



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Delimitación Biogeográfica y Molecular de
Centruroides limpidus (Karsch, 1879) (Scorpiones:
Buthidae), un Alacrán de Importancia Médica del
Centro-Sur de México**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

FERNANDO OSCAR BEJARANO MENDOZA



DIRECTOR DE TESIS:

EDMUNDO GONZÁLEZ SANTILLÁN

Ciudad Universitaria CD. MX. 2022



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del Asesor.

Dr.
Edmundo
González
Santillán

2. Presidente

Dr.
Fernando
Álvarez
Padilla

3. Vocal

Dr.
Javier
Ponce
Saavedra

4. Datos del Sinodal 1

Dr.
Rubí Nesli
Meza
Lázaro

5. Datos del Sinodal 2

Dr.
Marysol
Trujano
Ortega

Datos del alumno.

Bejarano
Mendoza
Fernando Oscar
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
416016686

Datos de la tesis.

Taxonomía y distribución de *Centruroides limpidus*
Sistemática
2022

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

La inspiración y posibilidad de realizar esta investigación se la debo a la enorme entrega académica del doctor Edmundo González Santillán, quien me orientó a cada paso de la realización del estudio y la construcción del manuscrito. Sin sus comentarios y consejos hubiera sido imposible concluir con este proyecto. También quisiera expresar mi agradecimiento al doctor Fernando Álvarez Padilla quien, junto con el doctor González, me inculcaron las bases de la investigación y pensamiento científico. Su instrucción ha sido fundamental en mi desarrollo intelectual y académico. Finalmente, quisiera agradecer al resto de los miembros del Laboratorio de Aracnología de la Facultad de Ciencias la Universidad Nacional Autónoma de México. Su apoyo en advocación de profesores y amistades me mostró las numerosas realidades a la que nos enfrentamos en la academia y en la vida personal.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

La combinación de entrega, sacrificio, confianza y responsabilidad que me han concedido mis padres a lo largo de mi trayectoria académica es la precondition sin la cual este texto ni siquiera podría existir. Es por esto que Patricia Mendoza Aguilera y Fernando Oscar Bejarano Sánchez son las personas a las que más agradecimientos quisiera conceder. Con ambos tuve el placer de recorrer este camino, dándome la oportunidad de demostrarles mi potencial y convicción de superarme constantemente. Gracias por su apoyo emocional y económico durante tantos años, es algo que sé nunca podré retribuir y que nunca esperarían que hiciera. También quisiera incluir a mi hermano Sebastián Bejarano Mendoza, quien me ha acompañado durante los momentos más importantes de mi vida y cuyo apoyo y camaradería me han sido importantísimos en avanzar con mi investigación y terminar mi carrera universitaria. Finalmente, quisiera incluir a todas las personas que me acompañaron desde que llegué a la Ciudad de México a estudiar la licenciatura en Biología y a quienes fueron llegando a lo largo de esa aventura. A mis amigos de la facultada, en quienes sabía que podía confiar y que me ayudaron a salir adelante a lo largo de la carrera. A mis amigos de la preparatoria y secundaria y algunos otros que me han seguido durante toda mi vida. Finalmente, agradezco a todos mis profesores e investigadores que me han abierto las puertas y permitido desarrollarme como profesionista.

ÍNCIDE

1.- INTRODUCCIÓN.....	6
2.- ANTECEDENTES.....	14
2.1.- Generalidades de Scorpiones.....	14
2.2.- Morfología de Scopriones.....	15
2.3.- Sistemática del orden Scorpiones.....	17
2.4.- El género <i>Centruroides</i> Marx 1890 en México.....	19
2.5.- Historia taxonómica de <i>Centruroides</i> mexicanos.....	20
2.6.- Taxonomía y distribución de <i>Centruroides limpidus</i> (Karsch, 1879).....	22
2.7.- Análisis filogenéticos previos para delimitar a <i>Centruroides limpidus</i>	26
3.- JUSTIFICACIÓN.....	29
4.- HIPÓTESIS.....	29
5.- OBJETIVOS.....	30
5.1.- Objetivos particulares.....	30
6.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
6.1.- Muestreo taxonómico.....	31
6.2.- Secuenciación de marcadores moleculares.....	31
6.3.- Análisis filogenéticos.....	35
6.4.- Métodos de delimitación de especies.....	37
6.5.- Obtención de datos georreferenciados y mapas de distribución.....	39
6.6.- Modelado de distribución potencial.....	40
7.- RESULTADOS.....	43
7.1.- Análisis filogenéticos.....	43
7.2.- Análisis de delimitación de especies.....	50
7.3.- Delimitación geográfica.....	53
7.4.- Modelo de distribución potencial.....	55
8.- DISCUSIÓN.....	61

8.1.- Las evidencias moleculares sugieren que los clados del este y oeste de <i>Centruroides limpidus</i> pertenecen a linajes independientes.....	61
8.2.- Los patrones biogeográficos de las poblaciones de <i>Centruroides limpidus</i> muestran cierta concordancia con su estructura genética.....	64
8.3.- Posición filogenética de <i>Centruroides limpidus</i> dentro del grupo de especies <i>elegans</i>	68
8.4.- La distribución de las variables climáticas bioclimáticas que tienen incidencia sobre la distribución de las poblaciones de <i>C. limpidus</i> provee de información sobre posibles estrategias epidemiológicas contra la IPPA.....	69
9.- CONSIDERACIONES FINALES.....	71
10.- CONCLUSIONES.....	73
APÉNDICE A.....	75
APÉNDICE B.....	79
APÉNDICE C.....	87
LITERATURA CITADA.....	90

Delimitación biogeográfica y molecular de la especie *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) (Scorpiones: Buthidae), un alacrán de importancia médica del centro-sur de México

1. INTRODUCCIÓN

Los principales retos de la sistemática son dilucidar el origen y relaciones filogenéticas de la biodiversidad y su organización en un sistema lógico. Dos principales esquemas para esto son los análisis filogenéticos con base en evidencia morfológica y molecular para proponer hipótesis sobre la historia evolutiva de las especies; y la taxonomía, que se encarga de reflejar estas hipótesis en un sistema de clasificación y nomenclatura (Hennig, 1966; Wheeler, 2012). La sistemática filogenética toma como base la idea de descendencia con modificación y, con esta premisa, propone patrones históricos evolutivos (Darwin, 1859). La taxonomía se basa en el sistema nomenclatural propuesto por Carlos Linneo en su publicación de 1758 titulada *Systema Naturae*. Un sistema de clasificación que refleje las relaciones filogenéticas naturales entre los organismos vivos, así como un sistema nomenclatural que lo refleje, consolidan la base teórica de estas dos disciplinas.

La delimitación de especies también es uno de quehaceres de la sistemática filogenética (Mayr, 1996; Fujita et al., 2012). La definición de qué es una especie ha sido sujeto de debate, prueba de ello son los más de 24 conceptos propuestos (Mayden, 1997; Mallet, 2007). La definición de una especie conforma la base de varias disciplinas biológicas (ej., la biología evolutiva), por lo que su establecimiento es de crítica importancia (Isaac et al., 2004). No obstante, la delimitación de especies se enfrenta a varios retos. En principio, sobre cuál concepto describe mejor a las especies. Por otro lado, existen casos particulares, como las especies crípticas (Bickford et al. 2007), definidas como ejemplares de una especie nominal, morfológicamente indistinguibles entre sí, pero que, con base en información adicional, regularmente molecular, podrían ser consideradas como linajes diferentes (Planas y Ribera, 2014; Fujita et al., 2012). Todas estas dificultades rinden la delimitación de especies como un proceso inconsistente (Issac et al., 2004).

En el presente trabajo se pretende emplear dos conceptos de especies, los de Simpson (1951), y DeQueiroz (2007), así como las nociones taxonómicas de Hey et al. (2003). La propuesta de Simpson (1951) se puede resumir en que una especie es un linaje con una trayectoria, roles y tendencias evolutivas independientes; combinando la idea de que las especies son linajes históricos con la sus roles evolutivos y ecológicos. Por otro lado, la aproximación de DeQueiroz (2007) incita a la conceptualización de las especies como segmentos de poblaciones constituidas de subpoblaciones y relacionadas entre sí por un proceso de ancestría y descendencia. Cuando dichos linajes divergen, el paso del tiempo originará progresivamente las “propiedades secundarias” de las especies, como la compatibilidad reproductiva con descendencia fértil propuesta por concepto biológico de especie. Finalmente, la propuesta de Hey et al., (2003) se basa en que una especie nueva, o cualquier taxón, debe ser considerado como una hipótesis que podría ser apoyada con evidencia o sometidas a revisión. Bajo esta perspectiva se somete a prueba la estabilidad de una especie a través de distintas líneas de evidencia y no a través del uso diferencial de algún concepto de especie.

El método dominante para la delimitación de especies fue la exploración y comparación morfológica apoyada con datos biogeográficos. Comúnmente se erigían taxones con base en observaciones subjetivas, carentes de análisis estadísticos y fundamentados en conclusiones retóricas. Actualmente, existen métodos que permiten la incorporación de fuentes de información alternativa, como el desarrollo de la inferencia filogenética a partir de secuencias genómicas con la incorporación de modelos de evolución de nucleótidos y esquemas teóricos sobre el proceso evolutivo (ej., la teoría de coalescencia). Por otro lado, también se ha incrementado la calidad de la información que se puede usar para este mismo propósito, como lo prueban los actuales métodos de análisis biogeográfico y la morfometría geométrica (Fujita et al., 2012; Zhang et al., 2013). A pesar del desarrollo de estos métodos, los datos morfológicos aún de proveen información sobre la trayectoria evolutiva de las especies. Además, es fundamental para elaborar diagnosis y claves de identificación, además de ser de utilidad en otras disciplinas biológicas (Lemmon y Lemmon, 2013; Giribet, 2015).

El desarrollo de métodos para delimitar especies basados en información molecular se enfoca análisis filogenéticos que incorporan modelos de evolución y, recientemente, en métodos que incorporan el modelo de coalescencia aplicado a más de una especie (Madisson, 1997; Fujisawa y Barraclough, 2013; Zhang et al., 2013; Yang y Rannala, 2014). El resultado de un

análisis filogenético es un cladograma de estructura binaria y de ancestría-descendencia, en donde las relaciones de los linajes, los eventos de especiación, relaciones evolutivas y tiempos de divergencia son reconstruidos. Su elaboración requiere del análisis de genes homólogos, los cuales contienen información sobre la trayectoria evolutiva de los linajes (Yang y Rannala, 2012; Hellmuth y Wieseke, 2016). Una vez obtenidos estos genes, se establece una hipótesis de homología primaria entre nucleótidos a través de un alineamiento. Una vez alcanzado un alineamiento óptimo, esta información se puede utilizar en la construcción de árbol filogenético (Higgins y Lemey, 2009). Bajo el supuesto de que los genes muestreados representan estimados del genoma completo y, a su vez, sus relaciones filogenéticas reflejan las de los organismos muestreados, es que se puede reconstruir la historia evolutiva de los linajes (Cummings et al., 1995).

Los genes mitocondriales citocromo oxidasa (COI) y 16S han sido de particular interés por sus propiedades físico-químicas, así como por la cantidad de información que confieren sobre la historia evolutiva de las especies. Estas propiedades incluyen su estructura compacta (15-16 kb), la herencia por vía materna sin recombinación, la exhibición general de haploidía, y que se encuentran en múltiples copias dentro de una sola célula (Schubart 2009; Gantenbein, 2005). De forma particular, el gen del citocromo oxidasa 1 (COI) carece de intrones y se encuentra poco expuesto a eventos de recombinación (Patwardhan, 2014). El marcador 16S contiene regiones muy conservadas (pues desempeñan funciones biomecánicas) y muy variables, útiles en análisis filogenéticos dada su heterocronía para la separación de especies y linajes más antiguos.

Una de las principales aproximaciones a la reconstrucción filogenética es concatenar la información de múltiples loci en un solo “super gen”. La determinación del árbol de especies se realiza a través de la estimación de sus parámetros (i.e., topología, longitud de rama y modelos de evolución) a través del criterio de máxima verosimilitud (ML) e la inferencia Bayesiana (IB). Ambos criterios gozan de ser estadísticamente consistentes (i.e., el estimador del valor de verosimilitud tenderá a aproximarse a la realidad, conforme más datos se tengan disponibles) y eficientes (i.e., reduce la varianza de los parámetros estimados). Para la determinación del modelo de evolución apropiado para un conjunto de secuencias, se estiman tres parámetros: 1) las frecuencias de los cuatro nucleótidos, que modelan la proporción de nucleótidos en una matriz; 2) matrices de tasa instantánea, que describen las tasas relativas de cambio entre nucleótidos; y 3) la variación de tasas de cambio entre sitios (Yang y Rannala, 2012). A pesar de la precisión de esta

aproximación, la concatenación implícitamente asume que todos los loci muestreados comparten la misma topología y largos de rama. Esfuerzos por modelar la evolución independiente de distintas regiones del genoma empleadas para construir filogenias han buscado acomodar modelos de evolución particulares para distintas regiones del “super gen” concatenado. En contraste, el modelo de coalescencia de especies múltiple (MSC) toma en consideración el supuesto de que distintos loci poseen historias evolutivas independientes y, por lo tanto, sus árboles filogenéticos poseen largos de rama y topologías particulares (Edwards et al., 2016).

El modelo de coalescencia de especies múltiple (MSC), descrito por Yang y Rannala (2003), modela la probabilidad de que los distintos árboles de genes hayan evolucionado dentro de un árbol de especies. Este modelo considera la discordancia entre las genealogías de los marcadores moleculares empleados (i.e., árboles de genes) y los linajes en los que evolucionan (i.e., árboles de especies) para inferir la historia evolutiva y relaciones de las especies muestreadas. Dicha discordancia es producto del sorteo incompleto de linajes (SIL), proceso por el cual los polimorfismos ancestrales continúan manteniéndose en múltiples linajes posterior a eventos de especiación y que presentan patrones de fijación que son incongruentes con la historia evolutiva de los mismos. Contemplando un árbol de especies desde el presente hacia el pasado, la discordancia es producto de alelos que no experimentan coalescencia durante eventos de especiación subsecuentes (Figura 1). A pesar de haber otros factores que generan discordancia entre árboles de genes y árboles de especies, como la transferencia horizontal de genes, eventos de extinción e introgresión, el SIL es un fenómeno que ocurre en todas las poblaciones, especialmente en aquellas con eventos de especiación recientes, radiaciones ancestrales y linajes con poblaciones ancestrales grandes (Degnan y Rosenberg, 2009; Rannala et al., 2020). Los parámetros que describen un árbol de especies son los tiempos de divergencia, definidos por $s - 1$, en donde s representa las especies contemporáneas; y los tamaños poblacionales, descritos por $2s - 1$. La magnitud de ambos parámetros es definida por la tasa de mutación de las secuencias muestreadas. Por lo tanto, ambos parámetros se miden usando la tasa de mutación por sitio. Cada especie opera como un proceso de coalescencia independiente, en donde cada una tiene una tasa de coalescencia de $\theta_i = 4N_i\mu$. Dado un árbol de especies, los árboles de genes que evolucionan dentro de él son independientes entre loci y, para cada loci, el proceso de coalescencia es independiente para cada especie.

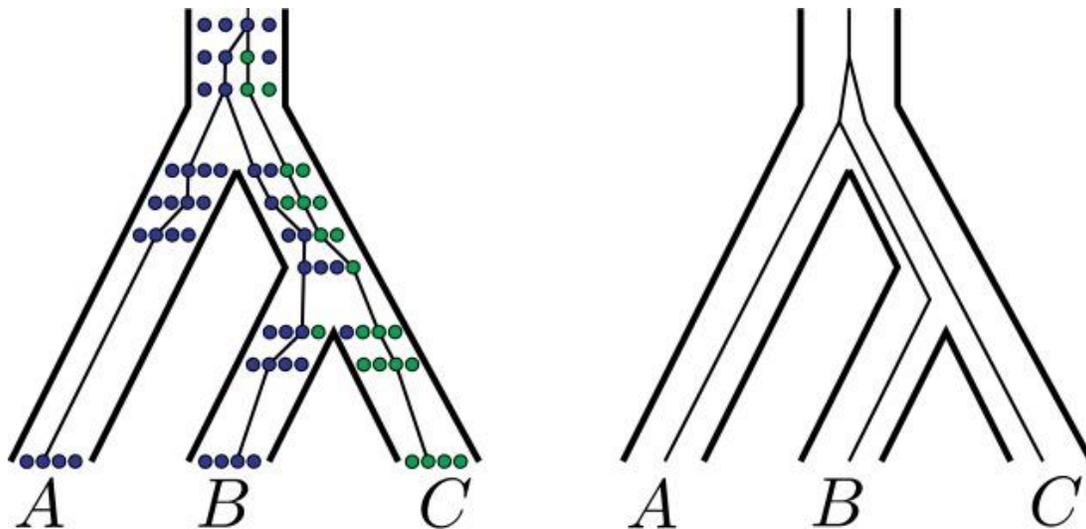


Figura 1.- Representación visual del sorteo incompleto de linajes. En el cladograma de la izquierda, se puede observar el proceso de herencia de los polimorfismos a través de las poblaciones, las cuales divergen y eventualmente especian. A la derecha, se observa cómo el patrón de relación de estos alelos es incongruente con el árbol de especies (Chan et al., 2017).

Las historias de coalescencia son la secuencia de las ramas del árbol de especies en donde pueden ocurrir eventos de coalescencia con una probabilidad. Dicha probabilidad depende del largo y ancho de estas ramas, parámetros a su vez descritos por los tiempos de divergencia y el tamaño poblacional ancestral, respectivamente. Las historias de coalescencia describen un conjunto de historias etiquetadas, definidas como los posibles árboles de genes que pueden evolucionar a lo largo de las ramas del árbol de especies (Edwards, 1970; Degnan y Rosenberg, 2009; Rannala et al., 2020) Dada una historia de coalescencia, las distintas historias etiquetadas no tienen la misma probabilidad (Figura 2). Esto puede ejemplificado para el caso de un árbol de especies construido a partir de una secuencia de tres especies, en el que el modelo MSC recupera la historia etiquetada (i.e., el árbol de genes) más probable como idéntico a la topología del árbol de especies. Sin embargo, al agregar más especies, el árbol de genes más probable puede no corresponder al árbol de especies Este fenómeno indica que los parámetros que definen al árbol de especies se encuentran dentro de la zona anómala (Degnan y Rosenberg, 2006). A pesar de este problema, se puede emplear este principio para reconstruir las relaciones filogenéticas de las especies. Tal es el caso de los métodos de resumen denominados de dos pasos, como ASTRAL o MP-EST. Estas aproximaciones descomponen los árboles de genes en cuartetos sin raíz (equivalente a árboles enraizados de tres especies), evitando el problema de la zona anómala y

posteriormente reconstruyendo un estimado sobre el árbol de especies incluyendo todos los terminales.

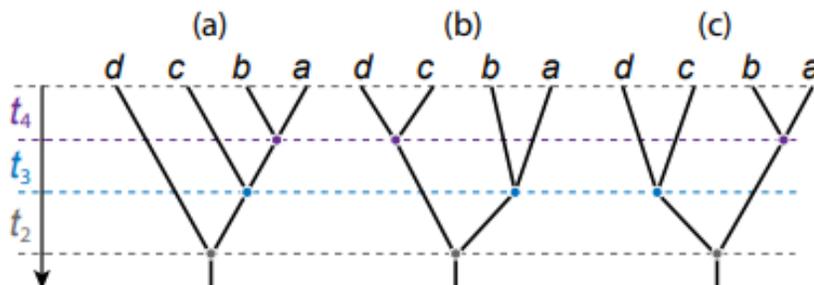


Figura 2.- Ejemplos de historias etiquetadas para cuatro secuencias (*a*, *b*, *c* y *d*) generadas bajo el proceso de coalescencia. Los nodos internos están ordenados conforme a su edad (Rannala et al., 2020).

Otra fuente de información con potencial de aportar evidencia adicional a la delimitación de especies es la información biogeográfica. El modelado de distribución potencial (MDPs) comprende un conjunto de métodos que emplean información sobre registros georreferenciados de una o más especies en conjunto con datos ambientales para generar un modelo correlativo que corresponda con los requerimientos ecológicos de la especie y predice su idoneidad relativa (Franklin, 2013). Esta aproximación se ha empleado con éxito para responder preguntas sobre la evolución, taxonomía, biogeografía y ecología de las especies (Guisan y Zimmermann, 2000; Guisan y Thullier, 2005). Se basa en la relación limitante impuesta por las variables ambientales (i.e., variable independiente) sobre los taxones evaluados (i.e., variable dependiente), pudiendo así encontrar patrones de distribución, influenciados tanto por las variables ambientales como por las particularidades de los modelos seleccionados para realizar el análisis (Guisan y Thullier, 2005). Las primeras ideas que delinearon el esquema teórico empleado en el modelado de distribución potencial fueron introducidas por Joseph Grinnell y G. Evelyn Hutchinson, con los conceptos de nicho realizado y nicho fundamental (Soberón, 2008). Estos conceptos explican la distribución de las especies en términos de su relación con variables abióticas (i.e., temperatura o precipitación), bióticas (i.e., depredación) y su vagilidad. Dichas variables se representan a través del diagrama BAM (Biotic, Abiotic, Migration) (Figura 3). Puntualmente, por la dificultad de la inclusión de variables bióticas y de migración de las especies, los MDPs modelan el nicho fundamental de las especies (A en el diagrama) sobre el espacio ambiental, el cual es

posteriormente proyectado sobre un espacio geográfico. El resultado es un mapa de distribución potencial (Soberón et al., 2017). Métodos estadísticos paramétricos de modelado, como la aproximación de máxima entropía, así como el desarrollo de sistemas de información geográfica (GIS), proveen del sustrato analítico para evaluar los nichos ecológicos de las especies. Se puede emplear esta aproximación como una línea de evidencia para indagar sobre las posibles diferencias en las preferencias de hábitat de dos o más poblaciones, linajes, o especies; representadas tanto en el espacio geográfico y ambiental. Aportando así otra línea de evidencia útil para la delimitación de especies.

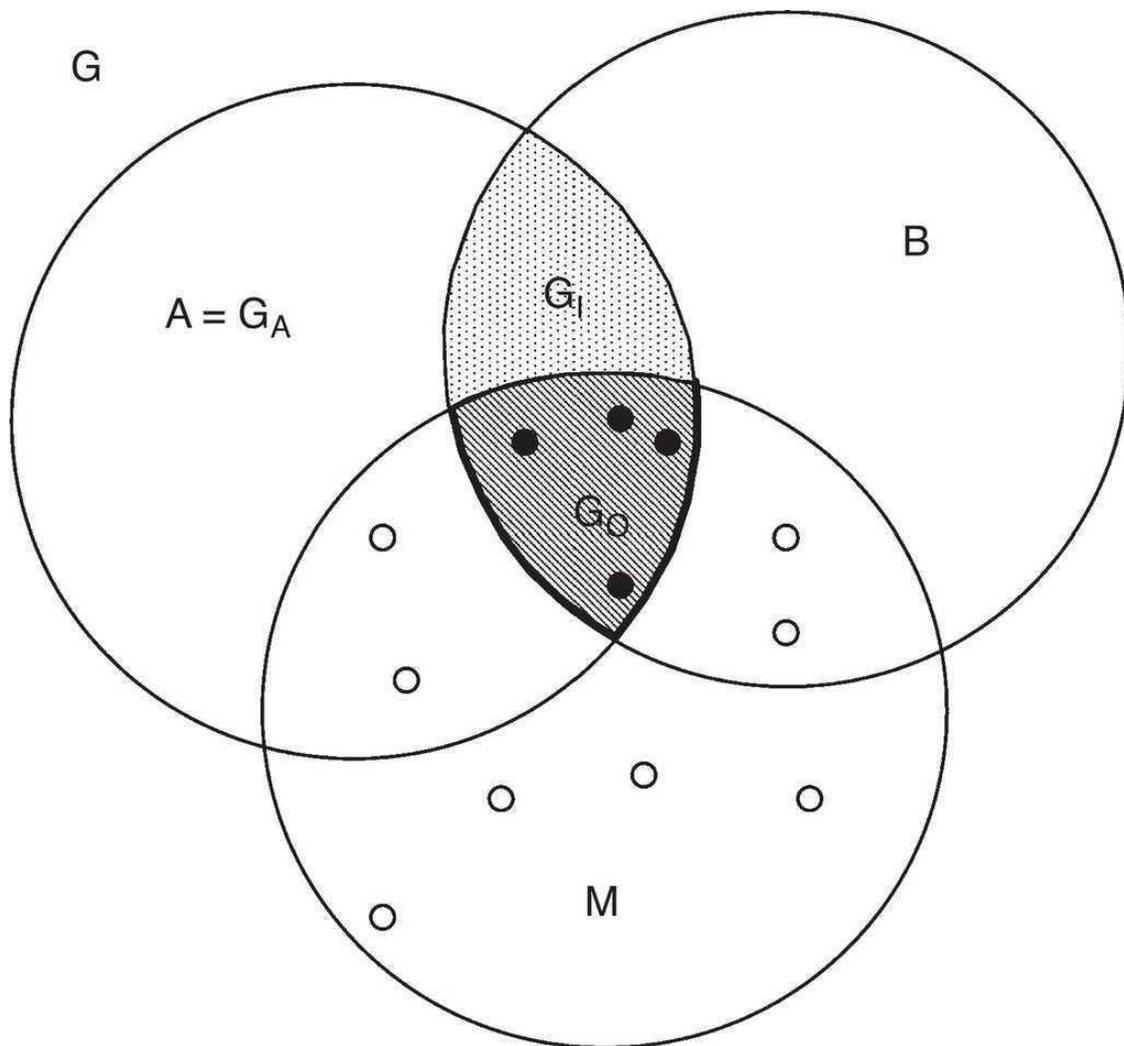


Figura 3.- Diagrama BAM, representando las ideas fundamentales sobre el nicho ecológico de Hutchinson tomado de Soberón et al. (2017). **A** representa los factores abióticos, definido como un

hipervolumen n-dimensional en donde las dimensiones representan los factores abióticos que mantienen a una población creciendo de forma indefinida. **B** representa las interacciones bióticas. **M** representa la vagilidad de las especies, o el área disponible a las mismas en durante un tiempo determinado. Los puntos blancos dentro de G_0 son poblaciones que crecen positivamente (poblaciones fuente), mientras los puntos negros son poblaciones con crecimiento negativo (poblaciones sumidero).

El presente estudio tiene como objetivo integrar la información proveniente de dos las líneas de evidencia discutidas anteriormente, filogenómica y biogeográfica, con la intención de indagar si el alacrán de importancia médica *Centruroides limpidus*, una especie que habita en el centro-sur de México, constituye un solo taxón con amplia distribución o un complejo de especies. Particularmente, se pretende realizar un análisis filogenómico empleando los marcadores anteriormente descritos, así como un modelado de distribución potencial empleando datos georreferenciados obtenidos en bases de datos públicas. En contraste con investigaciones previas que incluyen el taxón de interés, la presente pretende emplear métodos filogenéticos basados en caracteres, así como la inclusión de muestras provenientes de la mayoría del área de distribución de *C. limpidus* para evaluar su estabilidad taxonómica. Finalmente, con base en lo obtenido, se pretende actualizar la información sobre el estatus taxonómico de *C. limpidus*, así como actualizar la información sobre su distribución en México.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades del orden Scorpiones

Los escorpiones son arácnidos depredadores, generalmente nocturnos, que emplean una variedad de estrategias para atrapar a sus presas, siendo un patrón taxón específico. Por ejemplo, los escorpiones de la familia Diplocentridae son depredadores de emboscada, esperando a que sus presas se acerquen a las inmediaciones de la entrada de sus galerías para atacar. Por otro lado, los alacranes de la familia Buthidae deambulan por un área activamente en busca de alimento, un comportamiento que se denomina “errante” (Polis, 1990). Por lo tanto, son animales importantes en la ecología de las comunidades en las que habitan (Ponce-Saavedra et al., 2016). Asimismo, este grupo se distribuye en todos los ecosistemas y sobre todos los continentes del mundo, con la excepción de la Antártida, Nueva Zelanda, ecosistemas boreales y varias islas oceánicas; su

diversidad incrementa en áreas subtropicales y decrece hacia el ecuador y los polos (Ochoa et al., 2011; Santibáñez-López *et al.*, 2015).

La historia de vida de los escorpiones es considerablemente distinta a la de otros arácnidos. Su reproducción es a través de un ritual de cortejo, en el que el macho se aproxima y toma a la hembra de los pedipalpos para comenzar un baile denominado “promenade a deux”. Este comportamiento dura hasta la deposición de un espermatóforo y su posterior inserción dentro del opérculo genital de la hembra. Una vez fertilizados los huevos, los embriones se pueden desarrollar de dos formas: aipokogénica, es decir, que los huevos poseen cantidades variables de vitelo y se desarrollan en el oviútero; y katoikogénica, donde los huevos no contienen vitelo y se alimentan a través de un órgano especializado en el oviútero denominado divertículo (Jedrzejowzka et al., 2016). Por otro lado, algunas especies de escorpiones son partenogénicos, pudiendo reproducirse asexualmente (Polis y Sissom, 1990). Son arácnidos vivíparos, que exhiben cuidado parental de las crías hasta la primera muda. Posterior a la primera ecdisis, la cual puede ocurrir simultáneamente o con distintos grados de asincronía, las crías abandonan a la madre. Las crías pueden permanecer sobre la madre de cinco a 25 días, variando de entre distintos taxones. El crecimiento tiene un rango de seis a nueve mudas y la adquieren la madurez sexual de seis a 83 meses. Aquellas especies con vidas longevas pueden vivir más de 20 años y ser iteróparas (Polis y Sissom, 1990).

A pesar de la abundancia de estudios sobre la taxonomía, sistemática y los venenos de los escorpiones, la investigación sobre su biología permanece fragmentaria. Particularmente, la investigación sobre la ecología y distribución de los alacranes de México es escasa, salvo algunos ejemplos notables (Ponce-Saavedra et al., 2006; Contreras-Garduño et al., 2006; Quijano-Ravell et al., 2011, 2012, 2012b, 2015). Por lo tanto, esta área de investigación sigue abierta es y de particular importancia por la incidencia de varias especies de importancia médica. El estudio de estas últimas es crítico para el desarrollo de planes para la contención y atención del alacranismo en México.

2.2. Morfología del orden Scorpiones

El cuerpo de los escorpiones, como el de todos los arácnidos, está constituido de dos tagmas, los cuales, en conjunto, se dividen en 18 segmentos. Los primeros seis segmentos corresponden a la

tagma anterior, denominado prosoma, que se encuentra cubierto dorsalmente por el caparazón, una placa subcuadrangular que lleva un par de ocelos medios, así como ocelos laterales, entre otras ornamentaciones. Ambos tipos de ocelos son estructuras fotorreceptoras que difieren en su estructura anatómica y celular y, por lo tanto, también son distintas funcionalmente: los ocelos medios son aptos para la discriminación espacial, mientras que los ojos laterales detectan cambios en la intensidad de la luz y están relacionados con la regulación del ciclo circadiano (Loria y Prendini, 2014). En el primer segmento encuentran los quelíceros, estructuras compuestas de tres segmentos y cuya función son la alimentación y aseo, los siguientes segmentos llevan los pedipalpos y los cuatro pares de apéndices locomotores, ambos conformados de seis artejos: coxa, trocánter, fémur, patela, tibia, basitarso y telotarso. Ventralmente, el prosoma presenta las coxapófisis, la fusión de las coxas del primer y segundo par de patas locomotoras que cierran la cavidad preoral; y la placa esternal, resultado de la fusión de los esternitos de los segmentos III y IV, estructura de importancia taxonómica a nivel de familia; esta estructura se encuentra flanqueada por las coxas de las patas locomotoras III y IV (Polis, 1990).

En cuanto a los apéndices mencionados, los pedipalpos poseen los tarsos y tibias modificados a manera de quelas, estructuras que emplean en la búsqueda y captura de presas. Las ornamentaciones de los pedipalpos, en forma de quillas y gránulos, se han usado como caracteres confiables para discernir entre taxones, especialmente a nivel específico y genérico. Como resultado, se ha desarrollado una compleja nomenclatura asociada a estas estructuras (González-Santillán y Prendini, 2013). Asimismo, los pedipalpos son los únicos apéndices donde se encuentran las tricobotrias, sedas mecanorreceptoras con valor taxonómico (Vachon, 1974). Los apéndices locomotores, además de asistir en la mecanorrecepción, les sirven principalmente para desplazarse.

De acuerdo con Polis (1990), los siguientes doce segmentos constituyen el segundo tagma, denominado opistosoma, el cual se subdivide en dos secciones: mesosoma y metasoma. El mesosoma está dividido en siete segmentos cubiertos dorsal y ventralmente por placas esclerotizadas (denominadas terguitos y esternitos, respectivamente). Ventralmente, en el primer segmento, se distingue una estructura pareada que cubre el gonoporo, conducto por el cual transitan los gametos, denominada opérculo genital. Esta estructura presenta dimorfismo sexual, con los machos exhibiendo un par de papilas genitales proximalmente. En el siguiente segmento

se encuentran los peines, estructuras autapomórficas que contienen una serie de microestructuras llamadas “peg sencilla”, cuya función es percepción mecánica y química. En los siguientes cuatro segmentos se encuentran los espiráculos o estigmas, aperturas que conducen al sistema respiratorio. Finalmente, el metasoma está constituido de cinco segmentos más el telson, una estructura globular que termina en un aguijón o acúleo cuya función es la inoculación de veneno. En general, los segmentos del metasoma se hacen progresivamente más largos posteriormente y están ornamentados por una variedad de carinas, gránulos y sedas que proveen información taxonómica. Finalmente, el ano se encuentra en la porción ventrodistal del quinto segmento, rodeado de cuatro papilas anales. La estructura general de los escorpiones se encuentra esquematizada en la Figura 4.

