



**Universidad Nacional  
Autónoma de México  
Facultad de Estudios  
Superiores Zaragoza**



**Límite de especies entre *Rhadinaea marcellae* y  
*Rhadinaea forbesi* (Squamata: Colubridae)**

**Tesis que para obtener el título de Biólogo**

**Presenta:**

**Sánchez García Juan Carlos**

**Director de tesis: M. en C. Uri Omar García Vázquez**

**Ciudad de México**

**agosto, 2018**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que el alumno **SÁNCHEZ GARCÍA JUAN CARLOS**, con número de cuenta **413053602**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **21 de agosto de 2018** a las **17:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dr. ANTONIO ALFREDO BUENO HERNÁNDEZ

**VOCAL** M. en C. URI OMAR GARCÍA VÁZQUEZ

**SECRETARIO** Dr. MANUEL FERIA ORTIZ

**SUPLENTE** Biól. MARÍA MAGDALENA ORDÓÑEZ RESÉNDIZ

**SUPLENTE** M. en C. GENARO MONTAÑO ARIAS

El título de la tesis que presenta es: **Límite de especies entre *Rhadinaea marcellae* y *Rhadinaea forbesi* (Squamata: Colubridae).**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”  
Ciudad de México, a 12 de junio de 2018

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
DIRECTOR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA  
DIRECCIÓN



RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

*“El mundo era tan reciente, que muchas cosas carecían de nombre,  
y para mencionarlas había que señalarlas con el dedo”*

Gabriel García Márquez

*“La única posibilidad de descubrir los límites de lo posible es  
aventurarse un poco más allá de ellos, hacia lo imposible”*

Arthur C. Clarke

*“La mayor aventura es la que nos espera.*

*Hoy y mañana aún no se han dicho.*

*Las posibilidades, los cambios son todos vuestros por hacer.*

*El molde de su vida en sus manos está para romper”*

J.R.R. Tolkien

## **Agradecimientos**

La elaboración de este trabajo fue posible gracias al apoyo otorgado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México a Uri Omar García Vázquez, a través del proyecto PAPIIT-IN 221016.

Agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la educación recibida en cada una de sus aulas, por las amistades que encontré dentro de sus instalaciones y por cada experiencia concedida.

Al Dr. Adrián Nieto Montes de Oca, por proporcionar los ejemplares existentes en el Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, además, por permitirme usar las instalaciones del laboratorio de Herpetología, para llevar a cabo los experimentos necesarios para mi tesis.

Al Biól. Miguel Ángel de la Torre Loranca y al Instituto Lorancai, por su apoyo con los ejemplares colectados y donados. También a Miguel por compartir su experiencia en campo y principalmente por la hospitalidad y amistad recibida de su parte y de su familia durante el trabajo en campo.

A mis sinodales: Dr. Antonio Alfredo Bueno Hernández, M. en C. Genaro Montaña Arias, Dr. Manuel Feria Ortiz, Biól. María Magdalena Ordóñez Reséndiz y M. en C. Uri Omar García Vázquez; por la revisión del trabajo, todas las consideraciones que tuvieron conmigo y las atenciones proporcionadas.

Agradezco de gran manera a Uri Omar García Vázquez, por su infinita paciencia a mi inexperiencia y errores tanto en campo como en el laboratorio; por la confianza recibida, los innumerables consejos personales y críticas profesionales; por compartir su experiencia en Herpetología; y sobre todo por la amistad formada.

A mis compañeros de laboratorio por cada experiencia, por cada broma y risas, por cada salida a campo en las que han ocurrido un sinnúmero de aventuras y anécdotas y por cada momento que hicieron ameno con sus ocurrencias y amistad.

A Toño, Romina y Diego, por compartir mis primeras salidas como herpetólogo, gracias por incluirme en el grupo y enseñarme lo básico en esos momentos en que lo desconocía todo al respecto.

A Mayen, Toño, Alan y Julio por las aventuras en Otontepec, por la guerra de construcciones, las quejas a la masa y por formar parte del nacimiento de la “Rapiña” entre biólogos.

A Gabo por la “infancia compartida”, y la compañía en campo; Gaby por confiarme sus problemas y las risas de las pláticas; Cindy por la confianza en mi persona; Fanny por su reciente amistad y paciencia en campo; A Rafa por sus ocurrencias y preguntas ilimitadas; Andrés por las “promos” compartidas; Uriel por tu positivismo y alegría, además del compromiso en laboratorio; Lesly, Tenorio y demás compañeros, por las aventuras que aguardan.

A mis amigos los “Escudos”: Jaime “El tigre moreliano”, Luis “Grut” y Marco “Rambo”. Gracias por ser mis hermanos durante la carrera, guerreros Zapotitlános les estaré por siempre agradecido

A mi Amigo de toda la vida, Axel “Chat” por estar conmigo en las malas y en las peores, por haberme inspirado a seguir estudiando con tu ingreso a la UNAM a pesar de los años perdidos, por tu inmejorable amistad, serás por siempre mi hermano.

Agradezco a mi tía Rosa por todo el apoyo concedido y la confianza que deposito en mi capacidad, para llevar a cabo mis metas. Te estaré por siempre agradecido.

A mi hermano “Parrish” por ayudarme a la instalación de software y a entender la parte informática y la forma de trabajar con comandos y por la compañía durante los desvelos de trabajo.

A Marcela por los años que compartimos, por la dedicación y compromiso, por los momentos maravillosos a tu lado, gracias negrita, sin ti no lo hubiera logrado.

Finalmente agradezco infinitamente a mis padres Juan Sánchez Gerardo y Araceli García Fuentes, sin ellos nada de esto sería posible, gracias por ser un ejemplo de fortaleza, dedicación y esfuerzo. Jamás me alcanzara para pagarles por toda una vida de sacrificios.

## Índice

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Introducción</b>	<b>2</b>
<b>Grupo de estudio</b>	<b>9</b>
<b>Antecedentes</b>	<b>11</b>
<b>Justificación</b>	<b>13</b>
<b>Objetivo general</b>	<b>14</b>
<b>Objetivos particulares</b>	<b>14</b>
<b>Hipótesis</b>	<b>15</b>
<b>Métodos</b>	<b>16</b>
<b>Resultados</b>	<b>25</b>
<b>Discusión de resultados</b>	<b>49</b>
<b>Consideraciones taxonómicas</b>	<b>57</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>61</b>
<b>Literatura citada</b>	<b>62</b>
<b>Apéndice I</b>	<b>74</b>
<b>Apéndice II</b>	<b>76</b>



## Resumen

Se investigaron las relaciones filogenéticas entre el complejo de *Rhadinaea marcellae* y *R. forbesi*, y las demás especies del grupo *decorata* del género *Rhadinaea*, por medio de análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Para evaluar los límites de especies dentro del complejo se utilizaron cuatro criterios, uno basado en ADN mitocondrial y la geografía (WP), dos modelos coalescentes de descubrimiento (GMYC y PTP) y uno de validación (BFD), además de un análisis estadístico a partir de caracteres morfométricos, merísticos y cualitativos.

Se encontró que el grupo *decorata* es polifilético con respecto a los grupos *flavilata* y *taeniata*, y se encuentra conformado por tres clados bien soportados, uno de las cuales agrupa a los haplotipos de la serie *marcellae-forbesi* junto a *R. cuneata* y *R. macdougalli*. Por su parte los análisis de límites de especies sugieren la existencia de tres especies dentro del complejo: *Rhadinaea marcellae*, que se caracteriza por tener una línea clara postocular que llega hasta detrás de las escamas supralabiales, y se une a ambos lados por un collar nugal que puede ser completo o incompleto; *Rhadinaea forbesi*, que se caracteriza por tener una línea clara postocular inclinada, que desaparece detrás de la última escama supralabial y *Rhadinaea* sp., que se caracteriza por tener una línea postocular clara inclinada que corre desde la parte posterior del ojo hasta por detrás de la boca, sube y sigue continua hacia la línea lateral.

## **Introducción**

La sistemática es la ciencia que se encarga de describir y ordenar la diversidad biológica, así como de elaborar sistemas de referencia y clasificación de los seres vivos, que nos permitan conocer las características de una especie con tan solo ubicarla dentro de ciertos grupos o taxones, los cuales deben reflejar relaciones genealógicas, motivo por el que se busca que estas agrupaciones sean monofiléticas (Morrone, 2000). En sistemática existen varias escuelas, dentro de las que destacan tres en particular: la primera es la Evolucionista, que tiene como unidad de estudio los grados evolutivos, que son grupos reconocidos por un conjunto de caracteres adaptativos, se basa en las relaciones genealógicas expresadas en filogramas que permiten observar la evolución de los taxones, así como el tiempo en el que éstos aparecieron (Mayr y Ashlock, 1991). La segunda es la Fenética, cuyo principio es que se pueden agrupar a los taxones mediante el parentesco filogenético y evolutivo reflejado en las similitudes morfológicas cuantificables, para ello se utilizan los coeficientes y la similitud global del mayor número de caracteres que sea posible medir para después elaborar un fenograma (Ridley, 1985). Por último, la Cladista o Filogenética, que se basa en las relaciones genealógicas para formar clados o grupos monofiléticos dentro de un cladograma, esta escuela se ha convertido en el método más utilizado para realizar estudios filogenéticos en la actualidad, su uso se ve favorecido por el desarrollo de software que aumenta su eficacia (Ruano y Tinaut, 2002; Goyenechea, 2007).

### **Concepto de especie.**

Existen muchos conceptos de especie que varían en cuanto al argumento o criterios que utilizan, por ejemplo, el concepto biológico que dice que las especies deben ser entidades naturales caracterizadas por su mutuo aislamiento reproductivo (Sáez, 2009) o el filogenético que define a una especie como un grupo irreducible de organismos con características

diagnósticas diferentes a las de otros grupos similares y que, además exhibe un patrón de ancestría y descendencia (Cracraft, 1983). El problema con el primero es que no considera a los casos de hibridaciones ni a las especies asexuales o aquellas con distribuciones alopátricas, en cambio el segundo se aplica a la demarcación de especies como taxones y depende totalmente del estado monofilético de estos grupos, evidencia que no siempre está disponible, además de que la categorización depende del método de análisis empleado, otro caso es el concepto evolutivo en el cual se toma en cuenta el tiempo, ya que cada especie tiene un origen, una existencia y un fin (Ruano y Tinaut, 2002). El concepto de especie tiene varias facetas y la elección de uno u otro dependerá del enfoque que el investigador le dé a su trabajo; por otro lado, cada concepto tiene una aportación valiosa y es posible tomarlos como base para formar un concepto unificado de especie (De Quieroz, 2007; Sáez, 2009).

### **Estudios morfológicos**

Tradicionalmente se usaron caracteres morfológicos para hacer estudios sistemáticos, éstos se realizaban con base en características fenotípicas como patrones de coloración, escutelación, estructura de los esqueletos y algunos casos la dentición. Específicamente al intentar resolver relaciones entre serpientes, muchos de los estudios basados en morfología, han demostrado ser congruentes con clados obtenidos a partir de información molecular (Rieppel, 1988; Kluge, 1991; Cundall et al., 1993; Tchernov et al., 2000; Lee & Scanlon, 2002). Sin embargo, en algunos casos al tomar solo el fenotipo para resolver relaciones genealógicas se tienen dificultades, ejemplo de ello son las especies crípticas que son imposibles de reconocer mediante la morfología (Puerto et al., 2001; Hoyos et al., 2003; Lee et al., 2007).

## **Técnicas moleculares en análisis filogenéticos**

Las técnicas moleculares representaron una revolución en la forma de realizar estudios de relaciones entre taxones, y han promovido un aumento exponencial de la identificación de las especies crípticas (Sáez, 2009). El obtener la información genética de un organismo a partir de una pequeña cantidad de tejido, ha contribuido a que la técnica de amplificación de DNA a través de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) sea la más utilizada en sistemática molecular (Baker et al., 1998; Carranza, 2002; Grechko, 2013). Además, el uso de marcadores mitocondriales se ha extendido en los últimos años, debido a que presentan algunas ventajas sobre los marcadores nucleares, ya que las mitocondrias son fáciles de aislar y se encuentran en gran cantidad en cada célula, su herencia es uniparental por lo que no existe recombinación, su genoma rara vez cuenta con intrones, pseudogenes o segmentos repetitivos, y la tasa de evolución nucleotídica es más alta que en los genes nucleares, estas características hacen que los genes mitocondriales sean la mejor opción para estudios a bajo nivel taxonómico (Carranza, 2002).

Específicamente, la filogenética molecular infiere la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio con base a su DNA, ya sea de origen nuclear o mitocondrial, para ello los avances teóricos y metodológicos en la construcción de cladograma han tenido un gran impacto al momento de inferir relaciones filogenéticas, principalmente utilizando tres tipos de análisis: los de máxima parsimonia (MP) que buscan el árbol más corto o con el menor número de pasos, los de máxima verosimilitud (MV) que encuentran el resultado general más óptimo, y los de inferencia bayesiana (IB) que permiten la cuantificación directa de las medidas estadísticas para cada parámetro (Leache y Reeder, 2002; De Luna, 2011).

## **Límite de especies.**

La tarea de delimitar especies es necesaria para mejorar la precisión en nuestra evaluación de la biodiversidad (Puerto et al., 2001), para ello se requiere de la evidencia de propiedades únicas que demuestren la monofilia de una población o de poblaciones con distribuciones alopátricas o parapátricas (Sites y Marshall, 2003; Sáez, 2009). Si bien, los datos moleculares brindan una fuente de información confiable, no pueden resolver por sí solos la asignación de especies, una hipótesis bien soportada debe tener información de múltiples evidencias para asegurar una buena delimitación de especies y entre más tiempo haya pasado desde la divergencia de una población, mayor será el número de evidencias que se puedan tomar para este propósito (De Quieroz, 2007). Los datos fenotípicos presentan un menor número de homoplasias que los datos genéticos y la existencia de múltiples haplotipos no es un criterio suficiente para resolver la asignación de especies por sí solos, por ello los caracteres morfológicos pueden ser utilizados como complemento de los métodos filogenéticos, al incluir ambos datos en un análisis para delimitar especies se puede aumentar en gran medida el soporte y credibilidad del mismo (Baker et al., 1998; Lee et al., 2007; Grechko, 2013).

### ***Criterios para delimitar especies***

En cuanto al uso de caracteres morfológicos, los análisis de componentes principales (ACP) y análisis de funciones discriminantes (AFD), pueden ser utilizados como base para separar linajes, éstos permiten separar los caracteres morfológicos de mayor peso o que mayor información aportan para reconocer patrones de agrupación de datos (Puerto et al., 2001; Hoyos et al., 2003). La existencia de congruencia entre estas agrupaciones con los clados de un análisis filogenético y/o la distribución geográfica son fuerte evidencia para delimitar especies (Lee et al., 2007; Grechko, 2013).

Por otra parte, existen muchos criterios para delimitar especies con base en datos moleculares, éstos pueden utilizar un solo locus o funcionar con datos multiloci, o requerir o no de un árbol ultramétrico, de modo que la elección del método adecuado para un estudio está en función del tipo de datos de entrada que se tengan y el enfoque que se quiera dar al trabajo, aunque se debe tener en cuenta que los límites encontrados por estos métodos son sólo aproximaciones, por lo tanto, es prudente integrar datos adicionales tales como caracteres morfológicos, ecológicos y/o geográficos (Ence y Carstens, 2011).

En particular, la monofila recíproca es el criterio básico para separar linajes que utiliza la filogenética en conjuntos de poblaciones alopátrica o parapatricamente distribuidas, implica que todos los miembros de una población comparten un antepasado común más reciente entre sí que con cualquier otro individuo fuera de la población. Las divisiones de alelos de la población producen relaciones polifiléticas que progresan lentamente a lo largo del tiempo hacia relaciones parafiléticas y luego a relaciones monofiléticas después de que ha tenido lugar la extinción de haplotipos complementarios ancestrales de un locus, es entonces que una especie puede ser reconocida con respecto a otra, este es un criterio conservador ya que sobrepone a la monofila de especies nominales antes que a la diversificación (Crandall et al., 2000; Kiziriana y Donnelly, 2004; De Quieroz, 2007).

El método propuesto por Wiens y Penkrot (2002) se basa en un árbol de ADN mitocondrial y en la procedencia geográfica de los ejemplares, este enfoque considera a una especie de interés también llamada “especie focal”, la cual representará una sola especie si en una filogenia con haplotipos no recombinantes aparece en un grupo monofilético y exclusivo con respecto a especies cercanamente emparentadas, o también si a pesar de aparecer en un grupo parafilético existe congruencia geográfica para sustentar que existe flujo génico entre los nodos basales. La

presencia de múltiples especies dentro de la especie focal estará dada por la ausencia de flujo génico entre sus ramas basales, lo cual es comprobado por nodos bien soportados y concordantes con la distribución geográfica de los haplotipos (Sites Jr y Marshall, 2003). Su aplicación es siguiendo una clave dicotómica, en la cual se toman las decisiones a nivel de especie (Wiens y Penkrot, 2002).

#### *Criterios basados en la teoría de la coalescencia.*

La teoría de la coalescencia (Kingman, 1982) se basa en el tiempo unitario para describir las relaciones entre antepasados y descendientes en una población, integra las funciones de espacio y tiempo para inferir la genealogía de las poblaciones y proporciona un marco conceptual muy sólido para identificar objetivamente las especies crípticas y alopátricas; ésta nos indica que la historia genética de dos alelos puede ser trazada hacia atrás en el tiempo hasta el momento que convergen (evento de coalescencia) en el ancestro común más próximo (MRCA), a su vez puede seguirse un par más de loci mucho más atrás en el tiempo, hasta otro evento de coalescencia; siguiendo este método se puede completar la historia genética de todo un conjunto de alelos y llegar a la especie ancestral en común (Zúñiga et al., 2009). Con base a esta teoría se han implementado numerosos métodos para delimitar especies como el General Mixed Yule Coalescent (GMYC, Pons et al., 2006) y el Poisson Tree Processes (PTP, Zhang et al., 2013) que tienen como propósito el descubrimiento de especies; otros, son óptimos para establecer el límite dentro de especies putativas, tal es el caso del Bayes Factor Delimitation (BFD, Grummer et al., 2014), y finalmente otros computacionalmente más complejos como Bayesian phylogenetics and phylogeography (BPyP, Yang y Rannala, 2010) sirven como métodos de validación una vez que ya se cuenta con una hipótesis de límites de especies previa (Fujita et al., 2012).

GMYC es un método de probabilidad que identifica cambios significativos en las tasas de ramificación de los procesos inter e intra específicos, utilizando el tiempo para identificar los puntos de transición, distinguiendo entre eventos de diversificación y eventos de coalescencia. GMYC supone que todas las ramas que parten de la raíz hasta dichos puntos de transición, son especies diferentes y para ello se basa en un modelo donde la evolución independiente conduce a la formación de grupos distintos, separados por ramas largas entre sí (Fujisawa y Barraclough, 2013; Zhang et al., 2013).

PTP es un método coalescente que considera el número de sustituciones entre cada ramificación y/o eventos de especiación, mediante el modelado de procesos de especiación utilizando el número de sustituciones en lugar del tiempo. Este método es ideal para la delimitación de especies en filogenias moleculares de un solo locus ya que solo necesita como entrada de un árbol filogenético enraizado (Zhang et al., 2013).

La delimitación de especies mediante BFD se realiza designando hipótesis de las especies que se desea comprobar, bajo un marco bayesiano en el programa \*BEAST (Drummond y Rambaut 2007), trabaja obteniendo las verosimilitudes marginales obtenidas de cada hipótesis y la diferencia de sus logaritmos para obtener los Factores de Bayes (FB), estos valores son utilizados después para comparar las hipótesis. Tiene la ventaja de no necesitar un árbol de entrada, ya que construye el árbol y el modelo de especies al mismo tiempo. Funciona estimando la probabilidad del cambio en la frecuencia de los alelos a través de los nodos entre ancestros y descendientes, obteniendo de este modo un árbol con distribuciones posteriores, tiempos de divergencia y tamaños efectivos de población (Grummer et al., 2014).



## **Grupo de estudio.**

La subfamilia Dipsadinae pertenece a la familia Colubridae y está compuesta por 101 géneros (Pyron et al., 2013), dentro de los que se encuentra el género *Rhadinaea* (Cope, 1863) conformado por 20 especies distribuidas dentro de cinco grupos: *calligaster*, *decorata*, *flavilata*, *taeniata* y *vermiculatriceps*. El grupo *decorata* es el más diverso y el mejor representado en México con 11 especies: *R. bogertorum* (Myers, 1974), *R. cuneata* (Myers, 1974), *R. decorata* (Günther, 1858), *R. forbesi* (Smith, 1942), *R. gaigeae* (Bailey, 1937), *R. hesperia* (Bailey, 1937), *R. macdougalli* (Smith & Langebartel, 1949), *R. marcellae* (Taylor, 1949), *R. montana* (Smith, 1944), *R. myersi* (Rossman, 1965) y *R. quinquelineata* (Cope, 1886). Todas distribuidas exclusivamente en el país, a excepción de *R. decorata* cuya distribución se extiende hasta Colombia y Noroeste de Ecuador (Myers, 1974, 2011; Wallach et al., 2014).

*Rhadinaea marcellae* (Fig.1) es una especie endémica de México conocida hasta hace poco tiempo de solo tres localidades, en los estados de San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla; habita principalmente en bosque mesófilo de montaña, en altitudes que van de 600 a 1500 m (Myers, 1974; Hernández-García y Mendoza-Quijano, 1994; Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997; Canseco-Márquez et al., 2000). Se distingue de otras especies del grupo por tener las siguientes características: (1) una línea blanca marcadamente inclinada, que corre desde el borde posterodorsal del ojo hasta por detrás del margen posterior de la boca, (2) una línea blanca con bordes negros que cruza la nuca de lado a lado, formando un collar que se conecta con las líneas blancas a cada lado del cuello, (3) una línea oscura vertebral, formada por dos líneas delgadas que corren por entre el borde de las escamas vertebrales y el borde dorsal de las paravertebrales, formando “pequeños rombos” con el centro claro, (4) vermiculaciones claras en la parte superior

de la cabeza, y (5) hemipenes con cerca de 50 espinas (Taylor, 1949; Myers, 1974; Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997).



*Figura 1.* Ejemplar de *Rhadinaea marcellae*, recolectado recientemente en la Sierra de Otontepec, Veracruz (foto: Uri García).

*Rhadinaea forbesi* (Fig.2) se conoce de los alrededores de Xalapa, Orizaba y Petlacala en el estado de Veracruz, habita en bosque mesófilo de montaña y bosque de pino-encino en altitudes que van de los 1700 a los 2100 m. *R. forbesi* se diferencia de las demás especies del grupo *decorata* por presentar las siguientes características: (1) una línea blanca postocular inclinada desde el contorno del ojo hasta por detrás de la abertura de la boca, (2) una línea oscura en la cuarta fila dorsal de escamas de alrededor de una escama de ancho, (3) una línea oscura continua ubicada en la fila media de las escamas vertebrales, (4) ausencia de un collar nual, (5) ausencia

de vermiculaciones en la parte superior de la cabeza y (6) hemipenes con alrededor de 25 espinas (Smith, 1942; Myers, 1974; Torre-Loranca y Lopez-luna, 2002).



Figura 2. Ejemplar de *Rhadinaea forbesi* de Acajete, Veracruz (foto: Esaú Valdenegro).

### **Antecedentes**

Smith (1942) describe a *R. forbesi* con base en tres ejemplares de una localidad cercana a Xalapa, Veracruz, la distingue de las demás especies conocidas por la línea clara postocular inclinada, el patrón de coloración y el bajo número de escamas ventrales.

Taylor (1949) describe a *R. marcellae* con base en un ejemplar de Xilitla, San Luis Potosí y la distingue de todas las demás especies del grupo principalmente por el patrón único de la cabeza que forman las líneas claras de cada lado del rostro y el collar nugal.

Myers (1974) analiza la sistemática del género *Rhadinaea* a partir de caracteres

morfológicos, principalmente con base en patrones de coloración y estructura de los hemipenes, asigna a *R. marcellae* al grupo *decorata*. Además, la describe como un intermedio entre *R. macdougalli* y *R. myersi* pero con un menor número de escamas ventrales, mencionando que en este aspecto, se parece mucho más a *R. forbesi*. Hasta esa fecha, solo se conocía del holotipo.

Hernández-García y Mendoza-Quijano (1994) reportan el segundo espécimen conocido de *R. marcellae*, recolectado en el municipio de Tlanchinol, Hidalgo, extendiendo su distribución 60 km al sureste de la localidad tipo. El ejemplar concuerda en su mayoría con la descripción del holotipo, excepto que presenta un collar incompleto y un mayor número de escamas ventrales (137 vs 128).

