles as model organism for the evolution of viviparity. *Herpetological Monographs* 20:131-146.
- Calderón-Espinosa, M. L., R. M. Andrews and F. R. Méndez-de la Cruz. 2006. Evolution of egg retention in the *Sceloporus spinosus* group: exploring the role of physiological, environmental, and phylogenetic factors. *Herpetological Monographs* 20:147-158.
- Dufaure, J. P. and J. Hubert. 1961. Table de developement du lézard vivipare. *Lacerta (Zoóteca) vivipara* Jacquin. *Archives Anatomie Microscopie Morphologie Experimentale* 50:309-328.
- Guillette, L. J., Jr. 1993. The evolution of viviparity in lizards. *BioScience* 43:742-751.
- Guillette, L. J., Jr., R. E. Jones, K. T. Fitzgerald and H. M. Smith. 1980. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. *Herpetologica* 36:201-215.

- Maddison, W. P. and D. R. Maddison. 2009. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.72. <http://mesquiteproject.org>; last access: 16.V.2010.
- Martins, E. P. 2004. COMPARE, version 4.6b. Computer programs for the statistical analysis of comparative data. Distributed by the author at <http://compare.bio.indiana.edu/>. Department of Biology, Indiana University, Bloomington IN.
- Mathies, T. and R. M. Andrews. 1995. Thermal and reproductive biology of high and low elevation populations of the lizard *Sceloporus scalaris*: implications for the evolution of viviparity. *Oecologia* 104:101-111
- Mathies, T. and R. M. Andrews. 1996. Extended Egg Retention and its influence on Embryonic Development and Eggs Water Balance: Implications for the Evolution of Viviparity. *Physiological Zoology* 69:1021-1035.
- Méndez-de la Cruz F. R., M. Villagrán-Santa Cruz and R. M. Andrews. 1998. Evolution of viviparity in the lizard genus *Sceloporus*. *Herpetologica* 54:521-532.
- Meza-Lázaro, R. N. 2008. Filogenia de *Sceloporus aeneus* y *Sceloporus bicanthalis* (Reptilia: Phrynosomatidae). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F. 44 p.
- Qualls, C. P. 1996. Influence of the evolution of viviparity on eggshell morphology in the lizard, *Lerista bougainvillii*. *Journal of Morphology* 228:119-125.
- Qualls, C. P. 1997. The effects of reproductive mode and climate on reproductive success in the Australian lizard, *Lerista bougainvillii*. *Journal of Herpetology* 31:60-65.
- Shine, R. 1983. Reptilian reproductive modes: the oviparity-viviparity continuum. *Herpetologica* 39:1-8.
- Shine, R. 1985a. The evolution of viviparity in reptiles: an ecological analysis. *In* *Biology of the Reptilia*, C. Gans and F. Billett (eds.). Vol. 15. Academic Press, New York. p. 605-694.
- Shine, R. 1985b. The reproductive biology of Australian reptiles: A search for general patterns. *In* *Biology of Australasian Frogs and Reptiles*, G. Grigg, R. Shine and H. Ehmann (eds.). Royal Zoological Society of New South Wales. p. 297-303.
- Shine, R. 2004. Does viviparity evolve in cold climate reptiles because pregnant females maintain stable (not high) body temperatures? *Evolution* 58:1809-1811.
- Shine, R. and L. J. Guilleter. 1988. The evolution of viviparity in Reptiles; a physiological model and its ecological consequences. *Journal of Theoretical Biology* 132:43-50.
- Tinkle, D. W. and J. W. Gibbons. 1977. The distribution and evolution of viviparity in reptiles. *Miscellaneous Publication of Zoology*. University of Michigan 154:1-55.
- Wiens, J. J. and T. W. Reeder. 1997. Phylogeny of the spiny lizards (*Sceloporus*) based on molecular and morphological evidence. *Herpetological Monographs* 11:1-101.

CAPITULO II

Hidratación del huevo y su relación con el desarrollo embrionario de *Sceloporus aeneus* en nidos naturales, en condiciones de alta montaña.

Hidratación del huevo y su relación con el desarrollo embrionario de *Sceloporus aeneus* en nidos naturales, en condiciones de alta montaña.

RESUMEN

Para evaluar el nivel de hidratación de los huevos en nidos naturales y su efecto en el desarrollo embrionario de *Sceloporus aeneus* se cuantificó la tasa de crecimiento del volumen (TCV) y la tasa de crecimiento del peso (TCP). Se hizo el monitoreo de los huevos de una población de esta especie a una altitud de 3,200 m de elevación en el Nevado de Toluca entre los años 1999, 2001 y 2002. Se encontró una relación positiva en el incremento de peso y volumen del huevo. También existió una relación significativa entre el peso y volumen del huevo con el incremento en los estadios de desarrollo de los embriones. El incremento paulatino en volumen y peso del huevo durante la incubación puede evidenciar que el embrión o membranas extraembrionarias regulan la absorción del agua del medio. La temperatura de incubación y cantidad de agua en el sustrato del nido no mostraron una relación significativa con el incremento del volumen y peso del huevo ni con el desarrollo embrionario, pero sin la temperatura ambiental e hidratación del huevo el embrión no podría metabolizar los nutrimentos almacenados, para lograr su desarrollo. La cantidad de huevos en el nido no influyó en la hidratación de los huevos en el mismo.

ABSTRACT

To assess the level of hydration of eggs in natural nests and their effect on the embryonic development of *Sceloporus aeneus* Growth Rate Volume (TCV) and Weight Growth Rate (TCP) was quantified. Monitoring eggs of a population of this species at an altitude of 3,200 m elevation in the Nevado de Toluca in the years 1999, 2001 y 2002. A positive relationship between weight increase and egg volume was found. Also there was a significant relationship between egg weight and volume with increasing stages of embryo development. The gradual increase in volume and weight egg during incubation may reveal the embryo or the extrembryonic membranes regulate water absortion of the medium. The incubation temperature and amount of water in the nest soil did not show significant association with volume increased, weight increased and embryo development, but without environmental temperature and egg hydration the embryo could not metabolize nutrients stored to achieve its development. The amount of eggs in the nest did not influence the hydration of the eggs in it.