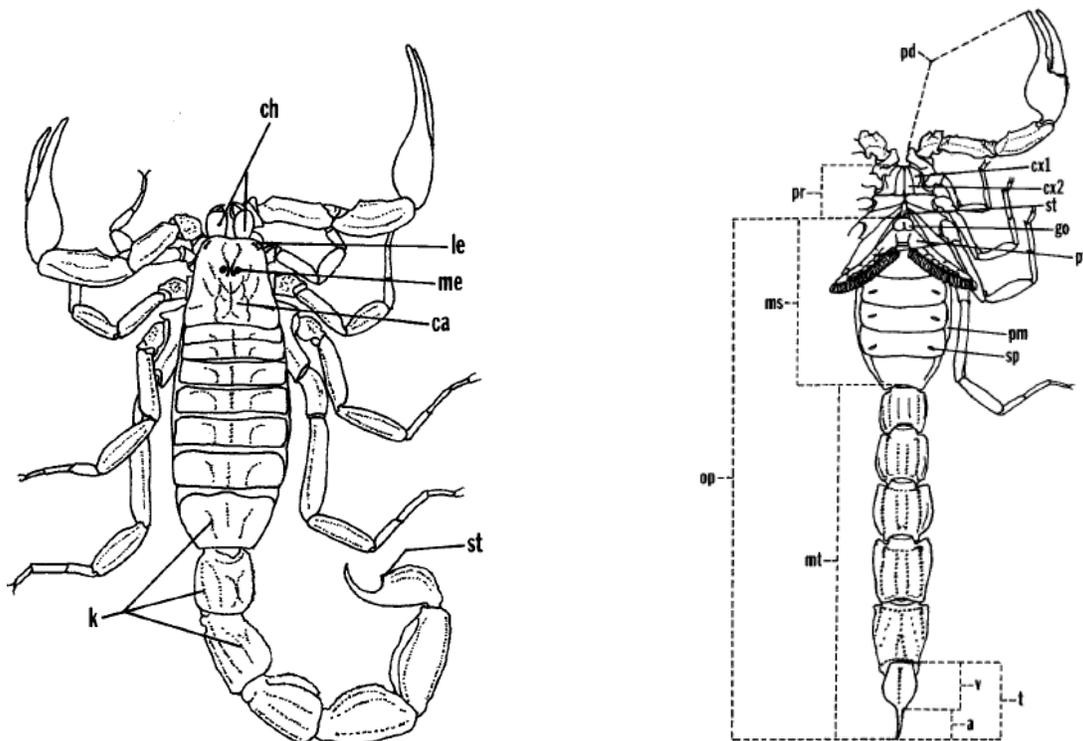


Figura 4.- Esquema general de la morfología externa del orden Scorpiones. De lado izquierdo: Vista dorsal; ch: quelíceros, le: ojos laterales, me: ojos medios, ca: caparazón, k: quillas, st: tubérculo subaculear. Lado derecho: Vista ventral, pd: pedipalpos, pr: prosoma, op: opistosoma, ms: mesosoma, mt: metasoma, cx1: coxa 1, cx2: coxa 2, st: esternón, go: opérculo genital, pt: peines, pm: membrana pleural, sp: espiráculo, t: telson, v: vesícula, a: acúleo (Polis, 1990).

2.3. Sistemática del orden Scorpiones

Los escorpiones son un grupo de organismos cuya clasificación taxonómica dista de ser estable en cualquiera de sus niveles jerárquicos (Santibáñez-López et al., 2015). Stockwell (1989) llevó a cabo uno de los primeros análisis cladístico del orden y aunque excluyó a la familia más diversa a nivel mundial (Buthidae), incluyó fósiles para enraizar su análisis. Posteriormente, otros autores contribuyeron de manera significativa a la clasificación, en ocasiones proponiendo cambios radicales (Lamoral, 1980; Sissom, 1990; Stockwell, 1992; Soleglad y Fet, 2000; Soleglad y Fet, 2001; Coddington et al., 2004; Prendini y Wheeler, 2005; Soleglad y Fet, 2005).

Más recientemente, las relaciones familiares han sido analizadas desde una perspectiva filogenómica (Sharma et al., 2015, 2018; Santibáñez-López et al., 2018; Santibáñez-López et al., 2019). Actualmente se reconocen 20 familias de escorpiones, 208 géneros y aproximadamente 2621 especies registradas para todo el mundo (Rein, 2021). La monofilia de varias familias sigue sin ser corroborada por análisis filogenéticos y es posible que clasificación cambie con estudios subsecuentes (Gopalakrishnakone et al., 2015; Sharma et al., 2015 y Lourenço, 2018). La confusión en la clasificación de los escorpiones surge a partir del escaso uso de métodos filogenéticos para evaluar la monofilia y estabilidad de los clados supraespecíficos, así como en la ausencia de aproximaciones integrativas de delimitación de especies (Stockwell, 1989; Prendini y Wheeler, 2005).

De todas estas familias, la familia Buthidae es la más diversa a nivel mundial (con 89 géneros y 1,110 especies descritas), incluyendo a la mayoría de las especies de importancia médica para el ser humano y con distribución mundial (Gantenbein et al., 2003). Particularmente, en América del Norte, la familia está principalmente representada por el género *Centruroides*, con más de 91 especies descritas distribuidas desde el oeste de Estados Unidos hasta el norte de América del Sur (Esposito et al., 2018). En México la familia Buthidae está representada por dos géneros: El más diverso *Centruroides*, con 45 especies descritas; y *Chanekes*, con 4 especies descritas. Además de esta familia, se reconocen 255 especies contenidas en 36 géneros y siete familias (Santibáñez-López et al., 2015; Urieta et al., 2020; Rein, 2021). En el cuadro 1 se enlistan las familias de escorpiones registradas en México, así como su diversidad y distribución (Sharma et al., 2015, Mullen y Sissom, 2019; Santibáñez-López et al., 2019). No obstante, el conocimiento sobre la diversidad y distribución de los escorpiones del país dista de estar completa. Por ejemplo, *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) carece de una descripción

actualizada, *Centruroides rodolfoi* (Santibáñez-López y Contreras-Félix, 2013) solamente se conoce de su localidad tipo y hay áreas inexploradas, especialmente del norte del país, con potencial de albergar más diversidad de este género (Santibáñez-López et al., 2015; González-Santillán y Possani, 2018).

Cuadro 1.- Distribución de las familias de escorpiones reconocidas en México, los porcentajes contrastan la diversidad del país y entre paréntesis se reporta el porcentaje con respecto a la diversidad mundial (Santibáñez-López et al., 2015; Mullen y Sissom, 2019).

Familias	Géneros	Especies	Distribución
Buthidae	2 (2%)	45 (4%)	En todo el país, con la mayor diversidad en centro occidente de México.
Chactidae	1 (8%)	2 (1%)	Península de Baja California e islas adyacentes.
Diplocentridae	3 (30%)	58 (48%)	En todo el país, con la mayor diversidad en el centro y sur de México.
Euscorpiidae	3 (75%)	8 (16%)	Vertiente de la Sierra Madre Oriental, de Tamaulipas a Oaxaca, Chiapas.
Hadruridae	3 (60%)	9 (29%)	Península de Baja California, sur de México (Oaxaca, Puebla, Guerrero y Morelos).
Superstitioniidae	1 (100%)	1 (100%)	Península de Baja California, Sonora y el sur de Arizona.
Typhlochactidae	4 (100%)	11 (100%)	Sierra Madre Oriental y sierra norte de Oaxaca.
Vaejovidae	21 (91%)	149 (74%)	En todo el país, mayor diversidad en la península de Baja California y el sur de México.

2.4. El género *Centruroides* Marx 1890 en México

El género *Centruroides* Marx 1890 es el más diverso de la familia Buthidae en América del Norte, a pesar de su origen Gondwánico (Esposito y Prendini 2019). Su distribución abarca casi todo el continente desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica, con incidencia en las Islas Galápagos y las Antillas (Fet y Lowe, 2000). Se les encuentra en la gran mayoría del territorio mexicano y son especialmente diverso y abundante en el sudoeste del territorio nacional (Fet et al., 2000, De Armas et al., 2003; Armas y Martín-Frías, 2003). A pesar de las numerosas especies descritas para el país, su diversidad actual se encuentra infraestimada (González-Santillán in prep.). Son escorpiones de tamaño variable, de hábitos nocturnos y errantes. Asimismo, algunas especies exhiben sinantropismo (Polis, 1990; Pinkus-Rendón, 1999). El veneno neurotóxico de algunas especies es el más potente entre los alacranes a nivel mundial, especialmente eficaces en seres humanos y otros mamíferos, pudiendo causar envenenamiento

severo e incluso la muerte (Towler et al., 2001). De las 45 especies de *Centruroides* descritas para México, menos de la mitad (21 especies, o el 46.6% de la diversidad) son consideradas de importancia médica (González-Santillán y Possani, 2018). Para reconocer a una especie como de importancia médica se requiere evidencia empírica y experimental, es decir, casos registrados de envenenamiento que requieren hospitalización en zonas donde se sabe está distribuida la especie, así como el cálculo del LD50 del veneno, respectivamente. Esta información es escasa en la mayoría de las especies, además de que se desconoce la distribución de varias especies que son o presuntamente son de importancia médica (González-Santillán y Possani, 2018).

México es el epicentro del alacranismo a nivel mundial. Esto se atribuye, en parte, a la estrategia errante y hábitos sinantrópicos de las especies del género *Centruroides*, así como a la expansión de áreas habitacionales dentro del área de distribución de estas especies. Actualmente, se tienen reportes de más de 300,000 casos de alacranismo anuales en el país, una cifra probablemente infraestimada, pues no todos los casos de envenenamiento y fallecimiento son reportados (Chavo-Haro y Ortiz, 2015; González-Santillán y Possani, 2018). Históricamente, los estados del país con más prevalencia de alacranismo se encuentran a lo largo de la costa del pacífico, centro y sur de México. Dichos estados son Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Puebla, Morelos, Estado de México, Guanajuato, Aguascalientes, Durango y Zacatecas (González-Rivera et al., 2004; Possani, 2005; Baldazo-Monsivaiz et al., 2013; González-Santillán y Possani, 2018). Dada la gravedad del problema, el estudio sobre la sistemática y distribución de estos alacranes aporta información crucial para el desarrollo de medidas de prevención y tratamiento contra la picadura de alacrán (González-Santillán y Possani, 2018).

2.5. Historia taxonómica de *Centruroides* mexicanos

El primer estudio monográfico para evaluar la diversidad y taxonomía del género *Centruroides* en México lo realizó Hoffmann (1932). Este trabajo retoma el esquema de clasificación de Pocock (1898, 1901) para las especies de este género, pues separó a las especies con base en la coloración dorsal del cuerpo en el grupo *rayados* y *no rayados*. Bajo esta aproximación, Hoffmann (1932) describió varias especies para México y sentó las bases para la taxonomía del género *Centruroides*. Posteriormente, González-Santillán (2001) amplió la idea de Hoffmann y propuso la circunscripción de cuatro grupos en donde incluyó a las especies conocidas para el

país. La delimitación de los grupos se basó en la presencia/ausencia de pigmentación dorsal del cuerpo, el tamaño de los individuos adultos y sus hábitos. Los grupos propuestos fueron llamados *bertholdii*, *thorellii*, *gracilis* y *rayados*. Asimismo, los *rayados* se dividieron en dos subgrupos con base en el patrón de la pigmentación del caparazón: *sufussus-infamatus* y *limpidus-elegans*. La estabilidad taxonómica de estos grupos ha sido cuestionada y se han propuesto una variedad de cambios (De Armas y Martín-Frías, 1999; Teurel, 2001; Ponce-Saavedra y Moreno-Barajas, 2005; Ponce-Saavedra y Francke, 2011). Recientemente, Ponce-Saavedra y Francke (2019) proponen dos grupos nuevos a partir de los subgrupos de los rayados, actualizando la clasificación con la diversidad conocida hasta ese momento. En consecuencia, actualmente se reconocen seis grupos de especies *bertholdii*, *elegans*, *gracilis*, *infamatus*, *nigrovariatus* y *thorellii*. En el apéndice A se reportan los registros de las especies de *Centruroides* en México por estado, el grupo al que pertenecen y se reconocen las especies de importancia médica.

Existen escasos estudios sobre las relaciones filogenéticas de estos grupos usando una base molecular y biogeográfica (Towler et al., 2001; Ponce-Saavedra y Francke, 2009; Yamashita y Rhoades, 2013; Quijano-Ravell et al., 2019). No obstante, este limitado acervo de estudios converge en la conclusión de que los grupos de especies mexicanas de *Centruroides* son artificiales, basados en características morfológicas homoplásicas. Recientemente, González-Santillán et al. (2020), realizaron un análisis filogenómico usando marcadores nucleares y mitocondriales de 20 especies de *Centruroides* que habitan en México. En este estudio se recupera una topología incompatible con la propuesta taxonómica de los grupos de especies actuales. Visibilizando la necesidad de realizar estudios con una aproximación integrativa que esclarezcan las relaciones y clasificación de este género.

En el caso de escorpiones bítidos, los marcadores moleculares 16S y COI ha sido extensamente usados para hacer análisis filogenéticos (Towler et al., 2001; Gantenbein et al., 2001; Fet et al., 2000, 2002; Gantenbein y Largiader, 2003; Parmakelis et al., 2006; Ponce-Saavedra-Francke, 2009; Mirshamsi et al., 2010). Sin embargo, los estudios citológicos sobre la espermatogénesis realizados por Wilson et al. (1916, 1931) y Wilson y Pollister (1937) en el género *Centruroides* comenzaron la sospecha sobre la posibilidad de recombinación en su genoma mitocondrial. Más tarde, Gantenbein et al. (2005) confirmaron esta suposición para bítidos de Europa y Asia. Por otro lado, el estudio filogeográfico de Yamashita y Rhoades (2013), donde se indaga sobre la taxonomía y distribución de *Centruroides vittatus*, no encontró

evidencia de recombinación para el gen mitocondrial COI. A pesar de que no se han estudiado procesos de recombinación en *C. limpidus*, la aproximación más apropiada es el uso combinado de varios genes para el análisis filogenético.

2.6. Taxonomía y distribución de *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879)

Centruroides limpidus (Karsch, 1879) (Figura 5) pertenece al grupo de especies *elegans*, el cual alberga la mayoría de las especies de importancia médica de este género (Ponce-Saavedra y Francke, 2019). Casi todas las especies de este grupo se distribuyen a lo largo de la costa oeste de México, desde el estado de Oaxaca hasta la península de Baja California (Armas et al., 2003; Ponce-Saavedra y Francke, 2019). *C. limpidus* es de particular importancia, pues los estados en donde se encuentra reportan más de un tercio de los casos registrados de alacranismo anualmente en el país, aproximadamente 120,000 casos anuales (Cid-Uribe et al., 2019). Este patrón es atribuible a su vasta distribución, ya que se encuentra registrado para varias entidades del país, además de las zonas de simpatría con otras especies de importancia médica (Cuadro 2, Figura 6).

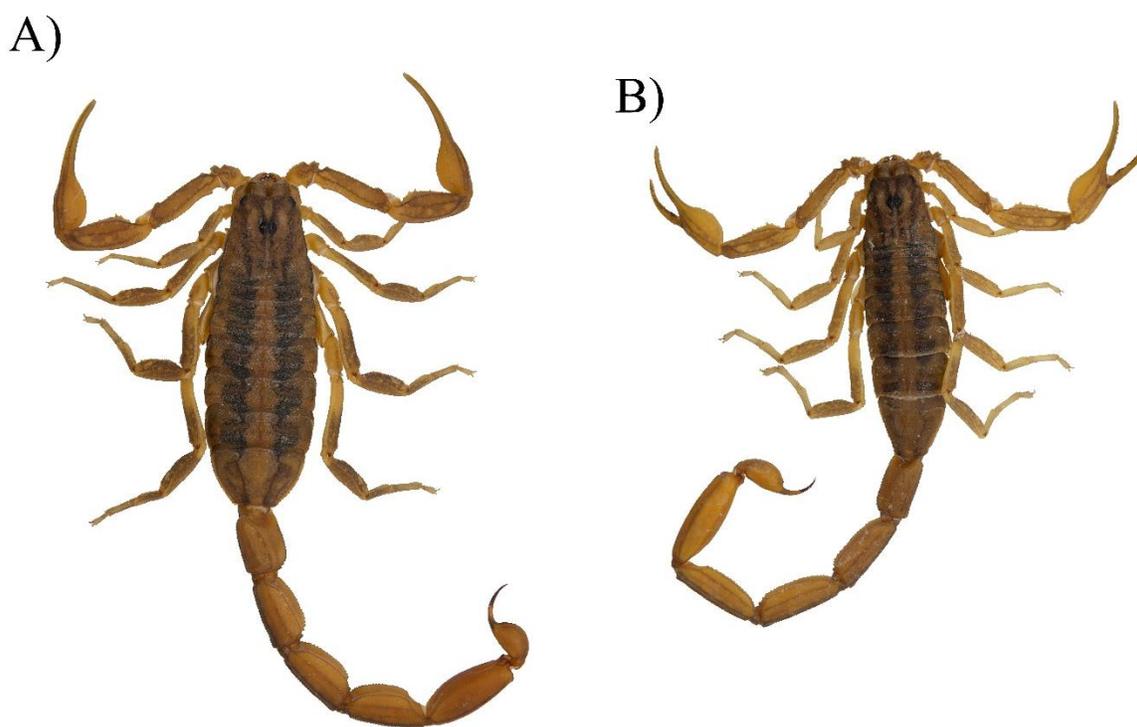


Figura 5.- Especímenes de *Centruroides limpidus* colectados en Amatlán, Tepoztlán, Morelos en vista dorsal. A) Hembra y B) macho.

En la descripción original de *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) se emplearon 7 organismos registrados como provenientes de “México” y otros 7 de “Puebla, México”, sin mayor detalle de la localidad (Ponce-Saavedra y Francke, 2004). Sucesivamente, Hoffman (1932)

designa la subespecie *Centruroides limpidus tecomanus* (Hoffman 1932) del estado de Colima y la distingue de lo que solía ser *C. limpidus limpidus* por poseer un tubérculo subaculear desarrollado y cónico, en lugar de uno redondeado y romo. Hoffmann extendió la distribución de lo que solía ser *C. l. limpidus* para abarcar los estados de Guerrero, Estado de México y Morelos. Díaz-Nájera (1962) indicó que los tonos de la coloración del cuerpo podrían ser usados como carácter taxonómico, “amarillo verdoso sucio” para *C. limpidus* y “amarillo ocre” *C. tecomanus*. Posteriormente, Díaz-Nájera (1964) reportó esta subespecie en Michoacán. Fet et al. (2000), en su Catálogo de Escorpiones del Mundo, amplían la distribución de *C. limpidus* al estado de Oaxaca. En el mismo año, Beutelspacher (2000) extendió aún más la distribución a la Ciudad de México y Nayarit. Ponce y Jones (2001) registraron la ocurrencia de esta especie más al norte en el estado de Querétaro. Finalmente, Armas y Martín-Frías (2008) publicaron un registro de *C. limpidus* para el estado de Veracruz. Un año después Ponce-Saavedra et al. (2009) designaron a *C. tecomanus* como una especie separada de *C. limpidus*.

En resumen, la distribución registrada de *C. limpidus* en la literatura incluye los estados de: Ciudad de México, Guerrero, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla y Querétaro. (Towler et al., 2001; Armas y Martín-Frías, 2008; Ponce-Saavedra et al., 2009; Martín-Frías et al., 2010; Ponce-Saavedra y Francke, 2013, González-Santillán y Possani, 2018). En la figura 6 y el cuadro 2 se exhibe la distribución reportada en la literatura sobre la especie *C. limpidus* por estado, municipio y localidad.

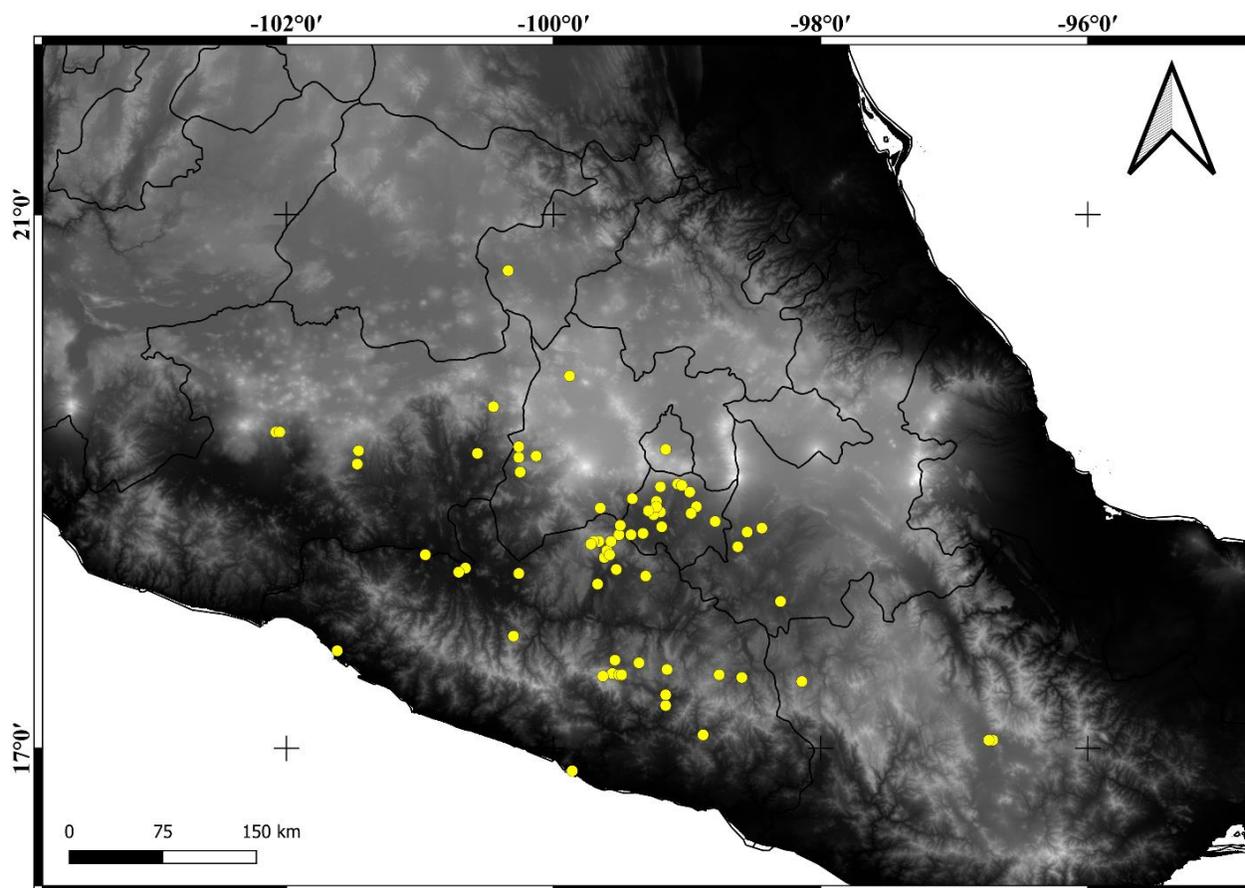


Figura 6.- Distribución histórica de *C. limpidus* de acuerdo con lo registrado en la literatura, la cual se expone a detalle en el cuadro 2.

Cuadro 2.- Registros de *Centruroides limpidus* por estado de la república publicados en las siguientes fuentes: Díaz-Nájera (1964) [1], Ponce-Saavedra et al. (2009) [3], Baldazo-Monsivaiz et al. (2016) [4], Baldazo-Monsivaiz et al. (2017) [5], Silva-Domínguez et al. (2019) [6]. No se reportan todas las localidades en Beutelspacher (2000) [2], ya que no todos fueron hechos por el autor y algunas son registros sin verificación directa de los ejemplares.

Estado	Localidades
Morelos	<ul style="list-style-type: none"> • Ahuatepec - Mpio. de Cuernavaca ^[1] • Xochitepec, Chinconcoac, Alpuyeca – Mpio. de Xochitepec ^[1,2] • Zacatepec – Mpio. de Zacatepec ^[1] • Oaxtepec – Mpio. de Yautepec ^[2] • Jonacatepec – Mpio. de Jonacatepec ^[2] • Puente de Ixtla – Mpio. de Puente de Ixtla ^[2] • Tepoztlán, Amatlán de Quetzalcóatl – Mpio. de Tepoztlán ^[2] • Palpan de Baranda – Mpio. de Miacatlán ^[2]

	<ul style="list-style-type: none"> • Agua Hedionda – Mpio. de Cuautla ^[2] • Temixco, Acatlipa, Xochicalco – Mpio. de Temixco ^[2] • Huajintlán – Mpio. de Amacuzac ^[2] • Ciudad Ayala – Mpio. de Ayala ^[2]
Ciudad de México	<ul style="list-style-type: none"> • Km 23.5 carretera federal México-Cuernavaca ^[2]
Guerrero	<ul style="list-style-type: none"> • Huitzucó - Mpio. de Huitzucó ^[5] • Axixintla, San Juan Unión, Tecapulco, Cacalotenango, Pantla, Chichila, La Mora, Acamixtla, Plaza de Gallos, Puente Campuzano y Totoapa - Mpio. de Taxco ^[4] • Mexcaltepec – Mpio. de Atoyac de Álvarez ^[4] • Amojileca, Xocomanatlán, Omiltemi y Chilpancingo – Mpio. de Chilpancingo de Bravo ^[5] • Zumpango del Río – Mpio. de Eduardo Neri ^[6] • Atliaca – Mpio. de Tixtla ^[6] • Ciudad Altamirano – Mpio. de Pungarabato ^[1] • Arcelia – Mpio. de Arcelia ^[1] • Cocula – Mpio. de Cocula ^[1] • Iguala – Mpio. de Iguala ^[1] • Teloloapan, Yerbabuena – Mpio. de San Miguel Teloloapan ^[1, 2] • Tlapa de Comonfort – Mpio. de Tlapa de Comonfort ^[1] • Zirándaro – Mpio. de Zirándaro de los Chávez ^[1] • Coyuca de Catalán – Mpio. de Coyuca de Catalán ^[2] • Chilapa de Álvarez – Mpio. de Chilapa de Álvarez ^[2] • Ayotzinapa – Mpio. de Ayotzinapa ^[2] • Acapulco – Mpio. de Acapulco de Juárez ^[2] • Colotlipa – Mpio. de Quechultenango ^[2] • Cacahuamilpa – Mpio. de Pilcaya ^[2]
Michoacán	<ul style="list-style-type: none"> • Tacámbaro, Pedernales - Mpio. de Tacámbaro ^[5, 2] • Tzitzio - Mpio. de Tzitzio ^[5] • Tuxpan – Mpio. de Tuxpan ^[2] • Jucutácato, Zumpimito – Mpio. de Uruapan ^[2] • La Palma de Jesús – Mpio. de Venustiano Carranza ^[2] • Tuzantla – Mpio. de Tuzantla ^[2]
Estado de México	<ul style="list-style-type: none"> • Santo Tomás de los Plátanos - Mpio. de Santo Tomás ^[5] • Valle de Bravo – Mpio. de Valle de Bravo ^[2] • Zacazonapan – Mpio. de Zacazonapan ^[2] • Ixtapan del Oro – Mpio. de Ixtapan del Oro ^[2] • Atlacomulco – Mpio. de Atlacomulco ^[2] • Tonalco – Mpio. de Tonalco ^[2]
Querétaro	<ul style="list-style-type: none"> • Cañon de los Cajones - Mpio. de Santiago de Querétaro ^[5]
Oaxaca	<ul style="list-style-type: none"> • Silacoyoapan – Mpio. de Silacoyoapan ^[2] • Ciudad de Oaxaca – Mpio. de Oaxaca ^[2] • Tamazulapam del Progreso – Mpio. de Tamazulapam del Progreso ^[2]
Puebla	<ul style="list-style-type: none"> • Atencingo – Mpio. de Chietla ^[1] • La Galarza – Mpio. de Izúcar de Matamoros ^[1] • San Felix Rijo – Mpio. de Tilapa ^[1] • Teruel – Mpio. de Tepeojuma ^[1] • Tecamatlán – Mpio. de Tecamatlán ^[2]

2.7. Análisis filogenéticos previos para delimitar a *Centruroides limpidus*

Towler et al. (2001) realizaron un estudio en donde se analizaron las relaciones filogenéticas de las especies de *Centruroides* oriundas de Michoacán, incluyendo a los entonces *Centruroides limpidus limpidus* y *C. limpidus tecomanus*. Del análisis resultó la topología de la figura 7. Los ejemplares de *Centruroides limpidus* se agrupan en dos clados bien soportados con distribuciones geográficas definidas. El primero con ejemplares de los municipios de Tzitzio, Huetamo y Churumuco de Morelos en Michoacán; y Tzirándaro en el estado de Guerrero, todos dentro de la depresión del Balsas. El segundo contiene ejemplares de Huitzucó, Guerrero que, según los autores, es la localidad más cercana a la localidad tipo de la especie; y Querétaro, una localidad completamente diferente, perteneciente a la zona del Bajío Mexicano. Años más tarde, Ponce-Saavedra y Francke (2004) designaron la especie *Centruroides balsasensis* a partir de evidencia morfológica y biogeográfica, pero también haciendo uso del trabajo de Towler et al. (2001), pues el primer clado discutido corresponde realmente a este taxón.

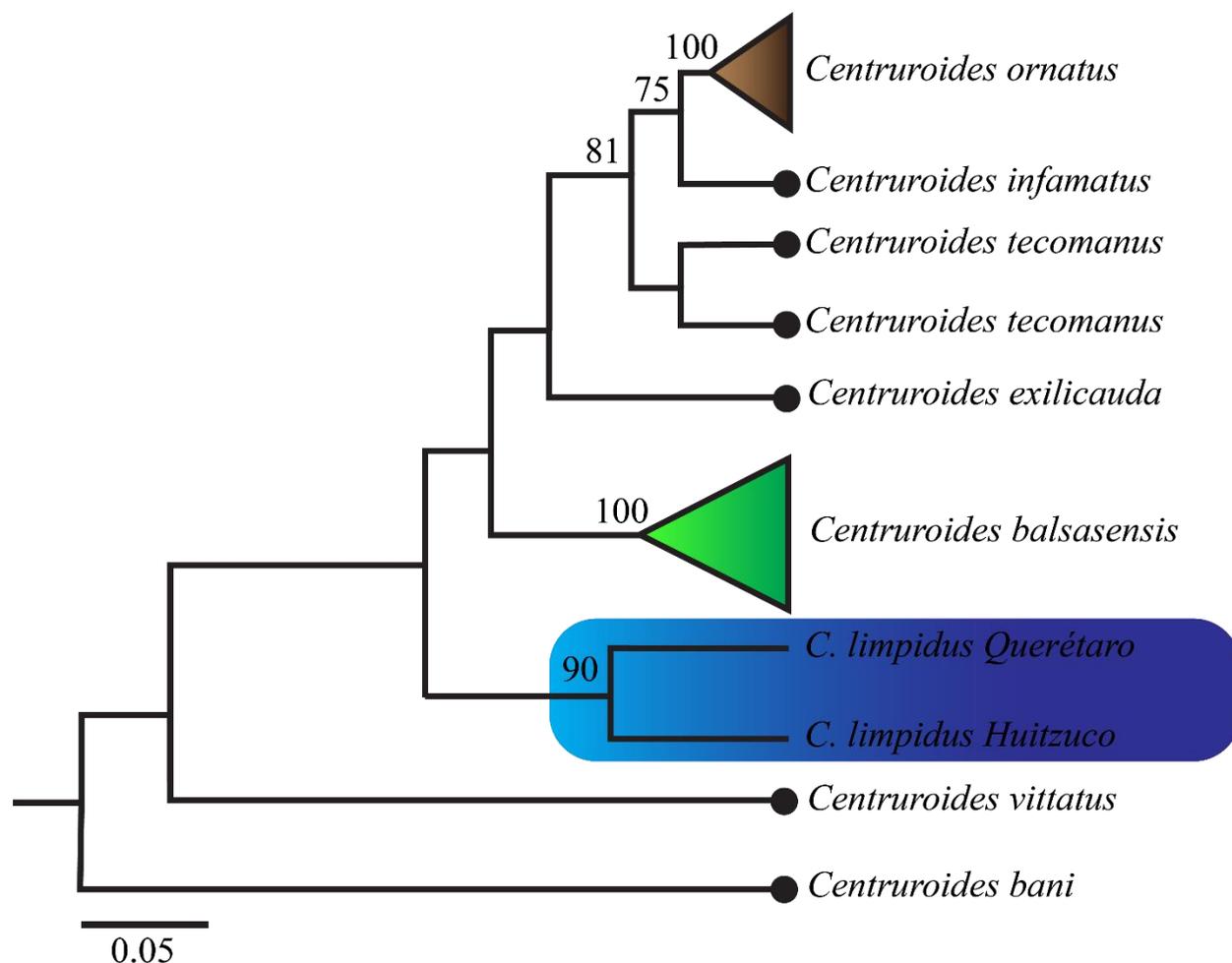


Figura 7.- Cladograma modificado de Towler et al. (2001) obtenido usando el criterio de máxima verosimilitud. En la publicación original, el clado en verde representaba a otra población de *C. limpidus* oriunda de Michoacán; aquí fue designada con base en la corrección de Ponce-Saavedra y Francke (2004). El clado en azul está constituido de dos organismos pertenecientes a *C. limpidus*.