Nieto-Montes de Oca y Mendelson (1997) documentaron siete crías de *R. marcellae* de Tlanchinol, Hidalgo, y describen la variación que se observa en el collar y la línea lateral, de los 10 ejemplares conocidos hasta entonces de *R. marcellae*, ya que el collar en algunos ejemplares es completo como en el holotipo e incompleto en otros, mientras que la línea lateral varía en cuanto a su posición y anchura. Adicionalmente, reportan un ejemplar encontrado cerca de Tepango, Puebla, el cual difiere de las características del resto de ejemplares de *R. marcellae*, ya que tan solo cuenta con un vestigio del collar nugal y presenta una cola más larga que cualquier otro miembro del grupo *decorata*, pero con tan solo 71 escamas subcaudales; también presenta algunas similitudes morfológicas con *R. forbesi*, otro miembro del grupo *decorata*, como la ausencia del collar nugal y la línea lateral, la cual es del mismo tamaño y completamente oscura, a diferencia de *R. marcellae* que tiene zonas claras. De acuerdo a estos autores, las diferencias más marcadas entre *R. marcellae* y *R. forbesi* son las vermiculaciones pálidas en la parte dorsal de la cabeza en *R. marcellae* y el número de espinas de los hemipenes (casi 50 en *R. marcellae* y alrededor de 25 en *R. forbesi*); el individuo de Tepango tiene alrededor de 47 espinas y debido a

esto los autores lo asignan tentativamente a *R. marcellae*, sin descartar, que se trate de una especie nueva.

Canseco-Márquez et al. (2000) confirman la presencia de *R. marcellae* en el estado de Puebla, con base en un ejemplar colectado cerca de Cuetzalan, el cual, a diferencia del ejemplar de Tepango, presenta un collar completo y un patrón de la cabeza consistentes con las características del holotipo.

### **Justificación**

*Rhadinaea marcellae* es una especie conocida de tan solo 11 ejemplares, con una distribución limitada a tres localidades que ocurren a lo largo de la sierra Madre Oriental (SMO), en los estados de San Luis Potosí, Hidalgo y Puebla (Fig. 3). El registro más sureño de *R. marcellae*, se encuentra cerca de Cuetzalan, al norte de Puebla, mientras que la localidad más norteña de *R. forbesi*, especie morfológicamente similar a *R. marcellae*, se encuentra en los alrededores de Tlapacoyan, Veracruz, localidad que colinda con el norte de Puebla y separada por tan solo 40 km de distancia de Cuetzalan; la zona entre estas dos localidades alberga condiciones poco variables, con altitudes que van de 500 m a 1500 m, un clima semicálido húmedo (A)C(fm), con parches de bosque tropical perennifolio, bosque mesófilo de montaña y bosques de encino en las partes más altas (Martínez et al., 2007), motivos por los cuales es probable que estas dos especies tengan en algún punto una distribución simpátrica. Estos patrones geográficos, sumados a la variación que se observa en las principales características diagnósticas de *R. marcellae* y las diferencias morfológicas que presenta el individuo de Tepango (*R. cf. marcellae*), representan un conflicto sistemático que ha quedado pendiente desde hace 20 años en espera de la revisión de más ejemplares (Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997). Recolectas recientes en la SMO y en la llanura costera del golfo han aportado nuevos individuos de *R. marcellae* (García-Vázquez

com. pers.). Con base en los nuevos registros más el material ya conocido, y un análisis integrativo, el presente trabajo pretende esclarecer el número de especies que existen entre los ejemplares que hasta el momento se identifican como *R. marcellae* y *R. forbesi*.

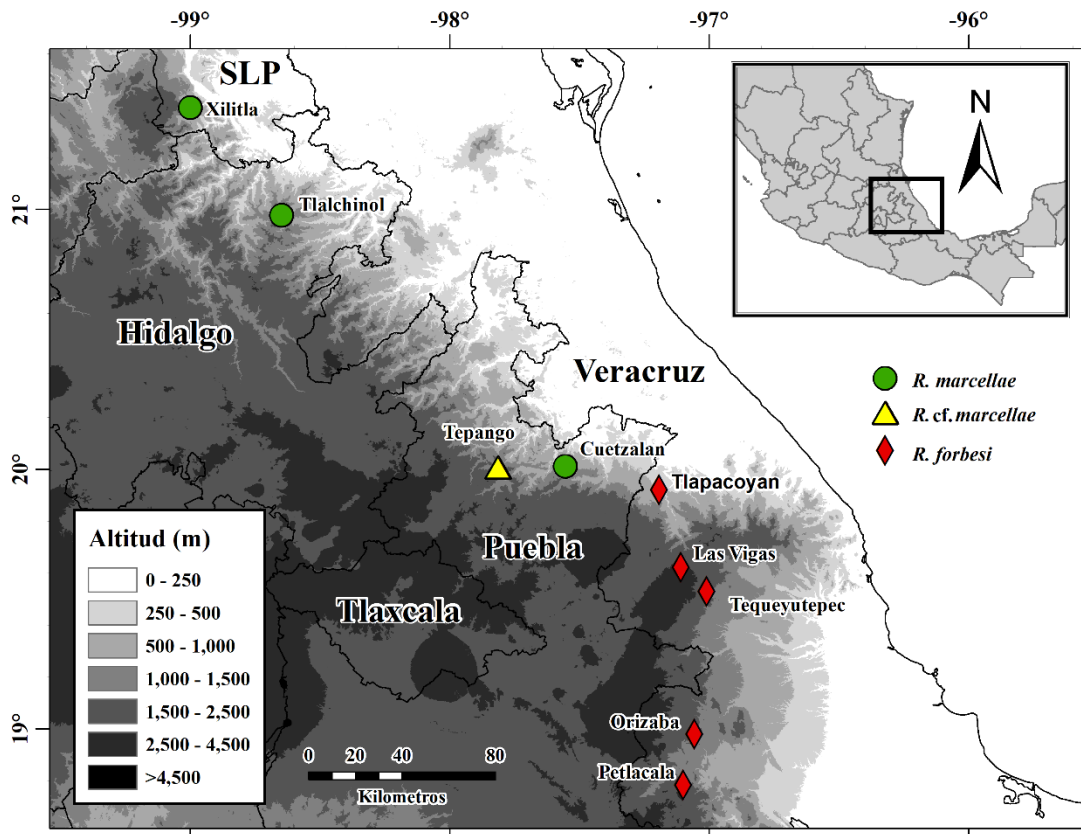


Figura 3. Localidades conocidas de *R. marcellae*, *R. forbesi* y el ejemplar de *R. cf. marcellae* de Tepango, Puebla.

### Objetivo General

Delimitar el número de especies que existen en el complejo *marcellae-forbesi* del género *Rhadinaea*.

### Objetivos Particulares.

- Evaluar la relación filogenética de los ejemplares de *R. marcellae* con respecto a los de *R. forbesi* con secuencias de un fragmento de un gen mitocondrial (cyt-b).

- Evaluar los límites de especies en el complejo *marcellae-forbesi* del género *Rhadinaea* mediante métodos basados en la coalescencia.
- Analizar los caracteres morfológicos de los ejemplares disponibles, por medio de Análisis de Componentes Principales y Análisis de Funciones Discriminantes.
- Establecer los límites entre las especies putativas y proponer los cambios taxonómicos pertinentes, de acuerdo a los criterios seleccionados.
- Asignar a una categoría válida el ejemplar proveniente de la localidad cercana a Tepango, Puebla, con base en los resultados obtenidos.

## **Hipótesis**

### **Hipótesis nula.**

Debido a que existen casos paralelos a *R. marcellae* y *R. forbesi*, en los que dos especies cuentan con una distribución similar a lo largo de la SMO, como el que existe entre *Anolis schiedii* y *A. naufragus* (Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997) o el observado entre *Xenosaurus platyceps* y *X. newmanorum*, (Nieto-Montes de Oca, 1999), es probable que *R. marcellae* y *R. forbesi* representen a dos entidades taxonómicas y el ejemplar de Tepango corresponderá a una especie aun no descrita.

### **Hipótesis alterna.**

*Rhadinaea marcellae* y *R. forbesi* corresponden a una sola especie que presenta diferentes fenotipos de acuerdo a la localidad donde ocurre y el espécimen de Tepango se tratará de una variación de este tipo.

## **Métodos**

Se realizó una búsqueda de ejemplares y se obtuvieron tejidos provenientes de trabajo de campo, bases de datos y de tres colecciones herpetológicas: Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias (MZFC), Colección Herpetológica de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (EBUAP) y en la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles (CNAR), para la revisión morfológica y toma de medidas morfométricas de los ejemplares disponibles, así como la extracción de DNA de los tejidos pertenecientes a *R. marcellae* y *R. forbesi*.

### **Trabajo de Campo.**

Se realizaron recolectas en las localidades documentadas tanto de *R. marcellae* como de *R. forbesi* (Fig. 2), así como en la localidad del espécimen de cerca de Tepango reportado por Nieto-Montes de Oca y Mendelson (1997) referido en este estudio como *R. cf. marcellae*, esto con el fin de obtener muestras adicionales para los análisis tanto morfológicos como filogenéticos. Se extrajo tejido fresco a los organismos recolectados y se conservaron en una solución de alcohol absoluto, los individuos fueron sacrificados mediante inyección con lidocaína al 5% en el corazón, después se fijaron con formol al 10% y finalmente preservados en frascos con alcohol etílico al 70% (Smart et al., 2017). Todos los ejemplares se depositaron en la colección herpetológica del Museo de Zoología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM (MZFZ).

### **Trabajo de gabinete.**

#### ***Caracteres morfológicos.***

Se recabaron datos morfométricos, merísticos y cualitativos de todos los individuos disponibles de *R. marcellae* y *R. forbesi*, las medidas morfométricas se tomaron con una cinta



métrica (0.5 mm) y con un calibrador vernier digital (0.05 mm). Todas las mediciones fueron hechas por la misma persona, además éstas se realizaron dos veces y se promediaron para aumentar la precisión de la medición (Hoyos et al., 2003). Se utilizaron los caracteres utilizados por Rivera-González (2009), ya que fueron usados para un estudio de otro género (*Atractus*) de la misma subfamilia (Dipsadinae), a éstos se le aumentaron otros caracteres cualitativos importantes en la diagnosis de las especies de *Rhadinaea* (Cuadro 1), fueron codificados numéricamente de acuerdo a su estado de carácter, para poder ser utilizados en conjunto con las variables merísticas (Myers, 1974; Rivera-González, 2009).

*Cuadro 1.* Caracteres morfológicos utilizados en este estudio.

<b>Caracteres morfométricos</b>	
<b>A cab</b>	Ancho de la cabeza (a la altura de la última escama supralabial)
<b>A Linlat</b>	Ancho de la línea lateral a medio cuerpo
<b>A loreal</b>	Altura de la escama loreal
<b>A rostral</b>	Ancho de la escama rostral
<b>D ocular</b>	Diámetro ocular
<b>Esc</b>	Ancho de una escama de la cuarta fila dorsal a medio cuerpo
<b>L cab</b>	Longitud de la cabeza (desde la punta del hocico hasta la última escama supralabial)
<b>L frontal</b>	Longitud de la escama frontal
<b>L internasal</b>	Longitud de la escama internasal
<b>L loreal</b>	Longitud de la escama loreal
<b>L pariet</b>	Longitud de la escama parietal
<b>L prefront</b>	Longitud de la escama prefrontal
<b>L supraoc</b>	Longitud de la escama supraocular
<b>LC</b>	Longitud de la cola (distancia entre la apertura cloacal y el extremo de la cola)
<b>LHC</b>	Longitud del cuerpo (distancia desde la punta del hocico a la apertura cloacal)
<b>LT</b>	Longitud total (distancia desde la punta del hocico al extremo de la cola)
<b>Caracteres merísticos</b>	
<b>Dor cab</b>	Número de dorsales a una cabeza de distancia de la última escama supralabial
<b>Dor clo</b>	Número de dorsales a una cabeza antes de la apertura cloacal
<b>Dor mid</b>	Número de dorsales a la altura de la mitad del cuerpo
<b>Infrlab</b>	Número de infralabiales

<b>Loreal</b>	Número de loreales
<b>Nasal</b>	Número de nasales
<b>Pos Linlat</b>	Posición de la banda lateral (número de fila de escamas dorsales)
<b>Postoc</b>	Número de postoculares
<b>Preoc</b>	Número de preoculares
<b>Subca</b>	Número de escamas subcaudales
<b>Subpreoc</b>	Número de subpreoculares
<b>Suprlab</b>	Número de supralabiales
<b>Temp</b>	Número de temporales
<b>Vent</b>	Número de escamas ventrales
<b>Caracteres cualitativos</b>	
<b>Collar</b>	Estado del collar: (1) ausente, (2) vestigial, (3) incompleto, (4) completo
<b>Lin clara</b>	Estado de la línea clara lateral (1) ausente, (2) difusa, (3) definida
<b>Lin vert</b>	Estado de la línea vertebral (1) vestigial, (2) centro de las escamas claros, (3) línea solida
<b>Linlat</b>	Estado de la línea lateral (en relación a Linlat/Esc): (1) delgada, (2) media, (3) gruesa
<b>Verm</b>	Vermiculaciones en la cabeza: (1) ausentes, (2) aparentes, (3) presentes

### *Análisis estadístico.*

Los datos fueron estandarizados transformándolos a logaritmo natural para disminuir la influencia que pudieran causar las diferencias dimensionales que existen entre los caracteres usados (Hoyos et al., 2003; Rivera-González, 2009), se construyó una base de datos con todos los caracteres morfométricos, merísticos y cualitativos en Microsoft Excel (2010), la cual se exportó al paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.2.04 (StatPoint technologies, 2013) donde se realizaron los análisis estadísticos.

Se realizó una gráfica de caja y bigote múltiple para observar la variación general de las variables, y eliminar aquellas que no tenían una variación significativa. Para justificar la factorización de la matriz de correlación utilizada en el análisis de componentes principales, se elaboró una prueba de correlación de Pearson para corroborar la existencia de correlación entre las variables y descartar aquellas que no aportaron valor estadístico al ACP (Carmona, 2014).

Con el fin de determinar si existe o no dimorfismo sexual, se realizaron tres ACP utilizando las variables elegidas en el paso anterior: uno con todos los ejemplares asignados a *R. marcellae*, otro con los ejemplares de *R. forbesi* y uno incluyendo ambas especies; después con los valores obtenidos se corrió un AFD por cada uno de los ACP, utilizando como criterio de clasificación, el sexo de cada individuo (Puerto et al. 2001; Hoyos et al., 2003; Orrico et al., 2017).

Se construyeron tres matrices: una con los datos morfométricos, otra incluyendo los caracteres merísticos (incluidos los caracteres cualitativos codificados) y por último, una utilizando los tres tipos de carácter en conjunto. Se corrió un ACP por cada matriz, ésto con el fin de identificar aquellas variables que aporten la mayor cantidad de información y resumirla en los primeros componentes (Puerto et al., 2001; Orrico et al., 2017), el número de componentes se determinó mediante una gráfica de sedimentación, conservando solo aquellos componentes con *Eigenvalor* superiores a 1 (Carmona, 2014). Después se realizó un Análisis de Funciones Discriminantes (AFD) por cada ACP realizado, utilizando como datos de entrada los componentes principales obtenidos, con el propósito de visualizar la capacidad que tienen los caracteres escogidos para la formación de patrones o agrupaciones (Rivera-González, 2009) y comprobar la congruencia de estos grupos con las especies nominales y los resultados del análisis filogenético.

### ***Caracteres moleculares.***

Para comprobar la monófila de *R. marcellae* y *R. forbesi* con respecto a otras especies del grupo *decorata* y analizar sus relaciones filogenéticas, se generaron secuencias de DNA mitocondrial de todos los organismos identificados como *R. marcellae* y *R. forbesi* disponibles, un ejemplar por cada una de las especies restantes del grupo *decorata*, una especie del grupo *flavilata* (*R. laureata*; Günther, 1868), otra del grupo *taeniata* (*R. fulvivittis*; Cope, 1875), una del

género *Rhadinella* (*R. godmani*; Günther, 1865) separado recientemente de *Rhadinaea* (Myers, 2011) y una secuencia del género *Coniophanes* (*Coniophanes* sp.), considerado el grupo hermano de *Rhadinaea* (Lawson et al., 2005; Pyron et al., 2011). Para enraizar el árbol se utilizó una secuencia de *Hypsiglena jani* (Dugès 1865).

### ***Extracción de DNA.***

A partir de los tejidos disponibles se llevó a cabo la extracción de DNA mediante la técnica de acetato de amonio (Hillis et al., 1994), en los casos en que las muestras de tejido eran muy viejas, se utilizó un kit de extracción (Quiagen DNeasy Blood y Tissue Kit; Quiagen, Valencia CA). Para comprobar la extracción de DNA se corrió un gel de agarosa en una cámara de electroforesis junto con un marcador molecular.

### ***Amplificación de DNA***

Mediante la técnica de PCR, se amplificó un fragmento del gen mitocondrial Cytocromo b, utilizando los protocolos y primers sugeridos por Lawson et al. (2005), este gen ha sido usado para estudios filogenéticos en Colubridae y Dipsadinae (Lawson et al., 2005; Pyron et al., 2011; Pyron et al., 2013). La verificación de los productos amplificados se realizó por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa, tomando como criterio el tamaño en pares de bases, los productos de la amplificación se purificaron por medio de la técnica de Polyethylene Glycol (PEG) para conservar solo los fragmentos de interés (Hillis et al., 1996). Los productos purificados se enviaron a la empresa MacroGen Sequencing Service, Korea, para la secuenciación de DNA mediante procesos automatizados con equipos secuenciadores AppliedBiosystems 3730XL de alto rendimiento.

### ***Edición y alineamiento de secuencias.***

Los fragmentos de las secuencias se editaron y ensamblaron en el programa Sequencher 4.1 (Gene Code Corp, Ann Arbor, USA), mientras que el alineamiento se realizó con la aplicación Muscle (Robert, 2004) implementada en MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016), las secuencias fueron ajustadas a “ojo” en caso de ser necesario.

### ***Modelos y esquema de partición.***

El producto del alineamiento fue analizado en PartitionFinder (Lanfear et al., 2012) para elegir tanto el esquema de partición, como el modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a los datos, bajo un criterio de información bayesiana y utilizando el algoritmo de búsqueda “greedy” (Smart et al., 2017).

### ***Análisis filogenéticos.***

Se utilizaron dos tipos de análisis filogenético: máxima verosimilitud (MV) y análisis bayesianos (IB). El análisis de MV se llevó a cabo en RAxML HPC 7.4.2 (Stamatakis, 2006) en la interfaz raxmlGUI 1.3 (Silvestro y Michalak, 2012), se realizó una búsqueda heurística con el modelo general de tiempo reversible (GTR) con la aproximación GTR+GAMMA, la cual integra la optimización de tasas de sustitución individual por sitio y la clasificación de las tasas individuales por categorías, este modelo ha sido utilizado anteriormente para estudios similares en la familia Colubridae (Pyron et al., 2011; Benignos et al., 2015; Stamatakis, 2016), para evaluar el soporte de los nodos se usó un Bootstrap no paramétrico con 1000 pseudoreplicas (Orrico et al., 2017).

El análisis bayesiano (IB) se ejecutó en el programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist et al., 2012), donde se corrieron dos cadenas paralelas de Markov (MCMC) con  $5 \times 10^7$  generaciones cada

una, muestreando cada 5000 generaciones, el 25% de generaciones iniciales se eliminaron como burn-in (Ruane et al., 2014; Smart et al., 2017). Los resultados de las cadenas de Markov se unieron y se corroboró su convergencia en TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007), después se construyó un árbol de máxima credibilidad en el software TreeAnnotator v1.8.0 (Drummond y Rambaut 2007), los resultados de ambos análisis fueron visualizados y editados en FigTree v1.4.2 (Rambaut, 2012). Para evaluar el soporte de los nodos en los árboles, fueron considerados bien soportados los valores de Bootstrap por encima de 70% para MV (Hillis y Bull, 1993; Taylor y Piel, 2004) y probabilidades posteriores superiores a 0.95 para IB (Orrico et al., 2017).

### ***Límite de especies.***

Para establecer los límites de especies se implementaron cuatro criterios: en primer lugar, se utilizó el aprovechamiento propuesto por Wiens y Penkrot (WP, 2002) el cual toma en cuenta la procedencia geográfica de las muestras, después se aplicaron tres métodos coalescentes; dos de descubrimiento de especies (GMYC y PTP) y uno de validación (BFD). El resultado de estos criterios en conjunto con el análisis morfológico realizado, constituye una evidencia suficientemente robusta para delimitar el número de especies existente en el complejo de estudio (Baker et al., 1998; Lee et al., 2007; Sáez, 2009; Ence y Carstens, 2011; Grechko, 2013).

### ***WP***

Se utilizó el “DNA tree based Approach” y como especie focal se utilizó por separado a *R. marcellae* y *R. forbesi*. Se utilizó el árbol construido a partir de Inferencia Bayesiana como referencia de las relaciones filogenéticas, y para visualizar la procedencia geográfica de las muestras, se elaboró un mapa con todos los registros de los ejemplares utilizados en el análisis filogenético. Considerando las especies focales, se buscó la presencia o ausencia de flujo génico

entre las ramas basales mediante el soporte de los nodos y su concordancia geográfica (Wiens y Penkrot, 2002; Morando et al., 2003; Sites Jr y Marshall, 2003).

### *GMYC*

Se construyó un árbol ultramétrico en BEAST v2.4.8 (Bouckaert et al., 2014), se utilizaron las mismas particiones que en los análisis de IB, y los modelos utilizados fueron calculados mediante bModelTest (Bouckaert y Drummond, 2017), se corrieron dos análisis por separado de  $1 \times 10^8$  generaciones cada uno, muestreando cada 1000 generaciones y desechando el 25% de los arboles iniciales como burn-in, se utilizaron como parámetros: “Relaxed Clock Log Normal” y “yule model prior”. Los archivos resultantes de los dos análisis fueron combinados en LogCombiner v2.4.8 (Bouckaert et al., 2014). Los valores de logaritmo se visualizaron en TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007) para comprobar la convergencia de las cadenas. Con base en los arboles obtenidos, se elaboró un árbol de máxima credibilidad mediante TreeAnnotator v1.8.0 (Drummond y Rambaut 2007). El árbol resultante se utilizó como entrada para el método GMYC (Pons et al., 2006), se utilizaron ambos métodos (“single threshold” y “multiple threshold”), con el uso del paquete “SPLITS” (Ezard et al., 2009; <http://rforge.rproject.org/projects/splits>) implementado en el software estadístico “R” (Development Core Team, 2010).

### *PTP*

Se corrieron dos análisis de  $1 \times 10^6$  generaciones con los siguientes parámetros: Thinning 100, burn-in 0.1 y Seed 123, mediante el servidor web (Zhang, 2013; <http://species.h-its.org/ptp/>), se utilizó como árbol de entrada el obtenido en RAxML, descartando a los grupos externos. Se tomaron en cuenta tanto los resultados del PTP con Máxima Verosimilitud como los

de PTP con soporte bayesiano (bPTP) (Zhang et al., 2013).

### *BFD*

Los modelos de especies que se pusieron a prueba fueron construidos a partir de los resultados del análisis filogenético y los criterios anteriormente usados. Se generaron archivos de salida (.xml) para cada modelo en BEAUti mediante StartBeast Template. Por cada una de las hipótesis se realizaron dos corridas en BEAST de  $3 \times 10^8$  generaciones muestreando cada 3000 generaciones, y desechando las primeras 20% como burn-in. Las verosimilitudes marginales fueron estimadas con path-sampling (PS; Lartillot y Philippe, 2006) corriendo una cadena adicional de Markov con 100 “pasos”, cada uno de  $3 \times 10^5$  generaciones (en total  $3 \times 10^7$  generaciones) muestreando cada 3000 con una frecuencia  $\text{Alpha} = 0.3$  y desechando el 20% como burn-in. Para calcular las verosimilitudes marginales finales de cada hipótesis se usó Path sampling analyser (Bouckaert et al., 2014), los resultados de cada par de réplicas fueron promediados y se ordenaron los modelos de acuerdo a su verosimilitud final, después se obtuvieron los valores de los factores de bayes (FB), con la fórmula:  $\text{FB} = 2 \times [\text{modelo1} - \text{modelo2}]$ , en relación a la hipótesis con el valor más alto (Yu et al., 2017). El soporte de apoyo a los valores de FB se asignó de acuerdo a la clasificación de Kass and Raftery (1995) donde solo se toman en cuenta los valores mayores a dos: valores entre dos y seis se consideran “bien soportados” y valores mayores a 10 como “decisivos” (Grummer et al., 2014; Nieto-Montes de Oca, et al., 2017; Solano-Zavaleta y Nieto-Montes de Oca, 2018).