INTRODUCCIÓN

Las especies ovíparas de los reptiles están sujetas a diversos factores que influyen en la sobrevivencia del huevo en el nido, la cual es la más vulnerable. Entre los factores que se han descrito están: temperaturas extremas, desecación, exceso de humedad, ataque de hongos y depredación (Packard *et al.*, 1977; Tinkle y Gibbons, 1977; Shine y Bull, 1979; Guillette y Lara 1996; Shine 1983).

En altitudes elevadas la temperatura es una variable limitante muy importante para el desarrollo embrionario de los reptiles ovíparos, así como también lo es el agua en el nido. Se ha observado que el huevo puede incrementar dos o hasta tres veces su peso por el efecto de la hidratación que es importante para los procesos metabólicos del embrión (Andrews y Sexton, 1981; Thompson, 1981; Warner *et al.*, 2011). Sin embargo, al acumularse agua en el huevo también se incrementa la pérdida de agua por transpiración, como posible consecuencia de una reducción o adelgazamiento del cascarón durante la incubación (Andrews y Sexton, 1981) sobre todo al final de este período (Tracy *et al.*, 1978) con consecuencias negativas en la sobrevivencia del embrión en el huevo.

Se ha encontrado que la hidratación del huevo de los escamados es fundamental en la sobrevivencia de las crías (Ji y Braña, 1999); en el desarrollo corporal y actividad de las crías de algunas especies (Finkler, 1999, 2006; Lorenzon *et al.*, 1999; Pandav, *et al.*, 2012) pero en otras especies no tiene influencia en la morfología o fisiología de los organismos (Gutzke y Packard 1987; Packard *et al.*, 1980; Radder y Shine, 2007).

La hidratación del huevo en el nido puede verse afectada negativamente por la cantidad de huevos en el nido, ocasionando por la competencia por el líquido (Marco *et al.*, 2004). La obtención de agua y competencia por el agua, se explica por el efecto físico de diferencia de concentraciones entre el huevo y su entorno, existe un segundo mecanismo para la hidratación y es un proceso activo llevado a cabo por el embrión y/o membranas extraembrionarias durante la incubación; proceso poco atendido en lacertilios por los investigadores (Shine y Thompson 2006).

El ingreso del agua al huevo de los escamados es necesario para el desarrollo de los embriones, pero aún se desconoce cómo se lleva a cabo el proceso de la hidratación del huevo en el nido de la especie *Sceloporus aeneus* que se desarrolla bien a los 3,200 msnm en el Nevado de Toluca. Aunque se conoce aspectos de la reproducción de las hembras de algunas poblaciones de *S. aeneus* (Guillette, 1981; Manríquez, *et al.*, 2013), se desconoce cómo se lleva a cabo la etapa de desarrollo de los huevos en el nido, la etapa más vulnerable en la reproducción. Esto nos lleva a plantear la hipótesis que la humedad en nido, es más importante que la temperatura en el desarrollo del huevo de *Sceloporus aeneus* a elevada altitud.

MÉTODOS

El sitio de estudio se encuentra el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, en los 19° 11' 51" latitud N y 99° 50' 45" longitud W a una elevación de 3,200 m, situado al SSW de la Ciudad de Toluca, Estado de México (INEGI, 1999, DOF, 2013). En esta localidad es donde ocurre la reproducción de *Sceloporus aeneus* a mayor altitud. Prevalece un clima C(fm)w(b')ig semifrío con verano fresco y largo y la temperatura del mes más caliente oscila entre 6.5° y 12° C, la precipitación media anual es de 1560 mm; presentándose el mes más caliente antes del solsticio de verano (INEGI, 1999). Los suelos varían de medianamente profundos, predominando los de colore oscuros como el pardo grisáceo oscuro y texturas francas y migajones arenosos (Colon, 1987).

Sceloporus aeneus anida en montículos de tierra elaborados por tuzas que se encuentran rodeados de pastizal en macoyos de *Festuca sp* y *Mulhenbergia sp* y la asociación de *Pinus montezumae*, *Pinus pseudostrobus* y *Pinus ayacahuite* (Rzedowski, 1981).

Se visitó el área de estudio en la época de lluvias, en los años 1999, 2001 y 2002. Se obtuvieron datos de temperatura y humedad del nido y la condición general de los huevos de *S. aeneus* durante su incubación. En el año de 1999 se localizaron seis nidos ubicados dentro de montículos de tierra hechos por tuzas al construir sus galerías subterráneas (Sánchez-Herrera, 1980; Gillette, 1986), y se hizo un monitoreo a éstos, durante los meses de julio a septiembre. En el año 2001 se localizaron tres nidos y se monitorearon de agosto a

septiembre, mientras que en el año 2002 se localizaron 17 nidos y se llevó a cabo el monitoreo de los huevos cada 14 días. Se hizo un seguimiento del volumen y peso de los huevos, así mismo se registró a los huevos dañados por depredación o no fecundados, se reconocieron porque son de menor tamaño que el resto de los huevos en la camada y a dos días se adhiere la cascara al vitelo dando un aspecto de seco.

En cada nido se hizo un conteo inicial de los huevos, marcándolos con un plumón indeleble pintándoles una raya para volver a depositarlos en la posición original para evitar el desprendimiento del embrión y que éste muriera. Cada huevo se pesó ($\pm 0.1\text{g}$) y se midió el largo y ancho con un calibrador vernier ($\pm 0.1\text{mm}$), después de lo cual se volvió a colocar en el nido. Con las medidas de largo y ancho se estableció el volumen de cada huevo, con la fórmula del volumen para un elipsoide (Shelby, 1965): $V = \frac{4}{3} \pi a^2 \cdot b$ donde a y b son la mitad del ancho y largo del huevo respectivamente. Se midió la temperatura ambiental con un termocople HOBO ($\pm 0.1^\circ \text{C}$) en la profundidad en que se encontraron los huevos (2 a 5 cm de profundidad).

En cada monitoreo se obtuvo una muestra de 100 gr. de suelo de un montículo aledaño similar al nido. Esta se puso en un horno a 200°C por 48 horas para desecarla. Posteriormente se sacó el porcentaje de humedad por la diferencia de peso. Esto para conocer la cantidad porcentual de agua en el nido (Aguilo, *et al.*, 1991).