Ponce-Saavedra et al. (2009) llevaron a cabo un análisis morfométrico y filogenético para delimitar a *C. limpidus*, *C. tecomanus* y *C. balsasensis*. Utilizando los criterios de optimización de Neighborn Joining y Minimum Evolution, obtuvieron dos dendogramas muy similares, con un clado de *C. limpidus* compuesto de dos grupos: 1) El primero representado por ejemplares del Estado de México, dos municipios de Michoacán y uno de Querétaro; 2) El otro clado lo conforman dos ejemplares colectados de Huitzucó, al sudeste de Guerrero (Figura 8). En este caso, a diferencia de la investigación de Towler et al. (2001), se puede observar la divergencia de

C. limpidus en dos clados definidos geográficamente. Por otro lado, también se concluye que existe una zona de simpatria en las poblaciones de *C. limpidus* y *C. balsasensis* en Tzitzio Michoacán. Como es claro, en ambos estudios se aprecia una separación entre las poblaciones del oeste, las cuales se encuentran en los estados de Michoacán, Estado de México y Querétaro; y las poblaciones del este, las cuales fueron colectadas en los estados de Morelos, Puebla y Guerrero.

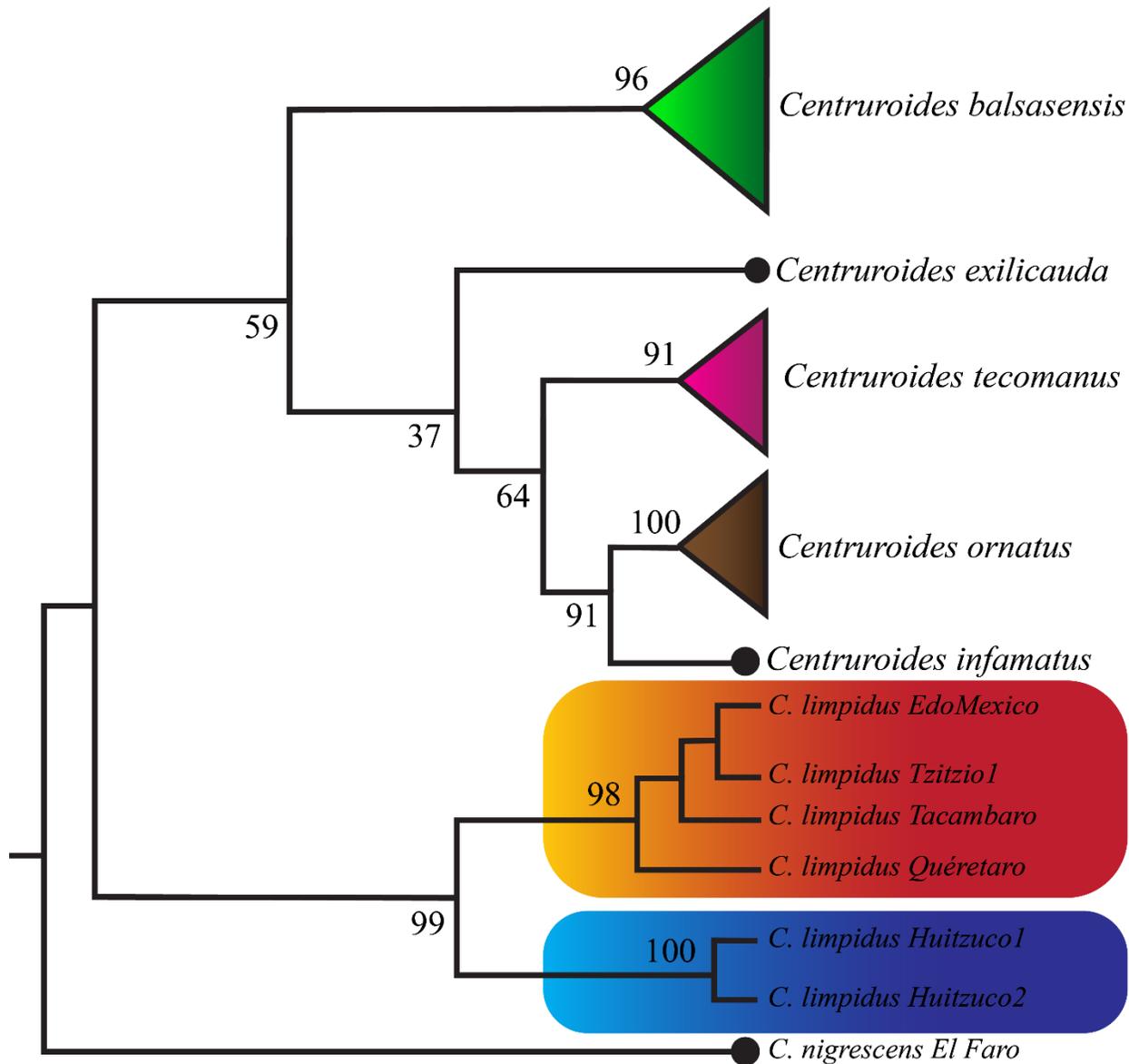


Figura 8.- Dendrograma modificado de Ponce-Saavedra et al. (2009) obtenido usando el criterio de mínima evolución. En rojo, el clado con las especies de *C. limpidus* oriundas de Michoacán, Estado de México y Querétaro; en azul, el clado con las especies de *C. limpidus* oriundas del sureste de Guerrero. Los valores soporte Bootstrap se muestran sobre las ramas correspondientes.

3. JUSTIFICACIÓN

En México el alacranismo es un problema de salud pública prevalente, que afecta a miles de personas anualmente (González-Rivera et al., 2004; Possani, 2005; Baldazo-Monsivaiz *et al.*, 2013; Chávez-Haro y Ortiz, 2015; Ponce-Saavedra et al., 2016 en González-Santillán y Possani, 2018; Cid-Uribe et al., 2018). El eficaz tratamiento de las picaduras, la difusión de información y el trabajo de investigación sobre las especies del género *Centruroides* ha contribuido sustancialmente para mitigar el problema. De acuerdo con Possani (2005) y González-Santillán y Possani (2018), dos de los estados con más casos de alacranismo por número de habitantes son Guerrero y Morelos. La identidad taxonómica y distribución de los taxones que habitan estos estados son de importancia para el desarrollo de planes de manejo epidemiológico eficientes. Una de estas especies es *Centruroides limpidus*, cuya área de distribución abarca estos estados, así como otros donde la incidencia de alacranismo es prevalente. La correcta evaluación de la taxonomía de esta especie, así como una propia delimitación de su área de distribución es crítica como información fundamental sobre la cual realizar investigación epidemiológica.

4. HIPÓTESIS

Considerando los antecedentes respecto a la divergencia de *C. limpidus*, los análisis filogenéticos realizados con información adicional recuperarán una topología que pondrá en evidencia el mismo patrón. Además, los árboles exhibirán una separación entre las poblaciones del este y del oeste. Asimismo, el análisis de delimitación de especies, a través del programa BPP, corroborará la divergencia discutida anteriormente. Finalmente, el modelo de distribución potencial será congruente con la demarcación ecológica de las poblaciones de *C. limpidus* que habitan los estados de Morelos, Puebla y el sur de Guerrero en comparación con aquellas que se encuentran en los estados de Michoacán y Estado de México.

5. OBJETIVOS

Delimitar molecularmente a la especie *Centruroides limpidus*, empleando técnicas de reconstrucción filogenética y un análisis de delimitación de especies bayesiano. Además, elaborar un mapa de distribución usando registros publicados en bases de datos públicas. Finalmente, se construirá un modelo de distribución potencial de acuerdo a lo resultados de los análisis filogenéticos y de delimitación de especies.

5.1. Objetivos particulares

1. Realizar un análisis filogenético con secuencias publicadas en bases de datos públicas, así como de secuenciadas de especímenes recientemente recolectadas de la especie *Centruroides limpidus*, utilizando el criterio de optimización de máxima verosimilitud en el programa IQ-TREE, así como bajo el modelo de coalescencia de múltiples especies con el programa ASTRAL.
2. Usando los árboles filogenéticos resultantes, corroborar la divergencia observada en las poblaciones de *Centruroides limpidus* a través del programa de delimitación de especies BPP (Bayesian Phylogeography and Phylogenetics), basado en el modelo de coalescencia de múltiples especies.
3. Actualizar la distribución de *C. limpidus* a través de la generación de un mapa que integre la información publicada y los resultados taxonómicos presentados en esta aportación.
4. Se construirá un modelo de distribución potencial de las poblaciones de *Centruroides limpidus* a partir de los resultados de los análisis filogenéticos y la delimitación de especies.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Muestro taxonómico

Con el fin de someter a prueba la estabilidad taxonómica de *Centruroides limpidus* se incluyeron muestras de la mayoría de su área de distribución, así como secuencias de otros taxones cuya cercanía taxonómica o filogenética ya se había probado en estudios previos (Towler et al., 2001; Ponce-Saavedra et al., 2009, Esposito y Prendini, 2019, González-Santillán et al. 2020). Los taxones elegidos fueron *Centruroides elegans* [n = 4], *Centruroides meisei* [n = 3], *Centruroides limpidus* [n = 13], *Centruroides noxius* [n = 4], *Centruroides balsasensis* [n = 8], *Centruroides baergi* [n = 4] y *Centruroides gracilis* [n = 4] siguiendo los resultados de Esposito y Prendini (2019) y González-Santillán et al. (2020). Se eligió a *Centruroides gracilis* para enraizar el análisis ya que esta especie pertenece al grupo *gracilis* (Ponce-Saavedra y Francke, 2019), perteneciente al clado de América Central, hermano del clado de Norte América, donde se encuentra *C. limpidus* (Esposito y Prendini, 2019).

La obtención de las secuencias se realizó a través de una búsqueda en la base de datos GenBank, buscando bajo nombre de taxón y a través de un BLAST. Adicionalmente se secuenciaron siete ejemplares, incluido un ejemplar de *C. limpidus* procedente de Puebla, representante de la localidad tipo de la especie. En suma, se emplearon 39 terminales representando siete especies de *Centruroides* incluidas en el análisis, de las cuales cinco se obtuvieron *de novo* y 34 de GenBank. En el cuadro 3 se muestra la lista de las especies, procedencia, marcadores y coordenadas de recolecta.

6.2. Secuenciación de marcadores moleculares

La extracción de DNA se realizó usando tejido muscular del cuarto par de patas y procesado con el kit de extracción Qiagen DNEasy Blood and Tissue de acuerdo con los protocolos estándar. La amplificación de los genes de interés se realizó a través de ciclos térmicos dentro de tubos Eppendorff usando un protocolo de PCR, el cual se condujo utilizando 1µl de Pure-Taq-Ready-To-Go PCR para cada dirección del primer, 2µl del DNA modelo, así como 21µl de agua para

PCR. El perfil térmico empleado se aplicó de la siguiente forma: 94°C por 3:00 minutos, 94°C por 0:30 minutos, 55-42°C durante 0:30 minutos (Dependiendo del marcador secuenciado), 72°C por 0:45 minutos y, finalmente, 72°C durante 7:00 minutos. Se realizaron un total de 40 ciclos.

La verificación de los productos del PCR se realizó a través de una electroforesis con gel de agarosa-TBE al 1% teñido con SYBR Safe. Los productos amplificados se limpiaron utilizando esferas paramagnéticas de electroforesis (Beckman Coulter) y fueron posteriormente resuspendidos en 40 µl de agua purificada para DNA. Los productos amplificados fueron secuenciados en ambas direcciones. Cada 8µl de la mezcla de la reacción de secuenciación incluyó 1µl de Big Dye, 1µl de Big Dye Terminating Buffer, 1µl de 3.2 pm primer y 5 µl del producto de la amplificación. La secuenciación de las muestras se realizó a través de una termocicladora Eppendorff Mastercycler durante 35 ciclos y empleado el siguiente perfil térmico: 96°C durante 0:15 minutos, 50°C durante 0:15 minutos, 60°C durante 4:00 minutos, posteriormente manteniéndolo a 4°C. Los productos de la secuenciación fueron limpiados con esferas paramagnéticas CleanSeq. Posteriormente, los productos fueron resuspendidos en EDTA para transferir 33µl a un tubo Eppendorff y ser analizados en el secuenciador de DNA automático Prism 3730xl (Applied Biosystems, Inc).

Las cadenas complementarias de DNA fueron ensambladas en secuencias consenso a través del programa Sequencher ver. 5 (Gene Code Corporations, 2010). Se realizó la remoción de todos los primers añadidos a las secuencias y se evaluó su calidad vía la búsqueda de discordancia entre secuencias observadas en el cromatograma.

Cuadro 3.- Número de acceso de las secuencias obtenidas de GenBank y BLAST correspondientes a los marcadores mitocondriales 16S (n = 35) y COI (n = 20), con localidad y georreferencia. Las fuentes de donde se obtuvieron las secuencias publicadas fueron: Bolaños et al. (2018) [1], Ponce-Saavedra et al. (2009) [2], Towler et al. (2001) [3], Esposito et al. (2018) [4], Esposito y Prendini (2018) [5], Teruel et al. (2007) [6], Dávila et al. (2005) [7].

- Secuencias registradas como *C. limpidus* en GenBank y cuyo registro debe ser *C. balsasensis* se indican con * (Ponce-Saavedra et al., 2009).
- Secuencias registradas como *C. limpidus* en GenBank y cuyo registro debe ser *C. elegans* se indican con ** (Revisar sección de Resultados).

Espece	Número de acceso 16S n = 35	Número de acceso COI n = 20	Coordenadas geográficas	Localidad
<i>Centruroides limpidus</i>	MF134690.1 [1] *****	MF134791.1 [1] AY803353.1 [7]	***** *****	Cuernavaca, Morelos Cuernavaca, Morelos
	EU499950.1 [2]	*****	*****	*****
	EU499940.1 [2]	*****	18°18'19", -99°20'05"	Huitzucu, Guerrero
	EU499939.1 [2]	*****	19°09'21", -100°13'30"	Santo Tomás de los Plátanos, Estado de México
	EU499938.1 [2]	*****	19°35'00", -100°55'05"	Tzitzio, Michoacán
	EU492908.1 [2]	*****	19°14'00", -101°27'04"	Tacámbaro, Michoacán
	EU499949 [2]	*****	*****	*****
	AF439764.1 [3]	*****	20°40'47", -100°25'39"	Santiago de Querétaro, Querétaro
	AF439763.1 [3]	*****	18°18'19", -99°20'05"	Huitzucu, Guerrero
	AF439758.1 [3]	*****	*****	Churumuco, Michoacán
C.limp_pue *****	***** C.limp_mia_mor	18°20'24.9", -98°57'16.2" 99°21', -18°45'	Jolalpan, Puebla Miacatlán, Morelos	
<i>Centruroides gracilis</i>	MK479022.1 [5]	MK479175.1 [5]	*****	Vargas, Venezuela
	MF134689.1 [1]	MF134801.1 [1]	*****	Tuxtepec, Oaxaca
	KY981894.1 [4]	KY982180.1 [4]	21°11'14", -109°54'16"	Tamazunchale, Hidalgo
	DQ990822.1 [6]	*****	*****	Santiago de Cuba, Cuba
<i>Centruroides elegans</i>	MK479031.1** [5]	MK479170.1** [5]	*****	Jalisco, México
	MK479017.1 [5]	MK479184.1 [5]	*****	Jalisco, México
	EU499948.1 [2]	*****	*****	*****
<i>Centruroides meisei</i>	MF134691.1 [1]	MF134792.1 [1]	*****	Emiliano Zapata, Jalisco
	MK479034.1 [5]	MK479187.1 [5]	*****	Guerrero, México
	C.meis_1 C.meis_2	C.meis_1 C.meis_2	***** *****	Copala, Guerrero Copala, Guerrero
<i>Centruroides baergi</i>	MK479009.1 [5]	MK479162.1 [5]	*****	Oaxaca, México
	MF134702.1 [1]	MF134794.1 [1]	*****	Zapotitlán Puebla
	MF134701.1 [1]	MF134793.1 [1]	*****	Zapotitlán, Puebla
	*****	AY995823.1 [7]	*****	*****
<i>Centruroides noxius</i>	MF134699.1 [1]	MF134797.1 [1]	*****	Pantanal, Nayarit

	MF134698.1 ^[1]	MF134796.1 ^[1]	*****	Pantanal, Nayarit
	MK479040.1 ^[5]	MK479193.1 ^[5]	*****	Nayarit, México
	*****	C.nox_1	¿?	¿?
<i>Centruroides balsasensis</i>	AF439761.1* ^[3]	*****	*****	Tzirandaro, Guerrero
	AF439759* ^[3]	*****	18°39'39", -101°38'46"	Churumuco, Michoacán
	EU499941.1* ^[2]	*****	¿?	¿?
	AF439760.1* ^[3]	*****	19°33'00", -100°55'5"	Huetamo, Guerrero
	AF439762.1* ^[3]	*****	19°35'00", -100°55'05"	Tzitzio, Michoacán
	EU499934 ^[3]	*****	18°28'37", -100°58'46"	Tzirandaro, Guerrero
	EU499937 ^[3]	*****	19°33'00", -100°55'5"	Huetamo, Guerrero

6.3. Análisis filogenéticos

El alineamiento de las secuencias para cada marcador se realizó utilizando en servidor en línea de MAFFT versión 7 (Kato et al., 2019). Se implementó la estrategia de alineamiento G-INS-i, opción apropiada cuando se tienen secuencias de largos similares (Kato et al., 2005). El parámetro de matriz de costos se ajustó a PAM1, adecuada para secuencias provenientes de taxones cercanamente relacionados (Wheeler, 2002). Con el fin de evaluar la calidad del alineamiento, se utilizó el programa GUIDANCE2 (Ladan y Graur, 2008; Penn et al., 2010; Sela et al., 2015), el cual se basa en un puntaje que refleja la robustez de un alineamiento a perturbaciones. Este método genera un conjunto de alineamientos múltiples, los cuales son calculados a partir de muestras bootstrap obtenidas del alineamiento original. Para el presente análisis, se implementaron 100 remuestreos. Estas muestras son posteriormente comparadas con el alineamiento de base, el cual se genera previo al cálculo de los árboles bootstrap. Esta comparación determina un valor de certidumbre (de 0 a 1) para cada residuo, par de residuos, columnas y secuencias del alineamiento. Asimismo, el algoritmo incorpora el uso de *Heads-or-tails* (HoT) scores (Ladan y Graur, 2008), el cual consiste en la comparación del alineamiento original con un conjunto de alineamientos co-óptimos, es decir, alineamientos con el mismo score máximo por el algoritmo de alineamiento. Esta aproximación mejora la determinación de los valores de certidumbre (Ladan y Graur, 2008; Sela et al., 2015).

Posteriormente, se eliminaron las columnas con sitios pobremente alineados usando el algoritmo Gblocks ver. 0.91b (Cartesana, 2000; Talavera y Cartesana, 2007). Este programa descarta estos sitios con base en dos criterios de inclusión: los bloques seleccionados deben de estar libres de segmentos continuos de regiones no conservadas, y las posiciones flanco deben de estar altamente conservadas, con la intención de preservar la precisión del alineamiento. Por su corto tamaño, se usaron parámetros “relajados” para la obtención de bloques en el caso del alineamiento del marcador 16S. Por otro lado, por su mayor tamaño, se emplearon parámetros “estrictos” en el caso de COI (Talavera y Cortesana, 2007).

Las matrices de datos se concatenaron usando el programa Mesquite ver. 3.61 (Maddison y Maddison, 2018). La matriz denominada como “GB” corresponde a la matriz procesada con Gblocks que resultó en un total de 911 nucleótidos alineados, con un 35.9% de datos faltantes.

Para explorar el efecto de eliminar estas secciones con poca información filogenética de la matriz, se realizó un análisis con las secuencias sin editar. La matriz concatenada y sin edición, denominada como “NGB”, incluyó 2045 sitios y tuvo un 39.15 % de datos faltantes.

Entre los múltiples algoritmos empleados para realizar una reconstrucción filogenética bajo el criterio de máxima verosimilitud, el programa IQ-TREE es ampliamente usado por la implementación efectiva de tres aspectos fundamentales: 1) selección de un modelo de evolución a través de ModelFinder, basado en el criterio de Información Bayesiano (BIC); 2) un algoritmo rápido de búsqueda heurística de tipo “hill-climbing” basado en la estrategia Nearest Neighbor Interchange (NNI, estrategia de intercambio de ramas); y una aproximación más rápida para calcular valores de soporte Bootstrap (Nguyen et al., 2015; Kalyaanamoorthy et al., 2017; Hoang et al., 2017). Tras varias iteraciones, el programa genera un árbol filogenético que maximiza el valor de verosimilitud de los parámetros (i.e., topología del árbol y largo de ramas) con mejores resultados que otros algoritmos similares (ej., RAxML) (Minh et al., 2020).

Empleando las matrices GB y NGB, se realizó una reconstrucción filogenética en el programa IQTREE2 ver. 2.0.6 (Nguyen et al., 2015). Asimismo, se determinó el valor de soporte para cada rama a través de la función UltraFast Bootstrap (Hoang et al., 2018). Adicionalmente, con la intención de determinar el soporte de cada loci y de cada sitio en la resolución de la topología, se incluyó el cálculo del factor de concordancia de genes (gCF), así como el factor de concordancia entre sitios (sCF). Los modelos de evolución para cada marcador fueron determinados a través de la función de ModelFinder dentro de IQ-TREE, basada en el criterio de información bayesiana (BIC) (Cherenor et al., 2016).

Una herramienta de reconstrucción filogenética que toma en consideración la posible presencia del sorteo incompleto de linajes es ASTRAL (Accurate Species Tree Reconstruction Algorithm). Este programa corresponde a un método de resumen, es decir, que realiza la construcción filogenética en dos pasos: primero se obtienen los árboles de genes de un alineamiento de forma independiente a través de una reconstrucción filogenética bajo el criterio de ML sobre un conjunto de secuencias alineadas, y después se resume la información en estos árboles para generar un árbol de especies. Previo al resumen de la información contenida en los árboles de genes, el algoritmo los descompone en cuartetos sin raíz, es decir, cuatro terminales unidos por una rama interna y organizados de acuerdo con el criterio de optimización usado. Estos cuartetos pueden tener una de tres posibles topologías y, para cada cuarteto obtenido de

todos los conjuntos de terminales, el árbol de especies inducirá una de las tres topologías (Shekhar et al. 2018; Zhang et al., 2020). Específicamente, ASTRAL resuelve el problema del árbol de genes con máximo soporte de cuarteto (Maximum Quartet Support Species Tree, MQSST). El puntaje de cuarteto para un árbol de especies dado un conjunto de árboles de genes es la suma del número de los cuartetos compartidos entre los árboles de genes y el árbol de especies. Es decir, el problema MQSST se enfoca en hallar el árbol de especies con el mayor puntaje de cuartetos con respecto a un conjunto de árboles de genes (Shekhar et al., 2018). De esta forma se puede realizar una reconstrucción filogenética incorporando la información discordante que es de esperarse bajo el modelo MSC en la evolución de los linajes. Por otro lado, bajo el modelo MSC, el cuarteto de árbol de genes más probable siempre será idéntico al cuarteto del árbol de especies correspondiente. Así, la descomposición en cuartetos asegura que la reconstrucción del árbol de especies corresponda con la topología de los árboles de genes más probables encontrados por el algoritmo (Mirarab, 2019).

Con la intención de explorar el comportamiento de los datos usando una aproximación distinta al método de concatenación, así como para tomar en cuenta la posible discordancia de las secuencias analizadas bajo el modelo MSC, se construyó una filogenia usando el programa ASTRAL ver. 5.7.7 (Mirarab et al., 2014; Mirarab y Warnow, 2015). Para este análisis, se estimaron los árboles para cada marcador (COI y 16S) de forma independiente con el programa IQTREE2 para después incorporar los árboles de genes en ASTRAL 7.5.5. Finalmente, se obtuvo el soporte las ramas en unidades de coalescencia (Sayyari y Mirarab, 2016).

6.4. Métodos de delimitación de especies

La delimitación de especies usando el modelo MSC es posible bajo un esquema Bayesiano, el cual calcula la probabilidad posterior de un conjunto de modelos de delimitación de especies. Los modelos de delimitación de especies son definidos por diferentes parámetros que describen el número de linajes, la topología, los largos (i.e., tiempo en generaciones) y anchos (i.e., tamaño poblacional) de rama de un árbol de especies, ajustados a una filogenia guía. Los modelos son evaluados iterativamente empleando un algoritmo Cadenas de Markov Monte Carlo reversibles. Esta aproximación ha sido ampliamente empleada a través del programa BPP (Bayesian Phylogenetics and Phylogeography). Recientemente se ha cuestionado la capacidad de

esta aproximación para discernir entre poblaciones y especies (Jackson et al., 2017; Sukumaran y Knowles, 2017). Sin embargo, Leaché et al. (2019), con base en una revisión de los análisis de Jackson et al. (2017) y Sukumaran y Knowles (2017), así como en estudios de simulación, proponen que BPP es una herramienta eficiente para distinguir entre linajes presuntamente considerados especies, las cuales tienen morfología críptica y distribución simpátrica.

Para someter a prueba las hipótesis sobre la estabilidad taxonómica de las especies y poblaciones de *C. limpidus* se utilizó el programa BPP versión 4.3.0 (Flouri et al., 2018). La elección de esta aproximación se basó en la posibilidad de incluir más de un marcador para la delimitación de especies. Específicamente, el programa se corrió utilizando el algoritmo A10 denominado “Delimitación de especies utilizando un árbol guía fijo” (Yang y Rannala, 2010; Rannala y Yang, 2013). El programa evalúa, utilizando cadenas de Markov reversibles (rjMCMC), distintos modelos de delimitación de especies a través de un análisis de secuencias guiándose a través de un árbol de especies de referencia que, en este caso, corresponde a los árboles obtenidos en el análisis previo con IQ-TREE y ASTRAL. La intención de usar ambas topologías radica en la influencia del árbol guía en el cálculo de probabilidad posterior de los modelos de delimitación de especie planteado por el programa (Leaché y Fujita, 2010). Las especificaciones del rjMCMC incluyen un total de 100,000 generaciones, con un muestreo cada segunda generación y un burn-in de 8000 generaciones (Nascimento et al., 2017; Flouri et al., 2020). Para explorar el efecto en la variación de los parámetros poblacionales se realizaron cuatro grupos de análisis (A-D) variando tamaño ancestral de la población y el nivel de divergencia (Leaché y Fujita, 2010; Gehara et al., 2017; Waichert et al., 2019) especificando la probabilidad *a priori* de los parámetros θ y τ (Cuadro 4). Valores bajos para la media del prior θ están asociados a probabilidades de especiación más elevadas, mientras que valores similares para τ no tienen impactos significativos (Leaché y Fujita, 2010). Todos los análisis se corrieron dos veces usando distintas semillas y usando los dos algoritmos de rjMCMC con el fin de asegurar la convergencia o mezcla adecuada (mixing) en las cadenas de Markov. Se utilizó un $\alpha = 3$ para el primer parámetro de las distribuciones gamma inversas especificadas, pues, como lo sugiere el manual del programa se recomienda al tratar con especies cuya información sobre los tiempos de divergencia y tamaños de población ancestrales/actuales) es desconocida (Flouri et al., 2018; Flouri et al., 2020). Finalmente, con el fin de someter a prueba si BPP es capaz de reconocer linajes independientes usando nuestros datos, se modificó artificialmente la monofilia de *C.*

balsasensis en los árboles guía, separándolo en dos clados divergentes. De igual forma, para los datos artificiales se realizó el protocolo descrito.

Cuadro 4.- Diseño del análisis de delimitación de especies (algoritmo 10) del programa BPP, a ser considerado para las topologías de ML y ASTRAL.

Análisis	Tiempos de Divergencia	Tamaño Poblacional Ancestral	Gamma Inversa Prior (θ)	Gamma Inversa Prior (τ)	Media y Varianza de Ambos Priors
A	Recientes	Grandes	\sim IG (3, 0.01)	\sim IG (3, 0.004)	$\theta\bar{x} = 0.01$ $\tau\bar{x} = 0.002$ $\theta s^2 = 2.5 \times 10^5$ $\tau s^2 = 4 \times 10^6$
B	Recientes	Pequeños	\sim IG (3, 0.004)	\sim IG (3, 0.004)	$\bar{x} = 0.002$ $s^2 = 4 \times 10^6$
C	Profundos	Pequeños	\sim IG (3, 0.004)	\sim IG (3, 0.01)	$\theta\bar{x} = 0.002$ $\tau\bar{x} = 0.01$ $\theta s^2 = 4 \times 10^6$ $\tau s^2 = 2.5 \times 10^5$
D	Profundos	Grandes	\sim IG (3, 0.004)	\sim IG (3, 0.004)	$\bar{x} = 0.01$ $s^2 = 2.5 \times 10^5$

6.5. Obtención de datos georreferenciados y mapas de distribución

La evaluación del área de distribución de *C. limpidus* se realizó a través del sistema de información geográfica del programa QGIS ver. 3.16.0. El mapa con la división geopolítica de México y el mapa de las divisiones biogeográficas de México del Catálogo de Metadatos Geográficos se obtuvieron a través del Portal de Información Geoinformática de CONABIO (CONABIO, 2020). Los mapas topográficos se obtuvieron del portal de Shuttle Radar Topography Mission (Jarvis et al., 2008). En primer lugar, se obtuvieron todos los datos de incidencia de *C. limpidus* del portal de GBIF (Global Biodiversity Facility), el cual cuenta con información georreferenciada proveniente de colecciones biológicas. Usando toda esta información, se construyó un mapa de distribución, el cual contiene datos provenientes de la Colección de Nacional de Arácnidos del Instituto de Biología (CNAN), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); la Colección de Artrópodos de Importancia Médica (CAIM),

Laboratorio de Entomología del InDRE; y del Museo de Zoología Comparativa de la Universidad de Harvard (IZ).

Una vez obtenidas todas las observaciones, se curó la base de datos considerando los siguientes criterios: (1) Que las observaciones correspondieran al área de distribución de los registros publicados (Cuadro 2); y (2) que los registros se encontraran respaldados por organismos depositados en alguna colección biológica y que dicho registro tuviera información del colector, identificador y georreferencia. En el caso de las muestras tomadas de la Colección Nacional de Arácnidos del Instituto de Biología (CNAN), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) se llevó a cabo la observación directa de los organismos incluidos. Así, se elaboró un mapa de distribución usando los registros correspondientes (Cuadro 5). Finalmente, la curación de la base de datos, con base en los criterios anteriores se realizó a través de los paquetes Pandas y Regex, para manipulación y modificación de bases de datos; ambos dentro del lenguaje de programación Python ver. 3.0.1.

Cuadro 5.- Registros totales y filtrados de *C. limpidus* obtenidos de las colecciones biológicas empleadas para la elaboración del mapa de distribución.

Colección Biológica	Observaciones sin filtrar	Observaciones filtradas	Estados con registro
Colección de Artrópodos de Importancia Médica, InDRE (CAIM)	1187	70	Estado de México Guerrero Michoacán
Colección Nacional de Arácnidos (CNAN), Universidad Nacional Autónoma de México	283	21	Morelos Puebla Querétaro
Museum of Comparative Zoology, Harvard	15	3	Morelos
Total	1485	94	

6.6. Modelado de distribución potencial

Se construyeron dos modelos de nicho ecológico con el fin de delimitar el área de distribución potencial de *C. limpidus* usando como guía la agrupación del análisis filogenético, que indica que

existen dos clados con una distribución este y oeste. Previo a la construcción del modelo, se realizó un análisis de correlación a través del estadístico de Pearson y un análisis de componentes principales (PCA) para identificar qué variables climáticas pudieran resultar redundantes. Se analizaron 19 variables climáticas obtenidas entre 1970 al 2000 y elevación con resolución de $\sim 1\text{km}^2$ de la página de WorldClim (Fick y Hijmans, 2017). Asimismo, estas se recortaron de acuerdo con el área de distribución de *C. limpidus* reportado en la literatura, incluyendo las áreas potencialmente accesibles a la especie y representando un área con variedad climática para contrastar los puntos de fondo con los de ocurrencia. El recorte se realizó empleando el programa QGIS y se transformaron en formato de imagen georreferenciado (.tiff). Las variables con un valor de correlación mayor a 0.80 y cuya contribución a la variación fuera mínima en el análisis de componentes principales fueron excluidas (Mirshamsi, 2013; Feng et al., 2019). Los datos filtrados de coordenadas registradas para *C. limpidus* fueron usados como evidencia de ocurrencia para construir el modelo (Apéndice B, cuadros B1 y B2). Además, con el fin de mitigar sesgos de muestreo, los puntos georreferenciados se filtraron de manera que tuvieran una separación de 10 km^2 .