## Resultados

Se obtuvieron un total de 38 registros de *R. marcellae* y *R. forbesi* (26 y 12 respectivamente), de los cuales 17 fueron provenientes de colecciones, 13 se tomaron de artículos y bases de datos; ocho más producto del muestreo de campo. Se obtuvo información de caracteres merísticos y cualitativos de 31 de estos registros, 19 ejemplares pudieron ser examinados para tomar las medidas morfométricas y se secuenció DNA del tejido de 10, además cuatro registros contenían información geográfica confiable (Anexo I).

### Revisión morfológica

Se encontró que los individuos asignados a *R. marcellae* pueden ser divididos en dos grupos, ya que algunos de los ejemplares solo cuentan con una línea vestigial similar a la de algunos ejemplares de *R. forbesi*, pero a diferencia de estos la línea postocular es continua con la banda lateral, las hembras tienen 129-139 ventrales y 63-74 subcaudales, los machos presentan 129-137 ventrales y 49-79 subcaudales. Se designó provisionalmente a este grupo como *R. cf. marcellae*. Todos los demás individuos de *R. marcellae* presentan una línea media vertebral con los centros claros y un collar nucal, ya sea completo o incompleto, las vermiculaciones en la parte dorsal de la cabeza no están presentes en algunos ejemplares, mientras que la línea lateral varía en cuanto al grosor y ubicación, ya que el ancho de la línea puede ser de una escama a solo 1/3. La ubicación de la banda lateral es principalmente en la cuarta fila de escamas dorsales; sin embargo, puede ocupar una parte de la tercer o quinta fila, el número de ventrales es de 132-139 en hembras y 128-135 en machos, mientras que las subcaudales son 69-73 y 69-78 respectivamente.

Algunos de los ejemplares asignados a *R. forbesi* presentan vermiculaciones en la cabeza,

mientras que ninguno presenta un collar nual, solo se observó en algunos de los organismos la presencia de una línea clara vestigial de tres escamas de largo y una de ancho. La línea media vertebral exhibe variación, ya que algunos individuos cuentan con una línea solida continua, mientras que otros presentan los centros de cada escama vertebral claros. Todos los ejemplares presentan una línea postocular inclinada discontinua con la línea lateral ya que desaparece al llegar a la parte de atrás de la boca, cuentan con 129-144 ventrales en machos y 136-149 en hembras, mientras que el número de subcaudales es de 56-67 en machos y 49-74 en hembras.

### **Análisis estadístico**

Con los datos estandarizados, se procedió a elegir las variables a usar. Se eliminaron del análisis las variables: Suprlab, Infrlab, Subpreoc, Preoc, Postoc, Loreal, Nasal, Temp, Dor cab y Dor mid; ya que eran idénticas en todos los ejemplares. A continuación, para observar la distribución y simetría de los datos, se elaboró un diagrama de caja y bigote de cada variable (Fig. 4), ésto con el fin de identificar aquellas que muestren poca variabilidad y no sean estadísticamente útiles para los análisis siguientes. Se detectaron tres variables que no presentaban variabilidad (Dor clo, Preoc y Suprlab), por lo que también fueron descartadas de los análisis subsecuentes. Existen casos en los que se aprecian valores extremos, tal es el ejemplo de la variable “Subca” y por otro lado, casos en que la media coincidía con la mediana como se puede observar en las variables “Infrlab” y “Vent”, estos ejemplos demuestran que estas variables poseen una significancia estadística minima, sin embargo, se decidió conservarlos para explotar el máximo de caracteres disponibles y corroborar su significancia en las pruebas posteriores.

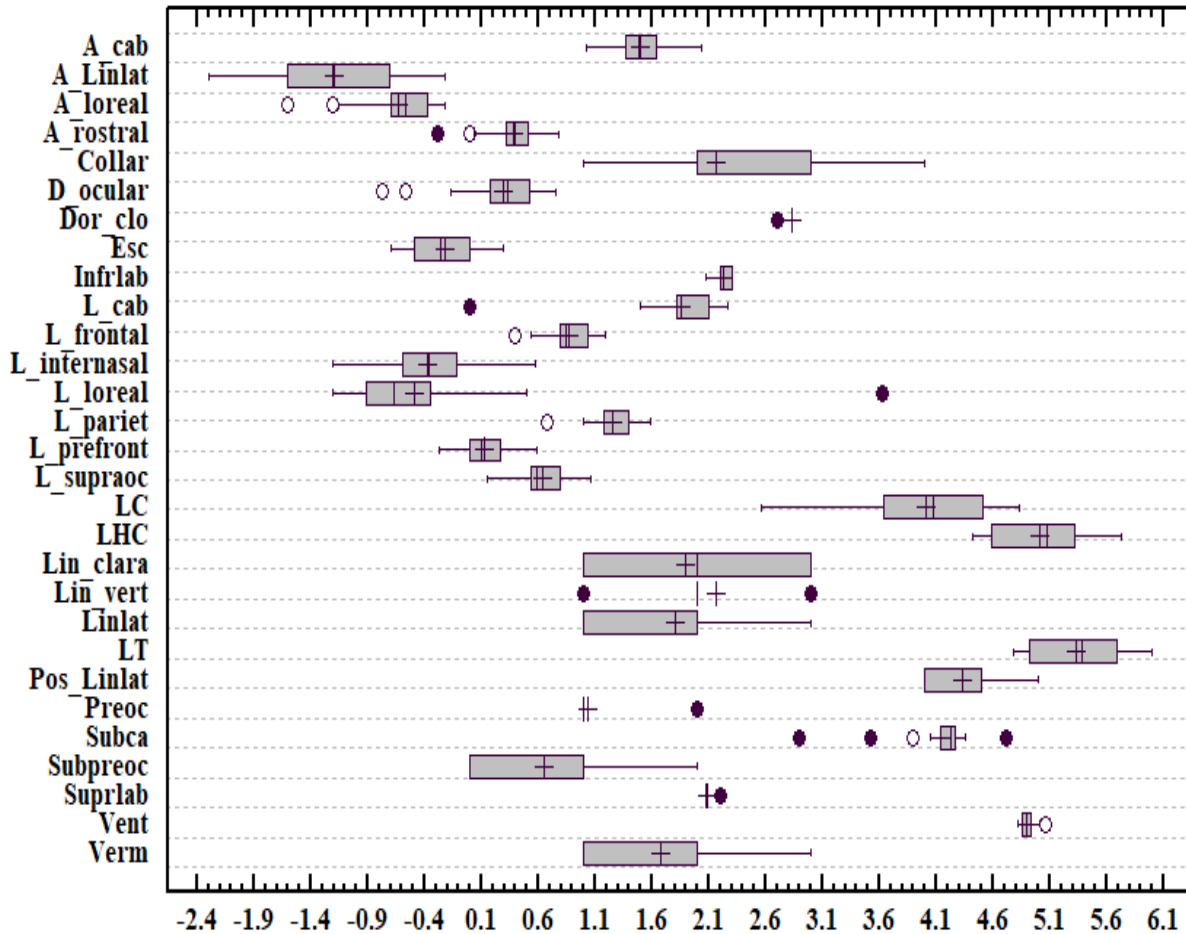


Figura 4. Grafica de caja y bigote de cada una de las variables utilizadas. Las cruces muestran la media, los puntos claros representan valores atípicos y los puntos negros valores extremos.

### *Análisis de Componentes Principales*

La mayoría de conjuntos de variables presentan una alta correlación entre sí, por lo que se usaron para generar las variables no correlacionadas del ACP, además la mayor parte de valores de  $-P$  fueron  $\leq 0.05$  lo que indica que tienen significancia estadística con un nivel de confianza de 95%, por lo que se decidió conservar todas las variables para realizar el ACP. Por otra parte, no se encontró diferencia significativa entre sexos, que siguieran la presencia de dimorfismo sexual en ninguno de los análisis realizados con este fin, por lo que se usaron las matrices sin tomar en cuenta el sexo de los ejemplares para los ACP siguientes.

### *Datos morfométricos*

Se usaron un total de 19 muestras para el análisis, de las que se tuvieron acceso a los ejemplares para la toma de medidas morfométricas. A partir de estos datos se obtuvieron los valores de cuatro componentes principales para las 16 variables originales (cuadro 2).

Se eligieron los cuatro primeros componentes principales mediante la gráfica de sedimentación (Fig. 5) que en conjunto explican el 82 % de la variabilidad original (cuadro 3). El primer componente aporta el 44.7% de la varianza mientras que el segundo describe el 21.21%. La dirección de cada variable con respecto a los dos primeros componentes principales es positiva, excepto L cab, que tiene una influencia negativa sobre los componentes 1 y 2 (Fig. 6). Para el componente uno las variables que más peso tuvieron fueron: L supraoc, L prefront y L frontal; mientras que para el componente dos, las variables que más influyeron fueron: LC, LT y LHC (Cuadro 4).

*Cuadro 2.* Componentes principales del análisis con datos morfométricos.

<b>Ejemplar</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>	<b>Componente 3</b>	<b>Componente 4</b>
MZFC 24585	-1.60528	-1.44600	0.52296	0.66065
ANMO 4339	2.10436	-0.67541	0.75207	-0.43319
EBUAP 1582	0.92213	-0.24625	-0.26648	-0.30505
EBUAP 1592	3.38117	0.13800	0.95010	-0.27272
EBUAP 1593	4.19105	0.37245	2.04183	-0.62774
Hueyapan NA	-2.04176	4.15306	0.80196	-0.16447
IBH 19726	5.30477	1.40716	-3.55072	-0.45712
IBH 29710	-2.58162	-1.91393	-0.69089	0.26113
IBH 29711	-2.00584	-1.52440	-0.14227	-0.94554
IBH 29712	-1.98228	-2.42505	-0.23040	0.73586
IBH 3845	2.49512	0.23214	0.74074	-0.89940
IBH 6895	-1.84574	-0.08247	-1.75670	-1.32334
JCSG 22	-5.00673	3.40404	-0.30006	0.42343
JCSG 86	-0.68688	-1.21244	0.04663	-0.13544
MZFC 31339	2.64346	0.14544	-0.12699	3.89557
UOGV 3025	-1.01812	2.43015	0.15077	0.79559

UOGV 3026	-0.36681	0.99400	0.84707	-1.13621
UOGV 3058	-0.73611	-2.16224	0.38302	-0.06519
UOGV 3068	-1.16488	-1.58826	-0.17263	-0.00679

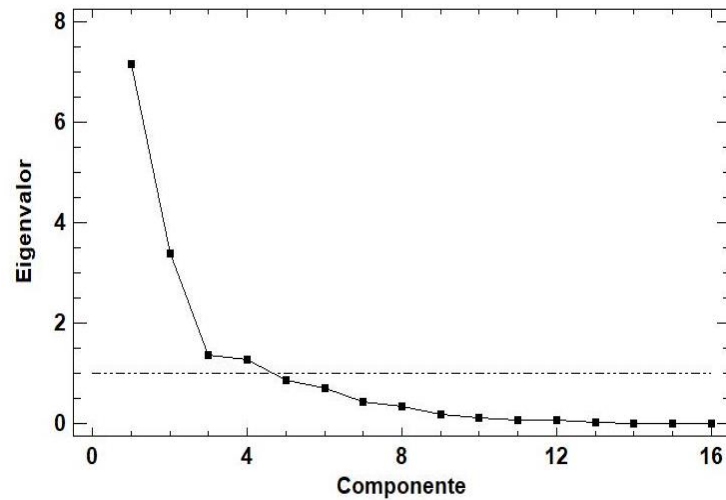


Figura 5. Grafica de sedimentación, la línea punteada indica cuantos componentes se usarán.

Cuadro 3. Eigenvalor y porcentaje de varianza que aporta cada componente.

Componente	Eigenvalor	%Varianza	%Acumulado
1	7.16716	44.795	44.795
2	3.39401	21.213	66.007
3	1.35795	8.487	74.495
4	1.26594	7.912	82.407
5	0.86360	5.398	87.804
6	0.69948	4.372	92.176
7	0.43926	2.745	94.921
8	0.33815	2.113	97.035
9	0.19242	1.203	98.237
10	0.11193	0.700	98.937
11	0.07739	0.484	99.421
12	0.06212	0.388	99.809
13	0.02141	0.134	99.943
14	0.00774	0.048	99.991
15	0.00138	0.009	100

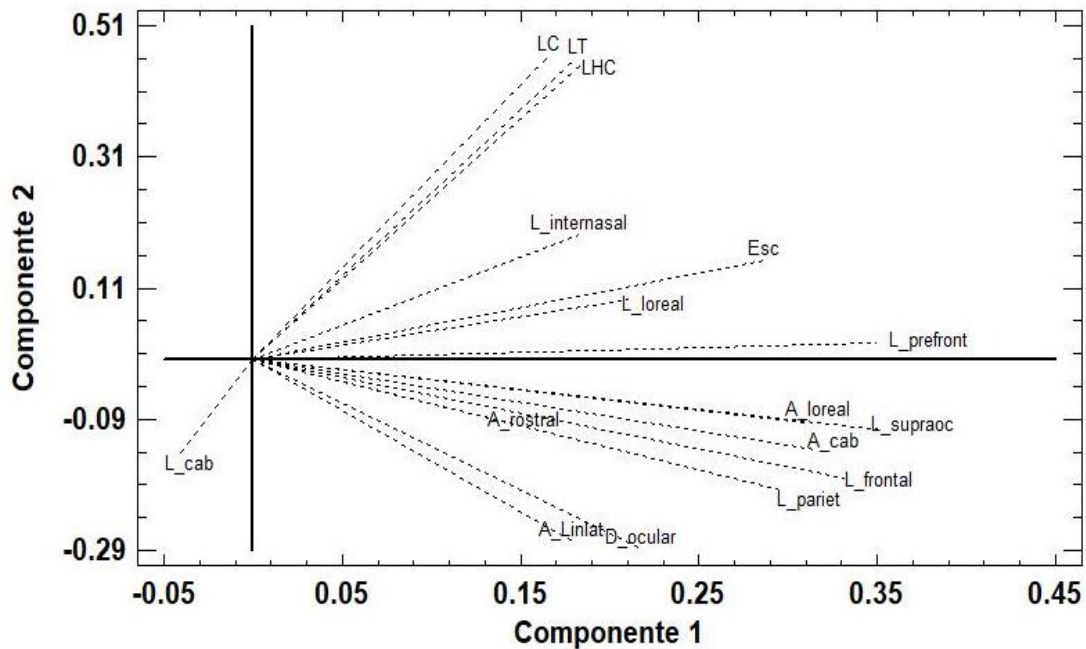


Figura 6. Influencia de cada variable a los dos primeros componentes principales.

Cuadro 4. Tabla de pesos de cada variable en los componentes principales.

Variable	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
A cab	0.315394	-0.136047	-0.047101	0.054799
A Linlat	0.179222	-0.275678	0.399484	0.196771
A loreal	0.310062	-0.095651	0.113615	0.204389
A rostral	0.152742	-0.101704	-0.030623	-0.744432
D ocular	0.217602	-0.287346	-0.184805	0.058194
Esc	0.286854	0.152928	-0.087273	-0.030614
L cab	-0.042890	-0.149713	0.691173	0.104958
L frontal	0.332264	-0.180860	0.030862	0.063728
L internasal	0.182882	0.191830	0.278680	-0.528444
L loreal	0.210998	0.093191	0.383473	-0.111939
L pariet	0.296491	-0.198297	-0.110897	0.032597
L prefront	0.349895	0.025306	-0.178023	0.038131
L supraoc	0.353465	-0.105795	-0.171012	0.021525
LC	0.165731	0.463248	0.065273	0.136031
LHC	0.183803	0.449822	0.021212	0.118400
LT	0.180488	0.459721	0.035291	0.125047

### *Datos merísticos y cualitativos*

Se utilizaron las 29 muestras que contenían datos merísticos y cualitativos, incluyendo los datos de los 10 ejemplares publicados en Nieto-Montes de Oca y Mendelson (1997), en total se usaron nueve variables originales de las cuales se obtuvieron cuatro componentes principales (Cuadro 5). Estos componentes obtuvieron *Eigenvalor* igual o mayores a uno (Fig. 7), los que en conjunto representan el 72.39% de la variabilidad original. El primer componente aporta el 28.79% de la varianza mientras que el segundo describe el 17.12% (Cuadro 6).

Con la excepción de Infralab, que afecta de manera positiva al componente uno, todas las variables influyen sobre los dos primeros componentes, además destaca la relación lineal positiva que tiene Lin vert con respecto a los dos componentes (Fig. 8). Las variables que más peso tuvieron para el componente uno son Collar y Verm, mientras que el componente dos se vio mayormente afectado por Infrlab y Lin vert (cuadro 7).

*Cuadro 5.* Componentes principales del análisis con datos merísticos y cualitativos.

<b>Ejemplar</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>	<b>Componente 3</b>	<b>Componente 4</b>
MZFC 24585	-0.40209	0.44003	1.40020	-0.07935
ANMO 4339	-1.19689	-0.73081	-0.70208	1.70635
EBUAP 1582	-2.32428	-0.26095	0.09908	-0.41526
EBUAP 1592	1.51383	-2.07950	2.84522	1.82598
EBUAP 1593	1.52135	-0.25430	0.96609	-1.31624
Hueyapan NA	-0.31919	-1.89661	-1.76808	-0.48175
IBH 19726	3.07015	0.73956	-2.14945	-0.42784
IBH 29710	1.08516	2.07552	-0.82510	-0.29718
IBH 29711	1.12419	1.40003	-0.03200	1.86601
IBH 29712	0.54879	1.92388	1.23267	0.18723
IBH 3845	1.22822	1.99679	-0.67749	0.00698
IBH 6895	-0.62896	1.36271	-0.78671	-1.09950
JCSG 22	-2.29228	-0.67813	-0.22463	0.22123
JCSG 86	0.66296	0.80436	0.22521	2.01087
LSUMZ 270	-2.46287	-0.17058	-0.79662	-0.43764
MZFC 31339	-0.93908	-0.96271	-1.41337	0.90852

MZFC 5324	0.36719	0.99729	1.66742	-2.02707
MZFC 5868	-0.68760	-0.41858	-0.30177	-0.44592
UOGV 3025	3.73671	-2.78467	0.42236	-0.32069
UOGV 3026	1.78260	-0.83910	0.69208	-1.69805
UOGV 3058	0.04735	1.77147	0.88721	1.70669
UOGV 3068	2.47269	-0.69329	-2.26082	0.33032
UTA R-12410	-1.56414	-0.16154	0.50214	-1.10878
UTA R-12411	-0.63223	0.36988	0.43830	-0.50995
UTA R-12412	-1.54161	0.16157	-0.13046	0.15057
UTA R-12413	-0.82694	0.47760	0.40459	-0.66390
UTA R-12414	-1.63494	-0.82861	0.02752	0.20741
UTA R-12415	-1.20373	-1.03685	-0.19643	0.50517
UTA R-12416	-0.50434	-0.72443	0.45494	-0.30419

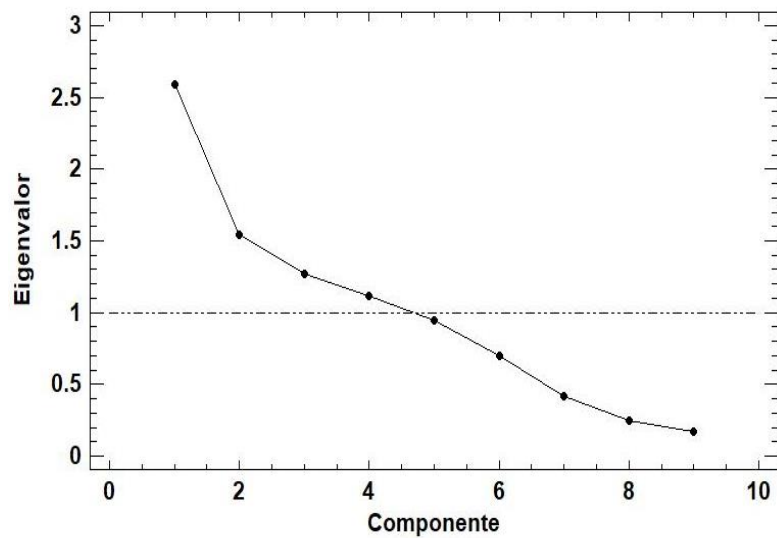


Figura 7. Grafica de sedimentación, la línea punteada indica cuantos componentes se utilizaran.

Cuadro 6. Eigenvalor y porcentaje de varianza que aporta cada componente.

Componente	Eigenvalor	%Varianza	%Acumulado
1	2.59166	28.796	28.796
2	1.54127	17.125	45.921
3	1.26962	14.107	60.028
4	1.11270	12.363	72.392
5	0.94829	10.537	82.928
6	0.70041	7.782	90.711
7	0.41790	4.643	95.354
8	0.25138	2.793	98.147
9	0.16674	1.853	100



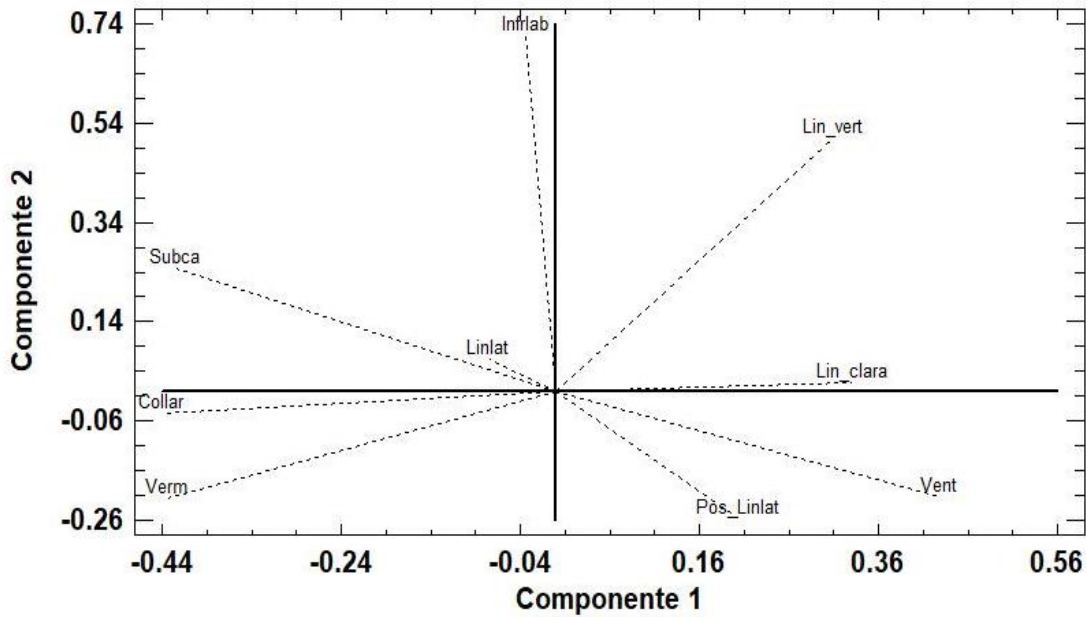


Figura 8. Influencia de cada variable a los dos primeros componentes principales.

Cuadro 7. Tabla de pesos de los componentes.

Variable	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
Collar	-0.439873	-0.045863	-0.389738	0.388994
Infrlab	-0.034156	0.715899	-0.068717	-0.107196
Lin clara	0.331182	0.017513	-0.461151	0.104914
Lin vert	0.310218	0.510365	-0.222622	0.379855
Linlat	-0.075321	0.065728	0.596545	0.432236
Pos Linlat	0.204310	-0.257604	-0.257877	-0.388664
Subca	-0.424361	0.248584	-0.209410	-0.355189
Vent	0.428159	-0.212405	-0.166815	0.303689
Verm	-0.434292	-0.216832	-0.295152	0.354432

#### *Datos morfométricos, merísticos y cualitativos*

El análisis se implementó a partir de los ejemplares de los cuales se tenían tanto datos morfométricos como merísticos, utilizando un total de 25 variables originales, a partir de las cuales se obtuvieron seis componentes principales (Cuadro 8), este número se estableció mediante la gráfica de sedimentación (Fig. 9), ya que son los que representaban *Eigenvalor*

mayores a uno. En conjunto estos componentes explican el 81.552% de información de las variables originales, los dos primeros componentes aportan el 30.23% y el 18.21% de la variabilidad inicial respectivamente (Cuadro 9).

Las variables afectan a los dos primeros componentes de manera que se agrupan en dos formas, las que influyen de manera negativa al componente uno, y las que lo afectan de manera positiva, por su parte el componente dos se encuentra influenciado de manera más equitativa por las variables usadas (Fig. 10). Las variables L supraoc, L prefront y L frontal, fueron las que mayormente afectaron al componente uno, de igual manera el componente dos contienen principalmente influencia de las variables LC, LT y LHC (Cuadro 10).