En cada uno de los muestreos se tomó un huevo al azar de algunos nidos, el cual se midió en su largo y ancho, además se peso y posteriormente fue fijado en formaldehído al 10% para determinar el estadio de desarrollo de cada embrión utilizando los criterios de Dufaure y Hubert (1961) que considera 40 estadios de desarrollo.

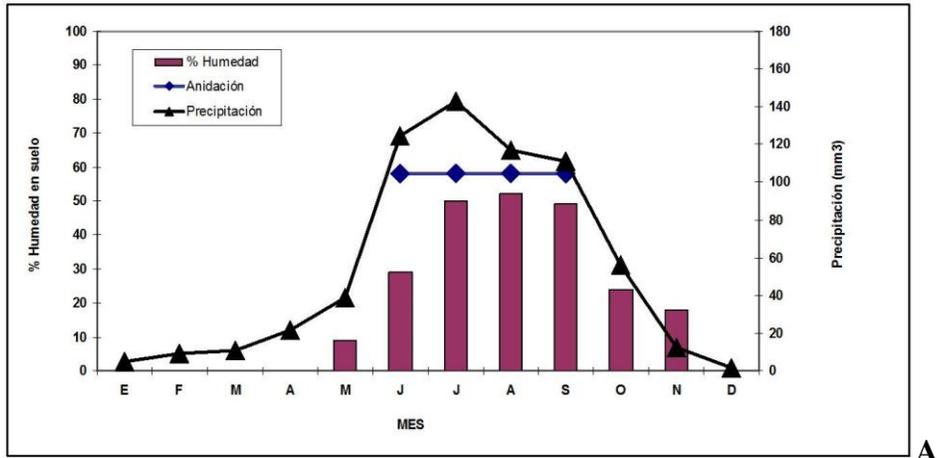
Se calculó la tasa de crecimiento en las dimensiones de volumen y peso de los huevos en el año 2002 ya que fue posible hacer el monitoreo de sus medidas cada 14 días. Debido a que las hembras de la especie anidan de forma desfasada, los huevos se encontraron en diferentes niveles de desarrollo durante el monitoreo. Se decidió que los valores de Volumen 2 y Peso 2 fueran aquellos que se dieron al momento previo a la eclosión y los valores de Volumen 1 y

Peso 1 fueron aquellos que se presentaron a los 48 días previos a la eclosión, esto permitió utilizar un mayor número de datos de huevos para el análisis. La incubación dura alrededor de los 52 días, a un promedio de 16°C (8-29°C intervalo) de incubación (Andrews, *et al.*, 1997). Tasa Crecimiento Volumen (TCV) $TCV = \text{Volumen 2} - \text{Volumen 1} / \text{Días Transcurridos}$ (48 días). Y la Tasa Crecimiento Peso (TCP) $TCP = \text{Peso 2} - \text{Peso 1} / \text{Días Transcurridos}$ (48 días)

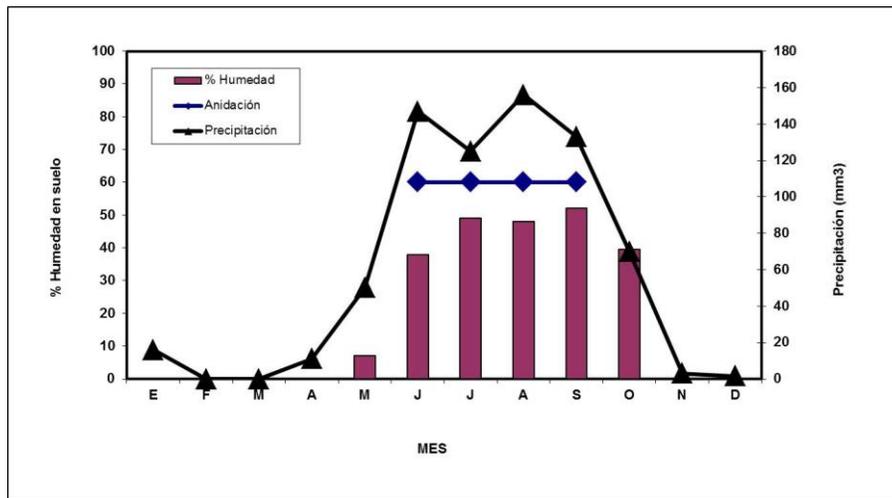
Se utilizó la correlación (r) de Pearson para establecer las relaciones existentes entre el volumen y el peso del huevo y de estos parámetros con el estadio embrionario y número de huevos en el nido, humedad relativa del sustrato y temperatura del nido (Sigma Stat versión 2.0). Se utilizó la prueba Kolmogorov Smirnov para tener la certeza en la distribución normal de los datos. Además se empleó el análisis de varianza para establecer la variación de la humedad en nidos y temperatura ambiental en los diferentes años.

RESULTADOS

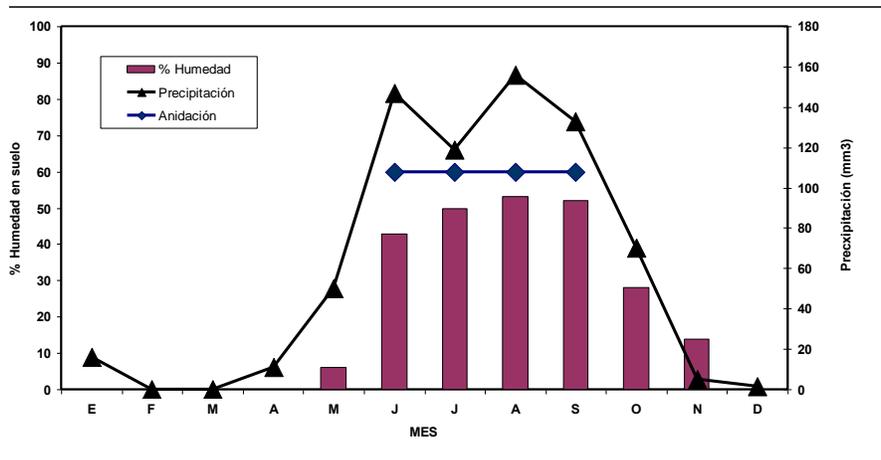
La humedad en el sustrato del nido durante la incubación en el año 1999 fue del orden del 45 ± 10.7 %, en el 2001 presentó un promedio de $46.7 \pm 6\%$; (ver figura 1). En el 2002 la humedad promedio en suelo fue de $49.6 \pm 4.6\%$. Con base en los datos de cantidad de agua es evidente la marcada estacionalidad en la disponibilidad de agua en suelo, hubo un grupo de meses con mayor humedad (junio a septiembre), que corresponde a la época de anidación y otro grupo formado por los meses de mayo, octubre y noviembre con valores bajos de humedad y que abarca la época en que no hay nidos. Por lo tanto hay diferencias significativas en los valores de humedad del nido entre estos dos grupos de meses ($H = 19.675$, $df = 6$, $P = 0.02$).