. El programa MaxEnt (Phillips et al., 2006), ha probado ser efectivo para el modelado de distribución potencial (Warren y Seifert, 2011) y ha sido utilizado para modelar la distribución de varios taxones de escorpiones (Haghani et al., 2020; Ureta et al., 2020). Este programa determina la idoneidad relativa de las especies sobre un mapa a partir de la minimizar la entropía entre las funciones de probabilidad en píxeles sobre puntos aleatorios tomados del fondo del área de estudio y sobre los puntos georreferenciados (Elith et al., 2006; Phillips et al., 2006; Muscarella et al., 2016). A pesar del buen desempeño del programa, la combinación de parámetros óptimo para la construcción del modelo en MaxEnt relevante. Para esto se emplea el paquete MDPeval (Muscarella et al., 2014), que realiza la construcción de varios modelos usando diferentes valores de los parámetros del modelo: La regularización de multiplicidad, que penaliza el incremento de la complejidad del modelo; y las transformaciones de las variables ambientales predictivas (Muscarella et al., 2014). Se configuró el modelado para evaluar con cinco regularizadores de multiplicidad, así como con todas las combinaciones de las variables ambientales relevantes. Los datos de ocurrencia se partitionaron con el modelo de jackknife n-1, el cual es ideal para evaluar muestras pequeñas ($n < 25$) (Pearson et al., 2007). Posterior a la construcción de los modelos, se determina el más óptimo a través del cálculo del criterio de información Akaike corregido (AICc)

para los mismos. Este estadístico estima, para un conjunto de modelos, el balance entre bondad de ajuste y complejidad de estos: valores bajos de AICc indican mejor optimalidad en la construcción del modelo. Finalmente, se reportó el valor del área bajo la curva (AUC), derivado de la curva ROC, que estima la capacidad del modelo de discernir eficientemente entre las condiciones ambientales sobre las ocurrencias y las condiciones ambientales del fondo, así como la tasa de omisión por cada modelo evaluado (Mateo et al., 2011), la contribución porcentual de ganancia y el porcentaje de la importancia de permutación de cada variable entre el conjunto de entrenamiento y los datos de fondo. Haciendo uso de esta información, e igualmente apoyándonos de la información disponible en GBIF, así como plataformas de colección de datos climáticos (), se construye un marco general sobre algunos aspectos ecológicos de la especie en cuestión. El análisis de los datos se realizó a través del paquete Pandas del lenguaje de programación Python ver 3.0.1 y algunas de las visualizaciones de obtuvieron por medio del programa Power BI Desktop ver. 2.98.100.

Con la combinación óptima de parámetros para generar el modelo, se optó por tomar en cuenta el sesgo de muestreo en los datos a través de la construcción de mapas usando una malla de sesgo (i.e., bias grid). Este documento refleja el esfuerzo de muestreo del área de estudio, corrigiendo así el sesgo de muestreo de los datos de presencia (Phillips et al., 2009; Kramer-Schadt et al., 2013; Fourcade et al., 2014). Para su realización, se emplearon los registros de *C. balsasensis* almacenados en GBIF, ya que su distribución es la más cercana entre las especies del género a la de *C. limpidus*. Finalmente, con la intención de indagar sobre la evolución de los nichos con la información de más de un MDP, se incluye el cálculo del estadístico de la *D* de Schoener. Este estadístico calcula la similitud entre dos nichos, considerando distribuciones de probabilidad definidas sobre el espacio geográfico (Warren et al., 2008).

7. RESULTADOS

7.1. Análisis filogenético

La certidumbre del alineamiento del marcador 16S mostró, en general, valores altos. En cuanto al score de las columnas, el valor más bajo fue 0.70, mientras que la gran mayoría obtuvo un valor > 0.95 ; el score de las secuencias fue de > 0.90 en todos los casos, excepto para la secuencia de *C. balsasensis* EU499937, que obtuvo un valor de 0.84. Finalmente, el score GUIDANCE2 para el alineamiento fue de 0.98. Por otro lado, el marcador COI siguió una tendencia similar, con valores para las columnas de > 0.90 en todos los casos, así como para las secuencias y un valor global de 1.0. El score GUIDANCE2 entre los alineamientos varió debido a la cantidad de secuencias empleadas entre ambos marcadores, 35 para 16S y 20 para COI. Por otro lado, el número de sitios constantes fueron, en proporción, más numerosos en el caso del COI comparado con el 16S. Asimismo, los bloques obtenidos a partir del análisis con Gblocks redujeron la cantidad de sitios para el marcador 16S de 511 a 304 y del COI de 1534 a 607.

Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de la aproximación de máxima verosimilitud y empelando las matrices GB y NGB se exhiben en las figuras 9 y 10, respectivamente. Los modelos de evolución empleados para cada marcador, así como la información sobre las secuencias se encuentra en el cuadro 6.

Cuadro 6.- Información estadística de las matrices GB y NGB utilizadas en el análisis filogenético.

Matriz	Marcador	Modelo de evolución	Número de sitios (total)	Sitios informativos	Sitios invariables
GB	16S	HKY+F+G4	304	99	183
	COI	TN+F+G4	607	120	447
	Concatenado	-	911	219	630
NGB	16S	HKY+F+G4	511	155	292
	COI	TIM3+F+G4	1534	194	1225
	Concatenado	-	2,045	349	1517

La figura 9 muestra la divergencia de *Centruroides limpidus* en dos clados, derivados de la matriz GB. Uno de estos clados está conformado por organismos de Querétaro, Estado de México

y Michoacán. Este clado es reconocido como el anteriormente mencionado “clado oeste”, el cual obtuvo buena resolución y valores de soporte moderados (Bootstrap = 78, Gcf = 100, Scf = 43). Su grupo hermano está conformado por organismos de Morelos, Puebla y Guerrero. A este clado, reconocidos como el mencionado “clado este” y presentó valores de soporte más bajos (Bootstrap = 72, Gcf = 0, Scf = 13.4), específicamente para los terminales colectados en el estado de Morelos (Bootstrap = 35, Gcf = 0, Scf = 0). Sin embargo, los terminales de Puebla y Guerrero presentaron una mejor resolución y soporte (Bootstrap = 71, Gcf = 100, Scf = 18.9). El clado de *C. limpidus* y sus clados internos obtuvieron valores de soporte bajos (Bootstrap = 61, Gcf = 0 y Scf = 30.8).

En cuanto a los otros grupos, se resolvió un clado hermano a *C. limpidus* que incluye las especies *C. meisei* y *C. elegans*. Este clado obtuvo mejores valores de soporte y refleja una parte del grupo *elegans*. Asimismo, la filiación de estos taxones se mantuvo constante a través de todas las reconstrucciones. De forma ordenada y secuencial, los ejemplares que representan *C. noxius*, *C. balsasensis*, *C. baergi* y *C. gracilis* formaron grupos monofiléticos con valores de soporte de moderados a buenos (Figura 9). Para esta resolución, *C. balsasensis* fue el único representante del grupo *elegans* que no fue incluido con el resto los miembros, encontrándose más cercanamente relacionado con *C. baergi* y corroborando su resolución en otros estudios (Esposito y Prendini, 2019; González-Santillán et al., 2020).

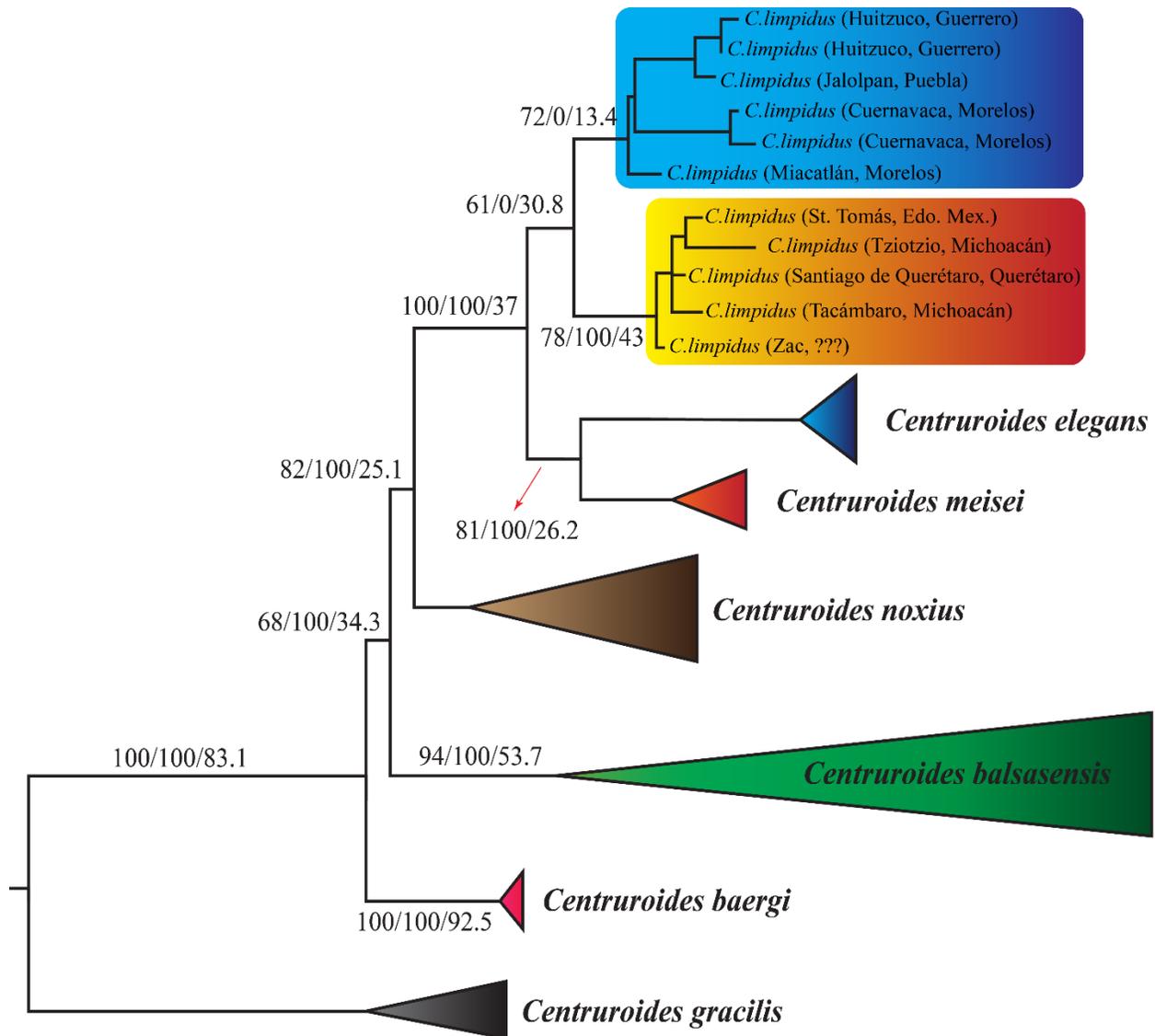


Figura 9.- Modificado del árbol de máxima verosimilitud obtenido del análisis de la matriz GB. El primer valor de soporte corresponde al Bootstrap, el segundo al factor de concordancia de genes y el tercero al factor de concordancia entre sitios.

El análisis de la matriz NGB (Figura 10) produjo una topología global similar a la anterior. Sin embargo, el clado oeste se agrupó con un clado conformado por *C. elegans* y *C. meisei*, con valores de soporte moderados (Bootstrap = 73, Gcf = 100 y Scf = 14.1). Asimismo, el clado oeste obtuvo buenos valores de soporte (Bootstrap = 98, Gcf = 100 y Scf = 66.8). A su vez, el clado del este se forma un grupo hermano con los clados mencionados con valores de soporte moderados (Bootstrap = 88, Gcf = 0 y Scf = 10.3). En este caso también se observa la filiación de *C.*

balsasensis con *C. baergi*, más cercanamente relacionado que con el resto de los representantes del grupo *elegans*.

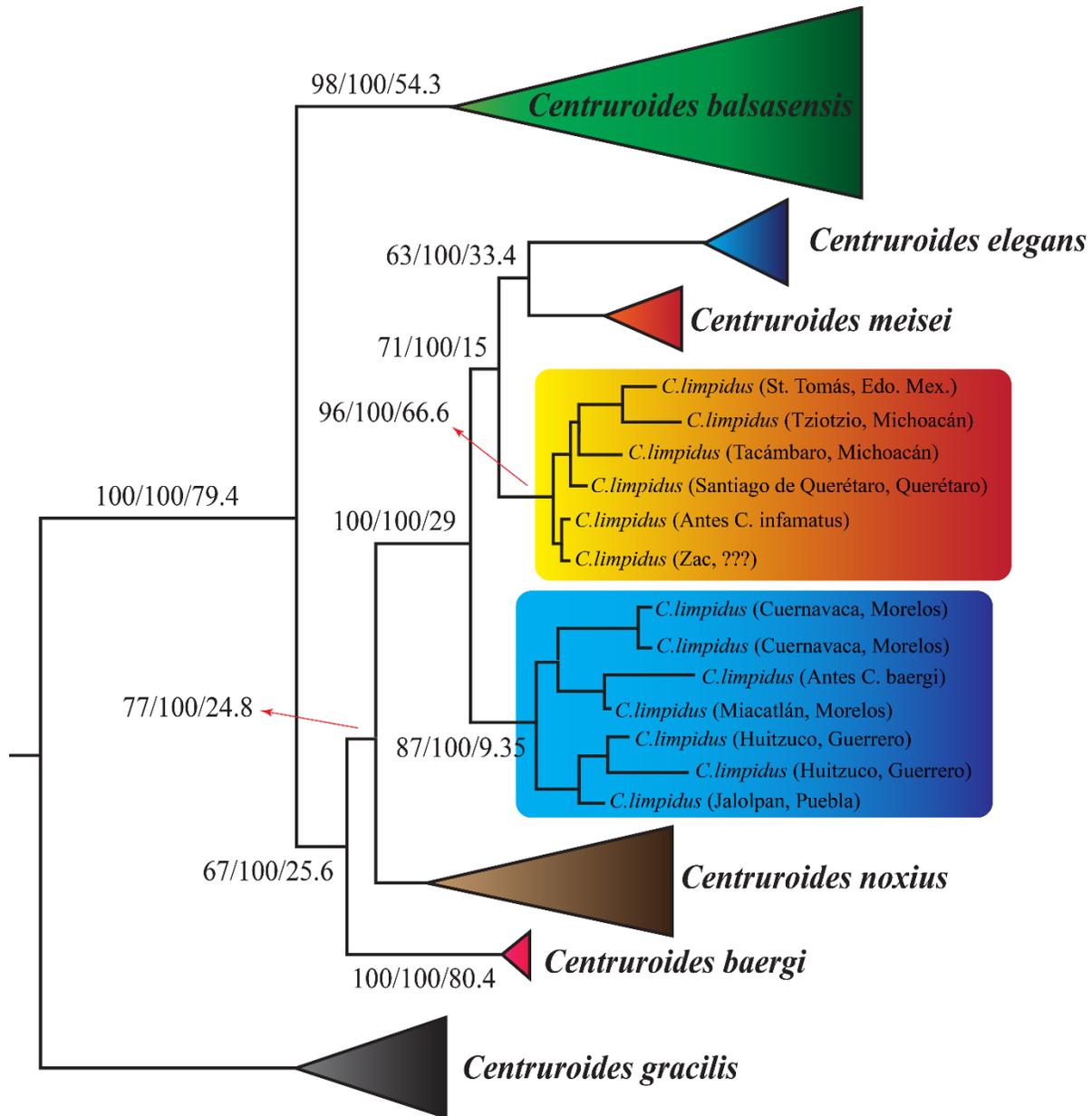


Figura 10.- Modificado del árbol de máxima verosimilitud derivado del análisis de la matriz NGB. El primer valor de soporte corresponde al Bootstrap, el segundo al factor de concordancia de genes y el tercero al factor de concordancia entre sitios.

Los árboles obtenidos con ASTRAL analizando tanto la matriz GB como la NGB muestran a *C. limpidus* dividido en tres clados (Figuras 11 y 12). Por un lado, el clado oeste es grupo hermano del clado conformado por las especies *C. elegans* y *C. meisei*. A su vez, este clado es hermano de un grupo constituido por los *C. limpidus* de Guerrero y Puebla. Finalmente, hermano a los clados anteriores están los *C. limpidus* de Morelos, formando, entre todos, un patrón de divergencia escalonado. Los tres clados obtuvieron un valor de soporte de 0.67, representado en unidades de coalescencia. En cuanto a los grupos restantes, su acomodo es idéntico al presentado en el análisis con IQTREE, incluso dentro de los clados de cada especie. La única diferencia que se obtuvo en la topología obtenida del análisis NGB es la distribución de los clados de *C. limpidus*, así como que valores de soporte son más bajos para algunas politomías.

Los resultados del análisis también permitieron identificar errores de etiquetado en algunas secuencias de GenBank. La secuencia AY995823.1, identificada como *C. baergi* y EU499949, identificada como *C. infamatus* en las bases de datos deben ser actualizadas, ya que el análisis consistentemente los agrupa en el clado de *C. limpidus*. Varias secuencias de *Centruroides limpidus*, publicadas por Towler et al. (2001) y posteriormente identificadas como *Centruroides balsasensis* por Ponce-Saavedra et al. (2009), se encuentran desactualizadas en las bases de datos donde residen (ej., EU499941, EU499948, EU499950) (Cuadro 3). Asimismo, la secuencia MK479031, etiquetada como *C. limpidus* por Esposito y Prendini (2019), representa un error de designación taxonómico y corresponde realmente al taxón *C. elegans*. Finalmente, la inclusión de *C. balsasensis* en el estudio, así como la ausencia de muestras usadas provenientes del área de distribución registrada para *C. tecomanus*, descartan la posibilidad que alguno de los clados divergentes de *C. limpidus* sea en realidad uno de estos taxones.

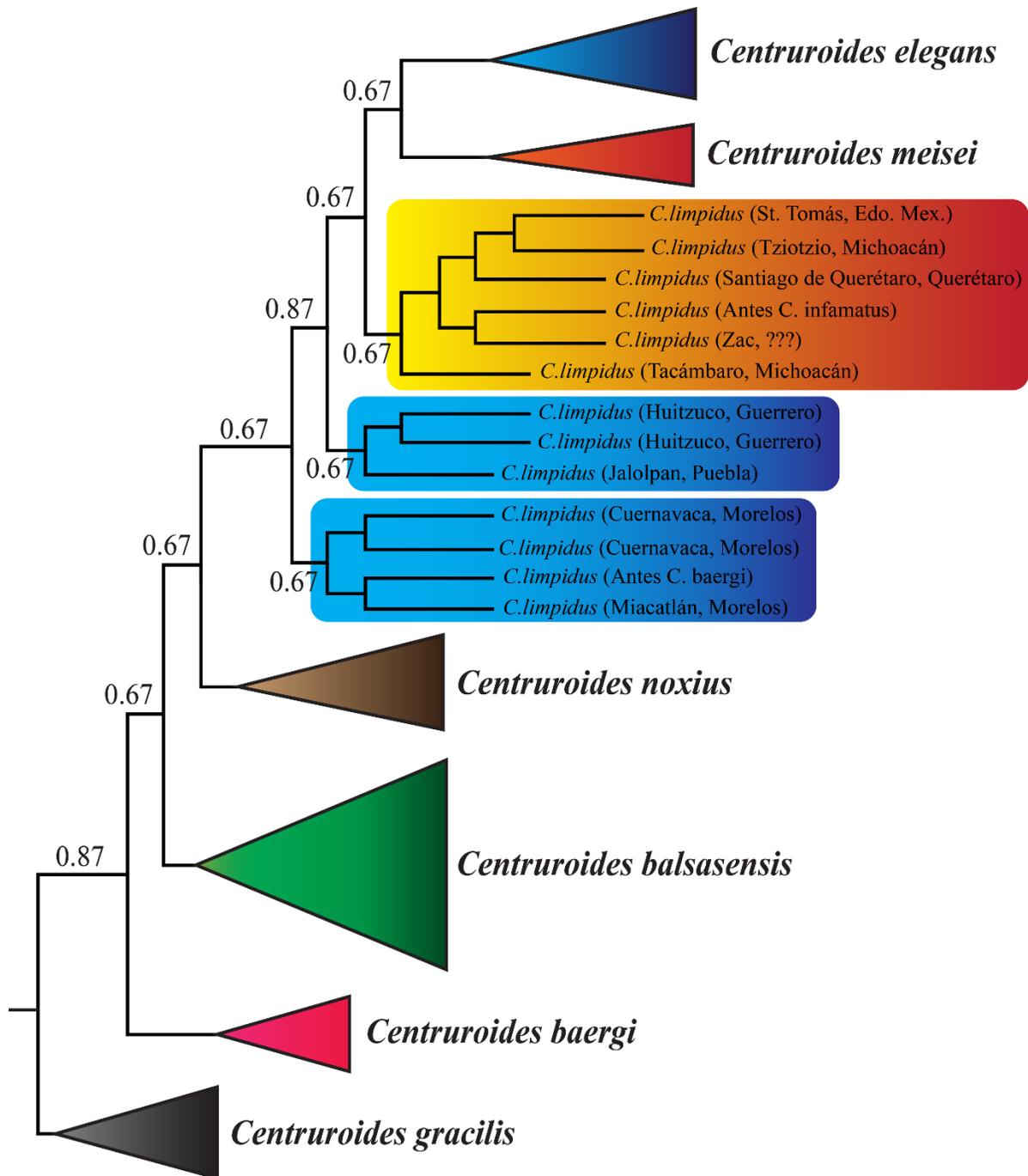


Figura 11.- Modificado del árbol de especies obtenido a través de ASTRAL usando la matriz GB. Los valores sobre las ramas representan su largo en unidades de coalescencia.

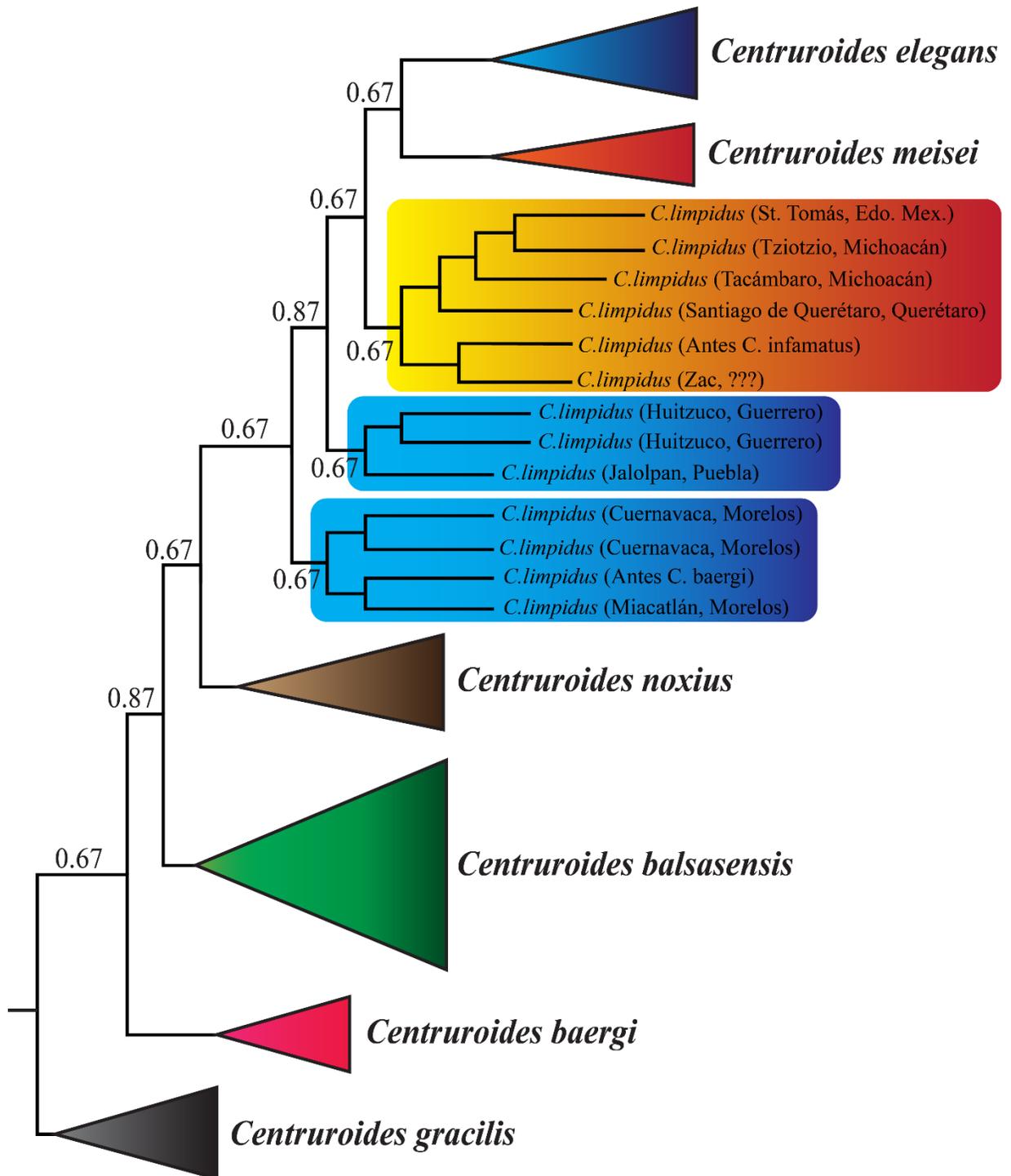


Figura 12.- Modificado del árbol de especies obtenido a través de ASTRAL usando la matriz NGB. Los valores sobre las ramas representan su largo en unidades de coalescencia.

7.2. Análisis de delimitación de especie

Se realizaron un total de 24 análisis variando diferentes parámetros, así como ambas topologías guía obtenidas con las matrices GB y NGB, resultantes de los análisis con IQTREE y ASTRAL. Adicionalmente, se aplicó la misma metodología a un escenario artificial en donde se separó a *C. balsasensis* en dos especies distintas. Para los análisis que incluyeron los árboles producidos por IQTREE (GB y NGB; figuras C1 y C2 en el apéndice C, respetivamente), se obtuvieron altos valores de soporte en todos los nodos del árbol guía, asignando la mayor probabilidad posterior al modelo que recupera todos los nodos internos del árbol guía, correspondientes a una topología con ocho especies (i.e., los grupos externos más los clados divergentes de *C. limpidus*: clado este y oeste), con alta probabilidad posterior. No obstante, análisis C, empleando el árbol guía de ASTRAL (GB), fue la excepción (Apéndice C, Cuadro C3). El análisis utilizando el árbol guía derivado de ASTRAL (Ambos árboles guía tienen la misma topología global) también resultó en alto soporte para todos los nodos internos propuestos y apoyando una resolución con nueve especies (i.e., los grupos externos más tres linajes divergentes de *C. limpidus*: El clado este menos los organismos de Morelos, los organismos provenientes de Morelos y el clado oeste). En este caso, soportando la existencia de nueve especies para la base de datos empleada. Finalmente, la para los análisis que incluyeron la alteración en la monofilia de *C. balsasensis*, se obtienen altos valores de soporte para todos los nodos excepto en la separación artificial. Es decir, el modelo con probabilidad posterior superior no soporta la bipartición de *C. balsasensis* (Apéndice C, cuadro C4). Los árboles guía para cada análisis se muestran en la figura 13, 14, 15 y 16 los cuales fueron generados empleando el software TreeView de ETE Toolkit (Huerta-Sepas y Sierra 2016). Dada la convergencia de las probabilidades posteriores cercanas a 1 del modelo que representa ocho para las topologías de IQTREE y nueve linajes para la topología de ASTRAL, la utilización de ambos algoritmos de delimitación, y variación de la semilla para cada análisis, se puede considerar que las cadenas de Markov corrieron sin inconvenientes (Yang, 2015).

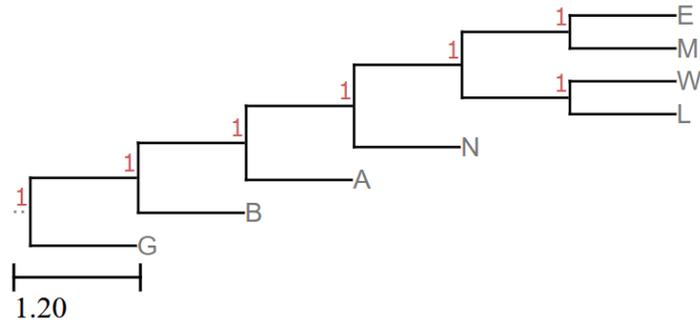


Figura 13.- Árbol guía derivado del análisis con máxima verosimilitud GB generado en el programa BPP con valores de probabilidad posterior para los nodos considerados como especies distintas. E: *C. elegans*, M: *C. meisei*, W: *C. limpidus* (Poblaciones del oeste), L: *C. limpidus* (Poblaciones del este), N: *C. noxius*, A: *C. balsasensis*, B: *C. baergi*, G: *C. gracilis*.

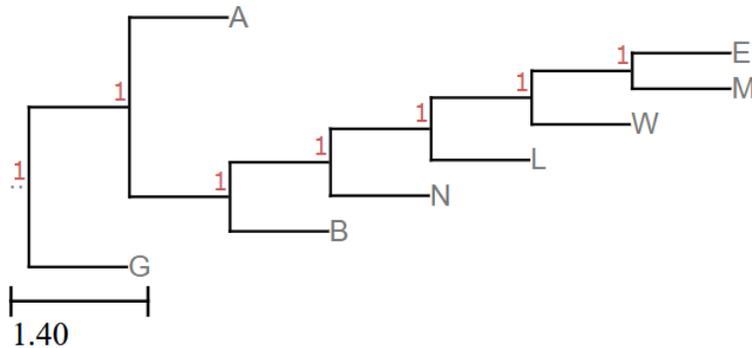


Figura 14.- Árbol guía derivado del análisis con máxima verosimilitud GB generado en el programa BPP con valores de probabilidad posterior para los nodos considerados como especies distintas. E: *C. elegans*, M: *C. meisei*, W: *C. limpidus* (Poblaciones del oeste), L: *C. limpidus* (Poblaciones del este), N: *C. noxius*, A: *C. balsasensis*, B: *C. baergi*, G: *C. gracilis*.

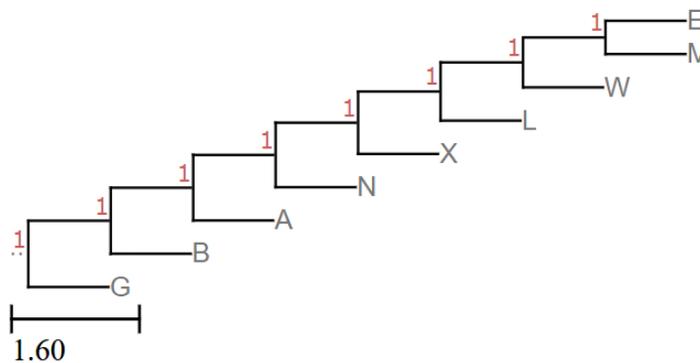


Figura 15.- Árbol guía derivado del análisis con ASTRAL GB y NGB (Las topologías fueron las mismas) generado en el programa BPP con valores de probabilidad posterior para los nodos considerados como

especies distintas. E: *C. elegans*, M: *C. meisei*, W: *C. limpidus* (Poblaciones del oeste), L: *C. limpidus* (Poblaciones de Guerrero y Puebla), X: *C. limpidus* (Poblaciones de Morelos), N: *C. noxius*, A: *C. balsasensis*, B: *C. baergi*, G: *C. gracilis*.

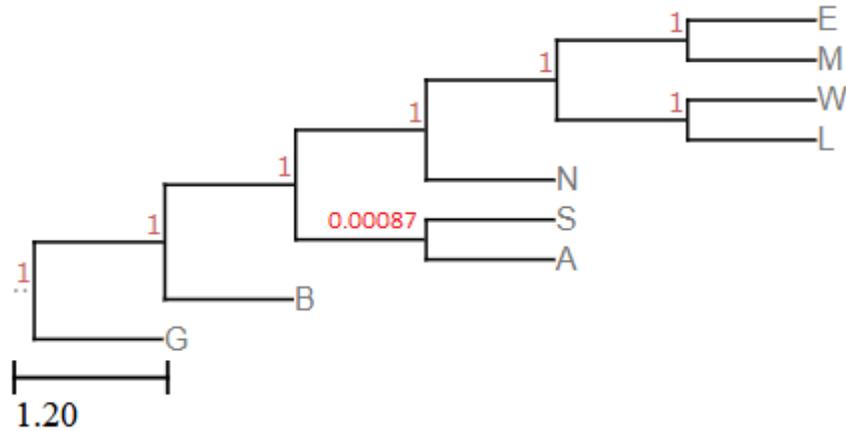


Figura 16.- Árbol guía artificial derivado de la modificación del árbol obtenido con IQTREE GB generado en el programa BPP con valores de probabilidad posterior para los nodos considerados como especies distintas. E: *C. elegans*, M: *C. meisei*, W: *C. limpidus* (Poblaciones del oeste), L: *C. limpidus* (Poblaciones de Guerrero y Puebla), S: *C. balsasensis* (Separación artificial), N: *C. noxius*, A: *C. balsasensis*, B: *C. baergi*, G: *C. gracilis*.

7.3. Delimitación Geográfica

El mapa presentado en la figura 17 incluye todos los registros obtenidos del acervo de GBIF para la especie *C. limpidus*.