*Cuadro 8.* Componentes principales del análisis con datos morfométricos, métricos y cualitativos.

<b>Ejemplar</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>	<b>Componente 3</b>	<b>Componente 4</b>	<b>Componente 5</b>	<b>Componente 6</b>
MZFC 24585	-1.84491	-1.26112	1.27423	-0.65544	0.06328	-1.22973
ANMO 4339	1.71353	-0.47742	2.14352	0.62402	0.37402	1.25954
EBUAP 1582	0.23889	0.04008	1.90223	1.64297	-0.72098	0.17584
EBUAP 1592	3.73964	0.27138	2.15025	-2.69339	-0.39249	1.52305
EBUAP 1593	4.30354	0.38302	0.75208	-1.08589	-1.45932	-2.85066
Hueyapan NA	-1.85736	4.92227	0.06607	0.19734	-0.19196	0.23001
IBH 19726	5.67865	0.49490	-3.76305	2.17591	0.89486	0.80642
IBH 29710	-2.68656	-2.16885	-1.57575	0.72194	0.31819	-1.46372
IBH 29711	-1.92825	-2.05026	-0.75280	-0.78412	-0.09538	1.27051
IBH 29712	-2.21186	-2.89237	-0.36385	-0.60009	0.56623	-0.76914
IBH 3845	2.48275	-0.74229	-0.45506	0.41081	-1.80965	1.32284
IBH 6895	-1.99755	-0.04410	-0.57991	2.43861	-3.10612	-0.14251
JCSG 22	-5.30540	3.59690	0.72318	0.78741	0.31301	0.84851
JCSG 86	-0.81296	-1.59848	0.24610	-0.51682	0.72142	0.38530
MZFC 31339	2.22063	0.69260	2.34138	2.67217	2.80609	-1.26650
UOGV 3025	0.00693	3.21330	-1.74988	-2.69149	1.83816	-0.44120
UOGV 3026	0.09697	1.37888	-0.98068	-1.61136	-1.99058	-0.73156
UOGV 3058	-1.08640	-2.96751	0.50609	-0.77350	0.68510	0.87838
UOGV 3068	-0.75029	-0.79094	-1.88416	-0.25909	1.18611	0.19459

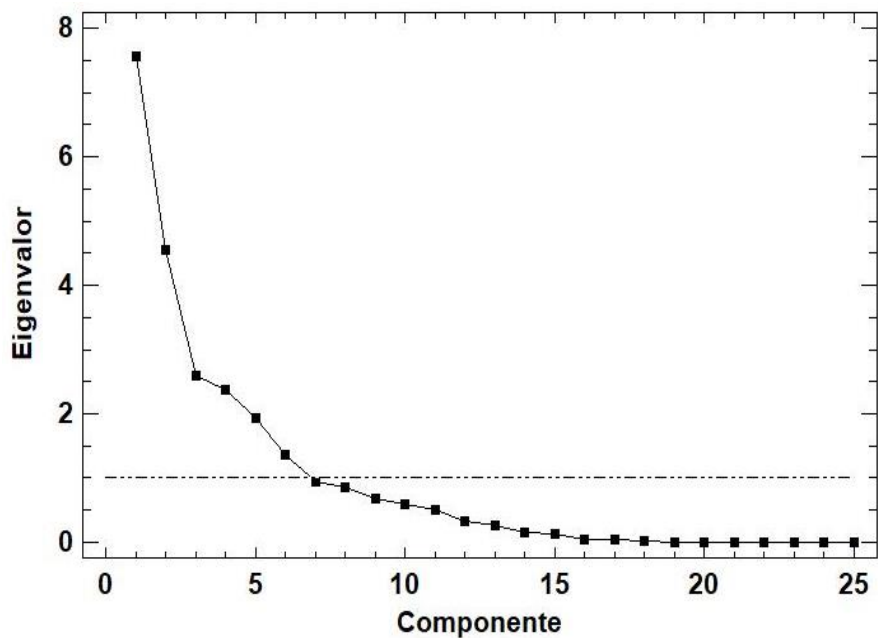


Figura 9. Grafica de sedimentación, la línea punteada indica cuantos componentes se usarán.

Cuadro 9. Eigenvalor y porcentaje de varianza que aporta cada componente.

Componente	Eigenvalor	%Varianza	%Acumulado
1	7.55964	30.239	30.239
2	4.55395	18.216	48.454
3	2.60067	10.403	58.857
4	2.38171	9.527	68.384
5	1.93605	7.744	76.128
6	1.35605	5.424	81.552
7	0.954877	3.82	85.372
8	0.852951	3.412	88.784
9	0.691683	2.767	91.55
10	0.602146	2.409	93.959
11	0.513961	2.056	96.015
12	0.335228	1.341	97.356
13	0.270098	1.08	98.436
14	0.154056	0.616	99.052
15	0.124185	0.497	99.549
16	0.0525276	0.21	99.759
17	0.0478799	0.192	99.951
18	0.0123306	0.049	100

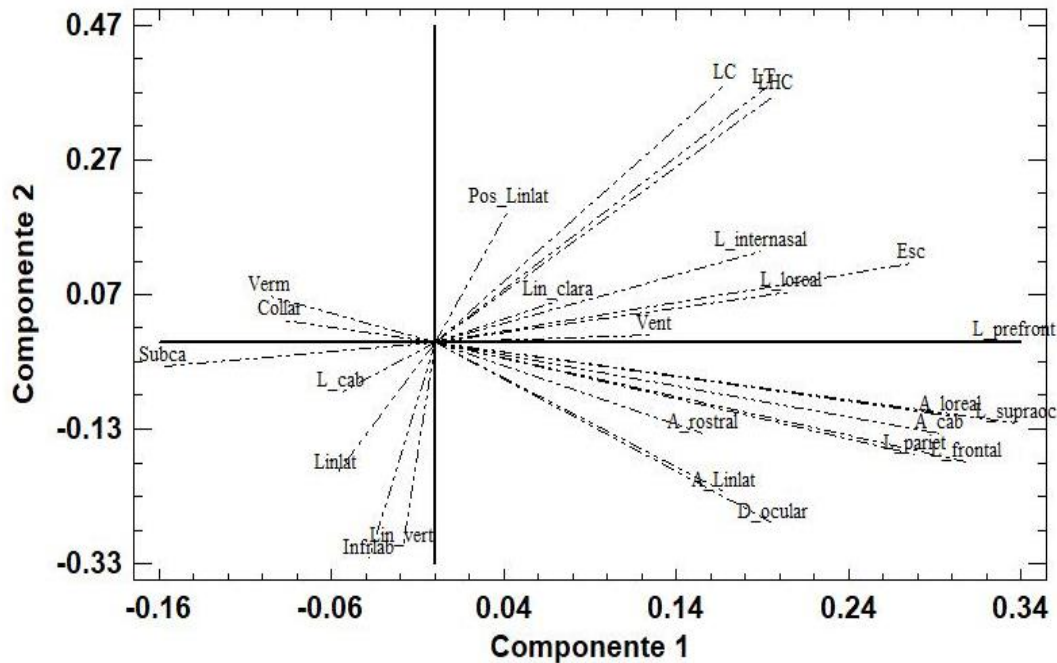


Figura 10. Influencia de cada variable a los dos primeros componentes principales.

Cuadro 10. Tabla de pesos de los componentes.

Variable	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4	Componente 5	Componente 6
A cab	0.292962	-0.136796	0.083650	0.168079	-0.073586	-0.024964
A Linlat	0.168152	-0.223549	0.230239	-0.291120	0.248221	-0.018444
A loreal	0.299407	-0.109295	0.046101	-0.065165	0.236953	0.037793
A rostral	0.155838	-0.136120	-0.187919	-0.116076	-0.427068	0.264176
Collar	-0.089121	0.032844	0.292075	0.459333	0.109584	0.324557
D ocular	0.196358	-0.271009	0.041451	0.104602	0.114400	0.087176
Esc	0.276859	0.117463	0.074674	0.213832	-0.180659	0.093330
Infrlab	-0.037976	-0.322763	-0.214588	0.293097	-0.151630	0.023919
L cab	-0.053913	-0.073779	0.413298	-0.196289	-0.143839	-0.158456
L frontal	0.308219	-0.178601	0.069143	0.077534	0.073919	-0.074451
L internasal	0.188963	0.134598	0.058577	-0.212694	-0.303671	0.325830
L loreal	0.207444	0.075393	0.089065	-0.114686	-0.199091	-0.459168
L pariet	0.278798	-0.168389	0.058042	0.080306	0.017526	-0.173925
L prefront	0.336494	0.000605	0.042180	0.145053	0.020753	0.041938
L supraoc	0.337897	-0.120445	-0.030409	0.133374	-0.000281	-0.056785
LC	0.169081	0.382861	0.079026	0.081191	0.029637	-0.002480
LHC	0.198215	0.366893	-0.014336	-0.021430	0.099423	0.096356
Lin clara	0.071813	0.061212	-0.226933	0.177125	0.133497	-0.264931
Lin vert	-0.019049	-0.305812	-0.338691	0.017245	0.139551	0.212024
Linlat	-0.057462	-0.195807	0.331622	-0.236452	0.271017	-0.078887

LT	0.191820	0.376609	0.013602	0.008123	0.080918	0.068406
Pos Linlat	0.043329	0.199014	-0.338467	0.041663	0.288128	-0.277515
Subca	-0.157676	-0.036318	0.076143	0.402064	-0.009527	-0.303886
Vent	0.127370	0.011022	-0.301702	-0.249829	0.378026	0.192428
Verm	-0.095617	0.068218	0.276894	0.216809	0.317643	0.284586

### *Análisis de funciones discriminantes*

Utilizando los valores de componentes principales obtenidos, se realizó un análisis de funciones discriminantes por cada uno de los tres ACP empleados, con el propósito de clasificar a los ejemplares utilizados en especies putativas, cada ejemplar fue asignado a alguna de los tres grupos derivados de la exploración morfológica (*R. marcellae*, *R. forbesi* y *R. cf. marcellae*).

### *Datos morfométricos*

Fueron utilizadas 19 muestras para cuatro variables predictoras (componentes principales) y se calcularon dos funciones discriminantes, con el propósito de clasificar a los ejemplares de acuerdo a las especies putativas, ninguna de las funciones discriminantes tiene valores -P menores que 0.05, de modo que ninguna es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95.0% (Cuadro 11). De las observaciones empleadas para ajustar el modelo, solamente el 68.4211% (13) fueron clasificadas correctamente.

En el diagrama de dispersión de las funciones, se observa que los centriolos de cada grupo se distribuyen de tal manera que las distribuciones de las muestras de cada conglomerado se sobreponen entre sí, principalmente aquellas que corresponden a las especies *R. marcellae* y *R. forbesi* (Fig. 4).

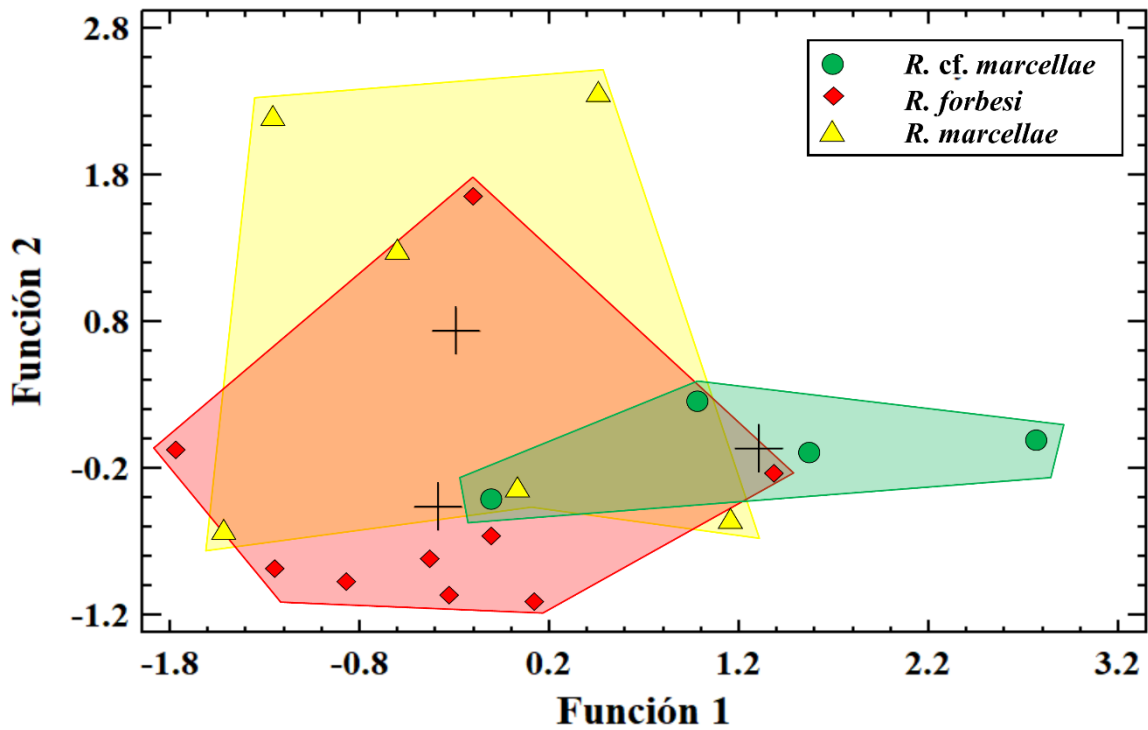


Figura 11. Grafica de dispersión de las muestras de acuerdo a las funciones discriminantes. Las cruces muestran el centriolo de cada grupo.

Cuadro 11. Valores obtenidos por cada función discriminante y sus valores estadísticos.

Función	Eigenvalor	%Relativo	Correlación	Derivada	Lambda	Chi-Cuadrada	GL	Valor-P
1	0.538959	62.51	0.59179	1	0.49104	10.3128	8	0.2438
2	0.323293	37.49	0.49428	2	0.75569	4.0618	3	0.2549

#### Datos merísticos

Un total de 29 ejemplares fueron utilizados para desarrollar un modelo que discrimine entre los tres niveles de especie, para ello se utilizaron cuatro variables para generar dos funciones discriminantes, mismas que en sus funciones derivadas cuentan con valores de -P menores que 0.05 por lo que, a diferencia de las obtenidas en el análisis con caracteres morfométricos, éstas son estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95% (cuadro 12). De los 29 ejemplares empleados para ajustar el modelo, se logró clasificar correctamente al 96.5% (28 de

29 muestras).

La grafica resultante de las funciones discriminantes utilizando caracteres merísticos y cualitativos (Fig. 15) muestra la formación de tres grupos claramente diferenciados y correspondientes a las unidades clasificatorias (*R. marcellae*, *R. forbesi* y *R. cf. marcellae*), en los que el centriolo de cada agrupación se encuentra separado de los otros dos. Un ejemplar de *R. forbesi* (UOGV 3025) se encuentra alejado de su centro, además muy cercano a la formación de *R. cf. marcellae* y corresponde al 3.4% que no se clasificó correctamente.

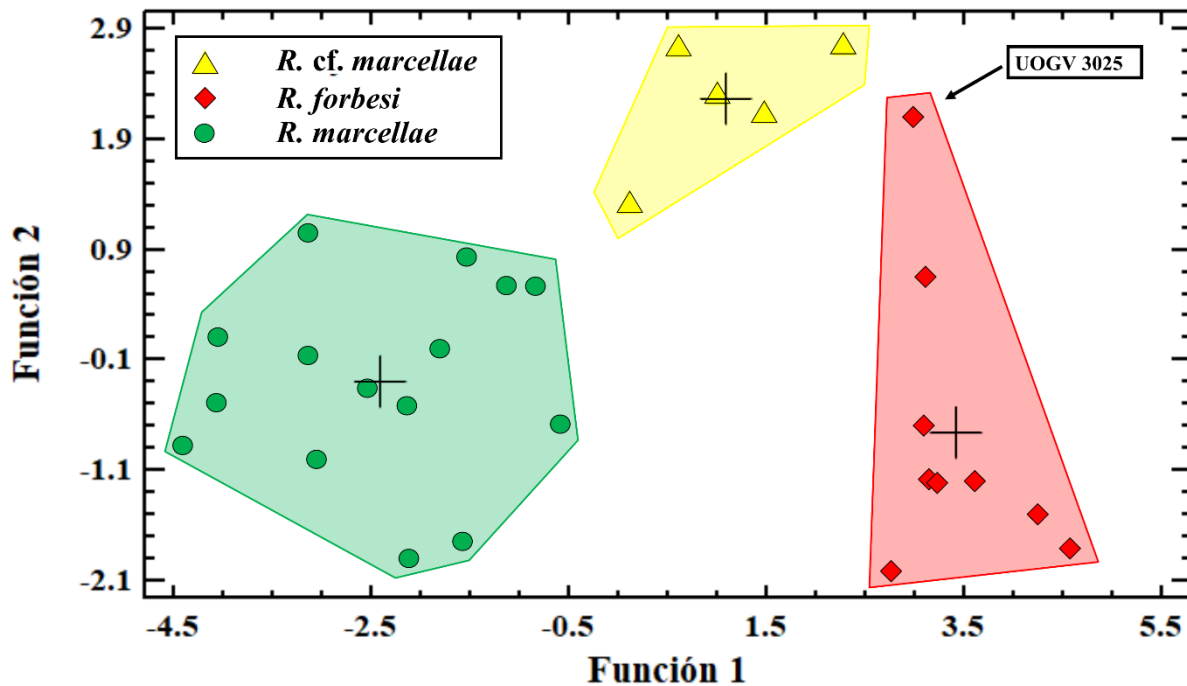


Figura 12. Grafica de dispersión de las muestras de acuerdo a las funciones discriminantes. Las cruces muestran el centriolo de cada grupo.

Cuadro 12. Valores obtenidos por cada función discriminante y sus valores estadísticos.

Función	Eigenvalor	Relativo	Canónica	Derivada	Lambda	Chi-Cuadrada	GL	Valor-P
1	7.6151	85.93	0.94017	1	0.051665	72.5924	8	0
2	1.24665	14.07	0.74491	2	0.445107	19.8313	3	0.0002

*Datos morfológicos, merísticos y cualitativos*

Fueron usadas seis variables derivadas de los componentes principales de 19 muestras, de las que se extrajo dos funciones discriminantes estadísticamente significativas, con valores-P menores que 0.05 a un nivel de confianza del 95.0% (Cuadro 13). En este caso el 100.0% de los ejemplares fueron clasificados correctamente. Como resultado de este análisis se obtuvieron tres agrupaciones definidas con centriolos bien separados y sin muestras muy alejadas de los mismos, de igual manera estas conglomeraciones corresponden al criterio clasificatorio utilizado.

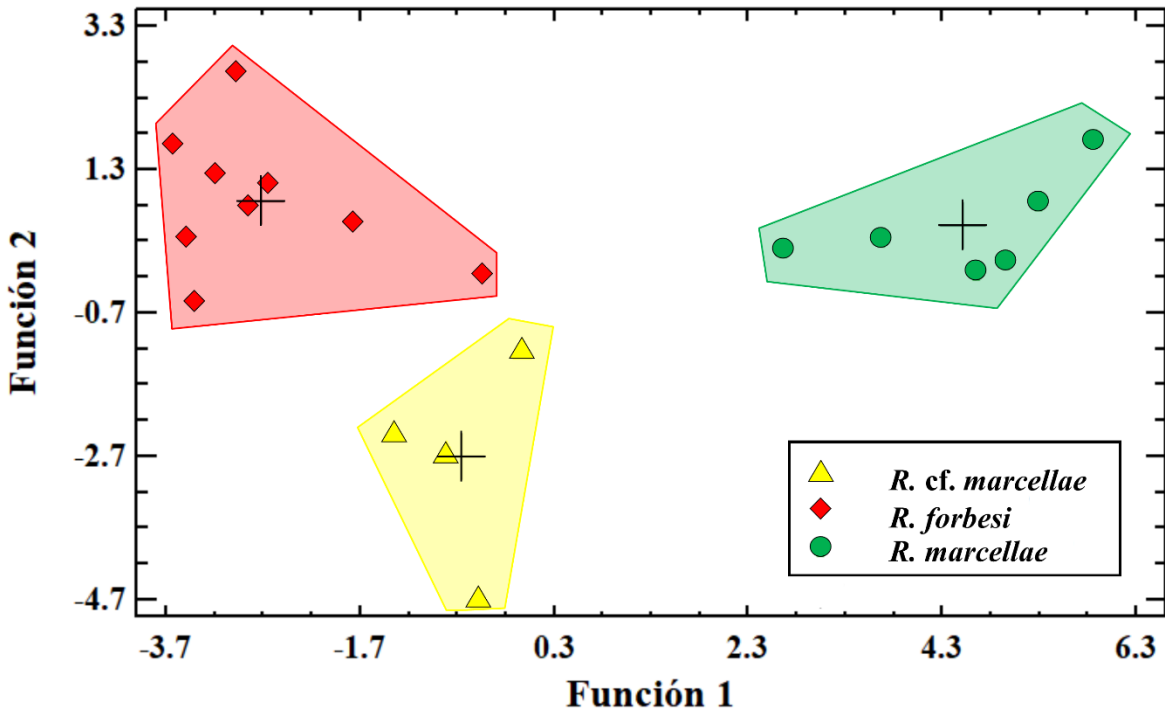


Figura 13. Grafica de dispersión de las muestras de acuerdo a las funciones discriminantes. Las cruces muestran el centriolo de cada grupo.

Cuadro 13. Valores obtenidos por cada función discriminante y sus valores estadísticos.

Función	Eigenvalor	Relativo	Canónica	Derivada	Lambda	Chi-Cuadrada	GL	Valor-P
1	11.8933	83.52	0.96044	1	0.023179	50.8207	12	0
2	2.34607	16.48	0.83734	2	0.298858	16.3051	5	0.006



## Análisis filogenéticos

Se obtuvieron un total de 10 secuencias del grupo de estudio cuatro de *R. marcellae*, cuatro de *R. forbesi* y dos de ejemplares identificados como la morfoespecie *R. cf. marcellae* (Cuadro 14), provenientes de la SMO, Sierra de Otontepec y Sierra de Zongolica de los estados de San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla y Veracruz (Fig. 19).

El producto final del alineamiento fue de 691pb que se dividieron en tres particiones con base en su posición: Partición 1 (primera posición), 1-691\3; Partición 2 (segunda posición), 2-691\3; partición 3 (tercera posición), 3-691\3. El análisis de Máxima verosimilitud se corrió bajo el modelo GTR+G para todas las particiones, mientras que en el análisis de Inferencia Bayesiana se usaron los modelos: HKY+G, GTR+I+G y GTR+G para las particiones 1, 2 y 3 respectivamente.

Cuadro 14. Localidades de los ejemplares del complejo usados en los análisis filogenéticos.