A



B



C

Figura 1. Niveles del Porcentaje de humedad en el sustrato del nido (barras), niveles de precipitación pluvial (líneas con triangulo) por mes y el periodo de anidación (líneas con rombos). Año 1999 (A) año 2001 (B) y 2002 (C).

El monitoreo en la variación del volumen y peso del huevo en el 2002 evidencia cambios relevantes en sus dimensiones, del orden del 81% en el volumen y de 4 veces en el peso, desde el inicio hasta poco antes de la eclosión de las crías. La TCV y TCP evidencian un incremento paulatino por día del volumen y peso ($X = 9.38 \text{ mm}^3/\text{día}$ y $X = 0.0082 \text{ g/día}$ respectivamente)

Relación del volumen y peso del huevo y de estas variables con el estadio embrionario.

En 1999 existió una relación lineal no significativa entre el volumen y el peso del huevo ($r = 0.98$, $P = 0.14$, $N = 4$; $y = 0.001x + 0.0553$). Mientras, que para el año 2001, no hubo una relación significativa entre estos valores ($r = 0.084$, $P = 0.48$, $N = 8$; $y = 0.0002x + 0.8222$). En 2002 se obtuvo una relación positiva significativa entre estas dos variables ($r = 0.97$, $P = 0.0003$, $N = 33$; $y = 0.0009x + 0.0465$) figura 2.

En la figura 3 se observa la relación positiva y significativa entre el estadio embrionario y peso del huevo durante el año 1999 ($r = 0.95$, $P = 0.043$, $N = 4$; $y = 0.1093x - 3.2465$) y para el año 2001 no existe una relación ($r = 0.17$, $P = 0.6$, $N = 8$; $y = 0.0115x + 0.5779$) Por otro lado, en el 2002 la misma relación fue positiva y significativa ($r = 0.89$, $P = 0.000002$, $N = 33$; $y = 0.0747x - 2.0161$).

En cuanto a la relación estadio embrionario y volumen del huevo en los tres años se encontró relación positiva y significativa ($r = 0.91$, $P = 0.0003$, $N = 4$; $y = 113.65x - 3441.6$, para el año 1999); ($r = 0.93$, $P = 0.0008$, $N = 8$; $y = 80.065x - 2166.1$, año 2001), y ($r = 0.9$, $P = 0.000013$, $N = 33$; $y = 85.3x - 2361$, año 2002) figura 4.

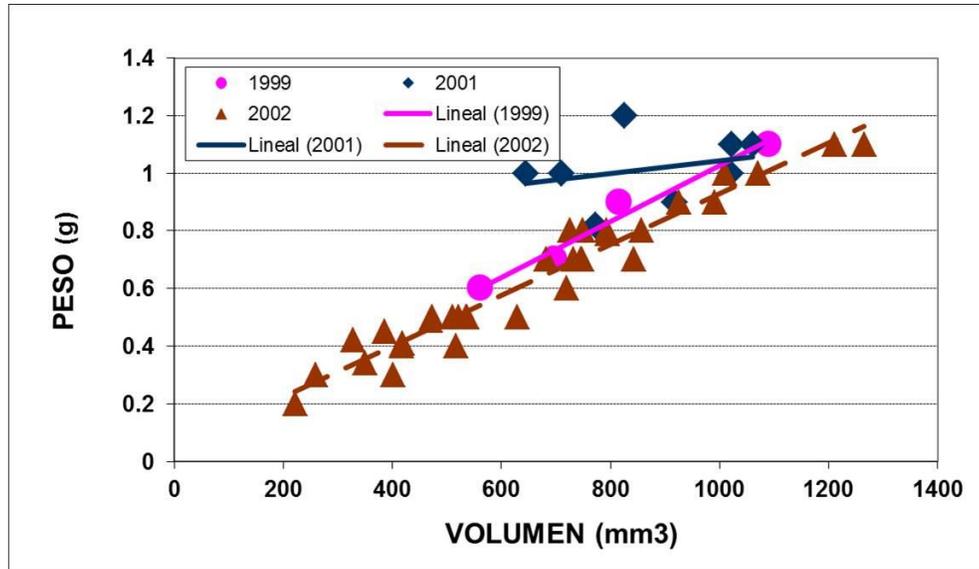


Figura 2. Relación entre volumen y peso del huevo de *S. aeneus* en los años 1999, 2001 y 2002.