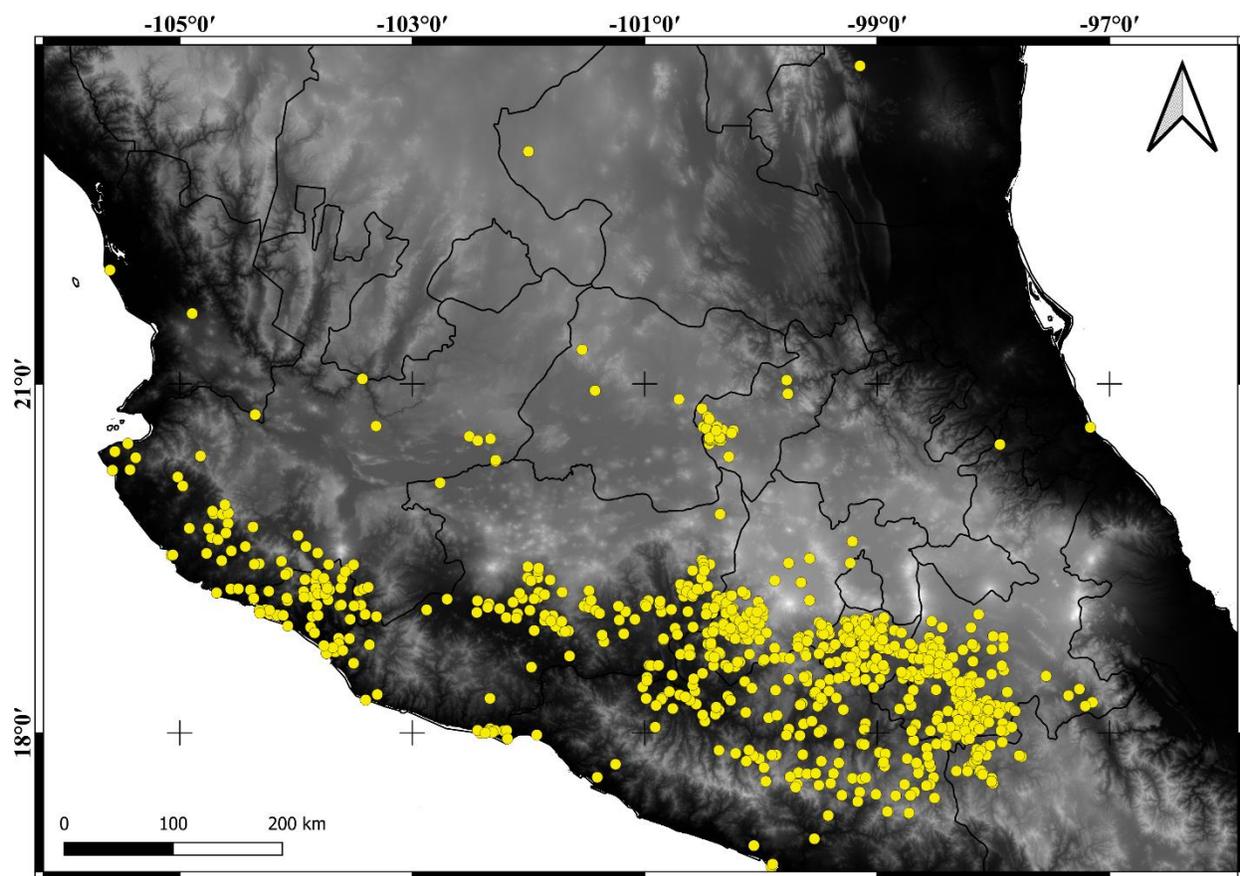


Figura 17.- Distribución de *C. limpidus* registrada en GBIF incluyendo todos los puntos de observación/recolecta provenientes de distintas bases de datos (i.e., sin filtros). La mayoría de estos registros provienen de la base de datos acumulada por la Colección de Artrópodos de Importancia Médica (CAIM), Laboratorio de Entomología (InDRE) y la aplicación Naturalista.

Considerando la resolución filogenética anteriormente planteada, los resultados del análisis de delimitación de especies, así como la inclusión de información sobre las provincias biogeográficas de México (Morrone et al., 2017), para el mapa de distribución con datos filtrados (Figura 18), se optó por dividir la distribución en dos clados (En azul y rojo). Las estrellas azules representan puntos georreferenciados de cuatro especímenes usados en el análisis filogenético, mismos que forman un solo clado y fueron recuperados como la misma especie en el análisis de delimitación de especies. Dichos organismos provienen de Cuernavaca, Morelos (18.94N, -

99.22W); Miacatlán, Morelos (18.75N, -99.35W); Jolalpan, Puebla (18.34N, -98.95W); y Huitzucó, Guerrero (18.30N, -99.33W). Los puntos azules corresponden a organismos que fueron seleccionados con base en su área de distribución (Este de México, dentro de la provincia de la Depresión del Río Balsas) como pertenecientes al mismo clado de las estrellas azules, es decir, al taxón *C. limpidus* del este. Por otro lado, las estrellas rojas hacen referencia a cuatro organismos recuperados como un clado divergente con respecto de las poblaciones de *C. limpidus* del este, y separados en el análisis de delimitación de especies. Estos son oriundos de Santo Tomás de los Plátanos, Estado de México (19.18N, -100.26W); Santiago de Querétaro, Querétaro (20.60N, -100.40W); Tacámbaro, Michoacán (19.23N, -101.46W); y Tzitzio, Michoacán (19.58N, -100.92 W). De igual forma, los puntos rojos fueron seleccionados con base en su área de distribución, la cual se encuentra cerca del límite de la provincia de la Depresión del Río Balsas con el Faja Volcánica Transversal, o bien dentro de este último, para representar organismos tentativamente pertenecientes al clado de la población del oeste. Finalmente, los puntos amarillos son aquellas observaciones que, a pesar de pasar todos los filtros, no se les puede asignar al clado del este o del oeste. La falta de claridad con estos puntos surge a partir de su ubicación, que está entre las dos poblaciones establecidas, y la incidencia de algunos sobre la provincia de la Sierra Madre del Sur (Color verde).

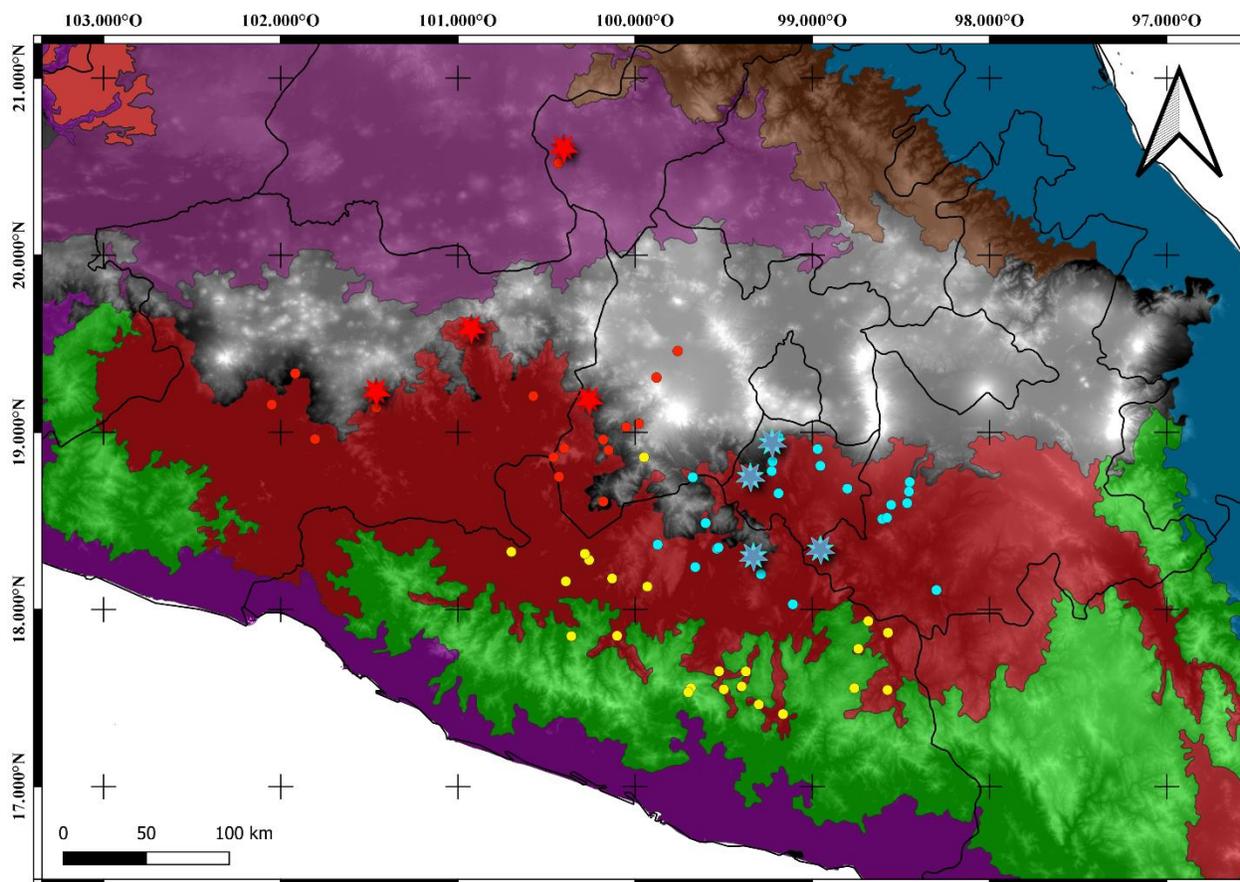


Figura 18.- Puntos georreferenciados de *Centruroides limpidus* filtrados (120), de acuerdo con las regiones biogeográficas propuesta por Morrone et al. (2017). Se incluyen las provincias biogeográficas de la Faja Volcánica Transversal (Gris), la Depresión del Balsas (Rojo), la Sierra Madre del Sur (Verde), la provincia del Desierto de Chihuahua (Lila), la provincia de las tierras bajas del Pacífico (Morado), la provincia Veracruzana (Azul) y la Sierra Madre Oriental (Café).

7.4 Modelo de distribución potencial

Derivado del análisis de correlación y PCA, se emplearon las siguientes variables bioclimáticas para la construcción del modelo de las poblaciones del este: Elevación (ELE), precipitación del mes más seco (BC14), precipitación del cuarto anual más cálido (BC18), precipitación del cuarto anual más frío (BC19), temperatura media del cuarto anual más húmedo (BC8), rango de temperatura anual (BC7) e isothermalidad (BC3) (Apéndice B, figuras B1 y B2). La figura 19 muestra el área de distribución potencial de *C. limpidus* de las poblaciones del este. El análisis de ENMeval eligió el modelo dos con un AICc = 0 y con los parámetros $fc = LQ$ y $rm = 1$.

Asimismo, para el conjunto de datos de entrenamiento fue de $AUC = 0.93$, mientras que para el conjunto de datos de prueba fue de $AUC = 0.94$. El valor de la diferencia entre los valores de AUC del conjunto de entrenamiento y el conjunto de prueba fue de 0.07. La variación de los estos estadísticos con respecto a los parámetros empleados (i.e., distintos modelos evaluados) se puede consultar en el Apéndice B, figuras B3 y B4. Finalmente, se obtuvo la contribución porcentual y de permutación de cada variable bioclimática para esta reconstrucción, siendo la precipitación del cuarto anual más frío (BC19 = 33.8 / 49%), temperatura media del cuarto anual más húmedo (BC8 = 20.6 / 18.1%) y la precipitación del cuarto anual más cálido (BC18 = 20.5 / 26.8%) las más influyentes.

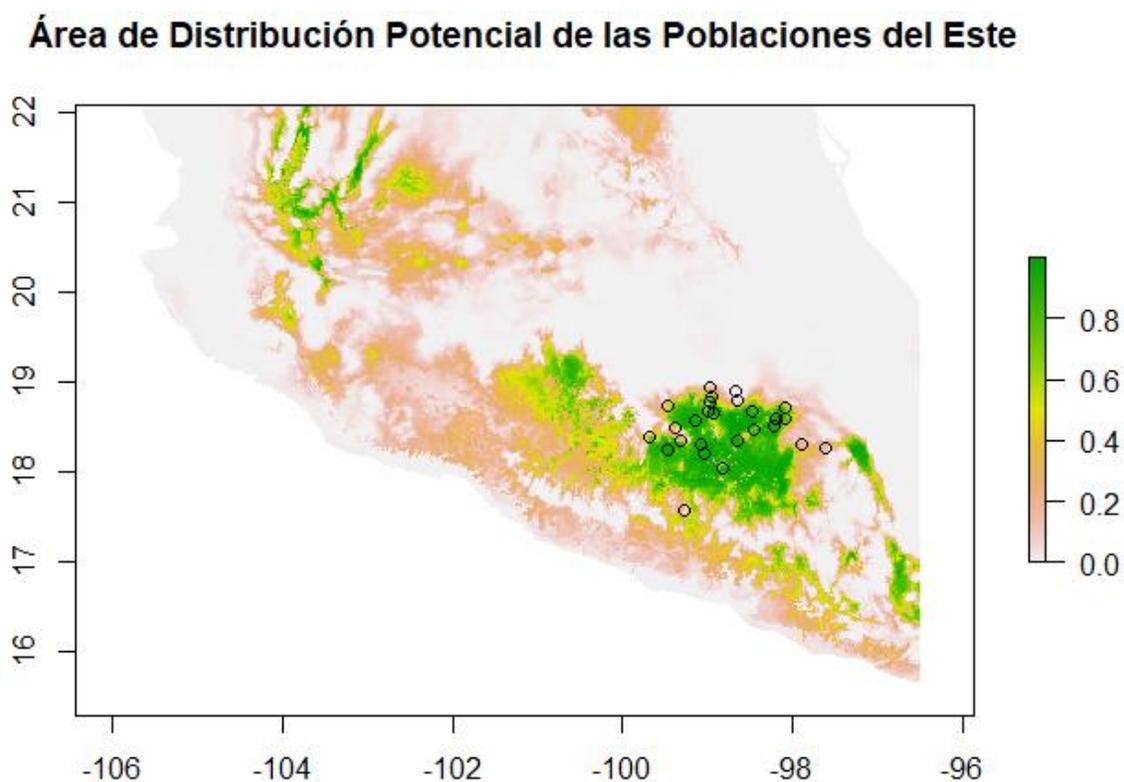


Figura 19.- Modelado de distribución potencial de *Centruroides limpidus* de las poblaciones del este ($n = 21$) derivado del modelo con mejor ajuste y complejidad óptima ($fc = LQ$, $rm = 1$).

La construcción del modelo de distribución potencial de la población del oeste, de acuerdo a los resultados del análisis de correlación y PCA (Apéndice B, figuras B5 y B6), indicaron que las variables bioclimáticas idóneas fueron: la isothermalidad (BC3), temperatura máxima del mes más cálido (BC5), rango de temperatura anual (BC7), precipitación anual (BC12), precipitación

del cuarto anual más seco (BC17), precipitación del cuarto anual más cálido (BC18), y la precipitación del cuarto anual más frío (BC19). El mapa de la figura 20 representa el área de distribución potencial para las poblaciones de *C. limpidus* del oeste. El mejor modelo fue el tres (fc = LQP y rm = 1), con un valor de AICc = 0. El AUC del mejor modelo para el conjunto de datos de entrenamiento fue de AUC = 0.88, mientras que para el AUC promedio del conjunto de datos de prueba fue AUC = 0.86. La diferencia entre los valores de AUC de los datos de entrenamiento y prueba fue de 0.12. La variación de los estos estadísticos con respecto a los parámetros empleados se puede consultar en el Apéndice B, figuras B7 y B8. Finalmente, se obtuvo la contribución porcentual y de permutación de cada variable bioclimática para esta reconstrucción, siendo el rango de temperatura anual (BC7 = 22.1 / 9%), la precipitación anual (BC12 = 20.3 / 39.9%) y la precipitación del cuarto anual más cálido (BC18 = 19.2 / 22.8%) las más influyentes.

Área de Distribución Potencial de las Poblaciones del Oeste

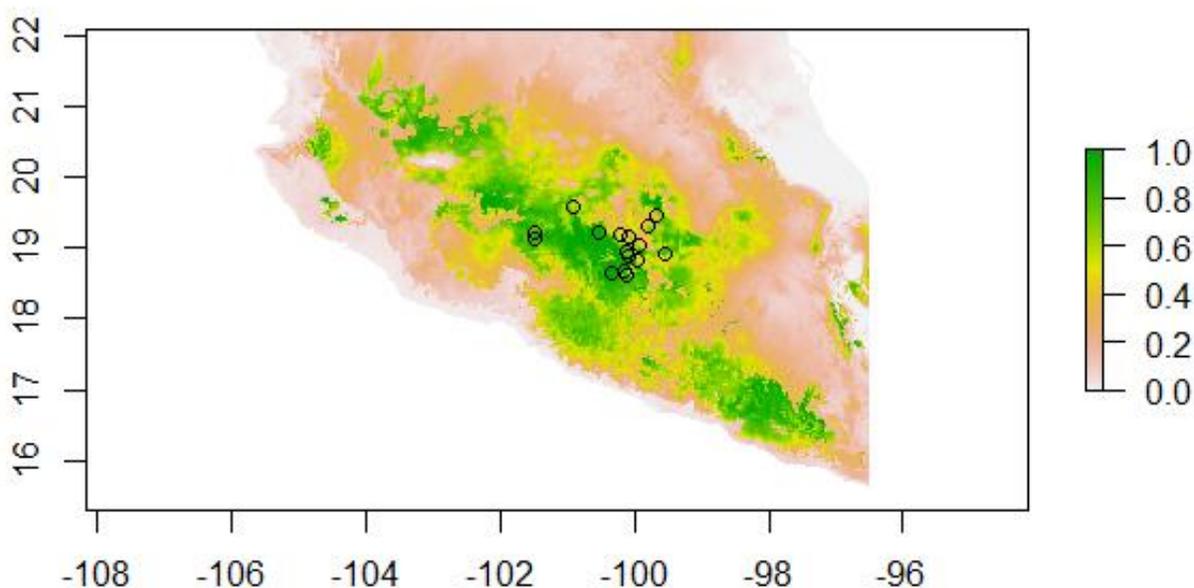


Figura 20.- Modelado de distribución potencial de *Centruroides limpidus* de las poblaciones del oeste derivado del modelo con mejor ajuste y complejidad óptima (fc = LQP, rm = 1).

La similitud entre los nichos en espacio geográfico, derivado de la obtención del valor de la D de Schoener para los mejores modelos de cada conjunto de poblaciones (Modelo dos para las poblaciones del este y modelo tres para las poblaciones del oeste), fue de $D = 0.493$.

Derivado de las variables con mayor contribución al modelo ambas poblaciones, se realizó un análisis estadístico adicional con la intención de obtener un contorno muy general sobre algunos aspectos ecológicos de ambas poblaciones. En cuanto a las variables más influyentes para la distribución potencial de las poblaciones del este, las gráficas de las figuras 22 y 23 muestran que el cuarto anual más cálido (marzo, abril, mayo y junio) se sobrepone por un mes con el cuarto anual más húmedo (junio, julio, agosto y septiembre). Esta concordancia es importante para entender aspectos ecológicos de *C. limpidus*, ya que es durante estos meses donde se realizan la mayoría de los registros de esta población (Figura 23). Por otro lado, durante los meses de enero, febrero, noviembre y diciembre la temperatura y precipitación adoptan los valores más bajos, concordante con el declive en los registros de *C. limpidus* (Figura 23).

En cuanto a las poblaciones del oeste, los resultados dan más peso a las fluctuaciones estacionales de temperatura y precipitación sobre las áreas que habitan. Así como es el caso para las poblaciones del este, una variable ambiental definitoria fue la precipitación de los meses más cálidos del año (marzo, abril, mayo, junio). No obstante, dadas las limitaciones impuestas por la muestra de este conjunto de datos (i.e., incidencia de poblaciones introducidas), cualquier especulación sobre la ecología de este clado, a partir del presente análisis, sería ir demasiado lejos. Asimismo, como es evidente en la figura 23, esta población es la que menos muestras aportó al análisis. No obstante, dada la cercanía filogenética de ambos conjuntos de poblaciones, así como la similitud del régimen ambiental de las zonas que ocupan, es de esperar que ambos exhiban patrones ecológicos similares.

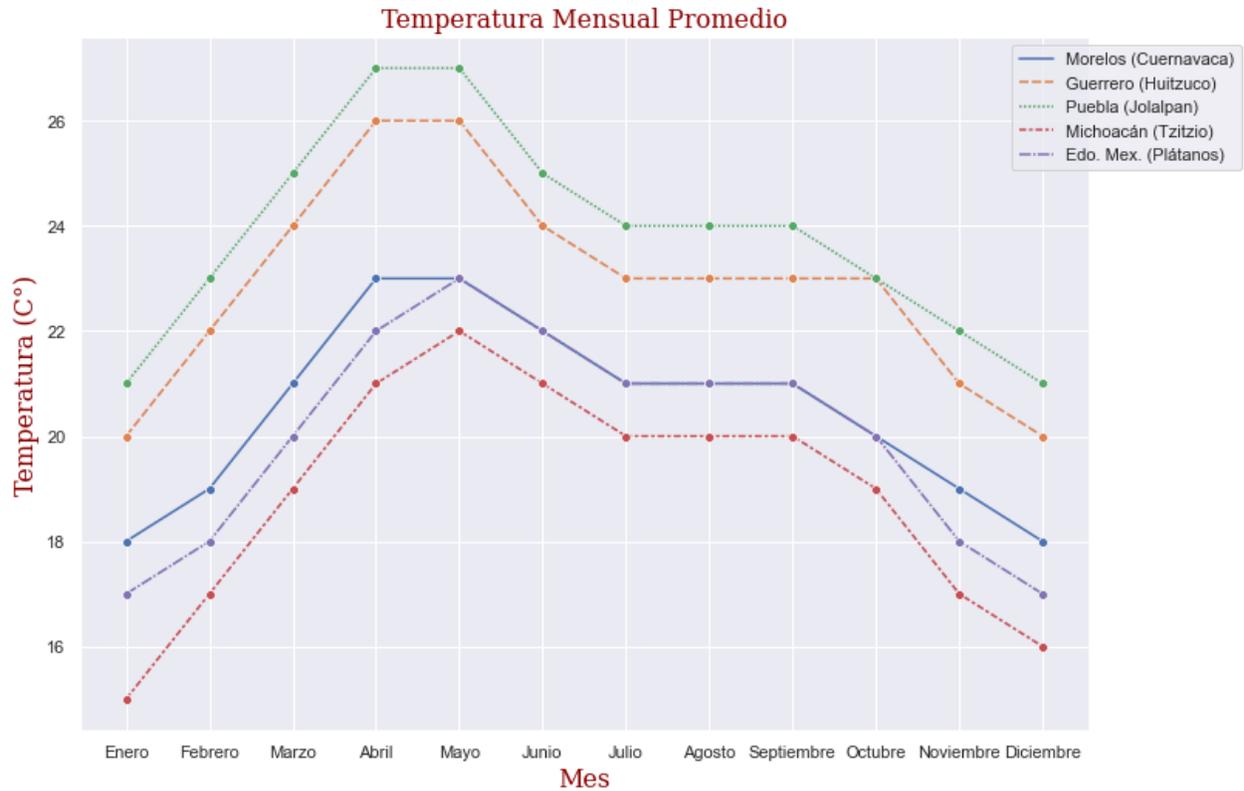


Figura 21.- Temperatura promedio mensual de las localidades en donde está registrada la presencia de *C. limpidus*. El gráfico se construyó a partir la de información climática promedio tomada para las localidades durante un periodo de 36 años y publicada en la página de WeatherSpark (Cedar Lake Ventures, 2022).

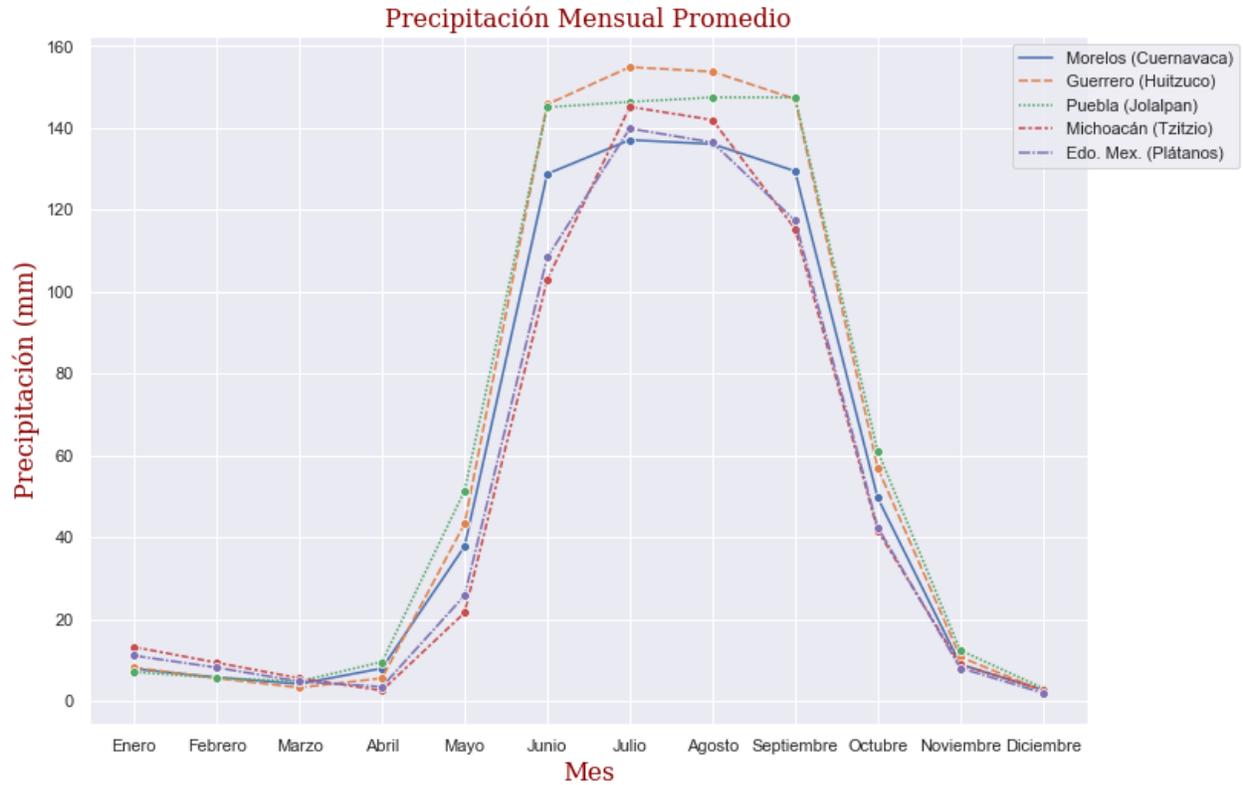


Figura 22.- Precipitación promedio mensual de las localidades en donde está registrada la presencia de *C. limpidus*. El gráfico se construyó a partir la de información climática promedio tomada para las localidades durante un periodo de 36 años y publicada en la página de WeatherSpark (Cedar Lake Ventures, 2022).

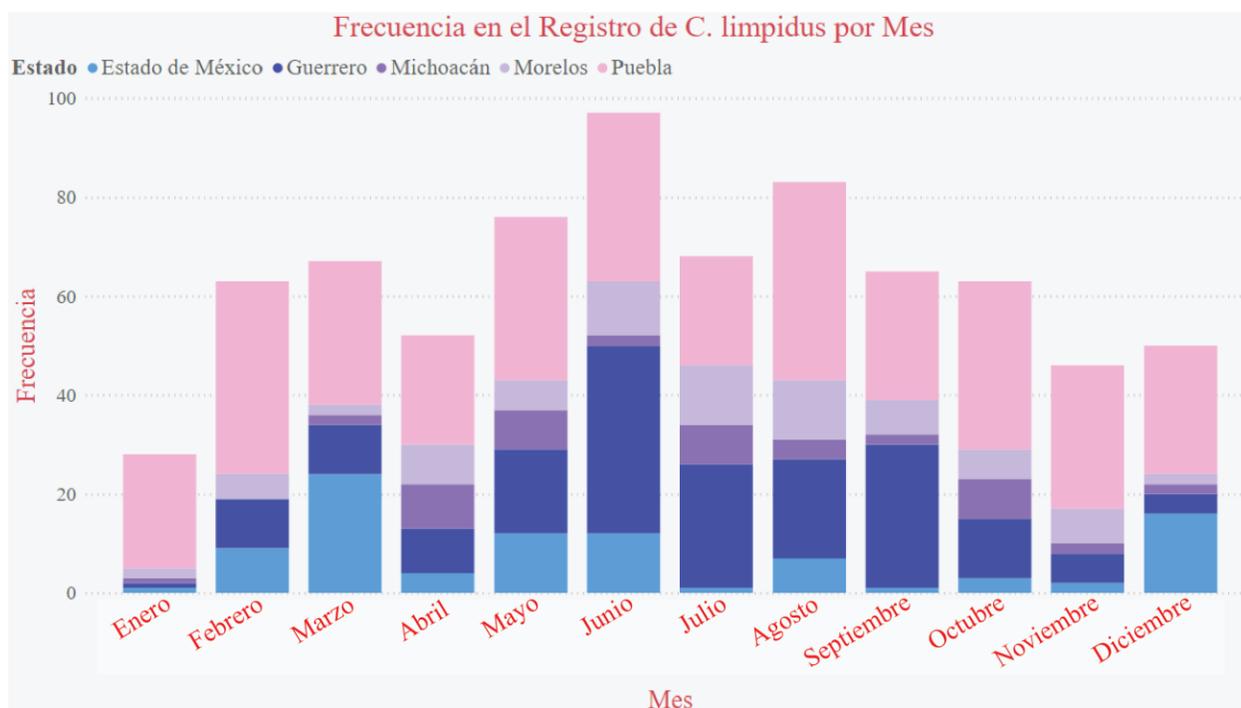


Figura 23.- Gráfica de barras de la ocurrencia de *C. limpidus* a lo largo del año (por mes). El gráfico fue construido a partir de los datos disponibles en la plataforma GBIF, y filtrados de acuerdo a los criterios descritos en la sección de métodos (n = 851). Los distintos colores representan la contribución al total por estado.

8. DISCUSIÓN

8.1 Las evidencias moleculares sugieren que los clados este y oeste de *Centruroides limpidus* pertenecen a linajes independiente

El conjunto de análisis realizados recupera consistentemente la divergencia entre las poblaciones del este y del oeste de la especie *C. limpidus*. Con la intención de falsear la hipótesis planteada, se pretendió explorar los datos empleados con más de una aproximación (i.e., Distintos tratamientos para la matriz de secuencias concatenada, análisis filogenéticos basados en concatenación y métodos de coalescencia, así como un análisis de delimitación de especies Bayesiano), a su vez sometiendo a prueba lo publicado en la literatura sobre la distribución

(Ureta et al., 2020) y la filogenómica (Towler et al., 2001; Ponce-Saavedra et al., 2009) de esta especie.

A pesar de que los árboles obtenidos en los distintos análisis filogenéticos usando ML obtuvieron topologías conflictivas, donde las relaciones de las poblaciones del oeste y del este no fueron constantes, sí hubo constancia en su divergencia, incluso cuando ambas poblaciones conformaron un solo clado divergente (Figura 9). Es probable que tanto las diferencias en la longitud entre las secuencias y la homoplasia contenida en algunos casos dentro de la matriz NGB distorsionaran las relaciones entre los clados este y oeste. Al extraer y analizar solo los caracteres informativos en la matriz GB, se recupera la correcta posición de los clados este y oeste. La suposición de que los clados este y oeste sean grupos hermanos entre ellos y no con *C. elegans* y *C. meisei*, tiene un fundamento biológico. Estas últimas dos especies se distribuyen en el litoral del Pacífico, mientras que los dos clados de *C. limpidus* son consistentes en cuanto a similitud morfológica y biogeografía (i.e., incidencia en la parte alta de la depresión del Balsas).

Las topologías obtenidas con ASTRAL, independientemente del tratamiento con GBlocks, recuperaron una topología idéntica (Figuras 11 y 12). La topología fue muy similar a la IQTREE NGB, lo único que difiere es que las muestras de Morelos se ubicaron de forma escalonada dentro del grupo que contiene la mayoría de las especies del grupo *elegans*. Dos factores pudieron hacer diferir estos dos grupos en cuanto a su topología: (1) la discordancia entre los árboles de genes de los marcadores utilizados, que a su vez es producto de la falta de muestras para el marcador COI (10 secuencias ausentes) y (2) los casi 40% de datos faltantes en la matriz NGB. Esto es particularmente notable en la posición de las secuencias de *C. limpidus* provenientes de Morelos, los cuales obtuvieron bajos valores de soporte en el árbol ML y resultaron divergentes en el análisis con ASTRAL. Para estas poblaciones no se pudieron obtener secuencias del marcador 16S y, por lo tanto, esta brecha de información potencialmente limitó la precisión de su resolución en el análisis de ASTRAL. En todos los casos los valores de soporte fueron subóptimos.

La reciente divergencia de las especies del género *Centruroides* en América del Norte (de aproximadamente 22 – 24 millones de años) supone obstáculos en la precisión de la reconstrucción filogenética (Esposito y Prendini, 2019). En primer lugar, la cantidad de sustituciones acumuladas en los loci analizados no contendrán suficiente señal filogenética para

discernir entre posibles resoluciones. En segundo lugar, la presencia de sorteo incompleto de linajes es potencialmente mayor, dada la presencia de ramas cortas del árbol de especies, aumentando la sensibilidad del análisis en ASTRAL a inferir el árbol de especies incorrecto, especialmente considerando el posible error en la estimación de árboles de genes (McCormack et al., 2009; Mirarab, 2019). La cohesión entre sus integrantes, así como con el resto del clado del este, incrementaría con la inclusión de más muestras para los terminales utilizados (Maddison y Knowles, 2006; McCormack et al., 2009). Es de particular importancia reportar que dentro del clado de *C. limpidus* para las poblaciones del oeste se resolvió un terminal colectado de Tzitzio, Michoacán; mientras que en el clado de *C. balsasensis* se incluye un organismo colectado de la misma localidad. Esta evidencia es congruente con lo reportado por Ponce-Saavedra y Francke (2004) y Ponce-Saavedra et al. (2009), donde se hace alusión a esta zona de simpatria en la depresión del Balsas.