<b>Etiqueta</b>	<b>Especie</b>	<b>Estado</b>	<b>Localidad</b>
MZFC 24585	<i>cf. marcellae</i>	Puebla	Xocayucan, Tlatlauquitepec
MZFC 5315	<i>cf. marcellae</i>	Puebla	25Km NE Zacatlán
MZFC 5134	<i>forbesi</i>	Veracruz	8Km NE Xalapa, Rancho "El Álamo"
UOGV 3025	<i>forbesi</i>	Veracruz	Acajete, La joya
UOGV 3058	<i>forbesi</i>	Veracruz	Zongolica, Finca Santa Martha
UOGV 3068	<i>forbesi</i>	Veracruz	Zongolica, Finca Santa Martha
ANMO 4339	<i>marcellae</i>	San Luis Potosí	Xilitla, Finca Santa Mónica
Hueyapan NA	<i>marcellae</i>	Puebla	Hueyapan
JCSG 22	<i>marcellae</i>	Veracruz	Sierra de Otontepec, San Nicolasillo
Tlanchinol NA	<i>marcellae</i>	Hidalgo	Tlanchinol

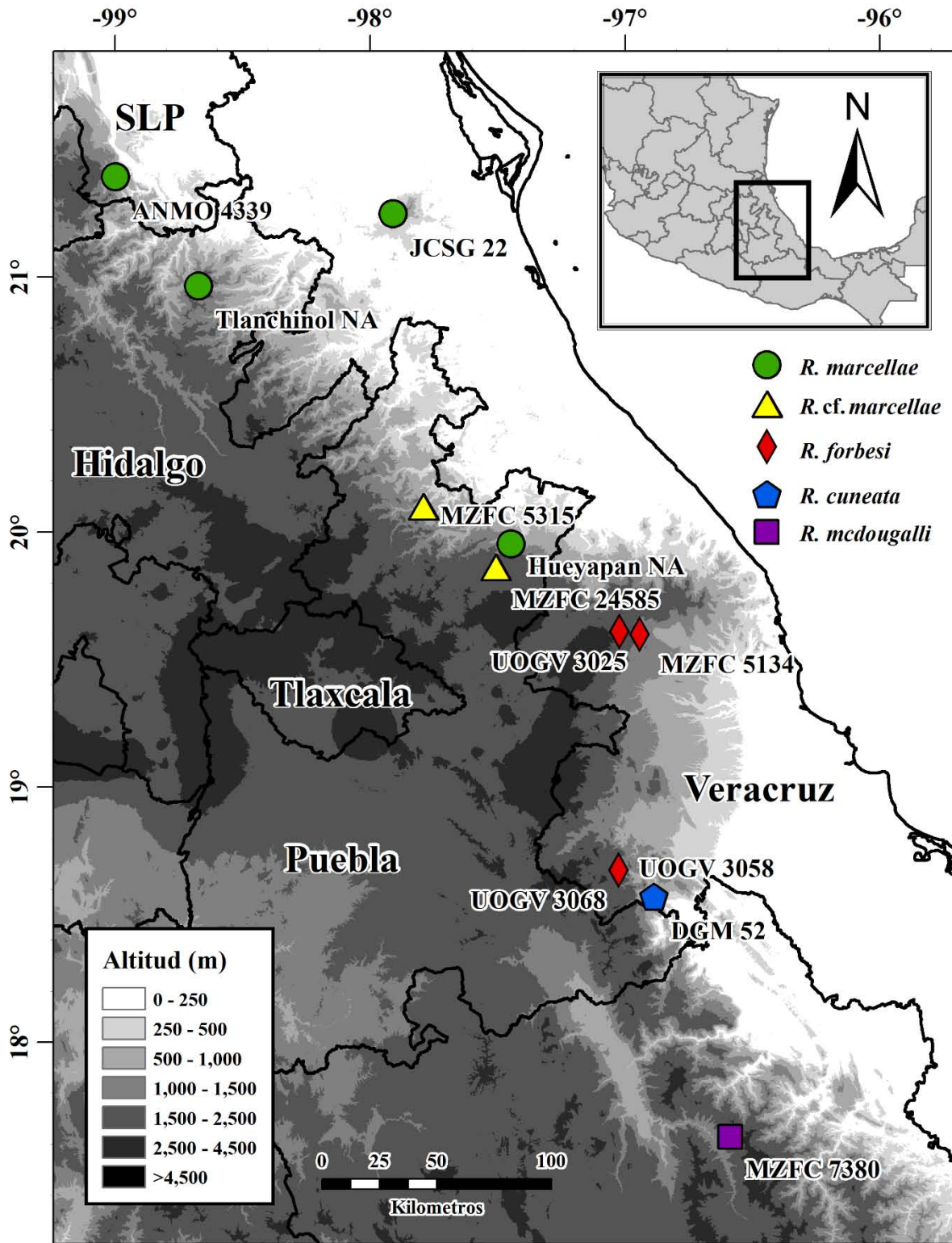


Figura 14. Localidades de las muestras utilizadas para los análisis filogenéticos y Límite de especies.

### *Máxima verosimilitud*

En el árbol obtenido a partir del análisis de MV (Fig. 15), se puede observar que el grupo *decorata* no es monofilético ya que los ejemplares que pertenecen a los grupos *flavilata* y *taeniata* (*R. laureata* y *R. fulvivittis* respectivamente) se encuentran ubicados dentro del grupo *decorata* con nodos bien soportados (valores de bootstrap >70), además, *R. decorata* está situada como un grupo hermano de *Rhadinella godmani*, y las demás especies del género *Rhadinaea*, lo que implica que el género *Rhadinaea* no es monofilético, aunque el soporte de los nodos implicados es muy bajo (8 y 46).

Se pueden reconocer en el cladograma tres grandes grupos bien soportados, el primero formado por *R. hesperia*, *R. fulvivittis*, *R. bogertorum* y *R. myersi* (Clado A); el segundo lo conforman *R. laureata*, *R. gaigae*, *R. montana* y *R. quinquelineata* (Clado B) y un tercer grupo que incluye a *R. macdougalli*, *R. cuneata* y los haplotipos pertenecientes a *R. marcellae*, *R. forbesi* y los que se han asignado a la morfoespecie *R. cf. marcellae* (Clado C). Este último se divide a su vez en dos grupos, el primero que incluye a *R. macdougalli* situada como grupo hermano de los haplotipos de *R. marcellae* y *R. cf. marcellae*, aunque con bajo valor de soporte (56). El segundo grupo contiene a *R. cuneata*, como grupo un hermano de los haplotipos pertenecientes a *R. forbesi*, pero el soporte de Bootstrap del nodo es de solo 68, por lo que no es considerado soportado.

Los haplotipos pertenecientes a *R. forbesi*, forman un grupo monofilético que incluye tanto a los representantes de los alrededores de Xalapa, como a los provenientes de la Sierra de Zongolica. En el otro grupo los haplotipos de *R. cf. marcellae* forman un grupo monofilético soportado con respecto a los demás haplotipos de *R. marcellae*, además este grupo es congruente con la morfología ya que presenta diferencias con respecto a los ejemplares de *R. marcellae*.

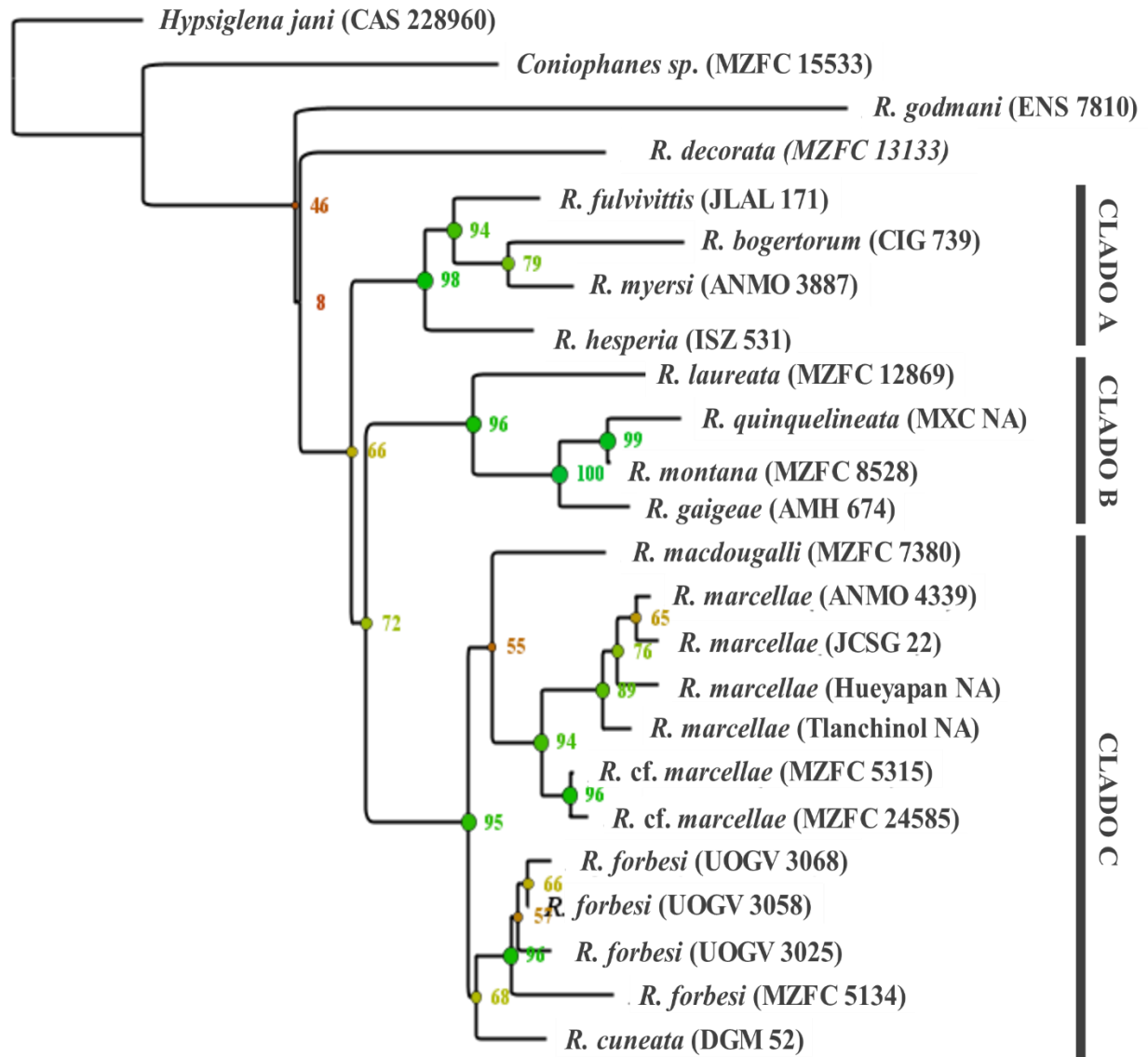


Figura 15. Árbol filogenético obtenido mediante Máxima Verosimilitud, los puntos en verde muestran a los nodos soportados.

### Inferencia bayesiana

El árbol obtenido mediante inferencia bayesiana es muy similar al de máxima verosimilitud, varía solo en la longitud de algunas ramas y el soporte de los nodos (Fig. 16). El género *Rhadinaea* aparece parafiletico con respecto a *Rhadinella godmani*, ya que esta última forma un

grupo con *R. decorata* (con un bajo soporte). Específicamente en el clado que contiene a los haplotipos de interés, los nodos tienen un mejor soporte que en el árbol de MV, principalmente el que muestra a *R. cuneata* como grupo hermano de *R. forbesi* ya que se encuentra bien soportado (Pp 0.97).

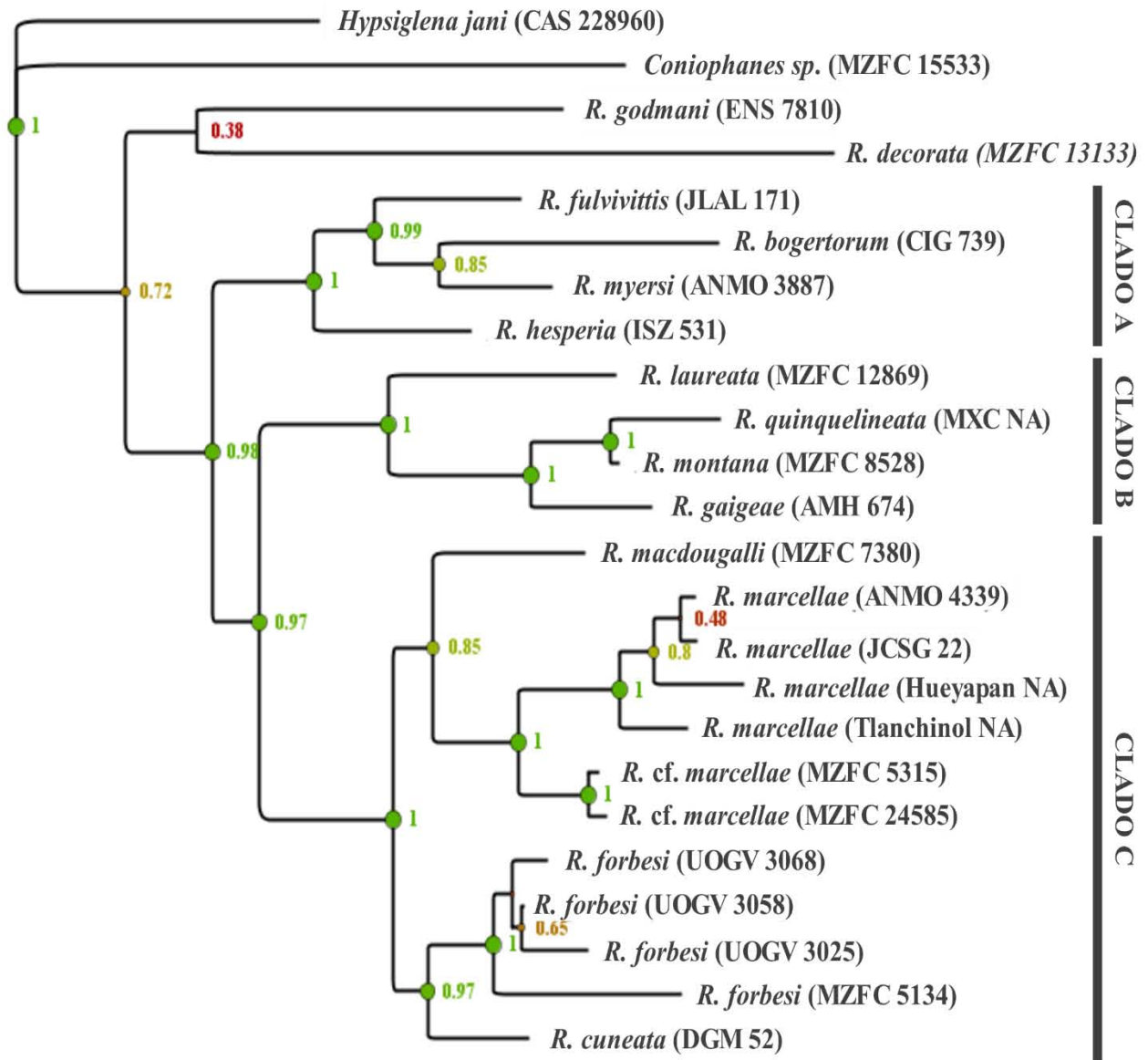


Figura 16. Árbol filogenético obtenido a partir de Inferencia Bayesiana, los puntos verdes muestran a los nodos soportados.

## **Límite de especies**

### **WP**

La delimitación llevada a cabo mediante Wiens y Penkrot (2002), se realizó con base en el árbol obtenido por inferencia bayesiana (Fig. 16), ya que en este se resuelven mejor las relaciones con respecto a *R. cuneata* y *R. macdougalli*, que en el realizado con ML.

Los haplotipos de la especie focal *R. forbesi* se encuentran todos en un solo clado bien soportado y concordante con su distribución geográfica, concentrada en dos zonas del Estado de Veracruz: El sur de la SMO, en los alrededores de Xalapa y en la Sierra de Zongolica, por lo que es una especie exclusiva con respecto a *R. marcellae*, *R. cuneata* y *R. macdougalli*, además representa una especie única (single especie).

La distribución geográfica de los haplotipos de *R. marcellae* (segunda especie focal), limitada al norte y centro de la SMO, así como su agrupación en un solo clado bien soportado, demuestran que representa a un grupo exclusivo con respecto a *R. macdougalli*, *R. forbesi* y *R. cuneata*, pero a diferencia de *R. forbesi*, la existencia de múltiples especies es sugerida por la presencia de un clado basal bien soportado, que divide a los dos ejemplares designados morfológicamente a *R. cf. marcellae* (MZFC 24585 y MZFC 5315) del resto de haplotipos pertenecientes a *R. marcellae*.

El análisis de WP sugiere la presencia de tres especies en el complejo *marcellae-forbesi*, la primera es *R. marcellae* conformada por los haplotipos: ANMO 4339, JCSG 22, Tlanchinol NA y Hueyapan NA; la segunda denominada *R. cf. marcellae* que incluye a las muestras MZFC 5315 y MZFC 24585; y la tercera con los haplotipos: MZFC 5134, UOGV 3025, UOGV 3058 Y UOGV 3068 que pertenecen a *R. forbesi*.

Con base en los resultados del análisis filogenético y WP, se decidió incluir a *R. macdougalli* y *R. cuneata* en los análisis de límite de especies siguientes, debido a su ubicación como grupos hermanos con respecto a *R. marcellae* (incluida *R. cf. marcellae*) y *R. Forbesi*, respectivamente.

### **GMYC**

El análisis de GMYC “single threshold” (GMYCs) sugiere la presencia de dos especies con un intervalo de confianza de 1-4 especies, la primera incluye a *R. cuneata* y los haplotipos correspondientes a *R. forbesi*, mientras la segunda incluye a los haplotipos de *R. marcellae*, *R. cf. marcellae* y *R. macdougalli*. La verosimilitud máxima para el modelo fue de 40.82426, mientras que la verosimilitud del modelo nulo fue de 40.82043 y un “threshold time” igual a -0.08994089.

Por su parte GMYC “multiple threshold” (GMYCm) arroja como resultado siete entidades, con un intervalo de confianza de 1-7 especies, estas son: 1) *R. macdougalli*; 2) Hueyapan NA; 3) Tlanchinol NA; 4) JCSG 22, ANMO 4339; 5) MZFC 24585, MZFC 5315; 6) MZFC 5134, UOGV 3025, UOGV 3058, UOGV 3068; 7) *R. cuneata*. La verosimilitud máxima fue de 40.83029, mientras que la verosimilitud nula 40.82043, los valores de “threshold time” son de -0.0468366 y -0.01534481.

### **PTP**

Para este modelo se utilizó como entrada el árbol de máxima verosimilitud, y al igual que en GMYC, se decidió incluir a *R. cuneata* y a *R. macdougalli*. El análisis con máxima verosimilitud (PTP) obtuvo seis especies: 1) *R. mcdougalli* (soporte = 0.986); 2) MZFC 5134 (soporte = 0.714); 3) UOGV 3025, UOGV 3058, UOGV 3068 (soporte = 0.309); 4) *R. cuneata* (soporte = 0.848); 5) Hueyapan NA, JCSG 22, ANMO 4339, Tlanchinol NA (soporte = 0.236); 6) MZFC 5315, MZFC 24585 (soporte = 0.549).

El método con soporte bayesiano (bPTP) obtuvo ocho especies: 1) *R. mcdougalli* (soporte = 0.986); 2) *R. cuneata* (soporte = 0.848); 3) MZFC 5134 (soporte = 0.714); 4) UOGV 3025, UOGV 3058, UOGV 3068 (soporte = 0.309); 5) MZFC 5315, MZFC 24585 (soporte = 0.549); 6) Tlalchinol NA (soporte = 0.609); 7) Hueyapan NA (soporte = 0.396); 8) JCSG 22, ANMO 4339 (soporte = 0.231).

**BFD**

A partir de los árboles del análisis filogenético y los resultados obtenidos por los otros criterios empleados, se construyeron 13 hipótesis de especies (Fig. 17) que fueron probadas con base en el factor de bayes (FB).

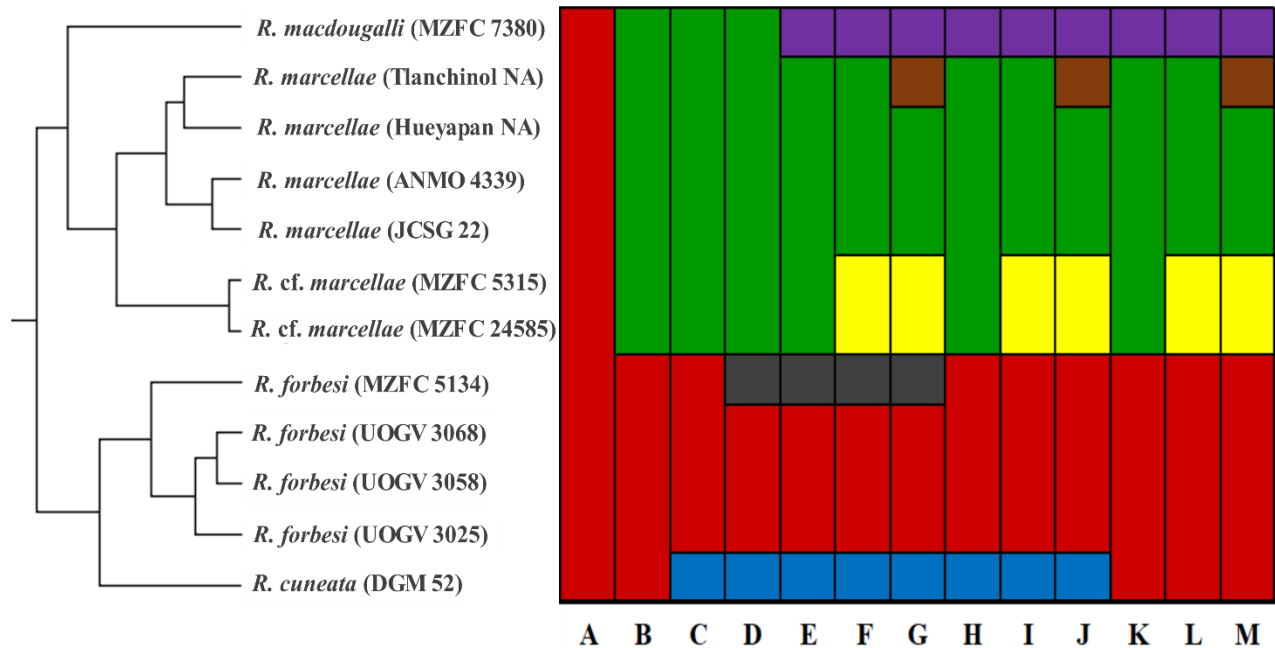


Figura 17. Modelos de especies probados mediante BFD.

Los modelos K y L obtuvieron los valores más altos de FB con 19.12 y 11.84 respectivamente, y representan los únicos dos modelos “decisivos” con valores de FB >10 (cuadro 15). La hipótesis K comprende tres especies, la primera incluye a *R. cuneata* + los



haplotipos de *R. forbesi*, la segunda incluye a todos los haplotipos de *R. marcellae* + *R. cf. marcellae*, y *R. macdugalli* representa a la tercera especie. El modelo L es similar, con la diferencia de que identifica a los haplotipos de *R. cf. marcellae* como una especie diferente de *R. marcellae* y por consiguiente esta hipótesis sugiere cuatro especies.

*Cuadro 15.* Valores de verosimilitud marginal (VM) y factores de bayes (FB) de cada hipótesis probada mediante BFD.

Hipótesis	MV	FB
M	-2384.656	
C	-2385.408	1.504
H	-2386.163	3.015
B	-2387.055	4.798
G	-2387.745	6.179
J	-2387.849	6.386
E	-2387.904	6.496
I	-2388.259	7.206
F	-2388.542	7.771
D	-2388.899	8.485
A	-2389.010	8.708
L	-2390.578	11.843
K	-2394.218	19.123

## Discusión de resultados

### *Análisis estadístico*

La discordancia entre los resultados obtenidos con caracteres morfométricos, con respecto a los caracteres merísticos y cualitativos, sugiere que no existen diferencias significativas de las medidas corporales que sirvan como base para la formación de grupos, la matriz de correlación

construida a partir de estos datos obtuvo las correlaciones más altas entre sus variables; sin embargo, sus valores de  $-P$  fueron también los más grandes, motivo por el cual esta prueba no fue estadísticamente significativa (Jackson, 1993; Restrepo y González, 2007), esta falta de variabilidad explica que las funciones discriminantes clasifican correctamente sólo el 68.4% de las muestras (Vicente-Villardón, 2006).

Por otro lado, los conjuntos de variables de los datos merísticos y cualitativos mostraron los valores de  $-P$  más bajos, por lo que ninguno carecía de significancia estadística, sin embargo, fue el análisis con los valores más bajos de correlación entre las variables, estos dos factores afectaron el análisis de componentes principales debido a que la variabilidad original se distribuyó entre un número mayor de variables, reduciendo el poder explicativo de cada uno de los componentes (Jackson, 1993), por lo que sólo representan el 72.3% de la información original con los primeros cuatro, lo anterior se observa en la gráfica de sedimentación (Fig. 9) donde la curva formada por los *Eigenvalor*, no se aproxima a la asíntota y en cambio describe una línea proporcional entre los primeros dos componentes, lo que indica que existe cierto grado de correlación entre estos (Jolliffe, 2002; Carmona, 2014).

Tanto los análisis con caracteres merísticos y cualitativos como los que utilizaron los tres tipos de datos, muestran que existen al menos tres morfoespecies definidas, en particular las pruebas que utilizaron todos los caracteres parecen ser las mejor sustentadas, ya que al incluir el máximo número de caracteres se explota de igual forma todo el potencial fenotípico, que resulta en mayor evidencia para delimitar especies (Puerto et al., 2001; Lee et al., 2007; Rivera, 2013). Al igual que con el análisis de datos morfométricos, la matriz de correlación de los caracteres merísticos, tuvo valores altos de correlación entre sus conjuntos de variables, pero a diferencia del primero los valores de  $-P$ , indicaron que estas correlaciones eran significativamente

diferentes, esto se debe a que al combinar las propiedades de las dos pruebas anteriores, los cuadrados de las desviaciones estándar formaron distribuciones normales (Downie y Heath, 1971; Jackson, 1993; Carmona, 2014), con lo que los primeros componentes del ACP pueden explicar mejor toda la información contenida en las variables originales (81.5%), de igual manera los valores de  $-P < 0.05$  del análisis de funciones discriminantes hacen que no se rechace la hipótesis nula, ya que se logró clasificar el 100% de las muestras examinadas dentro de tres unidades taxonómicas.