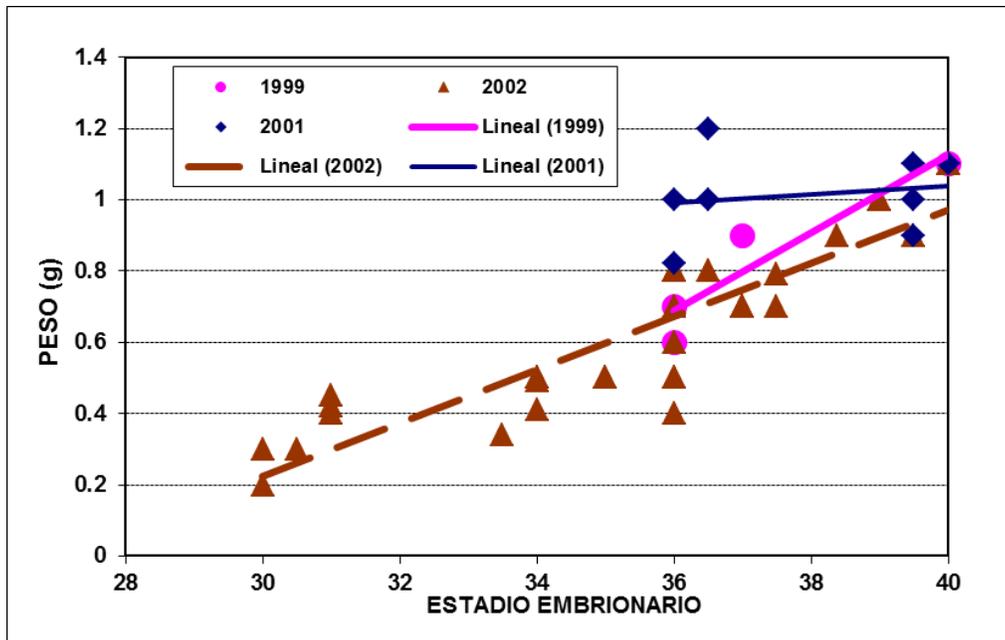


Figura 3. Relación entre el estadio de desarrollo embrionario y peso del huevo de *S. aeneus* durante los años 1999, 2001 y 2002.

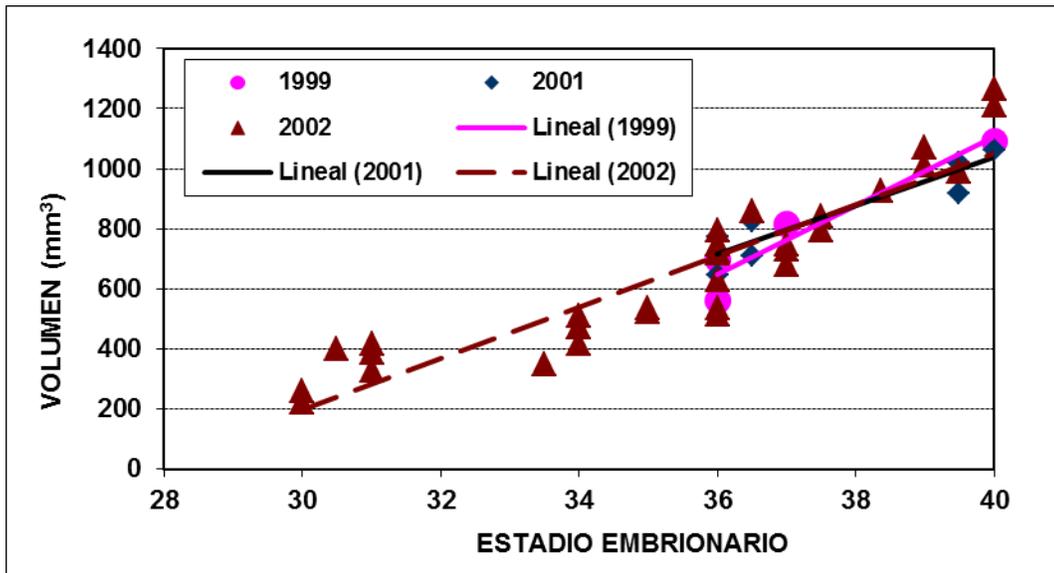


Figura 4. Relación entre el estadio de desarrollo embrionario y el volumen del huevo de *S. aeneus* durante los años 1999, 2001 y 2002.

Tasa de crecimiento en el monitoreo del 2002

Se observó un incremento paulatino en volumen (TCV) y peso (TCP) en los huevos a lo largo de la incubación en los años estudiados. Con los datos del año 2002, cuando se tuvo un mayor tamaño de muestra, se estimó que en los últimos 48 días antes de la eclosión tuvo una TCP promedio de 0.0082 ± 0.004 g/día (intervalo 0.001 a 0.02 g/día), mientras que la TCV fue de 9.38 ± 5.27 (intervalo 3.34 a 24.4 mm³/día). Lo que muestra que incremento en las dimensiones durante el desarrollo embrionario.

La correlación de la TCV y TCP fue lineal y significativa ($r = 0.87$, $P < 0.05$, $N = 31$) (ver figura 5). También fue significativa la correlación entre el TCP y estadio de desarrollo embrionario dentro del huevo ($r = 0.71$, $P = 0.003$, $N = 31$). Igualmente la correlación de la TCV y el desarrollo embrionario ($r = 0.88$, $P < 0.05$, $N = 31$).

El aumento en el volumen del huevo no tuvo relación alguna con la humedad relativa del sustrato de anidación ($r = 0.17$, $P = 0.35$, $N = 31$). Con la temperatura en el sustrato la correlación no fue significativa estadísticamente ($r = 0.10$, $P = 0.58$, $N = 31$). Lo mismo

sucedió entre el volumen del huevo con el número de huevos en el nido ($r = 0.26$, $P = 0.16$, $N = 31$). Mientras que el incremento en el peso del huevo no estuvo correlacionado con la humedad relativa del sustrato ($r = 0.12$, $P = 0.5$, $N = 31$), tampoco con la temperatura del sustrato ($r = 0.13$, $P = 0.46$, $N = 31$), y tampoco se relacionó el peso del huevo con el número de huevos en el nido ($r = 0.35$, $P = 0.4$, $N = 31$).