Asimismo, se hizo una exploración más profunda de nuestros datos, con la intención de obtener noción de la certeza de los resultados producto de los análisis filogenéticos, a través de una delimitación de especies Bayesiana. Esta evaluación fue consistente con la separación de ambos clados, distinguiendo ambos conjuntos de poblaciones como unidades genéticas independientes. 23 de los 24 análisis para el caso de la matriz GB recuperaron la máxima probabilidad posterior para el modelo que soporta todos los nodos internos (i.e., ocho linajes independientes), demostrando la estructura poblacional de los linajes analizados y haciendo énfasis en la divergencia de *C. limpidus*. Asimismo, se observa una tendencia similar en los resultados con el árbol guía de la matriz NGB derivada de IQTREE y el árbol guía ASTRAL. Es decir, el modelo de delimitación de especies con mayor probabilidad posterior es aquel que recupera la divergencia de *C. limpidus*. Este análisis sometió a prueba las diferencias genéticas entre ambas poblaciones muestreadas encontradas por los análisis filogenéticos previos. Adicionalmente, el análisis de prueba, realizar a partir de la modificación de la topología en el árbol guía GB derivado de IQTREE, en donde artificialmente se separó a *C. balsasensis* en dos especies distintas, le adjudicó el mayor valor de probabilidad posterior al modelo de delimitación en donde *C. balsasensis* es un clado monofilético. Este análisis adicional se realizó con la intención de someter a prueba la eficacia del método de delimitación empleado con nuestra base de datos (Leaché y Fujita, 2010; Gehara et al., 2017; Waichert et al., 2019).

A la fecha, la presente contribución es la única en emplear métodos de delimitación de especies basadas en el modelo MSC sobre el género *Centruroides*. Parmekelis et al. (2013) realizaron un análisis taxonómico exhaustivo sobre poblaciones del género *Euscorpius* de la región mediterránea en el cual se emplearon varios métodos de delimitación de especies. Buscando validar los resultados de sus métodos, optaron por realizar un análisis de delimitación de especies con el programa BPP. Además de ser congruente con la mayoría de las resoluciones propuestas por otros modelos, BPP fue el que rindió resultados de manera más consistente que los demás. Así, la los supuestos en los que se basa esta aproximación para evaluar la identidad taxonómica a nivel específico en escorpiones parece mostrar resultados confiables. El análisis con BPP fue el único entre los análisis incluidos en el presente estudio que provee de evidencia para suponer que *C. limpidus* incluye dos especies distintas.

Tomando en consideración los conceptos de especies discutidos en la introducción, bajo esta evidencia, es tentativo considerar a ambas poblaciones del oeste y del este de *C. limpidus* como especies distintas. No obstante, dado a que las características secundarias típicas de especies en proceso de divergencia aparecen gradualmente en las poblaciones con el tiempo (i.e., aislamiento reproductivo, monofilia en comparación, diferenciación ecológica, etc.), es pertinente apuntar que las poblaciones de *C. limpidus* se encuentran en un proceso de divergencia reciente. Más aún, dada la discusión anteriormente provista sobre el funcionamiento del programa BPP y la muestra empleada en los análisis moleculares la estructura poblacional observada en la delimitación de especies podría deberse al aislamiento de las poblaciones por su gran área de distribución. Reafirmando así la conclusión de un proceso temprano de divergencia en *C. limpidus*.

8.2 Los patrones biogeográficos de las poblaciones de *Centruroides limpidus* muestran cierta concordancia con su estructura genética

A la evidencia anteriormente descrita se añaden los resultados del análisis de delimitación geográfica y modelado de distribución potencial, donde las diferencias en la idoneidad relativa de las áreas que ocupan ambos conjuntos de poblaciones se hicieron patentes. No obstante, estas últimas no fueron tan pronunciadas como en el caso de los análisis moleculares, sugiriendo que a

pesar de que ambos conjuntos de poblaciones hayan experimentado una separación a nivel genético, el conjunto de características bioclimáticas que determina su presencia es aún muy similar. Esto es algo esperado, pues, dada la cercanía filogenética de ambos clados, es preciso conjeturar que sus variables bioclimáticas que determinan su distribución exhiban varias similitudes. Adicionalmente, un factor que limita la extensión de las conclusiones derivadas a partir de estos análisis es el hecho de que, para la población del oeste, varios puntos, especialmente aquellos profundamente embebidos en el Faja Volcánica Transversal, representan introducciones influenciadas por la presencia de asentamientos humanos. Además de las poblaciones que naturalmente ocurren en las zonas del Estado de México y Michoacán, la distribución de esta especie está extendida a otras áreas en donde naturalmente no habrían podido llegar, tal como es el caso de las poblaciones de Querétaro, así como las incidencias de esta especie en el Faja Volcánica Transversal y con una lejanía considerable de la Depresión del Río Balsas. Ejemplos de estos últimos incluyen los registros reportados de la Ciudad de México y de Valle de Bravo, en el Estado de México. Adicionalmente, otras variables ecológicas, como características edáficas, disponibilidad de escondites, o presencia de cierta vegetación y depredadores, además de la preferencia del hábitat determinada por variables bioclimáticas, influyen la dinámica de las poblaciones de *C. limpidus* (Polis, 1990). Es posible que alguna combinación de estas variables también tenga alguna repercusión en la divergencia identificada por los análisis filogenéticos; no obstante, su inclusión en un MDP es problemático o puede ser imposible.

Las observaciones registradas sobre la provincia de la Depresión Río Balsas, sobre los estados de Morelos, límite norte de Guerrero y límite occidental del Puebla, muy probablemente constituyen registros de *C. limpidus* para las poblaciones del este (Puntos azules en figura 18). Dentro de estas áreas, se encuentran a elevaciones de entre 950 y 1600 msnm, donde la vegetación predominante consiste en bosque tropical caducifolio. La abundancia y presencia disminuye conforme el bosque tropical caducifolio da lugar a los bosques templados, donde la vegetación dominante la ocupan árboles del género *Pinus* y *Quercus* (Observación personal). Sin embargo, la presencia de esta especie en zonas templadas probablemente se atribuya a la permanencia de poblaciones que habitan barrancas, así como otros sitios que proveen microhábitats idóneos para la especie. Estos sitios proveen de zonas a partir de las cuales individuos migran hacia lugares más templados, en donde apenas alcanzan a formar poblaciones

sumidero. Por otro lado, las poblaciones de *C. limpidus* del oeste se distribuyen en el límite las provincias de la Depresión del Río Balsas y Faja Volcánica Transversal, sobre áreas en su mayoría de más de 1600 msnm y en donde la vegetación principal es una combinación de bosques templados; no obstante, son mucho más abundantes en regiones en donde el microhábitat es similar a las condiciones que prefieren las poblaciones del este. Sin embargo, es evidente que *C. limpidus* es capaz de tolerar un amplio rango de condiciones climáticas. Este es el caso para los registros de Querétaro, los cuales inciden sobre la provincia del Altiplano Mexicano y sobre un área dominada por matorral xerófilo a 1300 msnm. Lo mismo para los registros en el Estado de México y Ciudad de México, en donde la especie puede ser encontrada a más de 2000 msnm. Un caso similar es registrado para la especie *Centruroides vittatus* en Yamashita y Rhoades (2013), justificando su hipótesis con base en los hábitos errantes de esta especie.

La construcción de modelo de distribución potencial para ambas poblaciones se muestra en contraste con lo obtenido por Urieta et al. (2020) para *C. limpidus*. La discrepancia se debe a los diferentes registros usados para la elección de las variables y el tamaño de muestra, ya que los autores usaron diez registros provenientes de la región costera de Guerrero, del Estado de México, región oeste y centro de Michoacán y Querétaro. En contraste, el presente estudio se limitó al uso de registros asignados filogenéticamente al taxón de interés y respaldados por la literatura disponible para el mismo, además de incluir más puntos en la construcción de los modelos. Otro punto de contraste con el trabajo de Urieta et al. (2020) fue la combinación de features, el regulador de multiplicidad, y el valor de AUC del modelo con menor valor de AICc. En cuanto a este último, el valor de AUC para su modelo más óptimo fue de 0.76, mientras que el AUC que obtuvimos fue de > 0.90 para ambos modelos.

Con base en el patrón biogeográfico discutido, así como en investigaciones sobre el ciclo de vida y aspectos ecológicos de otras especies del género *Centruroides* (Sissom, 1980; Francke y Jones, 1982; McReynolds, 2012; Brown, 2004; Quijano-Ravell, 2015; Ponce-Saavedra, 2003; Monge-Nájera, 2018) se podría especular que la densidad poblacional de *C. limpidus* varía a lo largo del año en función, principalmente, al régimen de temperatura y precipitación de su área de distribución. Asimismo, es posible que esta especie se reproduzca durante todo el año; no obstante, considerando la baja tasa de supervivencia de los estadios inmaduros durante el segundo y tercer instar, las presiones ambientales (i.e., tiempo fríos y poco húmedos) sesgan la densidad de las poblaciones y las hace mantenerse relativamente bajas con respecto a lo que

ocurre en los meses más cálidos y húmedos. Dado que la condición iterópara ha sido observada y registrada en otras especies del mismo género (Polis y Sissom, 1990, Davison et al., 2020), es posible que *C. limpidus* comparta esta estrategia reproductiva. Este patrón sugiere que las poblaciones de *C. limpidus* del este decrecen durante esta época, posterior al periodo de reproducción. Este mismo patrón ha sido reportado para otros alacranes bítidos, en donde la presencia de varias especies en lugares subtropicales se asocia a la temporada de lluvias, la cual tiene una correlación positiva con la disponibilidad de presas (Araújo et al., 2010). Es probable que la dinámica de las poblaciones que habitan en zonas suburbanas (i.e., varias poblaciones del oeste) sea distinta y esté sujeta a otros factores. Si bien estas especulaciones deben de considerarse como un atisbo hacia un entendimiento de la ecología de este potencial complejo de especies, su aplicación para las poblaciones del oeste requiere de mucha más investigación. Desafortunadamente, al poseer nula información sobre el ciclo de vida de las poblaciones de *C. limpidus*, es complicado integrar la importancia de las variables bioclimáticas sobre otros aspectos de su biología (i.e., estrategia reproductiva, duración de la ontogenia, entre otros). En añadidura, es pertinente discutir la copiosa cantidad de errores en los registros de las bases de datos empleadas para realizar los análisis; especialmente en el caso de la plataforma GBIF. La identificación de algunas especies del género *Centruroides* a través de caracteres morfológicos es un trabajo complicado (Ponce-Saavedra et al., 2004; Santibáñez-López y Contreras-Félix, 2013; Ponce-Saavedra y Francke, 2019). Este problema es especialmente prevalente en la aplicación Naturalista, de donde provienen la mayoría de las identificaciones erróneas o dudosas (ej. Observación de *C. limpidus* en el estado de Colima y Veracruz). Esto ha sido reportado en varias ocasiones y, por lo tanto, es preciso extremar precauciones al acudir a estos acerbos de información. Los métodos empleados en el presente análisis buscaron minimizar el uso de datos inciertos y erróneos; sin embargo, no se puede descartar por completo la posibilidad de haber incluido algún artefacto en los datos que se emplearon. Con razones de sobra sería adecuado coleccionar más especímenes, considerando los cuidados involucrados en la colecta y registro de datos. Solo con información fehaciente, proveniente de colecciones biológicas y colectas de campo, será posible obtener certezas sobre las conclusiones biológicas que se infieren a partir de los análisis planteados. Finalmente, la introducción de *C. limpidus* en áreas en donde no se encontraba naturalmente sesga los resultados del análisis de distribución potencial. Sería

adecuado que en estudios posteriores se considere este factor, así como las limitaciones discutidas.

8.3 Posición filogenética de *Centruroides limpidus* dentro del grupo de especies *elegans*

La resolución filogenética aquí presentada tiene incidencia sobre la clasificación de los grupos de especies del género *Centruroides*. En su mayor parte, el grupo *elegans*, en este caso representado por los taxones *C. limpidus*, *C. balsasensis*, *C. elegans* y *C. meisei*, se recuperó como monofilético. No obstante, la posición de *C. balsasensis*, consistentemente separado del resto de los taxones mencionados, socava la hipótesis de que el grupo *elegans* constituya un grupo monofilético. Su distancia a estos taxones, así como su proximidad a *C. baergi*, que pertenece al grupo *nigrovariatus*, es consistente con otras resoluciones publicadas (Towler et al., 2011; Ponce-Saavedra et al., 2009; Esposito y Prendini, 2019; González-Santillán et al., 2020)

La topología presentada en Ponce-Saavedra et al. (2009) resuelve a *C. balsasensis* como más cercano a *C. tecomanus*, *C. ornatus* y *C. infamatus*, que a *C. limpidus*. Por otro lado, el análisis filogenético realizado por Esposito y Prendini (2019) obtiene resultados similares, pues resuelve a *C. balsasensis* como grupo hermano de *C. baergi*. Otra fuente de evidencia independiente es el análisis realizado por González-Santillán et al. (2020), en donde se observa la misma topología y en donde el grupo *elegans* se encuentra separado en tres clados independientes. Uno de estos clados agrupa a *C. limpidus* con *C. elegans*, *C. meisei* y *C. insularis*, resultado similar al árbol presentado en los resultados del presente estudio. Además, considerando lo encontrado por Esposito y Prendini (2019) y González-Santillán et al. (2020), las poblaciones de *C. limpidus* del este y del oeste corresponden a una porción del artificial grupo *elegans* que invadió la región centro-sur del país. Compartiendo esta región con otras especies cercanamente relacionadas, como *C. elegans* y *C. meisei*. Esta zona es de particular importancia para el estudio de la diversificación y desarrollo de la toxicidad en los venenos de este género, siendo la presunta vía de invasión hacia las regiones del norte. Las montañas de la provincia del Faja Volcánica Transversal, así como otras barreras biogeográficas (ej. Río Pungaranchó), dividen la distribución de las dos poblaciones estudiadas.

El presente análisis incrementa la evidencia de que el grupo *elegans* no es monofilético y que emplear únicamente información morfológica para la delimitación taxonómica de las especies de *Centruroides* constituye una aproximación limitada y sujeta a errores, como Hoffmann (1932) había apuntó hace casi un siglo. Lo cual tiene sentido con los hallazgos de Esposito y Prendini (2019) sobre la reciente divergencia de las especies del género *Centruroides* en México: Una alta cantidad de homoplasia morfológica oscurece los procesos de divergencia de las especies, solo aparentes empleando otras fuentes de evidencia (ej., molecular y biogeográfica). Bajo este mismo razonamiento y observando la evidencia (ej., la filiación entre *C. balsasensis* y *C. baergi*) no sería una sorpresa encontrar polifiléticos los demás grupos de especies tras una inspección cercana.

8.4 La distribución de las variables bioclimáticas que tienen incidencia sobre la distribución de las poblaciones de *C. limpidus* provee de información sobre posibles estrategias epidemiológicas contra la IPPA

El mapa de la figura 18 se construyó, entre otros propósitos, con la intención de actualizar la información sobre las zonas potencialmente vulnerables a la incidencia de intoxicación por picadura de alacrán (IPPA). El mapa presentado por Cid-Urbe et al. (2019) da una noción del área de distribución de este taxón; sin embargo, el estudio carece de información particular sobre las localidades donde habita esta especie. En el gráfico de la figura 24 se puede observar la tendencia de IPPA durante los últimos cinco años en los estados donde se encuentran la mayoría de los registros de *C. limpidus*. Es importante, una vez más, aclarar que *C. limpidus* no es el único alacrán que provoca IPPA en estos estados. No obstante, dado su sinantropismo, así como su abundancia en ciertas zonas de Morelos y el Estado de México, seguramente la especie se encuentra involucrada en varios casos (Boletín Epidemiológico, 2015 – 2020). Aunado a esto, en la figura 25 se puede observar la transición, del año 2000 al 2020, de la cantidad de población mexicana que carece al acceso de servicios de salud. En ambos gráficos podemos ver que, para los estados donde se encuentran *C. limpidus* y otras especies de importancia médica en donde se reportan la mayoría de los casos de IPPA, se tiene la mayor incidencia de falta de servicios médicos. De particular énfasis es la zona de registros dudosos (Puntos amarillos en la figura 18), pues yace en la mayoría de Guerrero y la porción sur del Estado de México; ambos estados

afectados por la carencia de servicios médicos y especialmente vulnerables a la IPPA (Boletín Epidemiológico, 2015 – 2020; Coneval, 2020) (Figuras 24 y 25). Si agregamos a estas estadísticas la falta de conocimiento taxonómico y de la distribución de los alacranes que causan estas incidencias, el problema de alacranismo que sufre el país seguirá perpetuándose.

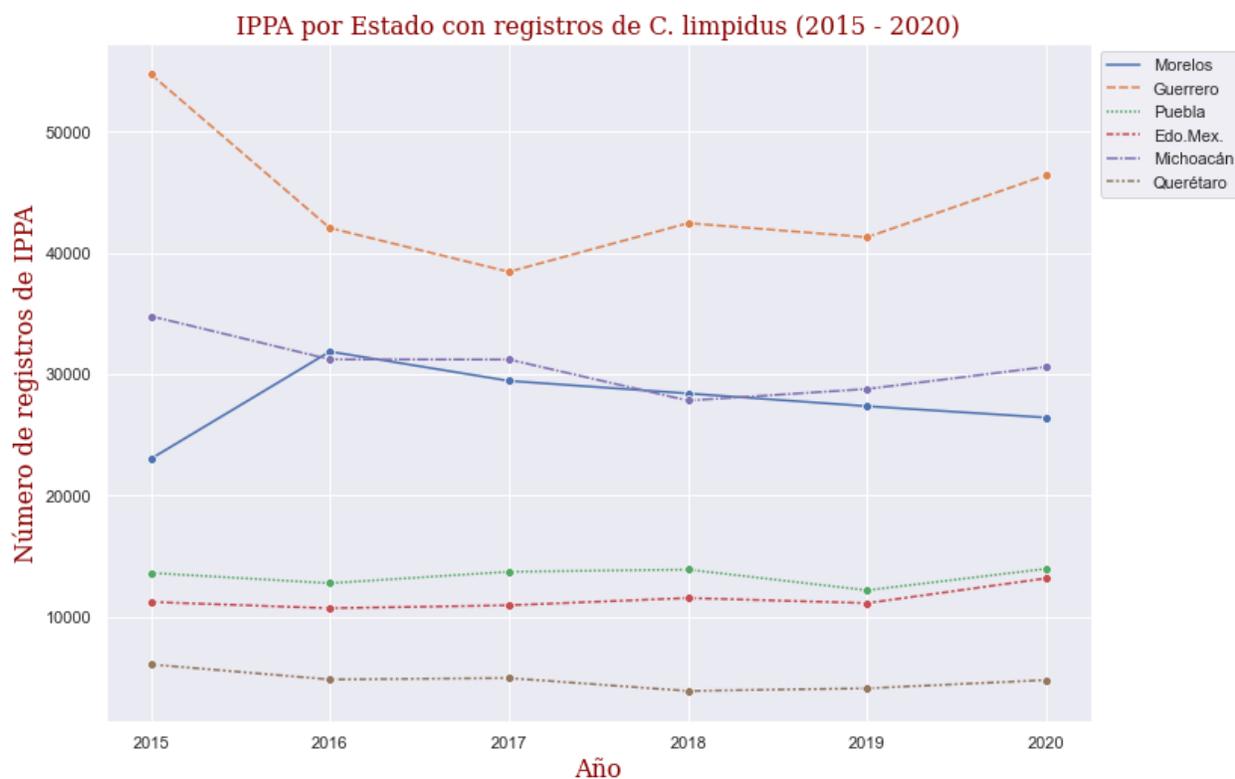


Figura 24.- Número de casos de IPPA reportados para los estados con la mayoría de los registros de *C. limpidus* durante un periodo de 5 años (2015 – 2020) (Boletín Epidemiológico, 2015 – 2020).

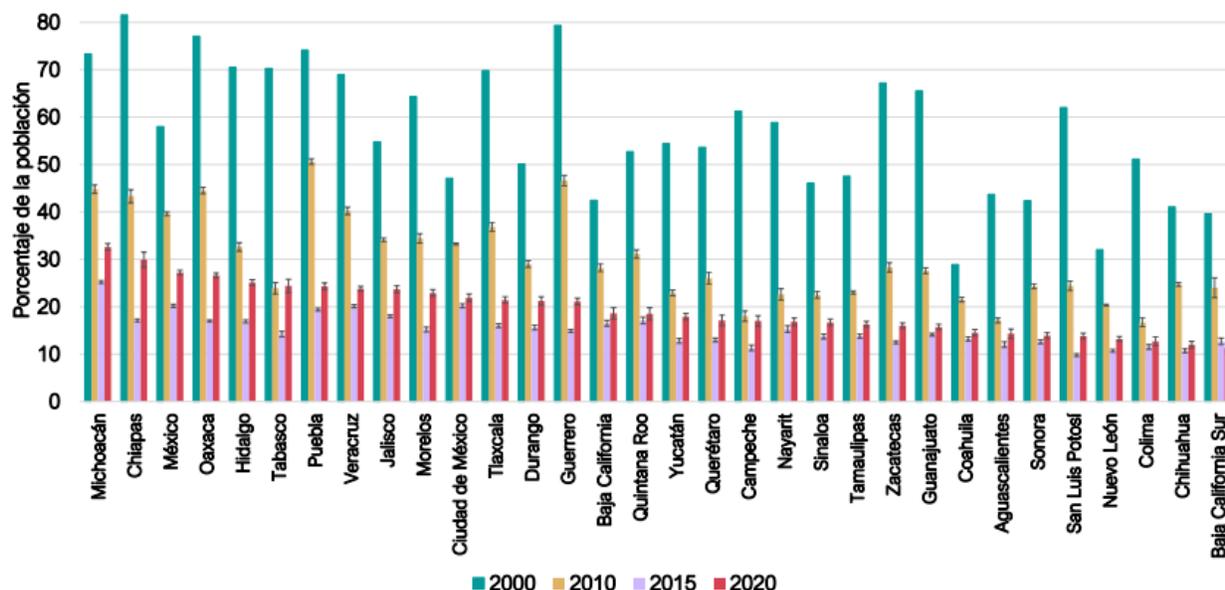


Figura 25.- Porcentaje de la población que sufre de carencias en la disponibilidad de servicios de salud por entidad federativa. Se puede observar el crecimiento de este problema del 2015 al 2020. (Coneval, 2020).

9. CONSIDERACIONES FINALES

Las limitaciones de este estudio son claras, comenzando por la obvia ausencia de una indagación morfológica de las poblaciones estudiadas. Al tratarse de especies crípticas, un análisis basado en herramientas modernas para evaluar diferencias morfométricas sometería a prueba la conclusión taxonómica aquí planteada. Desafortunadamente, la intención del presente proyecto y por circunstancias ajenas ha obstaculizado realizar este necesario esfuerzo. Otra consideración es la limitada información que proveen los marcadores empleados para develar las relaciones filogenéticas de la especie en cuestión. Como se ha observado en otros estudios con *Centruroides*, el uso de escasa información molecular constituye una aproximación subóptima para indagar las relaciones filogenéticas de estos organismos. Particularmente, la ausencia de secuencias de ambos marcadores para todos los ejemplares analizados es un factor limitante para la reconstrucción filogenética. Es por esto que la aplicación de tecnologías de secuenciación masiva, con el fin de encontrar fragmentos en el genoma que provean de suficiente señal filogenética, es imperativa en el estudio de estos organismos. Actualmente, tecnologías como

RADseq o UCEs han demostrado identificar y emplear regiones del genoma que son capaces de desentrañar las relaciones naturales entre grupos de organismos cercanamente relacionados. Ambas aproximaciones aumentarían la certeza filogenética y taxonómica para este grupo de alacranes de importancia médica.

Por otro lado, el muestreo de organismos aquí presentado representa, en su mayor parte, lo publicado en la literatura hasta ahora. Por lo tanto, un muestreo más amplio, donde se incluya toda la extensión del área de distribución de *C. limpidus*, es imprescindible para someter a prueba la conclusión filogenética presentada. Lejos de pretender dar una respuesta certera sobre la taxonomía y sistemática de este taxón, se ofrece evidencia para considerar a *C. limpidus* como un taxón monofilético experimentando divergencia reciente y exhibiendo una estructura poblacional. Tanto el análisis filogenético, como el de delimitación de especies y el de distribución esclarecen fragmentos de la situación taxonómica de *C. limpidus*, aún eclipsada por la falta de información geográfica, de diversidad y filogenómica. Un incremento exhaustivo de la muestra evaluada sobre toda su área de distribución es crítico para alcanzar certezas sobre la taxonomía, distribución y relaciones filogenéticas de esta especie de importancia médica.

Finalmente, como se hizo patente en Yamashita y Rhoads (2013), concluyendo sobre su estudio filogeográfico de *Centruroides vittatus*: “*We also stress that a multifactorial approach is important for scorpion species delimitation as scorpion population isolation and speciation appears to be the result of several interwoven factors*”. Las líneas de evidencia para estudiar la taxonomía y relaciones filogenéticas del género *Centruroides* y llegar a una conclusión bien soportada deben provenir de distintas aproximaciones al estudio de su biología. Con indagar sobre sus relaciones filogenéticas o reducir su taxonomía a la exploración morfológica se perpetua un esquema de clasificación insuficiente para estos taxones. Información sobre distribución (ej., Yamashita y Rhoads, 2013), composición de venenos (ej., Riaño-Umbrilla et al., 2017), ecología (ej. Quijano-Ravell et al., 2011), acompañada de información taxonómica y filogenómica es requerida si hemos de resolver la complicada biología del género *Centruroides* en América del Norte.

10. CONCLUSIONES

- A través del análisis filogenético, aunado al análisis de delimitación de especies, se corroboró la divergencia a nivel molecular entre las poblaciones de *C. limpidus* que habitan en el oeste de México (Querétaro, Michoacán y Estado de México) con respecto a aquellas que habitan en el este (Puebla, Morelos y Guerrero). Esta evidencia supone que *C. limpidus* constituye un linaje divergente y con una estructura poblacional definida.
- La realización de un mapa de distribución a través de registros filtrados bajo distintos criterios provee de una noción de la distribución de *C. limpidus* en un contexto biológico, al incluir las provincias biogeográficas y su distribución en las mismas; y en un contexto epidemiológico, al incluir las divisiones geopolíticas del país.
- Dado el solapamiento y, por lo tanto, la posible simpatría entre las poblaciones estudiadas de *C. limpidus*, derivado de las áreas de distribución potencial, no aportó de información para suponer diferencias significativas a nivel ecológico entre ambos clados. No obstante, sí evidenció el potencial de ocupación distribucional de las poblaciones estudiadas.
- Por lo tanto, se considera a *C. limpidus* como dos entidades evolutivamente independientes, las cuales experimentan una divergencia reciente. Esta conclusión no es del todo sorprendente, dado que la taxonomía y biogeografía del taxón en cuestión ha permanecido poco estudiadas desde su descripción.
- El grupo *elegans*, posiblemente como otros grupos de especies de *Centruroides* de Norte América, constituye un grupo polifilético. Dada la divergencia reciente del género, la información morfológica no es suficiente para establecer las relaciones filogenéticas del género.
- La importancia del estudio integrativo de estas especies, tan recomendada por estudios relacionados, es de crítica importancia para analizar sus patrones taxonómicos y biogeográficos. En el caso de los alacranes de importancia médica, y especialmente en

México, que es el epicentro de este problema a nivel mundial, esta información es de suma importancia

APÉNDICE A

Cuadro A1 – Lista de las especies del género *Centruroides* en México y su distribución por estado. Las 21 especies de importancia médica se indican en negritas (Menos una que aún no ha sido descrita, reportada en Possani y González-Santillán, 2018). La bibliografía hace referencia a los registros de la distribución de cada especie.

Grupo	Especie	Distribución	Fuente
<i>bertholdii</i> 9 spp.	<i>Centruroides bertholdii</i> (Thorell, 1877)	Oeste de Jalisco, Guanajuato, Michoacán y Morelos.	Quijano-Ravel y Ponce-Saavedra, 2014
	<i>Centruroides huichol</i> (Teruel et al., 2015)	Costa de Nayarit	Teruel et al., 2015, Quijano-Ravel y Ponce-Saavedra, 2014
	<i>Centruroides noxius</i> (Hoffman, 1932)	Centro de Nayarit	Teruel et al., 2015
	<i>Centruroides chiapanensis</i> Hoffman, 1932	Centro de Chiapas	Armas et al., 1995, Martín-Frías y Armas, 2001
	<i>Centruroides tapachulaensis</i> Hoffman, 1932	Costa del Pacífico del estado de Chiapas, extendiéndose hasta Guatemala	Armas et al., 2010
	<i>Centruroides flavopictus</i> (Pocock, 1898)	Veracruz, Campeche y Oaxaca	Goodman y Esposito, 2020
	<i>Centruroides meridionalis</i> Hoffmann, 1932	Chiapas	Hoffmann, 1932, Esposito y Prendini 2018
	<i>Centruroides ochraceus</i> (Pocock, 1898)	Veracruz, península de Yucatán, Quintana Roo y Campeche	Armas y Martín-Frías, 2008
	<i>Centruroides edwardsii</i> (Gervais, 1843)	Durango, Guerrero, Morelos, Nayarit y Sinaloa.	Baldazo-Monsivaís et al., 2013
<i>elegans</i> 13 spp.	<i>Centruroides balsasensis</i> Ponce-Saavedra y Francke, 2004	Michoacán, Guerrero y Estado de México.	Ponce-Saavedra y Francke, 2004 Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2014
	<i>Centruroides exilicauda</i> (Wood, 1863)	Estados Unidos, Baja California, Baja California Sur	Yamashita y Rhoads, 2013
	<i>Centruroides sculpturatus</i> Ewing, 1928	Estados Unidos y Sonora	González-Santillán y Possani, 2018
	<i>Centruroides bonito</i> Quijano-Ravell, Teruel, Ponce-Saavedra, 2016	Guerrero	Quijano-Ravell et al., 2016, Domínguez et al., 2019

	<i>Centruroides chamela</i> Ponce-Saavedra y Francke, 2011	Región costera de Jalisco	Ponce-Saavedra y Francke, 2013
	<i>Centruroides elegans</i> (Thorell, 1876)	Costa de Jalisco	Ponce-Saavedra y Francke, 2013, González-Santillán et al., 2019
	<i>Centruroides insularis</i> Pocock, 1902	Nayarit (Islas Tres Mariás)	Esposito y Prendini, 2019
	<i>Centruroides hirsutipalpus</i> Ponce-Saavedra y Francke, 2009	Colima (Municipio de Minatitlán)	Ponce-Saavedra y Francke, 2009, González-Santillán et al., 2019
	<i>Centruroides mascota</i> Ponce-Saavedra y Francke, 2011	Jalisco (Municipio de Mascota)	Ponce-Saavedra y Francke, 2011
	<i>Centruroides meisei</i> Hoffmann, 1932	Guerrero y Oaxaca	Teruel et al., 2015
	<i>Centruroides pallidiceps</i> Pocock, 1902	Sonora y Sinaloa	Ponce-Saavedra y Francke, 2019, Ponce-Saavedra y Moreno-Barajas, 2005
	<i>Centruroides tecomanus</i> (Hoffmann, 1932)	Colima, Jalisco, Michoacán y Guerrero	Ponce-Saavedra et al., 2009, Quijano-Ravel y Ponce-Saavedra, 2014, González-Santillán et al. 2019
	<i>Centruroides limpidus</i> (Karsch, 1897)	Morelos, Guerrero, Puebla, Michoacán, Estado de México, Querétaro	Hoffmann, 1932, Towler et al., 2001, Ponce-Saavedra et al., 2004, Ponce-Saavedra y Francke, 2009, Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2014, Baldazo-Monsivaiz et al., 2017
gracilis 6 spp.	<i>Centruroides caribbeanus</i> Teruel y Myers, 2017	Quintana Roo (Isla Cozumel)	Teruel y Myers, 2017
	<i>Centruroides chamulaensis</i> Hoffmann, 1932	Chiapas (Municipios de Huistán y Comitán)	Armas et al., 1995
	<i>Centruroides fulvipes</i> (Pocock, 1898)	Guerrero y Oaxaca	Baldazo-Monsivaiz et al., 2017
	<i>Centruroides gracilis</i> (Latreille, 1804)	Campeche, Chiapas, Hidalgo, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán	Martín-Frías y Armas, 2001
	<i>Centruroides nigrescens</i> (Pocock, 1898)	Michoacán, Guerrero y Oaxaca	Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2014, Baldazo-Monsivaiz et al., 2017
	<i>Centruroides nigrimanus</i> (Pocock, 1898)	Oaxaca, Guerrero y Chiapas	Ponce-Saavedra y Francke, 2013, Baldazo-Monsivaiz et al., 2003
infamatus 6 spp.	<i>Centruroides infamatus</i> (C.L. Koch, 1844)	Aguascalientes, Guerrero, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Zacatecas	Towler et al., 2001 Ponce-Saavedra y Francke, 2004 Quijano-Ravel y Ponce-Saavedra, 2014

	<i>Centruroides ornatus</i> Pocock, 1902	Norte de Michoacán, este de Jalisco y sur de Guanajuato	Quijano-Ravel y Ponce-Saavedra, 2014 Ponce-Saavedra et al., 2015
	<i>Centruroides lauriadnae</i> Ponce-Saavedra y Francke, 2019	Sonora	Ponce-Saavedra y Francke, 2019
	<i>Centruroides ruana</i> Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2016	Valle de Apatzingán, Michoacán	Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2016
	<i>Centruroides suffusus</i> Pocock, 1902	Sur de Durango, Nayarit, Sinaloa y Zacatecas	Ponce-Saavedra y Francke, 2013, Ponce-Saavedra y Francke, 2019
	<i>Centruroides vittatus</i> (Say, 1821)	Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango y Zacatecas	Shelley y Sissom, 1995
	<i>Centruroides romeroi</i> (Quijano-Ravell et al. 2019)	Michoacán (Coalcomán)	Quijano-Ravell et al., 2019
	<i>Centruroides baergi</i> (Hoffmann, 1932)	Oaxaca y Puebla (Valle de Tehuacán-Cuicatlán)	Armas y Martín-Frías, 1999, Martín-Frías et al., 2007, Teruel et al., 2015, Baldazo-Monsivaiz et al., 2017
	<i>Centruroides frankei</i> Santibáñez-López y Contreras-Félix, 2013	Oaxaca (Juquila)	Santibáñez-López y Contreras-Félix, 2013, Teruel et al., 2015
	<i>Centruroides rodolfoi</i> Santibáñez-López y Contreras-Félix, 2013	Oaxaca (Tlaxiaco)	Santibáñez-López y Contreras-Félix, 2013
	<i>Centruroides orizaba</i> Armas y Martín-Frías, 2003	Sur de Veracruz	Martín-Frías et al., 2007
nigrovarius	<i>Centruroides nigrovarius</i> (Pocock, 1898)	Oaxaca	Armas y Martín-Frías, 1999, Martín-Frías et al., 2007
9 spp.	<i>Centruroides serrano</i> Santibáñez-López y Ponce-Saavedra, 2008	Oaxaca (Villa Alta)	Santibáñez-López y Ponce-Saavedra, 2008
	<i>Centruroides poncei</i> Teruel, Kovarik, Baldazo-Monsivaiz, Hoferek, 2015	Oaxaca y Guerrero	Teruel et al., 2015
	<i>Centruroides villegasi</i> Baldazo-Monsivaiz, Ponce-Saavedra, Flores-Moreno, 2013	Guerrero (Chilapa de Álvarez)	Baldazo-Monsivaiz et al., 2013
	<i>Centruroides hoffmanni</i> Armas, 1996	Oaxaca (Istmo de Tehuantepec) y sureste de Chiapas	Teruel et al., 2015, Martín-Frías et al., 2005
thorellii	<i>Centruroides rileyi</i> Sissom, 1995	Sur de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz	Sissom, 1995
4 spp.	<i>Centruroides tuxtla</i> Armas, 1999	Chiapas (Tuxtla Gutiérrez)	Armas, 1999
	<i>Centruroides sissomi</i> Armas, 1996	Yucatán	Armas, 1996, Goodman y Esposito, 2020

<i>Insertae sedis</i>	<i>Centruroides schmidtii</i> Sissom, 1995	Chiapas y Yucatán	Sissom, 1995
	<i>Centruroides possanii</i> González-Santillán, Galán-Sánchez, Valdez-Velásquez, 2019	Colima	González-Santillán et al., 2019

APÉNDICE B

Cuadro B1.- Georreferencia de los organismos empleados en la elaboración del modelo de distribución potencial las poblaciones del este (n = 27).