### ***Análisis filogenético***

En general los árboles obtenidos a partir de ML e IB son similares, lo cual aumenta la robustez de la reconstrucción filogenética (Peña, 2011), en ambos casos la formación de tres clados dentro del grupo *decorata* parece ser consistente con la morfología de las especies que los conforman, particularmente en el Clado C, la mayoría de las especies que lo conforman cuentan con una línea postocular inclinada (Smith, 1942; Smith y Langebartel, 1949; Tylor, 1949; Myers, 1974), por lo que la inclusión de *R. macdougalli* como grupo hermano de *R. marcellae* y *R. cf. marcellae* es consistente. En el segundo grupo la relación de *R. cuneata*, como especie hermana de los haplotipos de *R. forbesi* se encuentra soportada en el análisis bayesiano ( $Pp = 0.97$ ). Ambas especies tienen similitudes morfológicas, como la posición y composición de la línea lateral, pero difieren en el patrón de la cabeza, ya que *R. cuneata*, presenta una marca en forma de cuña ((Myers, 1974; Luría-Manzano et al., 2014).

### ***Límite de especies***

La delimitación de tres especies obtenida por WP parece confiable, ya que estas cuentan con características morfológicas que sirven para identificarlas entre sí, además de que los resultados

del análisis estadístico apoyan fuertemente la hipótesis. La distribución de los haplotipos de cada especie no es exclusiva a cada grupo, lo que representa conflictos en la clasificación a nivel de especie, el ejemplar Hueyapan NA se encuentra en la misma zona geográfica que los ejemplares de *R. cf. marcellae*; sin embargo, ambos análisis filogenéticos agrupan a este individuo en el mismo clado que los demás haplotipos de *R. marcellae* y la presencia de un collar nucal, por lo que su asignación a *R. marcellae* se encuentra soportada.

Wiens y Penkrot (2002) mencionan que, para alcanzar resultados óptimos con el método, es adecuado tener el mayor número de muestras de cada localidad como sea posible, por lo que la delimitación realizada en el presente estudio podría no ser la que mejor represente el número real de especies, debido a que no en todos los casos se tuvieron disponibles el mínimo de dos muestras por cada localidad requerido por el modelo (Wiens y Penkrot, 2002; Sites Jr y Marshall, 2003).

En cuanto a los límites encontrados por los criterios de descubrimiento, GMYCs parece subestimar el número de especies (dos), mientras que GMYCm y bPTP las sobreestiman (siete y ocho respectivamente), estos resultados no son concordantes con la morfología y distribución, especialmente con las secuencias Hueyapan NA y Tlanchinol NA que son asignadas como especies individuales, y en la que no hay diferencias morfológicas evidentes entre estos ejemplares, y los asignados a *R. marcellae*. Por otra parte, el ejemplar MZFC 5134 de *R. forbesi* es asignado como una especie independiente por los métodos GMYCm y bPTP, esta hipótesis parece poco probable ya que la descripción de este individuo incluida en el artículo de Nieto-Montes de Oca y Mendelson (1997), coincide con la descripción original de *R. forbesi* de Smith (1942) y con los ejemplares de este taxón revisados en el presente estudio.

PTP en su versión clásica parece ser el método que mejor se ajusta a la evidencia morfológica

y geográfica, la asignación de MZFC 5134 como una especie distinta puede explicarse tomando en cuenta que PTP se basa en el número de sustituciones para encontrar la coalescencia, de modo que las longitudes de ramas largas (Figs. 17 y 18) pueden influir en el resultado del análisis (Zhang et al., 2013). Por su parte GMYC se basa en el tiempo para encontrar la coalescencia y al ancestro común más próximo, por lo que depende completamente de la calidad del análisis ultramétrico empleado (Pons et al., 2006; Ceccarelli et al., 2012) y al no tener más secuencias disponibles para *R. macdougalli* y *R. cuneata*, se pudo ver afectado el tamaño poblacional ( $\theta$ ) por lo que el threshold o el punto de transición en el que cada rama representa a una especie, se afecta de tal manera que puede causar un sesgo en el tiempo en que se calculaba (Fujita et al., 2012; Fujisawa y Barraclough, 2013), en el modo “single threshold” este punto se recorrió muy atrás en la escala temporal, de modo que solo se pudieron establecer dos ramas, correspondientes a las dos especies que arroja como resultado, mientras que en el modo “múltiple threshold” en el que se toman en cuenta dos umbrales, estos se sitúan en un tiempo muy reciente donde las ramas concuerdan con los nodos más internos, creando de esta manera una sobreestimación del número de especies, al considerar más eventos de especiación de los que probablemente existen, esta sobrevaloración de especies por parte de GMYCm ya ha sido documentado antes (Esselstyn et al. 2012; Schwarzfeld y Sperling, 2015; Jesús-Bonilla et al., 2017).

El criterio de validación (BFD), tiene resultados muy parecidos en sus dos mejores modelos, ambos consideran que *R. cuneata* y *R. forbesi* son una sola entidad taxonómica y la única diferencia que tienen es si separan o no a los haplotipos de *R. cf. marcellae* como un taxón independiente, el modelo más soportado (K) no reconoce a los haplotipos de *R. cf. marcellae* como especie, lo que no coincide con las observaciones morfológicas, y ya que ambos valores fueron decisivos también se tomó en cuenta el segundo mejor modelo (L), en el que estas

secuencias son reconocidas como un taxón (Bryson Jr et al., 2014; Solano-Zavaleta y Nieto-Montes de Oca, 2018). Por otra parte, BFD parece trabajar bien aun con el uso de un solo loci (Yu et al., 2017), aunque es más exacto al usar datos multiloci provenientes de genes mitocondriales y nucleares en conjunto (Grummer et al. 2014; Leaché et al., 2014).

El número de especies que sugiere cada criterio varía en cuanto a su número y composición; sin embargo, en este trabajo se plantea una hipótesis de límites de especie tomando en cuenta tres observaciones: a) existen especies que solo aparecen en dos métodos y cuentan con solo una muestra cada una, b) hay dos agrupaciones de secuencias que permanecen invariables en todos los métodos (UOGV 3025 + UOGV 3058 + UOGV 3068 y ANMO 4339 + JCSG 22) y c) hay tres grupos (*R. macdougalli*, los ejemplares identificados como *R. cf. marcellae* y el conjunto de *R. cuneata* + los haplotipos de *R. forbesi*) que si bien, no son constantes en todos los modelos, si coinciden en la mayoría de las hipótesis (Fig. 18). De este modo, el estatus específico de las primeras no está soportado, ya que no se encontraron diferencias morfológicas que apoyen estas hipótesis, por lo que son descartadas; las segundas tienen consistencia morfológica y geográfica entre sí, y representan la base de las especies *R. forbesi* y *R. marcellae*; por último los grupos *R. cf. marcellae* y *R. cuneata* tienen apoyo morfológico, ya que todos los ejemplares identificados como *R. cf. marcellae* presentan características morfológicas (mencionadas abajo), diferentes a *R. marcellae* y *R. forbesi* (Smith, 1942; Tylor, 1949; Myers, 1974, Nieto-Montes de Oca y mendelson, 1997), mientras que *R. macdougalli* tiene un menor número de escamas ventrales que todos los ejemplares revisados en este estudio (Myers, 1974). Por otra parte, *R. cuneata* se distingue de las demás especies del grupo *decorata* por tener marca clara en forma de cuña en la parte posterior de la cabeza (Myers, 1974), y aunque esta característica varia en cuanto a su posición, se considera que es taxonómicamente determinante para identificar esta especie (Luría-

Manzano et al., 2014), ninguno de los ejemplares de *R. forbesi* que se revisaron en este trabajo cuentan con esta marca por lo que se descarta que constituyan una misma especie con *R. cuneata*.

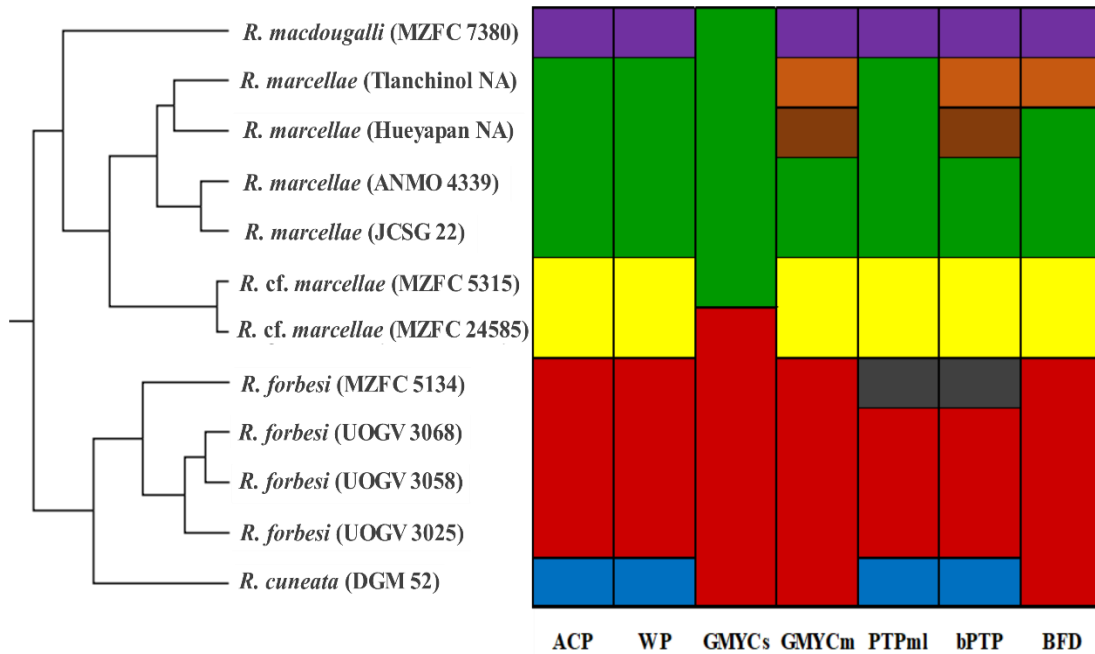


Figura 18. Resultados de cada método utilizado para delimitar especies.

La mayor parte de evidencia incluida: análisis morfológicos, filogenéticos y de límite de especies, sugieren que los haplotipos y ejemplares asignados como *R. cf. marcellae* representan una entidad taxonómica diferente de *R. marcellae* y *R. forbesi*. A diferencia de *R. marcellae*, ninguno de los ejemplares de *R. cf. marcellae* cuenta con vermiculaciones en la cabeza ni un collar nual (Tylor, 1949; Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997), mientras que a diferencia de *R. forbesi*, todos los individuos presentan una línea postocular clara que baja hasta por detrás de la boca y sube para unirse a la línea lateral de manera continua (Fig. 19C), en *R. forbesi* la línea postocular desaparece detrás de la boca, por lo que no es continua con las bandas laterales (Fig. 19A) (Smith, 1942; Myers, 1974). Por su parte, *R. marcellae* forma un clado consistente con la morfología, debido a que todos los ejemplares cuentan con un collar nual (completo o

incompleto) que se extiende desde la línea vertebral hacia las líneas laterales (Fig. 19B) (Taylor, 1949, Myers, 1974; Hernández-García y Mendoza-Quijano, 1994; Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997; Canseco-Márquez et al., 2000), cabe aclarar que aunque la línea clara está presente en algunos ejemplares de *R. forbesi* y *R. cf. marcellae*, esta queda confinada solo a la línea media vertebral, ocupando alrededor de tres escamas de largo, pero en ningún caso se proyecta hacia las líneas laterales como es el caso de todos los ejemplares de *R. marcellae* revisados en el presente trabajo.

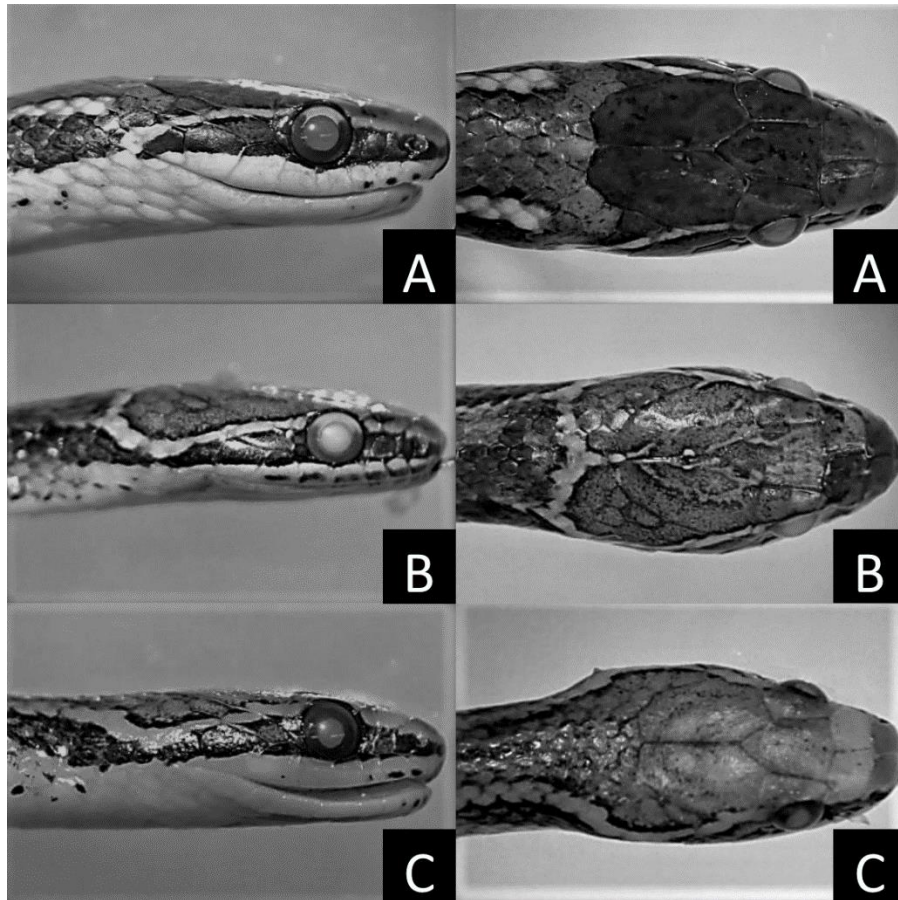


Figura 19. Vistas dorsal y lateral de los patrones de la cabeza en *R. forbesi* (A), *R. marcellae* (B) y *R. cf. marcellae* (C).

Se encontró que algunas de las características históricamente consideradas diagnósticas para separar a *R. marcellae* de *R. forbesi* (Smith, 1942; Tylor, 1949, Myers, 1974; Nieto-Montes de



Oca y Mendelson, 1997) parecen no ser exclusivos de alguna de las especies, por ejemplo: la línea oscura vertebral con los centros claros se consideraba propia de *R. marcellae* y ausente en *R. forbesi* (Tylor, 1949; Myers 1974; Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997); las vermiculaciones en la cabeza supuestamente presentes sólo en *R. marcellae* se encontraron en algunos de los ejemplares de *R. forbesi* (Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997), por lo que estos caracteres no son útiles para separar ambas especies.

### **Consideraciones taxonómicas**

A partir de los análisis realizados en este trabajo y siguiendo el concepto filogenético de especie (Cracraft, 1983), *R. marcellae* y *R. forbesi* son dos especies diferentes con una distribución alopátrica (Fig. 20), y las muestras identificadas como *R. cf. marcellae*, constituyen una especie aun no descrita (*Rhadinaea* sp.) y de distribución simpátrica con respecto a *R. marcellae*, ya que ambas suceden en la parte de la Sierra Norte de Puebla, mientras que la simpatría con respecto a *R. forbesi* es sugerida por el ejemplar UOGV 3026, proveniente de Los Reyes, Veracruz. Esta localidad se encuentra a solo 5 km de distancia de Zongolica, donde se colectaron ejemplares de *R. forbesi* (Fig. 20), la morfología de este ejemplar coincide con las de los demás ejemplares de *Rhadinaea* sp., por lo que su asignación a este grupo parece correcta; sin embargo, no se pudo secuenciar ADN de este individuo, por lo que no es posible afirmar que la distribución de *Rhadinaea* sp. sea continua desde la Sierra Norte de Puebla hasta la Sierra de Zongolica.

### **Descripción de las especies propuestas:**

*Rhadinaea* sp., es una especie que se distribuye en la Sierra Madre Oriental, en la Sierra Norte de Puebla y en la Sierra de Zongolica, Veracruz, en bosque de pino y bosque mesófilo de montaña, se caracteriza por tener una línea postocular clara inclinada que corre desde la parte posterior del ojo hasta por detrás de la boca, sube y sigue continua hacia la línea lateral, la cual abarca alrededor de una escama de grosor. El color base de la parte dorsal es café claro, presenta una línea media vertebral con los centros de cada escama claros, puede presentar una línea clara transversal en la parte de la nuca, pero sólo en la línea vertebral, nunca extendiéndose hacia las líneas laterales. Se diferencia de *R. marcellae* por no tener un collar nucal, de *R. forbesi* y *R. macdougalli*, por la continuidad de la línea postocular hacia la línea lateral y de *R. cuneata* por la ausencia de la mancha en forma de cuña (Myers, 1974, Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997).

*Rhadinaea marcellae*, habita en la parte norte y centro de la Sierra Madre Oriental, desde la región huasteca de San Luis Potosí hasta la Sierra Norte de Puebla, habita principalmente en bosque mesófilo de montaña, se caracteriza por tener una línea clara postocular que llega hasta detrás de las escamas supralabiales, éstas se unen a ambos lados por un collar nucal blanco, que puede ser completo o incompleto en algunos casos, pero siempre extendiéndose hacia los lados de la línea media dorsal, tiene una línea media vertebral con los centros de cada escama claros y algunos ejemplares presentan vermiculaciones (manchas en forma de gusano) en la parte dorsal de la cabeza. Se diferencia de las demás especies del grupo *decorata* por la presencia de un collar nucal completo o incompleto que une a ambos lados las líneas postoculares (Tylor, 1949; Myers, 1974; Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997).

*Rhadinaea forbesi*, se distribuye en el estado de Veracruz, en algunas localidades de la parte sur de la Sierra Madre Oriental, cercanas a la ciudad de Xalapa y en algunos puntos de la Sierra de Zongolica, habita principalmente en bosque de pino, se caracteriza por tener una línea clara postocular inclinada, que desaparece detrás de la última escama supralabial, puede presentar una línea media dorsal oscura y continua, o una línea con los centros de cada escama claros, su color base es café oscuro. Se diferencia de *R. marcellae* por la ausencia de un collar nocal que conecta las líneas laterales, de *Rhadinaea* sp. por la línea postocular que baja hasta por detrás de la línea de la boca, pero no vuelve a subir para juntarse con las líneas laterales, de *R. cuneata* por la ausencia de una mancha blanca en forma de cuña y de *R. macdougalli* por tener un mayor número de ventrales (Smith, 1949; Myers, 1974; Nieto-Montes de Oca y Mendelson, 1997).

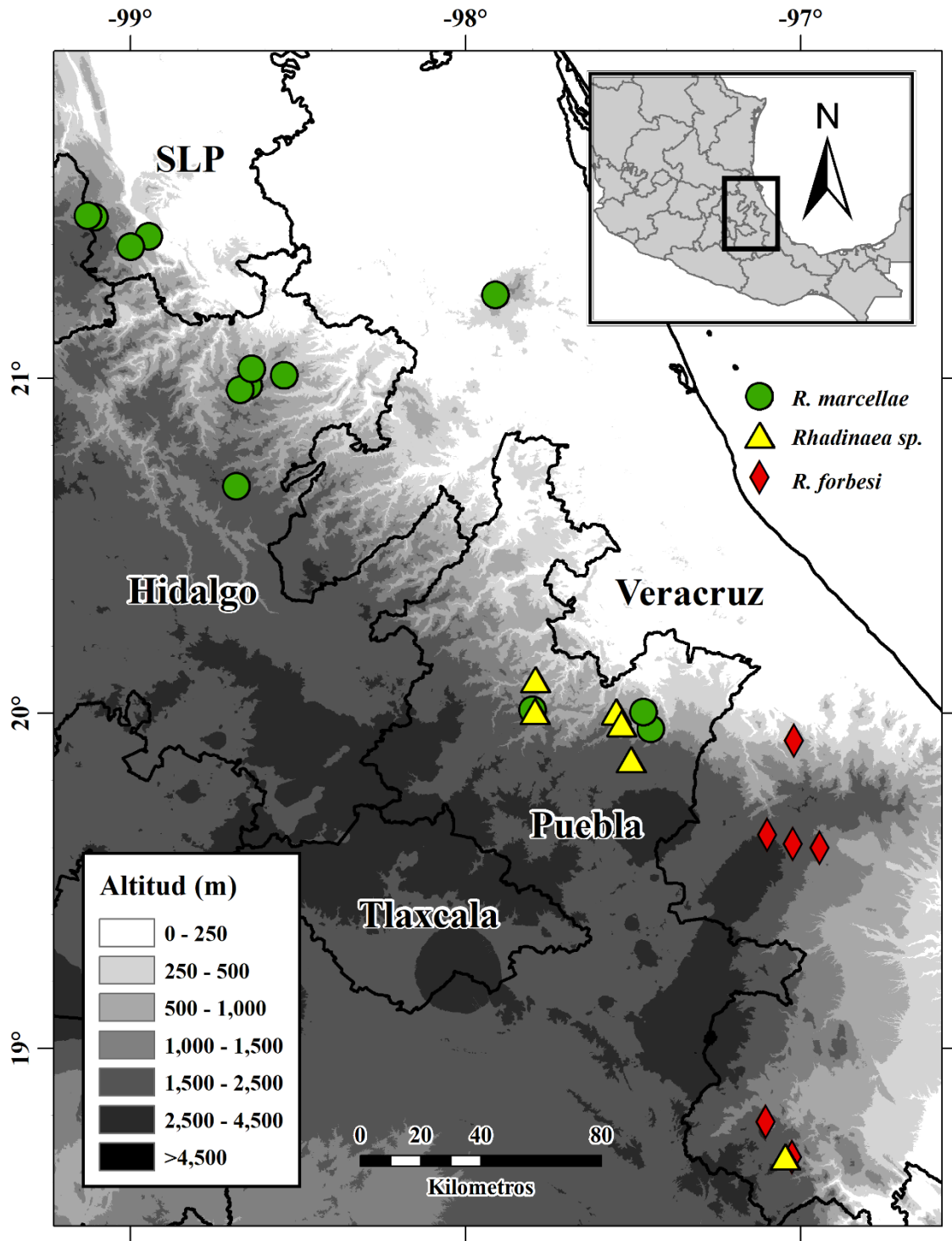


Figura 20. Mapa de distribución de las especies propuestas: *R. marcellae* (círculos verdes), *Rhadinaea* sp. (triángulos amarillos) y *R. forbesi* (rombos rojos).

## Conclusiones

- El análisis filogenético demuestra que *Rhadinaea* sp. forma un taxón monofilético independiente de *R. marcellae* y *R. forbesi*.
- El análisis estadístico comprueba que existen tres entidades morfológicas en el grupo de estudio, las cuales son concordantes con los análisis filogenéticos.
- Los métodos basados en la coalescencia demuestran que en el complejo *marcellae-forbesi* existen al menos tres especies: *R. marcellae*, *R. forbesi* y *Rhadinaea* sp.
- El espécimen documentado por Nieto-montes de Oca y Mendelson (1997) se ajusta con la descripción elaborada para *Rhadinaea* sp., por lo que su asignación a este taxón parece adecuada.
- Es necesario incluir muestras de *R. macdougalli* y *R. cuneata* para resolver mejor las relaciones con respecto a *R. marcellae*, *R. forbesi* y *Rhadinaea* sp. El muestreo de un mayor número ejemplares por cada localidad, además de incluir análisis filogenéticos utilizando datos multiloci, podría conducir a mejores resultados en los métodos utilizados para delimitar especies.