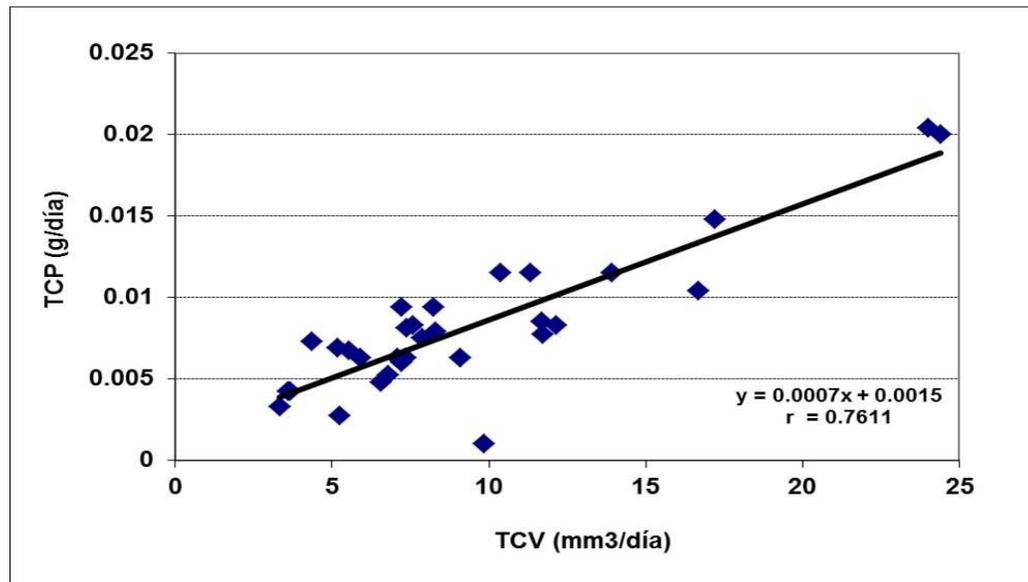


Figura 5. Relación entre la TCV y TCP del huevo de *Sceloporus aeneus* durante el año 2002.

Temperatura del sustrato en el nido

Los valores de temperatura entre 1999, 2001 y 2002 en el nido fueron diferentes significativamente ($H = 4.246$ $df = 2$, $P = 0.039$), de acuerdo al valor medio de temperatura anual el 1999 fue un poco más cálido. La temperatura promedio del sustrato del nido durante la incubación fue de $13.4 \pm 5.17^{\circ}\text{C}$, con una máxima de 22.6°C y una mínima de 7.4°C ; teniendo una diferencia entre las temperaturas de 15.1°C en el día, ver figura 6.

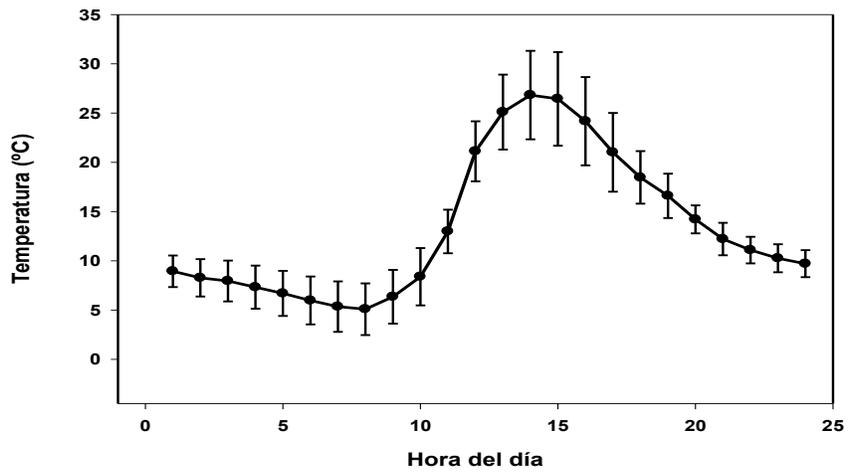


Figura 6. Valores medios de la temperatura por hora en el nido, durante la incubación del huevo de *S. aeneus*. Temperaturas registradas con un termocople HOBO ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$). Los círculos representan el valor medio y la líneas verticales la desviación estándar.

DISCUSIÓN

La cantidad de agua en el sustrato del nido durante la etapa de anidación de *S. aeneus* fue elevada ya que puede alcanzar el 50% del peso total. Situación que debe ser favorecida por el tipo de suelo, que sustenta la hidratación del huevo. Los datos del presente estudio muestran que conforme incrementa el volumen del huevo se incrementa el peso del mismo, y paralelamente se presenta el crecimiento y desarrollo embrionario, provocado por la disponibilidad de agua en el sitio de anidación, esto coincide con lo encontrado en *Podarcis muralis* (Ji y Braña, 1999) y en *Anolis sagrei* (Warner y Chapman, 2010).

Una vez que empieza la precipitación pluvial en el área de estudio el contenido de agua en el sustrato se mantiene en valores similares a lo largo del periodo de incubación que es de junio a septiembre, por ello no se evidencia una correlación significativa entre el incremento del peso y volumen del huevo con la humedad en el sustrato, seguramente por ello la anidación de la especie coincide con el periodo lluvioso (Manríquez, *et al.*, 2013), por lo que el agua, al ser absorbida por el huevo, influye en las dimensiones de éste, de manera que el agua resulta ser fundamental para el desarrollo del embrión (Packard, 1991).

La comparación de la temperatura de incubación entre años mostró diferencias significativas debido a que hay variaciones climáticas de año con año. La temperatura en la que se llevó a cabo la incubación de los huevos de *S. aeneus* fue muy variada en el ciclo diario y con amplias diferencias entre el momento más frío y el más cálido, del orden de entre 15 y 19°C, en este estudio. Se sabe que los huevos de *S. aeneus* pueden incubarse en temperaturas de entre 9 y 29°C, con una media diaria de 5.6°C en una población a menor altitud en el Ajusco, México (Andrews *et al.*, 1997). La cual resulta ser una temperatura baja en la incubación de lacertilios sceloporinos. En el presente estudio los huevos se sometieron a una temperatura mínima por arriba de los 5°C lo cual no resulta ser letal a los embriones en el huevo, pero sí propicia un periodo largo de incubación mayor a 52 días (Andrews *et al.*, 1997).

La temperatura, se mantiene en valores similares durante la incubación por lo que no resultó significativa su correlación con el aumento de peso y volumen del huevo y tampoco con el

desarrollo embrionario, pero es bien sabido que en los reptiles como organismos ectotermos, el metabolismo es dependiente de la temperatura (Muth, 1980; Sexton y Marion, 1974), sin la temperatura adecuada el embrión no podría metabolizar los nutrimentos almacenados y para ello se requiere agua (Ji y Braña, 1999).

La cantidad de huevos en el nido no influyó en la hidratación de cada huevo. Aunque durante el día pueda darse una disminución en la cantidad de agua por la irradiación solar, o se eleve la transpiración del huevo, no se presenta la competencia por agua entre los huevos de *S. aeneus* a diferencia de lo reportado en otros estudios (Marco *et al.*, 2004, Radder y Shine, 2007) e incluso la agregación pueda tener efecto negativo en el suministro de agua y sobrevivencia cuando los huevos adyacentes son infértiles o mueren los embriones (Warner y Chapman, 2010). Regularmente, durante las tardes llueve en el área de estudio, en la época de anidación, por lo tanto se suministra el agua que mantiene húmedo el sustrato y que evita la desecación de los huevos.