Estado	Latitud	Longitud	Localidad
Morelos	18.94	-99.22	Cuernavaca
	18.68	-98.80	Jonacantepec
	18.81	-98.95	Cuautla
	18.65	-99.19	Zacatepec de Hidalgo
	18.78	-99.22	Xochitepec
	18.90	-98.97	Oaxtepec
	18.83	-99.22	Acatlipa
	18.68	-99.24	Xoxocotla
	18.58	-99.39	Casahuatlán
Guerrero	18.30	-99.33	Huitzucó
	18.74	-99.67	Pilcaya
	18.24	-99.66	Cocula
	18.34	-99.53	Iguala
	18.20	-99.29	Lagunillas
	18.48	-99.60	Tecapulco
	18.03	-99.11	Copalillo
	17.54	-99.50	Chilpancingo
	18.38	-99.86	Teloloapan Chilapa de Álvarez
Puebla	18.34	-98.95	Jalolapan
	18.51	-98.57	Chietla
	18.71	-98.45	Tepeojuma
	18.60	-98.46	Izucar de Matamoros
	18.51	-98.60	Atecingo

18.59	-98.55	Tilapa
18.46	-98.77	Teotlalco
18.29	-98.29	Chinantla
18.25	-98.03	Acatlán de Osorio

Cuadro B2.- Georreferencia de los organismos empleados en la elaboración del modelo de distribución potencial las poblaciones del oeste (n = 18).

Estado	Latitud	Longitud	Localidad
Michoacán de Ocampo	19.20	-100.57	Tuzantla
	19.14	-101.46	Pedernales
	18.90	-100.15	Nanchititla
	19.58	-100.92	Tzitzio
	19.23	-101.46	Tacámbaro
Estado de México	19.18	-100.26	Santo Tomás de los Plátanos
	18.61	-100.18	Tlatlaya
	19.46	-99.76	Pungarancho
	19.31	-99.88	Luviones
	19.05	-99.98	San Sebastián Carboneras
	19.03	-100.05	Temascaltepec
	18.96	-100.18	Zacazonapan
	18.90	-100.15	Tejupilco
	18.65	-100.38	Las Arrobas
	18.83	-100.01	Santo Tomás de las Flores
18.68	-100.18	Amatepec	

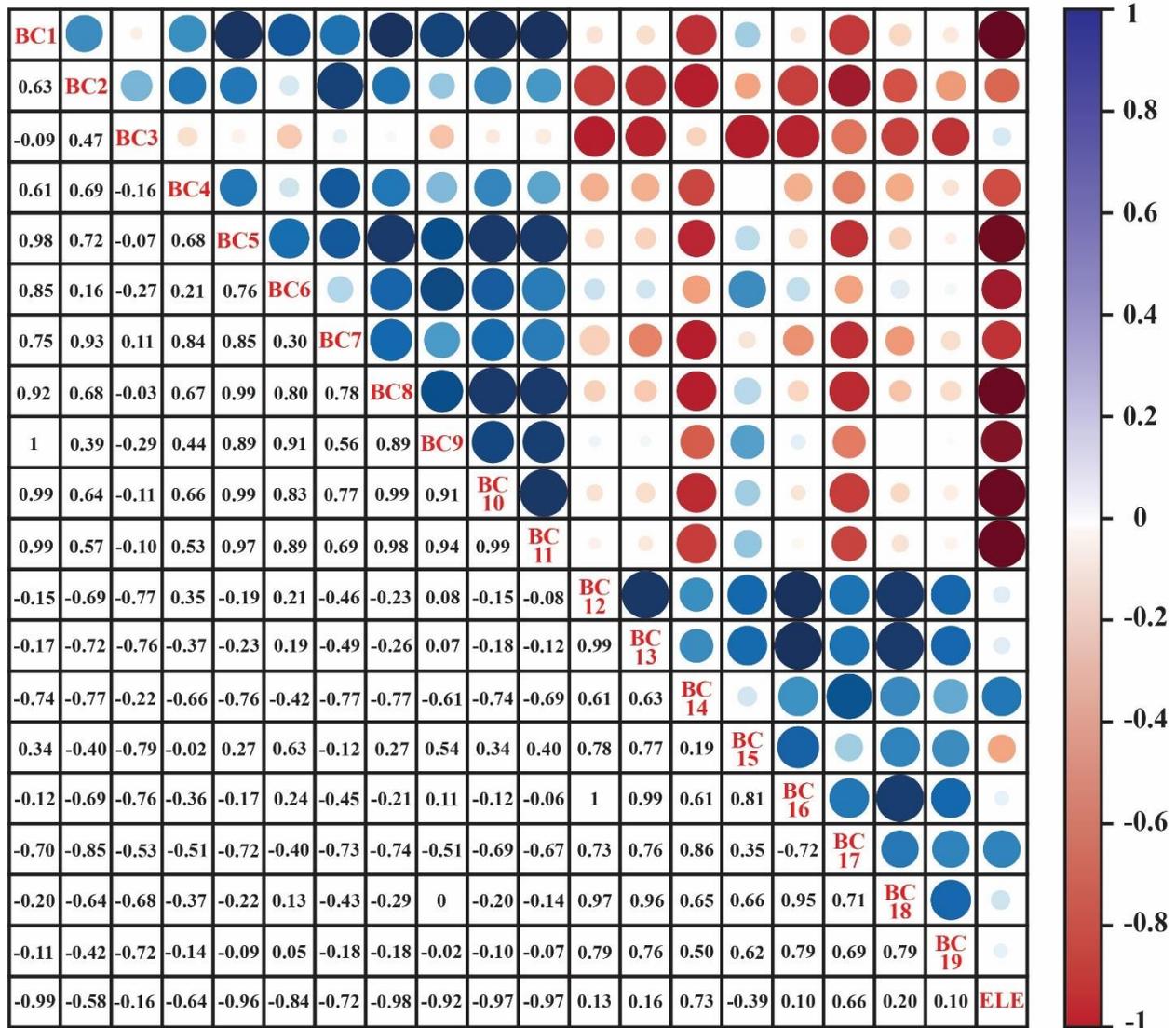


Figura B1.- Matriz de correlación (Pearson) de las variables bioclimáticas para las poblaciones del este. En la parte superior la relación se representa usando colores, en la parte inferior se puede observar el valor de p obtenido para cada par de variables.

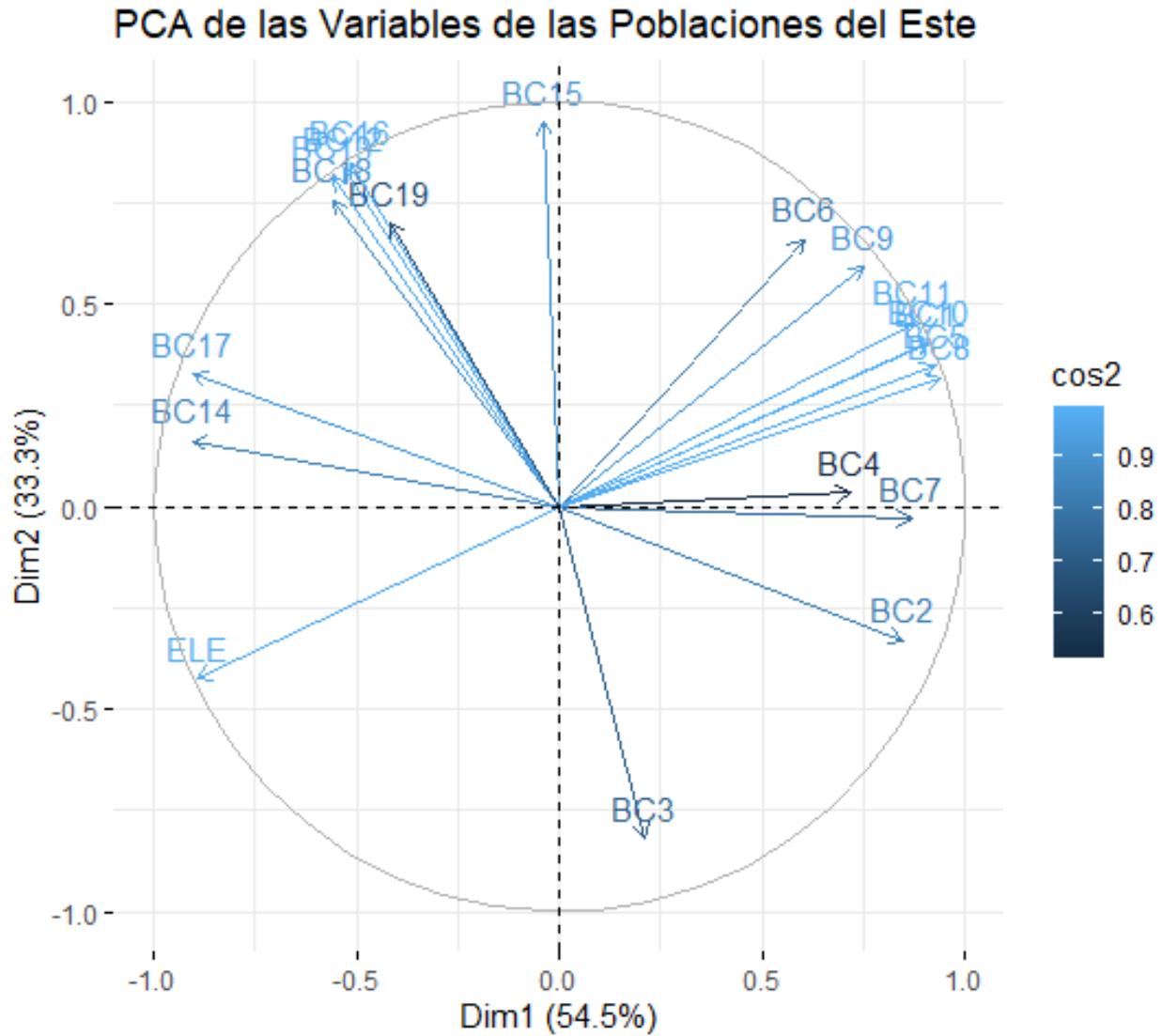


Figura B2.- Análisis de componentes principales (PCA) de las variables bioclimáticas de las poblaciones del este. Se muestra el porcentaje de varianza de cada componente principal (Dim 1 y Dim 2). Las variables positivamente correlacionadas se agrupan juntas, mientras que las negativamente correlacionadas se disponen en dirección contraria. La distancia de las variables al origen mide la cantidad de representación de las variables para cada componente, así como el color representado en la barra de \cos^2 .

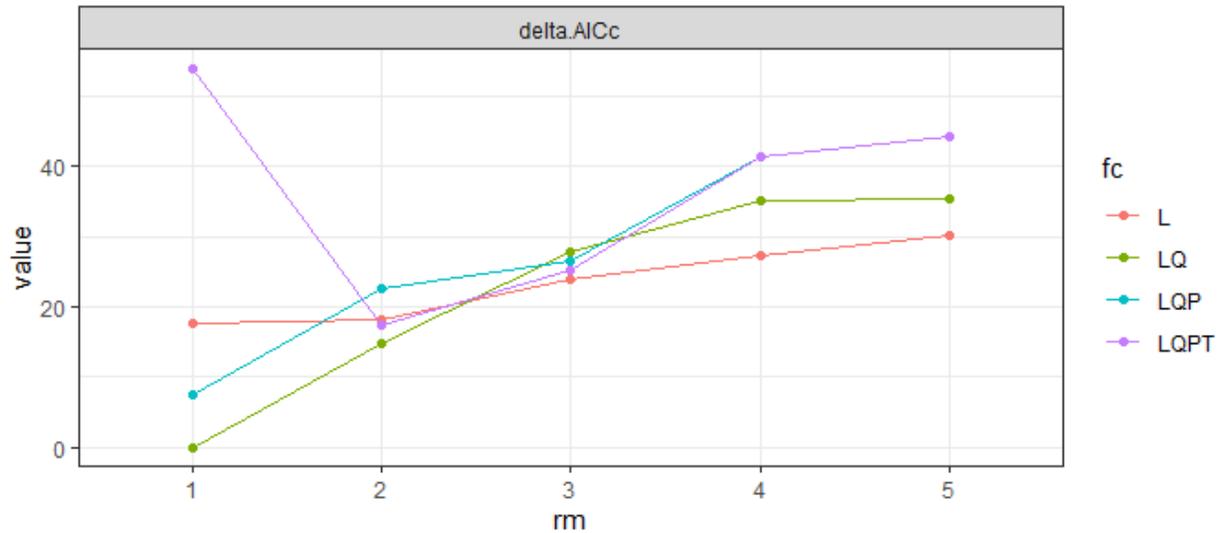


Figura B3.- Cambios en el valor del delta AICc dependientes de la complejidad de los modelos propuestos para las poblaciones del este (fc = combinaciones de features; rm = regularizador de mutliplicidad).

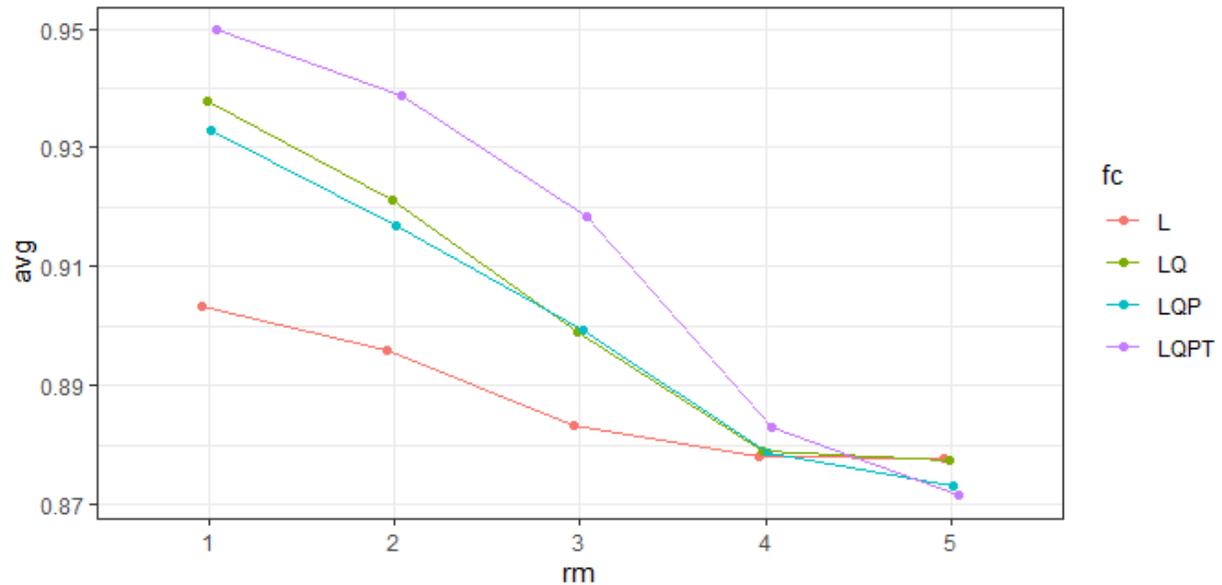


Figura B4.- Media del porcentaje de AUC dependientes de la complejidad de los modelos propuestos.

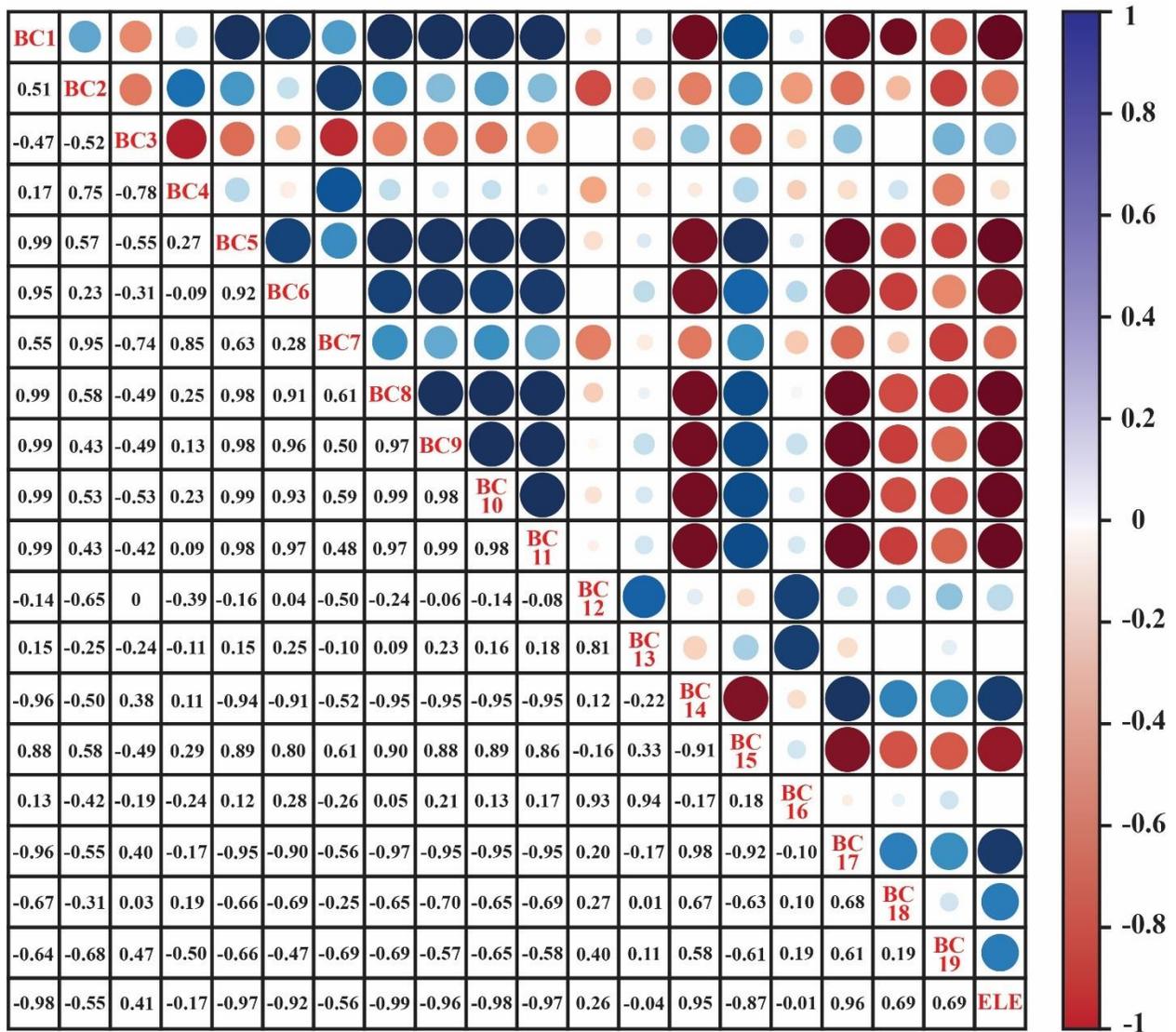


Figura B5.- Matriz de correlación (Pearson) de las variables bioclimáticas para las poblaciones del oeste. En la parte superior la relación se representa usando colores, en la parte inferior se puede observar el valor de p obtenido para cada par de variables.

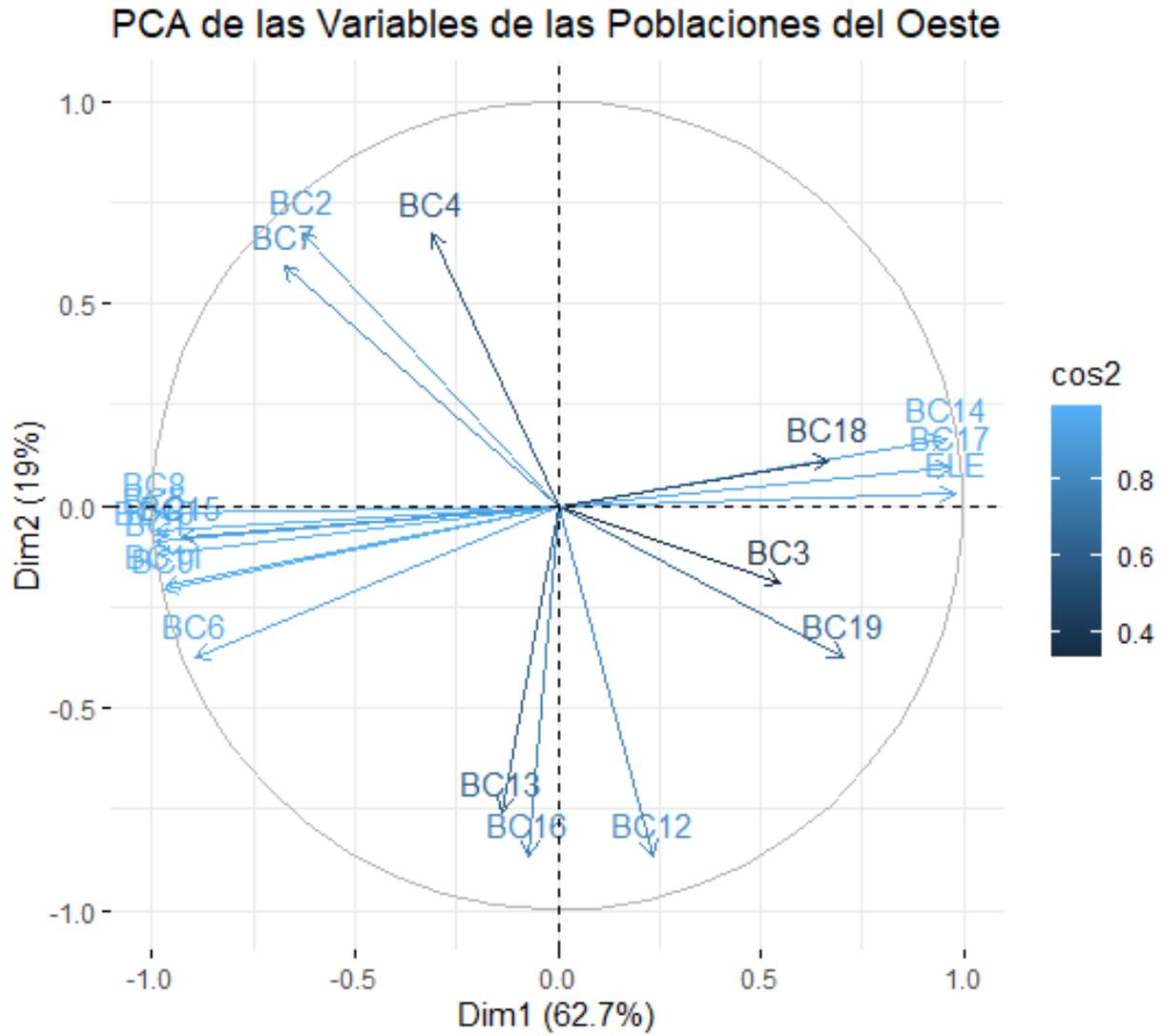


Figura B6.- Análisis de componentes principales (PCA) de las variables bioclimáticas de las poblaciones del oeste.

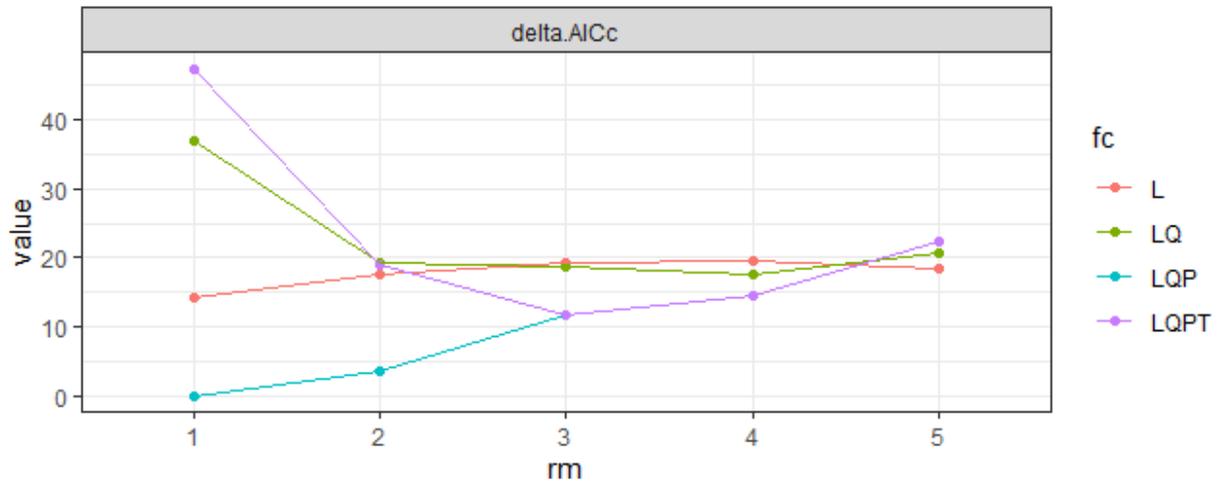


Figura B7.- Cambios en el valor del delta AICc dependientes de la complejidad de los modelos propuestos para las poblaciones del oeste (fc = combinaciones de features; rm = regularizador de mutliplicidad).

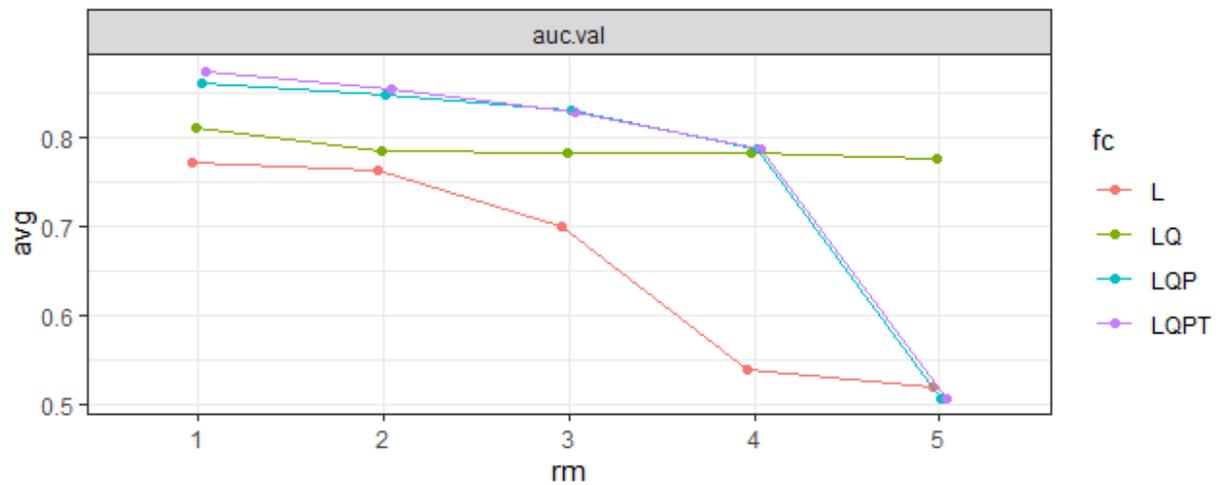


Figura B8.- Media del porcentaje de tasas de omisión y AUC dependientes de la complejidad de los modelos propuestos.

APÉNCICE C

Cuadro C1.- Resumen de los resultados obtenidos producto de los cuatro escenarios planteados para el análisis de delimitación de especies a través del programa BPP, utilizando la topología obtenida en el análisis de la matriz GB de ML como árbol guía.

Análisis	Algoritmo	Semilla	Modelo con la probabilidad posterior más alta
Análisis A $\theta = \sim\text{IG}(3, 0.01)$ $\tau = \sim\text{IG}(3, 0.004)$	Algoritmo 00	298935133	Modelo 9 = 0.9978
	Algoritmo 00	297572797	Modelo 9 = 0.9947
	Algoritmo 01	295693415	Modelo 9 = 0.9956
	Algoritmo 01	293343879	Modelo 9 = 0.9974
Análisis B $\theta = \sim\text{IG}(3, 0.004)$ $\tau = \sim\text{IG}(3, 0.01)$	Algoritmo 00	311347939	Modelo 9 = 0.9727
	Algoritmo 00	309935009	Modelo 9 = 0.9820
	Algoritmo 01	307699001	Modelo 9 = 0.9474
	Algoritmo 01	306415641	Modelo 9 = 0.9654
Análisis C $\theta = \sim\text{IG}(3, 0.01)$ $\tau = \sim\text{IG}(3, 0.01)$	Algoritmo 00	317985625	Modelo 9 = 0.9957
	Algoritmo 00	315932249	Modelo 9 = 0.9977
	Algoritmo 01	314457619	Modelo 9 = 0.9980
	Algoritmo 01	312855887	Modelo 9 = 0.9975
Análisis D $\theta = \sim\text{IG}(3, 0.004)$ $\tau = \sim\text{IG}(3, 0.004)$	Algoritmo 00	304725061	Modelo 9 = 0.9411
	Algoritmo 00	303494763	Modelo 9 = 0.9947
	Algoritmo 01	302207701	Modelo 9 = 0.9489
	Algoritmo 01	300736773	Modelo 9 = 0.9582

Cuadro C2.- Resumen de los resultados obtenidos producto de los cuatro escenarios planteados para el análisis de delimitación de especies a través del programa BPP, utilizando la topología obtenida en el análisis de la matriz NGB de ML como árbol guía.

Análisis	Algoritmo	Semilla	Modelo con la probabilidad posterior más alta
Análisis A $\theta = \sim\text{IG}(3, 0.01)$ $\tau = \sim\text{IG}(3, 0.004)$	Algoritmo 00	1330821259	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 00	1335387059	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	1326431921	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	1329126977	Modelo 9 = 1.0000
Análisis B $\theta = \sim\text{IG}(3, 0.004)$ $\tau = \sim\text{IG}(3, 0.01)$	Algoritmo 00	1345106043	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 00	1391234197	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	1392849503	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	1394396939	Modelo 9 = 0.9926
Análisis C	Algoritmo 00	91976499	Modelo 9 = 1.0000

$\theta = \sim\text{IG (3, 0.01)}$	Algoritmo 00	1314770621	Modelo 9 = 1.0000
$\tau = \sim\text{IG (3, 0.01)}$	Algoritmo 01	1316837571	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	1318895883	Modelo 9 = 0.9834
Análisis D	Algoritmo 00	1336945601	Modelo 9 = 0.8837
$\theta = \sim\text{IG (3, 0.004)}$	Algoritmo 00	1338766985	Modelo 9 = 0.9508
$\tau = \sim\text{IG (3, 0.004)}$	Algoritmo 01	1340615517	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	1342322139	Modelo 9 = 0.9780

Cuadro C3.- Resumen de los resultados obtenidos producto de los cuatro escenarios planteados para el análisis de delimitación de especies a través del programa BPP, utilizando la topología obtenida en el análisis de la matriz BG y NGB de ASTRAL como árbol guía.