## Literatura citada

- Baker, R. H., Yu, X., y DeSalle, R. (1998).** Assessing the relative contribution of molecular and morphological characters in simultaneous analysis trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(3), 427-436.
- Benignos, M., Ornelas-García, C. P., Lozano-Vilano, M. D. L., García-Ramírez, M. E., y Doadrio, I. (2015).** Filogeografía (*Herichthys*, Perciformes: Cichlidae), nuevos: género (*Nosferatu*) y especie *H. tepehua*. *Ciencia UANL*, 18(76), 76-81.
- Bouckaert, R. R., y Drummond, A. J. (2017).** bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC evolutionary biology*, 17(1), 42.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A. y Drummond, A. J. (2014).** BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10(4), e1003537.
- Bryson Jr, R. W., Linkem, C. W., Dorcas, M. E., Lathrop, A., Jones, J. M., Alvarado-Diaz, J., ... y Murphy, R. W. (2014).** Multiloci species delimitation in the *Crotalus triseriatus* species group (Serpentes: Viperidae: Crotalinae), with the description of two new species. *Zootaxa*, 3826(3), 475-496.
- Canseco-Márquez, L., Gutierrez-Mayen, G., y Salazar-Arenas, J. (2000).** New records and range extensions for amphibians and reptiles from Puebla, México. *Herpetological Review*, 31(4), 259-262.
- Carmona, F. (2014).** Un ejemplo de ACP paso a paso. *Apuntes, Departamento de estadística. Universidad de Barcelona*. [<https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/395026>

70/ejemploACP.pdf]. [Consulta: 23/10/2015].

- Carranza, S. (2002).** Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los Anfibios y Reptiles ibéricos. En J. M. Pleguezuelos, R. Márquez y M. Lizana. (Ed.), *Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España (2a reimpresión)* (550-579). Madrid, España: Dirección General de la Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española.
- Ceccarelli, F. S., Sharkey, M. J., y Zaldívar-Riverón, A. (2012).** Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae: Doryctinae) based on an integrative molecular and morphological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(1), 485-495.
- Cracraft, J. (1983).** Species concepts and speciation analysis. En R. F. Jhonson (Ed.) *Current ornithology* (159-187). Springer, Boston, MA.
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R., Mace, G. M., y Wayne, R. K. (2000).** Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in ecology y evolution*, 15(7), 290-295.
- Cundall, D., Wallach, V. y Rossman, D.A. (1993).** The systematic relationships of the snake genus *Anomochilus*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 109, 275-299.
- De Luna, E., Guerrero, J. A., y Chew-Taracena, T. (2005).** Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica*, 15(3), 351-370.
- De Queiroz, K. (2007).** Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6),

879-886.

**Downie, N. M., y Heath, R. W. (1971).** *Métodos estadísticos aplicados*. Ediciones Del Castillo. Madrid, España. 371p.

**Drummond, A. J., y Rambaut, A. (2007).** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 214.

**Ence, D. D., y Carstens, B. C. (2011).** SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 473-480.

**Esselstyn, J. A., Evans, B. J., Sedlock, J. L., Khan, F. A. A., y Heaney, L. R. (2012).** Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1743), 3678.

**Ezard, T., Fujisawa, T., y Barraclough, T. G. (2009).** Splits: species' limits by threshold statistics. *R package version*, 1(11), r29. Available from: URL <http://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>, last accessed march 2018.

**Fujisawa, T., y Barraclough, T. G. (2013).** Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, 62(5), 707-724.

**Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., y Moritz, C. (2012).** Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology y evolution*, 27(9), 480-488.

**Goyenechea, I. (2007).** Sistemática: su historia, sus métodos y sus aplicaciones en las serpientes



- del género *Conopsis*. *Ciencia ergo-sum*, 14(1).
- Grechko, V. V. (2013).** The problems of molecular phylogenetics with the example of squamate reptiles: Mitochondrial DNA markers. *Molecular Biology*, 47(1), 55-74.
- Grummer, J. A., Bryson Jr, R. W., y Reeder, T. W. (2014).** Species delimitation using Bayes factors: simulations and application to the *Sceloporus scalaris* species group (Squamata: Phrynosomatidae). *Systematic biology*, 63(2), 119-133.
- Hernández-García, E., y Mendoza-Quijano, F. (1994).** *Rhadinaea marcellae* (NCN). Mexico: Hidalgo. *Herpetological Review*, 25(1): 34.
- Hillis, D. M., Huelsenbeck, J. P., y Cunningham, C. W. (1994).** Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science*, 264(5159), 671-677.
- Hillis, D. M., Moritz, C., Mable, B. K., y Meyer, A. (1996).** Molecular Systematics (2nd edn). *Trends in Genetics*, 12(12), 534-534.
- Hillis, D. M., y Bull, J. J. (1993).** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, 42(2), 182-192.
- Hoyos, M. A., Otero, R., Saldarriaga, M., y Jaramillo, N. (2003).** Divergencia morfométrica entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae). *Actualidades Biológicas*, 25(79), 157-165.
- Jackson, D. A. (1993).** Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches. *Ecology*, 74(8), 2204-2214.
- Jesús-Bonilla, V. S., Barrientos-Lozano, L., y Zaldívar-Riverón, A. (2017).** Sequence-based species delineation and molecular phylogenetics of the transitional Nearctic–Neotropical

grasshopper genus *Taeniopoda* (Orthoptera, Romaleidae). *Systematics and Biodiversity*, 15(6), 600-617.

**Jolliffe, I. T. (2002).** Principal component analysis and factor analysis. In Jolliffe, I. T. (Ed.) *Principal component analysis* (second edition) (pp. 115-128). Springer, New York, NY.

**Kass, R. E., y Raftery, A. E. (1995).** Bayes factors. *Journal of the american statistical association*, 90(430), 773-795.

**Kingman, J. F. C. (1982).** The coalescent. *Stochastic processes and their applications*, 13(3), 235-248.

**Kizirian, D., y Donnelly, M. A. (2004).** The criterion of reciprocal monophyly and classification of nested diversity at the species level. *Molecular phylogenetics and evolution*, 32(3), 1072-1076.

**Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016).** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

**Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y., y Guindon, S. (2012).** PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29(6), 1695-1701.

**Lartillot, N., y Philippe, H. (2006).** Computing Bayes factors using thermodynamic integration. *Systematic biology*, 55(2), 195-207.

**Lawson, R., Slowinski, J. B., Crother, B. I., y Burbrink, F. T. (2005).** Phylogeny of the

Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular phylogenetics and evolution*, 37(2), 581-601.

**Leaché, A. D., Fujita, M. K., Minin, V. N., y Bouckaert, R. R. (2014).** Species delimitation using genome-wide SNP data. *Systematic Biology*, 63(4), 534-542.

**Leaché, A. D., y Reeder, T. W. (2002).** Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Systematic biology*, 51(1), 44-68.

**Lee, M. S., Hugall, A. F., Lawson, R., y Scanlon, J. D. (2007).** Phylogeny of snakes (Serpentes): combining morphological and molecular data in likelihood, Bayesian and parsimony analyses. *Systematics and Biodiversity*, 5(4), 371-389.

**Lee, M.S. y Scanlon, J.D. (2002).** Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy, and behaviour. *Biological Reviews*, 77, 333-401.

**Luría-Manzano, R., Ramírez-Bautista, A., y Canseco-Márquez, L. (2014).** Rediscovery of the Rare Snake *Rhadinaea cuneata* Myers, 1974 (Serpentes: Colubridae: Dipsadinae). *Journal of Herpetology*, 48(1), 122-124.

**Martínez, M. Á., Evangelista, V., Basurto, F., Mendoza, M., y Cruz-Rivas, A. (2007).** Flora útil de los cafetales en la Sierra Norte de Puebla, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 78(1), 15-40.

**Morando, M., Avila, L. J., y Sites Jr, J. W. (2003).** Sampling strategies for delimiting species: genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean–Patagonian South America. *Systematic Biology*, 52(2), 159-185.

**Morrone, J. J. (2000).** *Sistemática, Biogeografía, Evolución: Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio*. México: Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, UNAM.

**Myers, C. W. (1974).** The systematics of *Rhadinaea* (Colubridae), a genus of New World snakes. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 153(1), 1-262.

**Myers, C. W. (2011).** A new genus and new tribe for *Enicognathus melanauchen* Jan, 1863, a neglected South American snake (Colubridae: Xenodontinae), with taxonomic notes on some Dipsadinae. *American Museum Novitates*, (3715), 1-33.

**Mayr, E. y Ashlock P.D. (1991).** “Evolutionary Classification”, *Principles of systematic zoology*.

McGraw Hill, Nueva York.

**Nieto Montes de Oca, A. y Mendelson, J. R. (1997).** Variation in *Rhadinaea marcellae* (Squamata: Colubridae), a poorly known species from the Sierra Madre Oriental of Mexico. *Journal of Herpetology*, 124-127.

**Nieto-Montes de Oca, A. (1999).** Sistemática y biogeografía del género *Xenosaurus* (Squamata: Xenosauridae). *Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. Informe final Snib-Conabio proyecto*, (H245).

**Nieto-Montes de Oca, A., Barley, A. J., Meza-Lázaro, R. N., García-Vázquez, U. O., Zamora-Abrego, J. G., Thomson, R. C., y Leaché, A. D. (2017).** Phylogenomics and species delimitation in the knob-scaled lizards of the genus *Xenosaurus* (Squamata: Xenosauridae) using ddRADseq data reveal a substantial underestimation of

diversity. *Molecular phylogenetics and evolution*, 106, 241-253.

**Orrico, V. G., Nunes, I., Mattedi, C., Fouquet, A., Lemos, A. W., Rivera-Correa, M., Iyra, M. L., Loebmann, D., Pimenta, B. V. S., Caramaschi, U., Rodríguez, M. T. y Haddad, F.B. (2017).** Integrative taxonomy supports the existence of two distinct species within *Hypsiboas crepitans* (Anura: Hylidae). *Salamandra*, 53(1), 99-113.

**Peña, C. (2011).** Métodos de inferencia filogenética. *Revista peruana de biología*, 18(2), 265-267.

**Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., ... y Vogler, A. P. (2006).** Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic biology*, 55(4), 595-609.

**Puerto, G., da Graça Salomão, M., Theakston, R. D. G., Thorpe, R. S., Warrell, D. A., y Wüster, W. (2001).** Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 14(4), 527-538.

**Pyron, R. A., Burbrink, F. T., Colli, G. R., Nieto Montes de Oca, A., Vitt, L. J., Kuczynski, C. A., y Wiens, J. J. (2011).** The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular phylogenetics and evolution*, 58(2), 329-342.

**Pyron, R. A., Burbrink, F. T., y Wiens, J. J. (2013).** A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 93.

- R Development, Core Team (2010).** R: A language and environment for statistical computing. *Vienna, Austria. Internet: <http://www.R-project.org>.*
- Rambaut, A. (2012).** FigTree v. 1.4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. Edinburgh, UK: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology.
- Rambaut, A., y Drummond, A. J. (2007).** Tracer, version 1.5. Program distributed by the author. *Edinburgh, UK: University of Edinburgh. Auckland, New Zealand: University of Auckland.*
- Restrepo, L. F., y González, J. (2007).** From pearson to Spearman. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(2), 183-192.
- Ridley, M. (1985).** “The Techniques and Justification of Phenetic Taxonomy”. *Evolution and Classification. The Reformation of Cladism.* Longman, Londres.
- Rieppel, O. (1988).** A review of the origin of snakes. *Evolutionary biology*, 22, 37-130.
- Rivera González, D. E. (2009).** *Estudio comparativo entre especies del género Atractus (Colubridae: Dipsadinae) del Perú: análisis de sus relaciones fenéticas utilizando caracteres de la morfología externa, morfometría y merística* (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima, Perú.
- Robert, C. E. (2004).** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P. V. D., Ayres, D., Darling, A., Hohna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A. y Huelsenbeck, J. P. (2012).** MrBayes 3.2: efficient Bayesian

- phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539-542.
- Ruane, S., Bryson Jr, R. W., Pyron, R. A., y Burbrink, F. T. (2014).** Coalescent species delimitation in milksnakes (genus *Lampropeltis*) and impacts on phylogenetic comparative analyses. *Systematic Biology*, 63(2), 231-250.
- Ruano, F., y Tinaut, A. (2002).** Biodiversidad, clasificación y filogenia. *Evolución: La base de la biología (1. a ed., pp. 293-306)*.
- Sáez, A. G. (2009).** Genes y especies. *Revista Ecosistemas*, 18(1).
- Silvestro, D., y Michalak, I. (2012).** raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity y Evolution*, 12(4), 335-337.
- Sites Jr, J. W., y Marshall, J. C. (2003).** Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology y Evolution*, 18(9), 462-470.
- Smart, U., Sarker, G. C., Arifin, U., Harvey, M. B., Sidik, I., Hamidy, A., kurniawan, N. y Smith, E. N. (2017).** A New Genus and Two New Species of Arboreal Toads from the Highlands of Sumatra with a Phylogeny of Sundaland Toad Genera. *Herpetologica*, 73(1), 63-75.
- Smith, H. M. (1942).** Descriptions of new species and subspecies of Mexican snakes of the genus *Rhadinaea*. *Proc. Biol. Soc. Washington*, 55, 185-192.
- Smith, H. M., y Langebartel, D. A. (1949).** Notes on a collection of reptiles and amphibians from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca. *Journal of the Washington Academy of Sciences*, 39(12), 409-416.

- Solano-Zavaleta, I., y Nieto-Montes de Oca, A. (2018).** Species limits in the Morelet's Alligator lizard (Anguidae: Gerrhonotinae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 120, 16-27.
- Stamatakis, A. (2006).** RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688-2690.
- Stamatakis, A. (2016).** The RAxML v8. 2. X Manual. *Heidelberg Institute for Theoretical Studies*. Available from: <http://sco.h-its.org/exelixis/web/software/raxml/#documentation> (accessed 20 July 2016).
- Statgraphics Centurion, X. V. I. (2013).** Statgraphics centurion XVI software version 16.2. 04. Virginia (USA): StatPoint Technologies Inc, Warrenton.
- Schwarzfeld, M. D., y Sperling, F. A. (2015).** Comparison of five methods for delimitating species in *Ophion* Fabricius, a diverse genus of parasitoid wasps (Hymenoptera, Ichneumonidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 93, 234-248.
- Taylor, D. J., y Piel, W. H. (2004).** An assessment of accuracy, error, and conflict with support values from genome-scale phylogenetic data. *Molecular Biology and Evolution*, 21(8), 1534-1537.
- Taylor, E.H. (1949).** A preliminary account of the herpetology of the state of San Luis Potosi, Mexico. *Univ. Kansas Science Bulletin*, 33 (2): 169-215.
- Tchernov, E., Rieppel, O., Zaher, H., Polcyn, M.J. y Jacobs, L.L. (2000).** A fossil snake with limbs. *Science*, 287, 2010-2012.
- Torre Loranca, M. A., Vogt, R. C., y Luna, M. L. (2002).** *Rhadinaea Forbesi* (Forbes's



- Graceful Brown Snake) Reproduction. *Herpetological Review*, 33(3): 215.
- Vicente-Villardón, J. L. (2006).** Análisis discriminante: introducción. *Universidad de Salamanca: Departamento de estadística.*
- Wallach, V., Williams, K. L., y Boundy, J. (2014).** *Snakes of the world: a catalogue of living and extinct species.* CRC Press.
- Wiens, J. J., y Penkrot, T. A. (2002).** Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic biology*, 51(1), 69-91.
- Yang, Z., y Rannala, B. (2010).** Bayesian species delimitation using multiloci sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9264-9269.
- Yu, G., Rao, D., Matsui, M., y Yang, J. (2017).** Coalescent-based delimitation outperforms distance-based methods for delineating less divergent species: the case of *Kurixalus odontotarsus* species group. *Scientific reports*, 7(1), 16124.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., y Stamatakis, A. (2013).** A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.
- Zúñiga, G., Polaco, O. J., y Vargas, C. F. (2009).** La teoría de la evolución y la genética de poblaciones. *Setenta y cinco años de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*, 395-405.

**Apéndice I.** Cuadro de ejemplares usados en este estudio con sus localidades y coordenadas geográficas, se muestra también que datos se obtuvieron de cada ejemplar (SLP = San Luis Potosí, Alt = Altitud, Sec = secuencia de DNA, Mor = datos morfométricos, Mer = Caracteres merísticos y cualitativos).

<b>Ejemplar</b>	<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Alt</b>	<b>Sec</b>	<b>Mor</b>	<b>Mer</b>
MZFC 24585	<i>cf. marcellae</i>	Xocayucan, Tlatlauquitepec, Puebla.	19.861058	-97.505301	2010	X	X	X
ANMO 4339	<i>marcellae</i>	Finca Santa Mónica, Xilitla, SLP.	21.392457	-98.999368	705	X	X	X
EBUAP 1583	<i>marcellae</i>	Xalpanat, E of Cuetzalan, Puebla.	20.0030556	-97.468888	820		X	X
EBUAP 1592	<i>cf. marcellae</i>	4km SE San Miguel Tzinacapan, Cuetzalan, Puebla.	20.003055	-97.550000	1040		X	X
EBUAP 1593	<i>cf. marcellae</i>	Aprox 150 m Oeste villa Hermosa, Cuetzalan, Puebla.	19.9683333	-97.533333	1480		X	X
Hueyapan NA	<i>marcellae</i>	Hueyapan, Puebla.	19.953484	-97.447581	774	X	X	X
IBH 19726	<i>forbesi</i>	Petlacala, Veracruz.	18.779722	-97.103889	1100		X	X
IBH 29710	<i>forbesi</i>	Petlacala, Veracruz.	18.779722	-97.103889	1100		X	X
IBH 29711	<i>forbesi</i>	Petlacala, Veracruz.	18.779722	-97.103889	1100		X	X
IBH 29712	<i>forbesi</i>	Petlacala, Veracruz.	18.779722	-97.103889	1100		X	X
IBH 29713	<i>forbesi</i>	Petlacala, Veracruz.	18.779722	-97.103889	1100			X
IBH 3845	<i>forbesi</i>	El negro 6km SE las Vigas, Veracruz.	19.917777	-97.020250	607		X	X
IBH 6896	<i>marcellae</i>	Tepango de Rodríguez, Puebla.	20.010000	-97.800000	800		X	X
JAC 26030	<i>marcellae</i>	Municipalidad Tlanchinol: La Cabaña, Hidalgo.	20.978264	-98.647894	1280			
JC01	<i>marcellae</i>	Xilitla, SLP.	21.480343	-99.108050	1280			
JC02	<i>marcellae</i>	Xilitla, SLP.	21.485318	-99.127749	1405			
JCSG 22	<i>marcellae</i>	Rancho San Nicolasillo, Sierra de Otontepec, Veracruz.	21.248326	-97.910317	1064	X	X	X
MZFC 5134	<i>forbesi</i>	8Km NE Xalapa, S Banderillo R. "El Álamo", Veracruz.	19.598389	-96.943643	1548	X		
MZFC 5315	<i>cf. marcellae</i>	25Km NE Zacatlán, Zaragoza-Huachinango, Puebla.	20.099147	-97.790608	600	X		
JCSG 86	<i>forbesi</i>	Finca Santa Martha, Zongolica, Veracruz.	18.674700	-97.025900	1613		X	X
KU 26733	<i>forbesi</i>	Las Vigas, Veracruz.	19.636667	-97.100000	1295			
LCM 1322	<i>marcellae</i>	?	?	?	?			X
LSUMZ 271	<i>marcellae</i>	Xilitla, SLP.	21.423255	-98.945167	439			X

<b>Ejemplar</b>	<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>Latitud</b>	<b>Longitud</b>	<b>Alt</b>	<b>Sec</b>	<b>Mor</b>	<b>Mer</b>
MZFC 31340	<i>marcellae</i>	Meztitlan, Hidalgo.	20.677900	-98.684500	2018		X	X
MZFC 5325	<i>cf. marcellae</i>	Cerca de Tepango de Rodríguez, Puebla.	20.004167	-97.792500	750			X
MZFC 5869	<i>marcellae</i>	5.3 km E Tlanchinol, Arroyo de Apantlazol, Hidalgo.	21.008333	-98.541667	1500			X
Tlanchinol NA	<i>marcellae</i>	Tlanchinol, Hidalgo.	20.965716	-98.672745	1495	X		
UOGV 3025	<i>forbesi</i>	La joya, Acajete, Veracruz.	19.609866	-97.023133	2168	X	X	X
UOGV 3026	<i>cf. marcellae</i>	Los reyes, Veracruz.	18.674728	-97.045455	1791		X	X
UOGV 3058	<i>forbesi</i>	Finca Santa Martha, Zongolica, Veracruz.	18.674900	-97.025700	1618	X	X	X
UOGV 3068	<i>forbesi</i>	Finca Santa Martha, Zongolica, Veracruz.	18.674885	-97.025821	1615	X	X	X
UTA R-12410	<i>marcellae</i>	4.5 km NE Tlanchinol, Hidalgo.	21.028726	-98.638805	1510			X
UTA R-12411	<i>marcellae</i>	4.5 km NE Tlanchinol, Hidalgo.	21.028726	-98.638805	1510			X
UTA R-12412	<i>marcellae</i>	4.5 km NE Tlanchinol, Hidalgo.	21.028726	-98.638805	1510			X
UTA R-12413	<i>marcellae</i>	4.5 km NE Tlanchinol, Hidalgo.	21.028726	-98.638805	1510			X
UTA R-12414	<i>marcellae</i>	4.5 km NE Tlanchinol, Hidalgo.	21.028726	-98.638805	1510			X
UTA R-12415	<i>marcellae</i>	4.5 km NE Tlanchinol, Hidalgo.	21.028726	-98.638805	1510			X
UTA R-12416	<i>marcellae</i>	4.5 km NE Tlanchinol, Hidalgo.	21.028726	-98.638805	1510			X

**Apendice II.** Secuencias usadas en los análisis filogenéticos y de límite de especies

***Coniophanes sp.* (MZFC 15533)**

TCTTGGGTTCAACAACAATGCTCTTTTTATGCAACAAGGGCAGGGGTTGGGTATCTATGATTTTAT  
TTTCCGATCCGCTTTGTAGGGGATTTGTAAGGAAGAATAAGGAAGTACAGGATGGAGGTTGTTTGGCCA  
ATGTGTGTGAATGGTGGTCTACAGGTTAGTGGCTGCTCATGTGATTATTATGAATGTGGTGATTAGT  
GTTTCAAGATATGAGTTGGTAAAGTGGGCGAAAGGTTATTGGTCCGAGGTGGGATGTGTGTGTGAATGG  
TGTTGTGAGTAGGATGGTGAATGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCGAGTTTATTTGGGATCGATCG  
TAGGATTCATAGGCAAAATAGAAAGTACCACTCTGGTTTAAATGTGTTGTGGTGTACTATGGGATTTGC  
TTTGGAGATGTTTTCTGGATCATTAAAA  
NN  
NN  
NN  
NN  
NN  
NN

***Hypsiglena jani* (CAS 228960)**

NN  
TTAGGTATTTATGATTT  
TGTTTTCTGATCAACCCAGGATTGGGTTCAATAATGAAGAATAAGAAGTATAGGATGGAGGTAGTTTGG  
CCGATAGAGGTGAATGGGGGTTCTACTGGTTTGGTGGCTGCTCATGTAATTGTTATGAATGTAGCGATT  
AGTGTTCAAAATATTAGTTGGGTGAGTGGGCGGAAGGCTATGGATCGAACGTTGGATGTGTGTGTGAA  
TGGTGTATGTAAGCAGGATGGCAATTGATATAACTAGGGCTATTGTTCCCTCCAAGCTTATTTGGAATGG  
ATCGTAGAATGCCGTAGGCAAAATAGAAAGTACCACTCTGGTTTATGATGTGTTGTGGTGTACTATTGGAT  
TGGCTTTTGAGAAGTTTTCTGGATCATTAAAAATATTGGGGGTGAATGACAGAATCATAAATAATAGG  
GTGATAAGTAGGGTTAACATTAAGGTGTCTTTGTAAGAGTGGTATGGGTGAAATGGAATTTTGTCAAT  
ATCTGAATTTGTTCCGAGTGGGTTGCTAGAACCTTCGTTGTGGAGGAGTATGATATGGATGGAAGATA  
GTGAAATGATAGCGAATGGGAGGATGAAGTGCAGTGCAAAAGAATCGTGTGAGGGTTGGGTCGTTGAT  
GGAGAAACCACC

***R. bogertorum* (CIG 739)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTAGTTTAAAGCTACTAGGACGAAGATTAGATGTTTATAATTTTGT  
TTTCTGATCAACCTAGTAGGGGGTTTGTAAAGAAAGAATAAGAAGTATAGGATGGAGGTGTTTGGCTG  
ATAATGATGAATGGTGGCTCTACTGGTTTAGTGGCTGCTCATGTGATTGTTATGAATGTGGCAATTAAT  
ACTCAGAACATAAGTTGAGTTAGTGGACGGAATGTTATTGGTCGTATGTGGGATGTGTGAGTAAATGG  
GGTTGTAAGTAGAATAGCGATGGATATAATCAAGGCCAAGGCTCCCCCTAATTTATTCCGAATTGATC  
GTAGAATTCGTAAGCAAATAAGAAGTATCATTCTGGTTTATGATGTGTTGTGGTGTACTATAGGGTTAG  
CTTTAGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGAGAAAATGATAGGATAATGAATATCAGGGTA