La falta de una correlación lineal y significativa entre el peso y el volumen del huevo en el año del 2001 puede deberse a que los datos fueron obtenidos al final del periodo de incubación lo cual no evidenció variaciones entre ambos parámetros. Sin embargo, resultó una correlación directa y significativa entre el peso y volumen del huevo con el estadio embrionario, lo cual demuestra que el avance en el desarrollo embrionario depende del suministro constante de agua.

En el año 2002 al ser posible el seguimiento del desarrollo de las nidadas desde las primeras ovoposiciones hasta la eclosión, se encontró una relación directa entre el incremento de peso y el aumento de volumen paulatino del huevo, esto muestra que existe el ingreso gradual de agua en el huevo. Esto se ve ratificado igualmente por la alta relación entre el peso y el volumen del huevo con el incremento en el estadio de desarrollo de los embriones. Lo que evidencia que la hidratación del huevo no es una acción pasiva, dada por la sola disponibilidad de agua en el sustrato, debe ser un proceso fisiológico por parte del embrión (o membranas extraembrionarias) quien debe estar regulando la hidratación del huevo, como también se ha observado en *Anolis sagrei* (Warner, *et al.*, 2011).

El agua resulta ser un elemento esencial en el desarrollo embrionario dentro del huevo de los reptiles por el anabolismo. Existen evidencias que indican que la hidratación del huevo influye en la sobrevivencia de las crías de *Podarcis muralis* (Ji y Braña, 1999); en la proporción de desarrollo corporal y actividad en las crías (Lorenzon *et al.*, 1999; Pandav, *et al.*, 2012) así como en el tamaño y peso de las crías de algunos quelonios (Janzen *et al.*, 1995; Finkler, 1999, 2006), pero en otras especies no se ha detectado influencia en la morfología o fisiología de los organismos (Gutzke y Packard 1987; Packard *et al.*, 1980; Radder y Shine, 2007). Las hembras seguramente hacen la selección de los sitios de anidación identificando los factores ambientales, en este caso la suficiente disponibilidad de humedad, que pueda favorecer el desarrollo de los embriones para que tengan mejor desempeño futuro de los organismos (Marco *et al.*, 2004; Resetarits, 1996; Socci *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos con *S. aeneus* abren preguntas a resolver a futuro, una de ellas es sobre la forma en que los niveles de agua en nido influyen en la plasticidad fenotípica y sus ventajas en el desempeño de las crías para lograr su sobrevivencia. Las poblaciones de *S. aeneus* de menor altitud con menores niveles de precipitación parece ser que alcanzan mayor tamaño corporal (*Obs. Personal*).

CONCLUSIONES

Durante la incubación existe un incremento paulatino del huevo en una TCP de: $X = 0.0082$ g/día que provoco un incremento total del 400% y una TCV de: $X = 9.38$ mm³/día equivalente a un 81% total. Existió una estrecha relación entre ambos parámetros debido al proceso de hidratación del huevo.

La relación significativa entre el incremento de peso y el volumen del huevo con el avance del desarrollo embrionario muestra la dependencia del embrión por el agua para su desarrollo dentro del huevo y acción activa del embrión o membranas extraembrionarias en los índices de hidratación paulatina.

El número de huevos en el nido no influyó en los niveles de hidratación de los huevos.

La temperatura del nido y cantidad de agua no mostraron una relación significativa con el incremento del volumen y peso del huevo y con el desarrollo embrionario durante la incubación; sin embargo, sin la temperatura adecuada con la suficiente cantidad de agua el embrión no podría metabolizar los nutrimentos para su desarrollo como sucede en todos los reptiles.

Agradecimientos del capítulo. Al Dr. Fausto R. Méndez de la Cruz por su valiosa asesoría y conducción de mis estudios de posgrado, a la Dra. Maricela Villagrán Santa Cruz y el Dr. Héctor Gadsden Esparza integrantes del comité tutorial y a los sinodales: Dr. José Jaime Zuñiga Vega, Dr. Hibraim A. Pérez Mendoza y a la Dra. Norma Manríquez Morán, quienes con sus aportaciones ayudaron al desarrollo del presente estudio. Y al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México que contribuyo en mi formación académica. Al permiso Al permiso SEMARNAT-FAU 0074 para la colecta de organismos.

LITERATURA CITADA

Aguilo, A. M., Aramburu, M. M., Ayusco, C. E., Blanco A., Clatayud, P. L., Ceñal, G. F., Cifuentes, V. P., Escribano, B. R. Francés, A. E., Glaría, G. G., González, A. S., Lacota, M. E., Muñoz, R. C., Ortega, H. A., Otero, P.I., Ramos, F.A. y Sáiz, O. M., 1991. Guía para la elaboración de estudios de medio físico: contenido y metodología. 3a ed. Ministerio de Obras Públicas y Transporte. Madrid. España. 572 páginas.

Andrews, R. M., Qualls, C. P., y Rose, B. R. 1997. Effects of low temperature on embryonic development of *Sceloporus* lizards. *Copeia*. 1997: 827-833.

Andrews, R. M. y Sexton, O. J. 1981. Water relations of the eggs of *Anolis auratus* and *Anolis limifrons*. *Ecology*. 62: 556-562.

Colon, T. L. 1987. Estudio florístico ecológico de los hongos en el Parque Nacional Nevado de Toluca. Tesis de Licenciatura (Biología). UNAM ENEP Iztacala. México.

Diario Oficial de la Federación (DOF). 2013. DECRETO que reforma, deroga y adiciona diversas disposiciones del diverso publicado el 25 de enero de 1936, por el que se declaró Parque Nacional la montaña denominada "Nevado de Toluca" que fue modificado por el diverso publicado el 19 de febrero de 1937. (1 octubre del 2013).