ATAATAATGTAATNN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

**R. cf. Marcellae (MZFC 24585)**

CCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGACTAAGTGTTTATAATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCAGTAGTGGGCTGGTGAAGAAATAAAAAGTATAGGATGGAGGTCGTTTGTCCAA  
TAAGTGTAATGGTGGCTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCACGTGATTGTTATGAATGTAGCGATCAGG  
GTTCAAAATATAAGTTGGGTTAGTGGACGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGGGTGAATGG  
GGTTGTGATAAGGATAGCGATAGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCCAGTTTATTTGGGATAGATC  
GTAGAATTCCGTAGGCAAATAGGAAGTATCATTCTGGTTTGATGTGTTGTTGGTGTACCATGGGGTTAG  
CTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGGGAGAATGTTAAGATGATAAATATTATAGTA  
ATAAGGATGGTTAATATTATGGTGTCTTTGTAGGAGTGGTATGGGTGAAATGGGATTTTGTCAATGTCT  
GAGTTTGTTCCTAGGGGGTTGTCCGAGCCTTCATCGTGTTCCTCAATATGTGGATTGAGGATATTAAG  
ATGATGGCGAATGGTACGATGAAGTGTAAATGCGAAGAATCGTGTCCAGGCTTGGGTCATTAATAGAGA  
AACCCCC

**R. cf. marcellae (MZFC 5315)**

TCTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGACTAAGTGTTTATAATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCAGTAGTGGGCTGGTGAAGAAATAAAAAGTATAGGATGGAGGTCGTTTGTCCAA  
TAAGTGTAATGGTGGCTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCACGTGATTGTTATGAATGTAGCGATCAGG  
GTTCAAAATATAAGTTGGGTTAGTGGACGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGGGTGAATGG  
GGTTGTGATAAGGATAGCGATAGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCCAGTTTATTTGGGATAGATC  
GTAGAATTCCGTAGGCAAATAGGAAGTATCATTCTGGTTTGATGTGTTGTTGGTGTACCATGGGGTTAG  
CTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGGGAGAATGTTAAGATGATAAATATTATAGTA  
ATAANN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

**R. cuneata (DGM 52)**

NNNNNNNNNNNNCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGATTAGGTATTTATGATTTTG  
TTTTCTGACCAGCCCAGTAATGGGCTGGTGAAGAAATAAAAAGTATAGAATGGAGGTTGTTTGTCC  
AATAAGTGTAATGGTGGTCTACTGGTTTAGTGGCGGCTCATGTAATTGTTATGAATGTAGCGACTAA  
GGTTCAAAATATAAGTTGGGTTAGTGGGCGGAATGTTATTGGTCGTACGTGGGCTGTGTGAGTGAATG  
GGGTTGTAGTAAGAATAGCAATAGATATGATTAGGGCTATGGTTC CCCAGTTTATTTGGGATTGATC

GTAGAATTCCGTAGGCCAAATAAGAAGTACCACCTCTGGTTTAATGTGCTGTGGTGTACCAGGGGGTTA  
GCTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCATTAAGATGTTGGGGGAGAATGTTAAAATAATGAATAATAGAGT  
AATGAGANNN  
NN  
NN  
NN

***R. decorata* (MZFC 13133)**

TCCGTGGACAAGAACACGCTTTAAAGGTTTAAGCTATTAGAGCAGTGGTTAGGTATTTATGATTTTGT  
TTTCTGATCAGCCAGTAGGGGGTTTGTGATGAAGAAAAGGAAGTATAGAATGGAGGTGTTTGTCCA  
ATTAGAGTAAATGGGGGTTCTACGGGTTTGGTGGCTGCTCATGTAATTGTTATGAATGTGGCAATTAG  
GGTTCAGAATATAAGTTGGGTTAGGGGTCGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGATGTGTGGGTAATG  
GTGTTGTGAGAAGGATGGCAATGGATTTACTAGGGCTAAGGTTCCGCCTAGTTTGTGGGATAGAT  
CGGAGAATTCCGTAGGCCAAATAGGAAATATCATTCCGGGTTTAATGTGTTGTGGTGAACCATGGGGTT  
AGCTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTGAAGATGTTAGGGGTGAATGATATAATAATGAATAGTAGGG  
TAATAAGAATAATAAAA  
NN  
NN  
NN  
NN

***R. forbesi* (MZFC 5134)**

TCTTTGGTTTACCAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGGCTAAGTGTTTATGATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCATTAAATGGGCTGGTGTGAAGAATAAAAAGTATAGAATGGAGGTGTTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGCGGCTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTAATTGTTATGAATGTAGCGACTAAG  
GTTCAAATATAAGTTGGGTTAGTGGGCGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGAGTGAATGG  
GGTTGTAATAAGGATAGTGATAGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCTAGTTTATTTGGGATTGATCG  
TAGAATTCCGTAGGCCAAATAGGAAATATCACTCTGGTTTAATGTGCTGTGGTGTACCAGGGGGTTGG  
CTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCATTAAAAATGTTGGGAGAGAATGTTAAGATGATAAATAATAGAGTA  
ATAAGAAAGGTTACTACTATGGTGTCTTTGTAGGAGTCATATGGGTGTAATGCGATTTTGTCAAAGTCT  
GAGCATGTTCCTAGGTGCTCGCTGGAGCCTTCATATTTTGTATGATTCATCCGAATGGGACATAGTGAG  
ATGATGGCGAATGGTAAGATGAAGTGAATGCGAACAATCGTGTTAGGGTTGGGTCTGTAATGGACAA  
GCCCC

***R. forbesi* (UOGV 3025)**

TCTTTGGTCCCAAGAACCATGCTCTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGGCTAAGTGTTTATGATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCATTAAATGGGCTGGTGTGAAGAATAAAAAGTATAGAATGGAGGTGTTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGTGGCTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTAATTGTTATGAATGTAGCGACTAAG

GTTCAAATATAAGTTGGGTTAGTGGGCGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGAGTGAATGG  
GGCTGTAATAAGGATAGTGATAGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCTAGTTTATTTGGGATTGATCG  
TAGAATTCGGTAGGCAAATAGGAAGTATCACTCTGGTTTAAATGTGCTGTGGTGTACCAGGGGGTTGG  
CTTCTGAGAAGATTGCTGGGTCATTAAAAATGTTGGGAGAGAATGTTAAGATGATAATTTATAGAGTA  
ATAATAAGGGTCAGTATTAGGGTGTCTTTGTAGGAGTGATATGGGTGGAATGGGATTTTGTCAATGTC  
TGAGTTTATTCCTAGGGGGTTGCTGGACCCTTCATTGTGAAGGAGTATAATGTGAATTGAGGATAGTG  
AGATGATGGCGAATGGTAAGATGAAGTGTAAGTGCAGAAATCGTGTTAGGGTTGGGTCATTAATGGA  
GAAGCCCC

***R. forbesi* (UOGV 3058)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGGCTAAGTGTATGATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCATTAATGGGCTGGTGATGAAGAATAAAAAGTATAGAATGGAGGTTGTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGCGGTTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTAATTGTTATGAATGTAGCGACTAAG  
GTTCAAATATAAGTTGGGTTAGTGGGCGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGAGTGAATGG  
GGTTGTAATAAGGATAGTGATAGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCTAGTTTATTTGGGATTGATCG  
TAGAATTCGGTAGGCAAATAGGAAGTATCACTCTGGTTTAAATGTGCTGTGGTGTACCAGGGGGTTGG  
CTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCATTAAAAATGTTGGGAGAGAATGTTAAGATGATAAATAATAGAGTA  
ATAAGAAGGGTAAGTATTAGGGTGTCTTTGTAGGAGTGATATGGGTGAAATGGGATTTTGTCAATGTC  
TGAGTTTGTCCCTAGGGGGTTGCTGGATCCCTTCATTGTGAAGGAGTATAATGTGAATTGAGGATAGTG  
AGATGATGGCGAATGGTAAGATGAAGTGTAAGTGCAGAAATCGTGTTAGGGTTGGGTCATTAATGGA  
GAAGCCCC

***R. forbesi* (UOGV 3068)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGGCTAAGTGTATGATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCATTAATGGGCTGGTGATGAAGAATAAAAAGTATAGAATGGAGGTTGTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGCGGTTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTAATTGTTATGAATGTAGCGACTAAG  
GTTCAAATATAAGTTGGGTTAGTGGGCGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGAGTGAATGG  
GGTTGTAATAAGGATAGTGATAGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCTAGTTTATTTGGGATTGATCG  
TAGAATTCGGTAGGCAAATAGGAAGTATCACTCTGGTTTAAATGTGCTGTGGTGTACCAGGGGGTTGG  
CTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCATTAAAAATGTTGGGAGAGAATGTTAAGATGATAAATAATAGAGTA  
ATAAGAACGTAAAAATNN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

***R. fulvivittis* (JLAL 171)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTAATGTAAGCTACTAGGACTAAGACTAGGTATTTATGATTTTGT  
TTTCTGTTCAACCCAGTACTGGGTTTGTGATGAAGAATAAAAAGTATAAAATGGAGGTTGTTTGGCCA  
ATAATGGTAAATGGCGGTTCTACTGGTTTGGTGGCTGCTCATGTGATTGTTATAAATGTGGCGATTAAT  
ACTCAGAAAATAAGTTGAGTTAGTGGACGGAAATGTTATTGGTCGTATGTGGGATGTGTGGGTAAATGG  
GGCTGTAAGTAGAATAGCGATGGATATAATCAAGGCCAAGGTTCCCCCAACTTATTTGGAATTGATC  
GTAGAATTCGTAAGCAAATAGGAAGTACCCTCTGGTTTAATGTGTTGTGGTGTACTATGGGGTTG  
GCTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTCGAAGATGTTAGGGGTAAATGATAAGATGATAAATATTAGGGT  
GATGATAGTGGTTAGTATTAGGGTGTCTTTATAGGAGTGATAGGGGTGAAATGGGATTTTGTCAATAT  
CTGAGTTTGTCCCCAGAGGGTTGTTGGAGCCCTCATTATGAAGAAGTATGATATGGATGGAAGACAGT  
GAGATGATGGCAAATGGTAAGATAAAGTGAAGTGCGAAGAATCGTGTTAAGGTGGGATCATTAAATAG  
AGAAGCCCC

***R. gaigeae* (AMH 674)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACCAGAACTAAGACTAAGTGTATAAATTTATT  
TTCTGACCAACCCAGTAATGGATTCAATAATGAAGAATAGGAAGTATAGGATGGAGGTTGTTTGGCTAA  
TAAGGGTGAATGGGGTTCTACTGGTTTGGTGGCTGCTCAAGTGATTGTTATAAATGTAGCGACTAGT  
GTTCAAATGTAAGTTGATTAGGGGGCGGAATGTTATTGGCCGTATGTGTGATGTGTGGGTAAATGG  
GGTTGTGATTAGAATAGTAATTGATATGATTAAGGCTAAGGTGCCCCCAAGTTTATTCGGGATAGATC  
GTAGAATTCGTAAGCAAATAAGAAATATCATTCCGGTTTAATGTGTTGTGGTGTACTATGGGATTGG  
CCTTTGAAAAGTTCTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGGGAGAATGTCAGGATAATAAATAGTGAGGTG  
ATAAGGGTGGTTAATATTATAATATCTTTGTAGGAGTGGTAGGGGTGGAATGGGATTTTATCAATATCT  
GAGTTTGTTCCTAGTGGGTTGTTAGAGCCFTCGCTATGTAGGAGTATGATGTGAATGGAGGATAATGA  
GATAATAGCGAATGGTAGGATAAAGTGTAGTGCAAAGAATCGTGTTAAGGTGGGATCATTAAATGGAG  
AAACCCCC

***R. godmani* (ENS 7810)**

NNNNNNNNNNNNCAAGAACAATGCTTTAGATTAAGCTACTAGAGCTGTGGCTAGGTATTTATAAATTTTG  
TTTTCTGATCAACCCAATATTGGGTTGATCATGAAGAATAAAAAGTATAAGACAGAGGTTATTTGGCC  
AATAAGGGTGAATGGTGGTTCTACGGGTTTGTGGCGGCTCATGTCATTGTTATGAATGTGGCGATTA  
GTGTTCAAAATATGAGTTGGGTTAGTGGGCGGAAAGTTATTGATCGTACACGGGATGTGTGGGTAAAT  
GGTGCTGTGAGTAAGATAGCGATTGCTATAAGTAGGGCTAGGGTCCCTCCTAGTTTATTTGGGATTGAT  
CGTAGGATGCCGTAAGCAAACAGAAAGTATCACTCCGGTTTAATATGTTGTGGTGTACCATGGGGTT  
AGCTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCATTAACAAGTTTGGAGTGAATGCTATAATAATAAATNNNNNNNN  
NN  
NN



NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

***R. hesperia* (ISZ 531)**

NNNNNNNNNNNCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGGACCAGGACTAGGTGTTTATGATTTTG  
TTTTCTGATCAACCTAGTATTGGGTTTGTAAAGAATAAGAAGTATAGAATAGAGGTTGTTTGACC  
AATAAGGGTAAATGGTGGTTCTACTGGTTTGGTAGCAGCTCATGTAATTGTTATGAATGTGGCGATTA  
ATATTCAAAATATAAGTTGGGTTAGTGGACGGAATGTTATTGGTCGTATGTTGGACGTGTGCGTAAAT  
GGGATTGTGAGTAGAATAGCGATGGATATAATCAAGGCCAAAAGTTCCTCCCACTTATTTGGAATTGA  
TCGTAGAATTCGTAAGCAAATAGGAAATACCCTCTGGTTTAAATGTGCTGTGGTGTACTATAGGGTT  
GGCTTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCAATAAAGATGTTGGGGGTGAATGATAGGATTATAAATATTATGGT  
AATAAGAATTGTTAATATTAATGTGTCTTTATAGGAGTGATATGGGTGAAATGGGATTTTATCAATATC  
TGAGTTTGTTTCTAAGGGGTTATTGGAGCCTTCATTGTGAAGGAGAATAATGTGGATGGAGGATAGTG  
AGATAATGGTAAATGGTAGAATGAAGTGAAGTGCAGAAGAATCGTGTCAGGGTGGGGTCATTAATGGA  
GAAACCCCC

***R. laureata* (AZR 211)**

NNNNNNNNNNNCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAAGCTGAGACTAAGTGTTTATAATTTTG  
TTTTCTGATCAACCTAATAATGGATTAGTAATGAAAAATAGAAAGTATAGGGTGGAGGTTGTTTGGCC  
AATGAGGGTAAATGGGGGTTCTACTGGTTTGTGCTGCTCAAGTGATTGTGATAAATGTGGCGATTA  
GGGTTCAGAAATATAAGTTGTTATTAGGGGGCGGAATGTTATTGGTCGTACGTGAGATGTGTGGGTAAAT  
GGGGTTGTAATTAGAATAGTAATTGATATAATTAGGGCTAATGTGCCTCCTAGCTTGTTTGGGATTGAC  
CGTAAGATTCCATAGGCAAATAGGAAATATCACTCAGGTTTAAATGTGTTGTGGTGTACTATGGGGTTT  
GCTTTAGAGAAGTTTTCTGGGTGCTTGAAAATGTTAGGGGTGAATGTTAGGATAATAAATAATAGGGT  
AATAAGGAAGGTAAATATTAGGGTATCTTTGTAGGAATGATATGGGTGGAATGGGATTTTGTCAATGT  
CTGAGTTTGTTTCTAAGGGGTTGTTAGAGCCTTCATTGTGATAGGAGTATGATGTGGATGGAGGATATTG  
AGATGATGGCGAACGGTAGAATAAAATGGAGTGCGAAGAATCGTGTTAGAGTGGGGTCATTAATGGA  
AAACCCCC

***R. macdougalli* (MZFC 7380)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTAATTTAAGCTACTAGAAGCTAAGACTAAGTGTTTATGATTTTGT  
TTCTGATCAACCCAGTAGTGGGCTGGTGATAAAGAATAAAAAAGTATAGAATGGAGGTCGTTTGTCCGA  
TAAGTGTAATGGTGGTTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTAATTGTTATAAATGTGGCGACTAGGG  
TTCAGAATATAAGTTGGGTTAATGGGCGGAATGTTATTGGTCGTATGTGGGCTGTGTGAGTGAATGGG  
GTTGTAATAAGAATAGCGATAGACATAATTAGGGCTATAGTTCCTCCCTAATTTATTAGGGATAGATCG

TAGAATTCCGTAGGCAAATAGGAAGTACCACTTCTGGTTTAAATGTGTTGTGGTGTACTATGGGGTTAGC  
TTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTGAAAATGTTGGGGGAGAATGTTAAGATAATAAATAACAGGGCAA  
TAAGAATGGTTAATATTATCANN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNN

***R. marcellae* (ANMO 4339)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGACTAAGTGTATAAATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCAGTAGTGGGCTGGTGATGAAGAATAAAAAGTATAGGATGGAGGTTGTTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGTGGTTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTGATTGTTATGAATGTAGCGACTAGGG  
TTCAAATATAAGTTGGGTTAGTGGGCGGAATGTTATTGGTTCGTACATGGGCTGTGTGGGTAAATGGG  
GTTGTAATAAGGATAGCGATGGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCCAGTTTATTTGGGATAGATCGT  
AGAATTCCGTAAAGCAAATAGGAAGTATCATTCGGGTTTGATGTGTTGTGGTGTACCATGGGGTTAGC  
TTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGGGAGAATGTTAAGATGATAAATATTATAGTAA  
TAAGTCTGTACAGNN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNN

***R. marcellae* (Hueyapan NA)**

TCTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGACTAAGTGTATAAATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCAGTAGTGGGTTGGTGATGAAGAATAAAAAGTATAGGATGGAGGTTGTTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGTGGTTGTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTGATTGTTATGAATGTAGCGACTATGG  
TTCAAATATAAGTTGGGTTAGTGGACGGAATGTTATTGGTTCGTACATGGGCTGTGTGGGTGAATGGG  
GTTGTAATAAGGATAGCGATGGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCCAGTTTATTTGGGATAGATCGT  
AGAATTCCGTAGGCAAATAAGAAGTATCATTCGGGTTTGATGTGTTGTGGTGTACCATGGGGTTAGC  
TTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCATTAAAAATGTTGGGGGAGAATGTTAAGATGATAAATATTATAGTAA  
TAAGTCTGGTATCATGANNN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNN

***R. marcellae* (JCSG 22)**

TCTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGACTAAGTGTATAAATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCAGTAGTGGGCTGGTGATGAAGAATAAAAAGTATAGGATGGAGGTTGTTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGTGGTTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTGATTGTTATGAATGTAGCGACTAGGG

TTCAAAATATAAGTTGGGTTAGTGGGCGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGGGTAAATGGG  
GTTGTAATAAGGATAGCGATGGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCCAGTTTATTTGGGATAGATCGT  
AGAATTCCGTAAGCAAATAGGAAGTATCATTCCGGGTTTGATGTGTTGTGGTGTACCATGGGGTTAGC  
TTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGGGAGAATGTTAAGATGATAAATATTATAGTAA  
TAAGATGTATTNN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

***R. marcellae* (Tlanchinol NA)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACTAGAACTAAGACTAAGTGTATAAATTTTGT  
TTCTGATCAGCCCAGTAGTGGGCTGGTGAATGAAGAATAAAAAGTATAGGATGGAGGTTGTTTGTCCAA  
TAAGTGTGAATGGTGGTTCTACTGGTTTGGTGGCGGCTCATGTGATTGTTATGAATGTAGCGACTAGGG  
TTCAAAATATAAGTTGGGTTAGTGGACCGGAATGTTATTGGTCGTACATGGGCTGTGTGGGTGAATGGG  
GTTGTAATAAGGATAGCGATGGATATAATTAGGGCTATGGTTCCTCCCAGTTTATTTGGGATAGATCGT  
AGGATTCCGTAGGCAAATAGGAAGTATCATTCCGGGTTTGATGTGTTGTGGTGTACCATGGGGTTAGC  
TTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCATTA AAAATGTTGGGGGAGAATGTTAAGATGATAAATATTATAGTAA  
TAAGGATGGTTAATATTATGGTGTCTTTGTAGGAGTGGTATGGGTGAAATGGGATTTTTGTCTATGTCTG  
AATTAGTTCCTACGGGCCTATAGGAGCCTTCCTTGTGTACAGCCCTAATGTGGATAGACTATACTGAGA  
TGATGGCTAATTAAGTAATANNN  
NNNNNNNN

***R. montana* (MZFC 8528)**

TCTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACCAGAACTAAGACTAAGTGTATAAATTTTGT  
TTTCTGACCAACCCAGTAATGGATTCAATAATGAAGAATAGGAAGTATAGGATGGAGGTTGTTTGGCTA  
ATAAGGGTGAATGGGGGTTCTACTGGTTTGGTGGCTGCTCAAGTGATTGTTATAAATGTAGCGACTAG  
TGTTCAAAATGTAAGTTGATTAAGGGGGCGGAATGTTATTGGCCGTATGTGTGATGTGTGGGTAAATG  
GGGTTGTGATTAGGATAGTAATTGATATGATTAAGGCTAAGGTGCCCCAGTTTATTTGGGATAGAT  
CGTAGAATTCCGTAGGCAAATAAGAAATATCATTCCGGTTTAATGTGTTGTGGTGTACTATAGGATTG  
GCCTTTGAAAAGTTCTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGGGAGAATGTCAGGATAATGAATAGTAGGGT  
AATAATTAGGGTTAATATTAGGGTGTCTTTGTAGGAGTGGTATGGGTGGAATGGGATTTTTGTCAATGTC  
TGAGTTTGTTCCTAAAGGGTTGTTGGAGCCTTCATTGTGTAGAAGAATGATGTGGATTGAGGATAGTG  
AGATGATGGCGAATGGCAAGATAAAGTGAAGTGCGAAGAATCGTGTTAATGTAGGGTCACCAATAGA  
GAATCCCC

***R. myersi* (ANMO 3887)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATGTTAAGCTACTAGGACTAAGACTAGGTATTTATGATTTTGT  
TTCTGATCAACCTAGTATTGGGTTTGTGATGAAGAATAAGAAATATAAAATGGAGGTTGTTGGCCAA  
TGATGGTGAATGGTGGTTCTACTGGTTTGGTGGCTGCTCATGTAATTGTTATGAATGTGGCAATTAATA  
CTCAAAATATAAGTTGGGTTAGTGGACGGAATGTTATTGGTCGTATGTGGGATGTGTGGGTAAATGGG  
GTTGTAAGTAGAATAGCGATGGATATAATCAAGGCCAAGGTTCCCCCTAATTTATTTGGAATTGATCG  
TAGAACTCCGTAAGCAAATAGGAAATATCATTCTGGTTTGTGTTGTGGTGTACTATGGGGTTGGC  
TTTTGAGAAGTTTTCTGGGTCGTTAAAGATGTTGGGGATAAATGATAGAATGATGAATATCAATGTGC  
TNN  
NN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

***R. quinquelineata* (MXC NA)**

TCTTTGGTTTTCAAGAACAATGCTTTATTTTAAGCTACCAGAACTAAGACTAAGTGTATAAATTTTGT  
TTCTGACCAACCCAGCAATGGACTCATAACGAAGAATAGGAAGTATAGGATGGAGGTTGTTGGCTAA  
TAAGGGTGAATGGGGGTTCTACTGGTTTGGTGGCTGCTCAAGTGATTGTTATAAATGTAGCGACTAGT  
GTTCAAAATGTAAGTTGATTAGGGGGCGGAATGTTATTGGCCGTATGTGTGATGTGTGGGTAAATGG  
GGTTGTAATTAGGATAGTAATTGATATGATTAAGGCTAAGGTGCCCCCTAGTTTATTTGGGATAGATCG  
TAGAATTCCGTAGGCAAATAAGAAATATCATTCCGGTTTAAATGTGTTGTGGTGTACTATAGGATTGGC  
CTTTGAAAAGTTTTCTGGGTCGTTAAAAATGTTGGGGGTGAATGTTAGGATAATGAATAGTAGGGTAA  
TAATTAGGGTTAATATTAGGGTGTCTTTGTACGATTGGTCTGGGTAGAATGGGATTTTGTCAATGTCCA  
AGTTTGTTCCATAAAGGGTTGTTGGAGCCCTCATTGTGAAGAACAATGATGTGGATTGCCGACAGTGAG  
ATGATGACAAATGGTAAGATAAAATGAAATGCCAAGAATCGTGTAATGTAGGGTCACCAATATAGA  
ACCCGCC