Dufaure, J., P. y Hubert, J. 1961. Table de Développement du Léopard Vivipare: Lacerta (Zootoca) Vivipara Jacquin. *Archives de Anatomie Microscopique Morphologie Expérimentale*. 50: 309-328.

Finkler, M. S. 1999. Influence of water availability during incubation on hatchling size, body composition, desiccation tolerance, and terrestrial locomotor performance in the snapping turtle *Chelydra serpentina*. *Physiology Biochemistry Zoology*. 72: 714-722.

Finkler, M. S. 2006. Does variation in soil water content induce variation in size of hatchling snapping turtles (*Chelydra serpentina*)? *Copeia*. 769-777

Guillette, L.J.Jr. 1981. Reproductive strategies and the evolution of viviparity in two allopatric populations of the mexican lizard *Sceloporus aeneus*. Doctoral Thesis in Physiology. University of Colorado. USA. 120 pp.

Guillette, L.J.Jr. 1986. Notes on ovoposition and nesting in the high elevation lizard, *Sceloporus aeneus*. *Copeia*. 1: 232-233.

Guillette, L.J.Jr. y Lara-Gongora, G. 1996. Notes on ovoposition and nesting in the high elevation lizard, *Sceloporus aeneus*. *Copeia*, 10: 232-233.

Gutzke, W. H. N. y Packard C.G. 1987. Influence of the hydric and thermal environments on eggs and hatching of bull snakes *Pituophis melanoleucus*. *Physiological Zoology* 60: 9-17.

INEGI. 1999. Cuaderno estadístico del Estado de México. Toluca Estado de México.

Janzen, F.J., Ast, J.C. y Paukstis, G.L. 1995. Influence of the hydric environment and clutch on eggs and embryos of two sympatric map turtles. *Functional Ecology*. 9: 913-922.

Ji X. y Braña, F.1999. The influence of termal and hydric enviroments on embryonic use of energy and nutrients, and hatchlig traits, in the wall lizards (*Podarcis muralis*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 124A: 205-213.

Lorenzon P., Clobert, J., Oppliger A. y John-Alder, H. 1999. Effect of water constraint on growth rate, activity and body temperature of yearling common lizard (*Lacerta vivipara*). *Oecologia*. 118: 423-430.

Manríquez-Morán, N., Villagrán-Santa Cruz M. and Méndez de la Cruz F. R. 2013. Reproductive activity in females of the oviparous lizard *Sceloporus aeneus*. *The Southwestern Naturalist* 58: 325–329.

Marco, A., Díaz-Paniagua, C. e Hidalgo Villa, J.2004. Influences of egg agregation and soil moisture on incubation of flexible-shelled lacertid eggs. *Canadian Journal of Zoology* 82:60-65.

Muth, A.1980. Physiological ecology of desert iguana (*Dipsosaurus dorsalis*) eggs: temperature and water relations. *Ecology* 61: 1335-1343.

Packard, M. J., Packard, G. C. y Boardman, T.J. 1980. Water balance of the eggs of a desert lizard *Callisaurus draconoides*. *Canadian Journal of Zoology* 58: 2051-2058.

Packard, G. C. 1991. Physiological and ecological importance of water to embryos of oviparous reptiles. En: *Egg incubation: its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Deeming, D.C. y Ferguson, M.W.K. (eds.) Cambridge University Press. Cambridge, UK. 213-228 pp.

Packard, G. C., Tracy, C.R. y Roth, J.J. 1977. The physiological ecology or reptilian eggs and embryos, and evolution of viviparity within the class Reptilia. *Biological Review*. 52: 71-105.

Pandav, B. N., Saidapur, S. K. y Shanbhag, B. A. 2012. Expression of phenotypic plasticity in hatchling of the lizard *Calotes versicolor* (Squamata:Agamidae) influence of nest moisture. *Phyllomedusa* 11:13-20.

Radder, R. S. y Shine, R. 2007. Why do female lizard lay their eggs in communal nests? *Journal Animal Ecology*. 76: 881-887.

Resetarits, W. J., Jr. 1996. Oviposition site choice and life history evolution. *American Society of Zoology* 36: 205-215.

Rzedowski, J. 1981. *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México. México. 215-235 pp.

- Sánchez-Herrera, O. 1980. Herpetofauna of the Pedregal de San Angel. Bulletin Maryland Herpetological Society. 16: 9-18.
- Sexton, O. J. y Marion, K. R. 1974. Duration of incubation *Sceloporus undulatus* eggs at constant temperature. Physiological Zoology. 207: 227-236.
- Shelby, S. M. 1965. Standard math tables. 14a ed. Chemical Rubber Company, Cleveland USA.
- Shine, R. y Bull, J. J. 1979. The evolution of live-bearing in lizards and snakes. American Naturalist. 113: 905-923.
- Shine, R. 1983. Reptilian viviparity in colds climates: testing the assumption of an evolutionary hypothesis. Oecologia. 57: 397-405.
- Shine, R. y Thompson, M. B. 2006. Did embryonic responses to incubation conditions drive the evolution of reproductive modes in squamate reptiles?. Herpetological Monographs. 20, 2006: 159-171.
- Socci, A. M., Schlaepfer, M. A. y Gavin, T. A. 2005. The importance of soil moisture and leaf cover in a female lizard's (*Norops polylepis*) Evaluation of potential oviposition sites. Herpetologica 61: 233-240.
- Thompson, J. 1981. A study of source of nutrients for embryonic development in a viviparous lizard. *Sphenomorphos quoyii*. Comparative Biochemical Physiology 70A: 509-518.
- Tinkle, D. W. y Gibbons. J. W. 1977. The distribution and evolution of viviparty in reptiles. Miscelaneous Publish Museum of Zoology. Univiversity of Michigan 154:1-55.
- Tracy, C. R., Packard, G. C. y Packard, M. J. 1978. Water relations of chelonian eggs. Physiological Zoology. 51: 378-387.
- Warner, D.A. y Chapman, M.N. 2010. Does solitary incubation enhance egg water uptake and offspring in a lizard that produces single-egg clutches? Journal Experimental Zoology. 315:149-155.
- Warner, D. A., Moody M. A. y Telemeco, R. S. 2011. Is water uptake by reptilian eggs regulated by physiological processes of embryos or a passive hydraulic response to developmental environments? Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 160:421-425.