Análisis	Algoritmo	Semilla	Modelo con la probabilidad posterior más alta
Análisis A	Algoritmo 00	198910795	Modelo 9 = 1.0000
$\theta = \sim\text{IG (3, 0.01)}$	Algoritmo 00	197284383	Modelo 9 = 0.9180
$\tau = \sim\text{IG (3, 0.004)}$	Algoritmo 01	194638687	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	192371829	Modelo 9 = 1.0000
Análisis B	Algoritmo 00	205987785	Modelo 5 = 1.0000
$\theta = \sim\text{IG (3, 0.004)}$	Algoritmo 00	203829519	Modelo 5 = 1.0000
$\tau = \sim\text{IG (3, 0.01)}$	Algoritmo 01	202368463	Modelo 5 = 0.8850
	Algoritmo 01	200566823	Modelo 5 = 0.9999
Análisis C	Algoritmo 00	222307435	Modelo 9 = 0.9299
$\theta = \sim\text{IG (3, 0.01)}$	Algoritmo 00	216396575	Modelo 9 = 1.0000
$\tau = \sim\text{IG (3, 0.01)}$	Algoritmo 01	210765833	Modelo 9 = 1.0000
	Algoritmo 01	208832155	Modelo 9 = 0.9994
Análisis D	Algoritmo 00	190994685	Modelo 9 = 1.0000
$\theta = \sim\text{IG (3, 0.004)}$	Algoritmo 00	181508927	Modelo 9 = 1.0000
$\tau = \sim\text{IG (3, 0.004)}$	Algoritmo 01	183672129	Modelo 9 = 0.9778
	Algoritmo 01	185373815	Modelo 9 = 0.9718

Cuadro C4.- Resumen de los resultados obtenidos producto de los cuatro escenarios planteados para el análisis de delimitación de especies a través del programa BPP, utilizando la topología modificada, en donde *C. balsasensis* es polifilético, de la matriz GB (IQTREE) como árbol guía.

Análisis	Algoritmo	Semilla	Modelo con la probabilidad posterior más alta
Análisis A	Algoritmo 00	1820961727	Modelo 14 = 0.9941
$\theta = \sim\text{IG (3, 0.01)}$	Algoritmo 00	1822869491	Modelo 14 = 0.9991
$\tau = \sim\text{IG (3, 0.004)}$	Algoritmo 01	1824505775	Modelo 14 = 0.9920

	Algoritmo 01	1826746719	Modelo 14 = 0.9941
Análisis B	Algoritmo 00	1813397307	Modelo 14 = 0.8884
$\theta = \sim\text{IG}(3, 0.004)$	Algoritmo 00	1814887979	Modelo 14 = 0.9877
$\tau = \sim\text{IG}(3, 0.01)$	Algoritmo 01	1816710597	Modelo 14 = 0.9372
	Algoritmo 01	1818807163	Modelo 14 = 0.9655
Análisis C	Algoritmo 00	1763335161	Modelo 14 = 0.9983
$\theta = \sim\text{IG}(3, 0.01)$	Algoritmo 00	1765275009	Modelo 14 = 0.9960
$\tau = \sim\text{IG}(3, 0.01)$	Algoritmo 01	1767533229	Modelo 14 = 0.9924
	Algoritmo 01	1770009867	Modelo 14 = 0.9944
Análisis D	Algoritmo 00	1828772947	Modelo 14 = 0.9724
$\theta = \sim\text{IG}(3, 0.004)$	Algoritmo 00	1841790413	Modelo 14 = 0.9940
$\tau = \sim\text{IG}(3, 0.004)$	Algoritmo 01	1851936361	Modelo 14 = 0.9894
	Algoritmo 01	1857594251	Modelo 14 = 0.9964

LITERATURA CITADA

- Araújo, S. C., Candido, M. D., Araújo, F. P. H., Dias, C. S., Vasconcellos, C. (2010). Seasonal variations in scorpion activities (Arachnida: Scorpiones) in an area of Caatinga vegetation in northeastern Brazil. *Zoologia (Curitiba)*. 27(3): 372-376.
- Armas, F. L. (1996). Presencia de *Centruroides schmidtii* Sissom en el sureste de México y descripción de dos nuevas especies (Scorpiones: Buthidae). *Museo Entomológico, Managua, Nicaragua*.
- Armas, F. L., Beutlespacher C. R., Martín, F. E. (1995). Notes on the taxonomy and distribution of some *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) of Mexico. *Revista Nicaragüense de Entomología*. 32: 29-43.
- Armas, F. L., Martín-Frías, E. (1999). *Alacranismo en México. Estado actual de géneros Centruroides y principales problemas taxonómicos y biogeográficos*, 3.
- Armas, F. L., Martín-Frías, E. (2008). El género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) en el estado de Veracruz, México. *Boletín de la SEA*. 43: 7-22.
- Armas, F. L., Martín-Frías, E. (2008). El género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) en el estado de Veracruz. *Boletín de la SEA*. 43: 7-22.
- Armas, F. L., Martín-Frías, E., Estévez-Ramírez, J. (2003). Lista anotada de las especies mexicanas del género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae). *Revista Ibérica de Aracnología*. 8: 93-83.
- Armas, F. L., Trujillo, E. R., Viquez, C., Agreda, O. E. (2010). Primer registro de *Centruroides tapachulensis* Hoffmann, 1932 (Scorpiones: Buthidae) para Guatemala. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*. 46: 261-266.
- Baldazo-Monsivaiz, G. J., Ponce-Saavedra, J., Flores-Moreno, M. (2013). Una nueva especie de alacrán del género *Centruroides* de importancia médica (Scorpiones: Buthidae) del estado de Guerrero, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84: 100-116.
- Baldazo-Monsivaiz, G. J., Teruel, R., Cortés-Guzmán, J. A., Canché-Aguilar, I. (2017). Los escorpiones (Arachnida: Scorpiones) del municipio de Chilpancingo de los Bravo, estado de Guerrero, México. *Entomología Mexicana*. 4: 21-27.
- Beutlespacher, B. C. R. (2000). *Catálogo de alacranes de México*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán.
- Bickford, D., Lohman, J. D., Sodhi, S. N., Ng, K. L. P., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 22(3): 148-155.
- Bolaños, L. M., Rosenblueth, M., Manrique de Lara, A., Migueles-Lozano, A., Gil-Aguillón, C., Mateo-Estrada, V., González-Serrano, F., Santibáñez-López, E. C., García-Santibáñez, T., Martínez-Romero,

- E. (2019). Cophylogenetic analysis suggest cospeciation between the scorpion *Mycoplasma* clade symbionts and their hosts. *Plos One*. 14(1): e0209588.
- Bromham, L., Duchene, S., Hua, X., Ritchie, M. A., Duchene, A. D., Ho, W. Y. S., (2018). Bayesian Molecular Dating: Opening up the Black Box. *Biological Reviews*. 93: 1165-1191.
- Bronwell, P., Farley, D. R., (1979). Orientation to vibrations in sand by the nocturnal scorpion *Paruroctonus mesaensis*: Mechanism of target localization. *Journal of Comparative Physiology*. 131: 31-38.
- Chan, Y., Ranwez, V., Scornavacca, C. (2017). Inferring incomplete lineage sorting, duplications, transfer and losses with reconciliations. *Journal of Theoretical Biology*. 432: 1-7.
- Chavez-Haro, A. L., Ortíz, E. (2015). Scorpionism and dangerous species in Mexico. En Gopalakrishnakone, P., Possani, L. D., Schwartz, E., Rodríguez de la Vega, R. C. (Eds). *Scorpion Venoms* (pp. 101-213). México: Springer+Business.
- Cid-Uribe, I. J., Meneses, P. E., Batista, F. V. C., Ortiz, E., Possani, D. L. (2019). Dissecting toxicity: The venom gland transcriptome and the venom proteome of the highly venomous scorpion *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879). *Toxins*. 11(5): 2-21.
- Claridge, M. F., Dawah H. A., Wilson, M. R. (eds.) (1997). [*Species: The units of diversity.*](#) Chapman y Hall. pp. 381–423.
- Coddington, J. A., Giribet, G., Harvey, M. S., Prendini, L., Walter, D. E. (2004). Arachnida. *Assembling the tree of life*.
- Cartesana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 17: 540-552.
- Cartesana, J., Talavera, G. (2007). Improving of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*. 56, 564-577.
- Cummings P.M., Otto P.S., Wakeley J. (1995). Sampling Properties of DNA Sequence Data in Phylogenetic Analysis. *Mol. Biol. Evol.* 12(5)8: 814-822.
- Dávila, S., Pinero, D., Bustos, P., Cevallos, M. A., Dávila, G. (2005). The mitochondrial genome sequence of the scorpion *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) (Chelicerata: Arachnida). *Gene*. 360(2): 92-102.
- Degnan, H. J., Rosenberg, A. N. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference and multispecies coalescent. *Trend in Ecology and Evolution*. 24(6): 332-340.
- Dhar, A., Minin, N. V., (2015). Maximum Likelihood Methods for Phylogenetic Inference. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*. 10.1016/B978-0-12-800049-6.00207-9.
- Díaz-Najera, A. (1962). Alacranes de la república mexicana: Identificación de ejemplares capturados en 235 localidades. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop. (Mex)*. 24: 15-30.

- Duchene, A. D., Duchene, S., Ho, W. Y. S., (2017). New Statistical Criteria Detect Phylogenetic Bias Caused by Compositional Heterogeneity. *Mol. Biol. Evol.* 34(6): 1529-1534.
- Dufayard J.F., Duret L., Penel S., Gouy M., RechMDPann F., Perrière G., (2005). Tree pattern matching in phylogenetic trees: automatic search for orthologs or paralogs in homologous gene sequence databases. *Bioinformatics.* 21(11): 2596-2603.
- Elith, J. H., Graham, C. P., Anderson, R., Dudík, M., Ferrier, S., Guisan, A., Hijmans, J. R., Huettmann, F., Leathwick, R. J., Lehmann, A., Li, J., Lohmann, G. L., Loiselle A. B., Manion, G., Moritz, C., Nakamura, M., Nakazawa, Y., Overton, M. C., Peterson, T. A., Phillips, J. S., Richardson, K., Scachetti-Pereira, R., Schapire, E. R., Soberón, J., Williams, S., Wisz, S. M., Zimmermann, E. N. (2006). Novel methods improve prediction of species' distribution from occurrence data. *Ecography.* 29: 129-151.
- Esposito, A. L., Prendini, L. (2019). Island ancestors and New World biogeography: A case study from the scorpions (Buthidae: Centruroidinae). *Scientific Reports.* 9(1): 1-11.
- Feng, X., Park, S. D., Liang, Y., Pandey, R., Papes, M. (2019). Collinearity in ecological niche modelling: Confusion and challenges. *Ecology and Evolution.* 9(18): 10365-10376.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist.* 125(1): 1-15.
- Felsenstein, J., Kishino, H. (1993). Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hillis and Bull. *Systematic Biology.* 42:193-200.
- Fet, V., Sissom, W. D., Lowe, G., Braunwalder, M. E. (2000). *Catalog of the scorpions of the world (1758-1998)*. New York Entomological Society.
- Fick, S. E., Hijmans, R. J. (2017). Worldclim2: New 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology.*
- Flouri, T., Jiao, X., Rannala, B., Yang, Z. (2018). Species tree inference with BPP using genomic sequences and the multispecies coalescent. *Molecular Biology and Evolution.* 35(10): 2585-2593
- Flouri, T., Jiao, X., Rannala, B., Yang, Z. (2020). A bayesian implementation of the multispecies coalescent model with introgression for phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution.* 37(4): 1211-1223.
- Fujisawa, T., Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation in simulated data sets. *Systematic Biology.* 65(5): 707-724.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology y evolution.* 27(9): 480-488.

- Gantenbein, B., Fet, V., Barker, B. M. (2001). Mitochondrial DNA reveals a deep, divergent phylogeny in *Centruroides exilicauda* (Wood, 1863) (Scorpiones: Buthidae). *Scorpions 2001. In Memoriam Gary A. Polis*. 235-244.
- Gantenbein, B., Fet, V., Gantenbein-Ritter, A. I., Balloux, F. (2005). Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (Scorpiones: Buthidae). *Proc. R. Soc. B*. 272: 697-704.
- Gantenbein, B., Largiader, C. R. (2003). The phylogeographic importance of the Strait of Gibraltar as a gene flow barrier for terrestrial arthropods: A case study with the scorpion *Buthus occitanus* as model organism. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 28(1): 119-130.
- Gehara, M., Barth, A., Faria de Oliveira, E., Antonio-Costa, M., Haddad, C., Vences, M. (2017). Model-Based analysis reveals insular population diversification and cryptic frog species in the *Ischnochnebra parva* complex in the Atlantic forest of Brazil. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 112: 68-78.
- Giribet, G. (2015). Morphology should not be forgotten in the era of phylogenomics – A phylogenetic perspective. *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology*. 256: 96 – 103.
- Gómez-Rave, J. L., Muñoz, X. A., Sierra-Castrillo, J., Román-Marín, M. L. (2019). Scorpion venom: New promise in the treatment of cancer. *Acta Biológica Colombiana*. 24(2): 213-223.
- González-Rivera, A., Álvarez-Navarro, A. P., Lombardo-Aburto, E., Hernández-Orozco, H., López-Alquicira, M., Solórzano-García, E., Ortega-Martínez, E. (2004). Alacranismo. *Acta Pediátrica Mexicana*. 25(1): 48-58.
- González-Santillán, E. (2001). Catálogo de escorpiones de la Colección Nacional de Arácnidos (CNAN). Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- González-Santillán, E., Delgado-Hernández, O., Cid-Uribe, J., Romero-Gutiérrez, M. T., Valdez-Velázquez, L. L., Herrera-Estrella, A. (2020). Avances en la sistemática filogenética de los alacranes de importancia médica de América del Norte (Buthidae: *Centruroides*). *VI Congreso Latinoamericano de Aracnología Virtual, Buenos Aires, Argentina*.
- González-Santillán, E. (2004). Diversidad, taxonomía y hábitat de alacranes. *Artrópodos de Chamela*. 25-35.
- González-Santillán, E., Galán-Sánchez, A. M., Valdez-Velázquez, L. L., (2019). A new species of *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from Colima, México. *Comptes Rendus Biologies*. 342: 331-344.
- González-Santillán, E., Possani, D. L. (2018). North American scorpions of public health importance with a reappraisal of historical epidemiology. *Acta Tropical*. 187: 264-274.
- González-Rivera, A., Álvarez-Navarro, P. A., Lombardo-Aburto, E., Hernández-Orozco, H., López-Alquicira, M., Solórzano-García, E. (2004). Alacranismo. *Acta Pediátrica Mexicana*. 25: 48-58.
- Goodman, A., Esposito, L. (2020). Niche partitioning in congeneric scorpions. *Invertebrate biology*. 139: e12280.

- Gopalakrishnakone, P., Possani, L. D., Schwartz, E. F., de la Vega, R. C. R. (Eds.). (2015). *Scorpion venoms*. Springer Netherlands.
- Guisan, A., Zimmermann, E. N. (2000). Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modeling*. 135: 147-186.
- Guisan, A., Thullier, W. (2005). Predicting species distribution: Offering more than simple habitat models. *Ecology Letters*. 8(9): 993-1009.
- Haghani, A., Khoobdel, M., Dehghani, R., Adibzadeh, A., Sobati, H., Aliabadian, M. (2020). Ecological niche modeling and distribution analysis of digger Scorpions: *Odontobuthus doriae*, *Odontobuthus bidentatus* (Scorpiones: Buthidae) and *Scorpio maurus* (Scorpiones: Scorpionidae) in Iran using maximum entropy method. *Applied Entomology and Zoology*. 55: 17-24.
- Hennig, W. (1966). *Phylogenetic Systematics*. Urbana, IL: University of Illinois Press.
- Hey, J., Waples, S. R., Arnold, L. M., Butlin, K. R., Harrison, G. R. (2013). Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 18(11): 597-603.
- Hillis, D., Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*. 42(2): 182-192.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*. 35(2): 518-522.
- Hoffmann, C. C. (1932). Los escorpiones de México. Segunda parte: Buthidae. *Monografías para la Entomología Médica en México*. (2).
- Howell, N. (1989). Evolutionary conservation of protein regions in the protonomative cytochrome b and their possible role in redox catalysis. *Journal of Molecular Evolution*. 39: 157 – 169.
- Hunson H.D., Bryant D., (2005). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* 23(2): 254-256.
- Isaac, N. J., Mallet, J., Mace, G. M. (2004). Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. *Trends in ecology y evolution*. 19(9): 464-469.
- Jackson, N., Carstens, B., Morales, A., O'Meara, B. C. (2017). Species delimitation with gene flow. *Systematic Biology*. 66(5): 799-812.
- Jaimes, A. (2007). Distribución real y potencial de los escorpiones de importancia médica de México. Tesis, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos.
- Jarvis, H. I., Reuter, A., Nelson, E. G. (2008). Hole-filled SRTM for the globe version 4. Available from CGIAR-CGI SRTM 90m database.

- Jedrzejowzka, I., Szymusiak, K., Mazurkiewicz-Kania, M., Gabrieć, A. (2016). Scorpion Kaitoikogenic Ovariuterus – Much more Alike to Apoikogenic Type than it seemed to be. *Arthropod Structure and Development*. 45(5): 1-8.
- Katoh, K., Kuma, K., Toh, H., Miyata, T. (2005). MAFFT versión 5: Improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acid Research*. 33(2): 511-518.
- Kück, P., y Struck, T. H. (2014). BaCoCa--a heuristic software tool for the parallel assessment of sequence biases in hundreds of gene and taxon partitions. *Molecular phylogenetics and evolution*. 70: 94–98.
- Landan, G., and D. Graur. (2008). Local reliability measures from sets of co-optimal multiple sequence alignments. *Pac Symp Biocomput*. 13: 15-24.
- Leaché, A. D., Fujita, M. K. (2010). Bayesian species delimitation in west African forest geckos (*Hemidactylus fasciatus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 277: 3071-3077.
- Leaché A. D., Zhu, T., Rannala, B., Yang, Z. (2019). The spectre of too many species. *Systematic Biology*. 68(1): 168-181.
- Lemmon M. E., Lemmon, R. A. (2013). High-throughput genomic data in systematics and phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 44: 99 – 121.
- Loria, F. S., Prendini, L. (2014). Homology of the lateral eyes of Scorpiones: A six-ocellus model. *Plos One*. 9(12): e112913.
- Lourenco W. R. (1985). Considérations sur le status de *Centruroides elegans insularis* Pocock, 1902, scorpions des îles Tres Marías, Mexique (Scorpiones: Buthidae). *Rev. Brasileira Biol*. 45(5): 637-641.
- Lourenco W. R. (2018). The evolution and distribution of noxious species of scorpions (Arachnida: Scorpiones). *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. 24: 1.
- Lourenco, W. R., Sissom, W. D. (2000). Scorpiones. *Biodiversidad, Taxonomía, y Biogeografía de Artrópodos de México: Hacia una Síntesis de su Conocimiento*. 2: 115-135.
- Maddison, P. W., Knowles, L. L. (2006). Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting. *Systematic Biology*. 55(1): 21-30.
- Maddison, P. W. (2007). Gene trees in species trees. *Systematic Biology*. 46(3): 523-536.
- Maddison, P. W., Maddison, D. R. (2019). Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 3.61. <http://www.mesquiteproject.org>.
- Mallet, J. (2007). Hybrid Speciation. *Nature Reviews*. 446(15): 279-283.
- Martín-Frías, E. Armas, F. L. (2001). Scorpions in Mexico: Comments on some species from *Centruroides gracilis* and *C. margaritatus* (Scorpiones: Buthidae) groups. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 7(2): 331-331.

- Martín-Frías, E., Armas, F. L., Paniagua-Solís, J. (2007). Complementos a la taxonomía e historia natural de *Centruroides orizaba* Armas y Martín-Frías, 2003 (Scorpiones: Buthidae). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*. 41: 313-319.
- Martín-Frías, E., Armas, L. F., Paniagua-Solís, J. (2005). Redescription of the mexican scorpion *Centruroides hoffmanni* Armas, 1996 (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*. 22: 1-7.
- Martín-Frías, E., Armas, L. F., Paniagua-Solís, J. (2007). Complementos a la taxonomía e historia natural de *Centruroides orizaba* Armas y Martín-Frías, 2003 (Scorpiones: Buthidae). *Boletín Sociedad Etimológicamente Aragonesa*. 41: 313-319.
- Martín-Frías, E., Armas, L. F., Olgúin, L. (2010). Nuevos datos taxonómicos sobre *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) (Scorpiones: Buthidae) del estado de Veracruz, México. *Boletín de La Sociedad Entomológica Aragonesa*. 46: 188.
- Mateo, G. R., Felicísimo, M. A., Muñoz, J. (2011). Modelos de distribución de especies: Una revisión sintética. *Revista Chilena de Historia Natural*. 84(2): 217 – 240.
- Mayr, E. (1996). What is a species, and what is not?. *Philosophy of science*. 63(2): 262-277.
- McCormack, J. E., Huang, H., Knowles, L. L. (2009). Maximum likelihood estimates for species trees: how accuracy of phylogenetic inference depends upon the divergence history and sampling design. *Systematic Biology*. 58(5): 501-508.
- McReynolds, C. N. (2008). Microhabitat preferences for errant scorpions, *Centruroides vittatus* (Scorpiones: Buthidae). *The Journal of Arachnology*. 36(3): 557-564.
- Michener, D. C., Sokal, R. R., (1957). A Quantitative Approach to a Problem in Classification. *Evolution*. 11(2): 130-162.
- Mihn, Q. B., Schmidt, A. H., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, D. M., Haeseler, A., Lanfear, R. (2020). IQ-TREE2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Molecular Biology and Evolution*. 37(5): 1530-1534.
- Mirarab, S. (2010). Species tree estimation using ASTRAL: Practical considerations.
- Mirarab, S., Reaz, R., Bayzid, M. S., Zimmermann, T., Swenson, M. S., Warnow, T. (2014). ASTRAL: Genome-scale coalescent-based species tree estimation. *Bioinformatics*. 30(17): i541-i548.
- Mirarab, S., Warnow, T. (2015). ASTRAL-II: Coalescent-based species tree estimation with many hundreds of taxa and thousands of genes. *Bioinformatics*. 31(12): i44-i52.
- Mirshamsi, O., Sari, A., Elahi, E., Hosseinie, S. (2010). Phylogenetic relationships of *Mesobuthus eupues* (CL Koch, 1839) inferred from COI sequences (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Natural History*. 44(47-48): 2851-2872.
- Moreira D. (2014) Orthologous Gene. In: Amils R. et al. (eds). Encyclopedia of Astrobiology. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-27833-4_1731-3.

- Morrone, J. J., Escalante, T., Rodríguez-Tapia, G. (2017). Mexican biogeographic provinces: Map and shapefiles. *Zootaxa*. 4277(2): 277-279.
- Mullen, G. R., Sissom, W. D. (2019). Scorpions (Scorpiones). *Medical and Veterinarian Entomology* (pp. 489-504). Academic Press.
- Muscarella, R., Galante, J. P., Soley-Guardia, M., Boria, A. R., Kass, M. J., Uriarte, M., Anderson, P. R. (2014). MDPeval: An R package for conducting spatially independent evaluation and estimating optimal model complexity for Maxent ecological niche models. *Methods in Ecology and Evolution*. 5: 1198-1205.
- Nascimento, F. F., Dos Reis, M., Yang, Z. (2017). A biologist guide to Bayesian phylogenetic analysis. *Nature, Ecology and Evolution*. 1: 1446 – 1454.
- Nguyen, T., Schmidt, A. H., Haeseler, A., Minh, Q. B. (2014). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 32(1): 268-274.
- Nute, M., Chou, J., Molloy, E. K., Warnow, T. (2018). The performance of coalescent-based species tree-estimation methods under models of missing data. *BMC Genomics*. 19(5): 1-22.
- Ochoa, A. J., Ojanguren, A., Mattoni, I. C., Prendini, L., (2011). Systematic Revision of the Andean Scorpion Genus *Orobothriurus* Maury, 1975 (Bothriuridae), with Discussion of the Altitude Record of Scorpions. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 359: 1-90
- Parmakelis, A., Stathi, I., Chatzaki, M., Simaiakis, S., Spanos, L., Louis, C., Mylonas, M. (2006). Evolution of *Mesbutus gibbosus* (Brullé, 1832) (Scorpiones: Buthidae) in the northeastern Mediterranean region. *Molecular Ecology*. 15: 2883-2894.
- Patwardhan, A., Ray, S., Roy, A. (2014). Molecular markers in phylogenetic studies – A review. *Phylogenetics and Evolutionary Biology*.
- Pearson, R. (2010). Species' distribution modelling for conservation educators and practitioners. *Lessons in Conservation*. 3: 56-89.
- Pearson, R.G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M., Peterson, A. T. (2007). Predicting species distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography*. 34: 102-117.
- Penn, O., Privman, E., Ashkenazy, H., Landan, G., Graur, D. and Pupko, T. (2010). GUIDANCE: a web server for assessing alignment confidence scores. *Nucleic Acids Research*, 38 (Web Server issue): W23-W28; doi: 10.1093/nar/gkq443
- Phillips, J. S., Anderson, P. R., Schapire, E. R. (2016). Maximum entropy modelling of species geographic distribution. *Ecological Modelling*. 190(3-4): 231-259.

- Pinkus-Rendón, A. M., Manrique-Saide, P., González-Delfín, H. (1999). Alacranes sinantrópicos de Mérida, Yucatán. *Rev Biomed.* 10: 153-158.
- Planas, E., Ribera, C. (2015). Description of six new species of *Loxoceles* (Aranae: Sicariidae) endemic to the Canary Islands and the utility of DNA barcoding for their fast and accurate identification. *Zoological Journal of the Linnean Society.* 147(1): 47-73.
- Polis, G. A. (1990). *The biology of scorpions* (No. 595.46 B5).
- Ponce-Saavedra, J., Francke, F. O. (2004). Una nueva especie de alacrán del género *Centruroides* Marx (1890) (Scorpiones: Buthidae) de la depresión del Balsas, México. *Acta Zoológica Mexicana.* 20(2): 221-232.
- Ponce-Saavedra, J., Francke, F. O. (2009). Descripción de una especie de alacrán con importancia médica del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) del estado de Colima, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 80(3): 647-658.
- Ponce-Saavedra, J., Francke, F. O. (2011). Especie nueva del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) de la costa de Jalisco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 82: 1163-1175.
- Ponce-Saavedra, J., Francke, F. O. (2013). Clave de identificación para alacranes del género *Centruroides* Marx, 1980 (Scorpiones: Buthidae) en el centro occidente de México. *Biológicas.* 15(1): 52-62.
- Ponce-Saavedra, J., Francke, F. O. (2019). Una especie de alacrán del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) del noroeste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 90: e902660.
- Ponce-Saavedra, J., Francke, F. O., Cano-Camacho, H., Hernández-Calderón, E. (2009). Evidencias morfológicas y moleculares que validan como especie a *Centruroides tecomanus* (Scorpiones: Buthidae). *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 80: 71-84.
- Ponce-Saavedra, J., Francke, F. O., Quijano-Ravell, F. A., Cortés-Santillán, R. (2016). Alacranes (Arachnida: Scorpiones) de importancia médica para la salud pública en México. *Folia Entomología Mexicana.* 2(3): 45-70
- Ponce-Saavedra, J., Jones, W. R. (2001). Nuevos registros de alacranes (Arachnida: Scorpiones) para el estado de Querétaro, México. *Mem. XXXVI Cong. Nal. Entomol.* 138.
- Ponce-Saavedra, J., Moreno-Barajas, R. J. (2005). El género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) en México. *Biológicas.* 7: 42-51.
- Ponce-Saavedra, J., Quijano-Ravell, F.A., Teruel, R., Francke, O. F. (2015). Redescription of *Centruroides ornatus* Pocock, 1902 (Scorpiones: Buthidae), a montane scorpion from central Mexico. *Revista Ibérica de Aracnología.* 15: 81-89.
- Possani, D. L. (2005). El alacrán y su piquete.

- Prendini, L., Crowe, T. M., Wheeler, W. C. (2003). Systematics and biogeography of the family Scorpionidae (Chelicerata: Scorpiones), with a discussion on phylogenetic methods. *Invertebrate Systematics*. 17(2): 185-259.
- Prendini, L., Wheeler, C. W. (2005). Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing. *Cladistics*. 21: 446-494.
- Quijano-Ravell, F. A., Ponce-Saavedra, J. (2014). Actualización taxonómica y distribución de los alacranes del estado de Michoacán. *Biológicas*. 16(2): 7-22.
- Quijano-Ravell, F. A., Ponce-Saavedra, J. (2016). Una nueva especie de alacrán del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) del estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87(1): 49-61.
- Ramírez-Acre, D. (2015). Uso del hábitat y actividad superficial de *Centruroides margaritatus* en el parque nacional Palo Verde, Guanacaste, Costa Rica. *Cuadernos de Investigación UNED*. 7(2): 279-286.
- Rannala, B. (2015). The art and science of species delimitation. *Current Zoology*. 61(5): 846-853.
- Rannala, B., g, Z. (2013). Improved reversible jump algorithms for Bayesian species delimitation. *Genetics*. 194(1): 245-253.
- Riaño-Umbarila, L., Rodríguez-Rodríguez, R. E., Santibáñez-López, E. C., Güereca, L., Uribe-Romero, J. S., Gómez-Ramírez, V. I., Cárcamo-Noriega, N. E., Possani, D. L., Becerril, B. (2017). Updating knowledge of new medically important scorpion species in Mexico. *Toxicon*. 138: 130-137.
- Rodriguez de la Vega, C. R., Schwartz, F. E., Possani, D. L. (2010). Mining on scorpion venom biodiversity. *Toxicon*. 56(7): 1155-1161.
- Saitou N., Nei M., (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees). *Molecular Biology and Evolution*. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Santibáñez-López E. C., Ponce-Saavedra, J. (2009). Una nueva especie de *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) de la sierra norte de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80(2): 321-331.
- Santibáñez-López, C. E., Contreras-Félix, G. A. (2013). Two new species of *Centruroides* Marx, 1980 (Scorpiones: Buthidae) from Oaxaca, Mexico. *Zootaxa*. 2: 130-140.
- Santibáñez-López, C. E., Ponce-Saavedra, J. (2008). A new species of *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from the northern mountain range from Oaxaca, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80(2): 321-331.
- Santibáñez-López, E. C., Francke, F. O., Ureta, C., Possani, D. L. (2015). Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity. *Toxins*. 8(1): 2-18.

- Santibáñez-López, E. C., González-Santillán, E., Monod, L., Sharma, P. P. (2019). Phylogenomics facilitates stable scorpion systematics: Reassessing the relationships of Vaejovidae and a new higher-level classification of Scorpiones (Arachnida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 135: 22-30.
- Santibáñez-López, E. C., Kriebel, R., Ballesteros, A. J., Rush, N., Witter, Z., Williams, J., Janies, A. D., Sharma, P. P. (2018). Integration of phylogenomics and molecular modeling reveals lineage-specific diversification of toxins in scorpions. *PeerJ*. 6: e5902.
- Santibáñez-López, E. C., Ojanguren-Affilastro, A. A., Sharma, P. P. (2020). Another one bites the dust: Taxonomic sampling of a key genus in phylogenomic datasets reveals more non-monophyletic groups in traditional scorpion classification. *Invertebrate Systematics*. 34: 133-143.
- Sayyari, E., Mirarab, S. (2016). Fast-coalescent based computation of long branch support from quartet frequencies. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7): 1654-1668.
- Shapiro B., Rambaut A., Drummond J.A., (2006). Choosing Appropriate Substitution Models for Phylogenetic Analysis of Protein Coding Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 23(1): 7-9.
- Sharma, P. P., Baker, M. C., Cosgrove, G. J., Johnson, E. J., Oberski, T. J., Raven, J. R., Harvey, S. M., Boyer, L. S., Giribet, G. (2018). A revised phylogeny of scorpions: Phylogenomic support for ancient divergence of a temperate Gondwanan family Bothriuridae.
- Sharma, P. P., Fernández, R., Esposito, A. L., González-Santillán, E., Monod, L. (2015). Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological signal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 282(1804): 20172953.
- Sela, I., Ashkenazy, H., Katoh, K. and Pupko, T. (2015) GUIDANCE2: accurate detection of unreliable alignment regions accounting for the uncertainty of multiple parameters. *Nucleic Acids Research*. 43 (Web Server issue): W7-W14.; doi: 10.1093/nar/gkq443.
- Shelly, R. M., Sissom, W. D. (1995). Distribution of scorpions *Centruroides vittatus* (Say) and *Centruroides hentzi* (Banks) in the United States and Mexico (Scorpiones: Buthidae). *Journal of Arachnology*. 23(2): 100-110.
- Shekhar, S., Roch, S., Mirarab, S. (2018). Species tree estimation using ASTRAL: how many genes are enough? *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 15(5): 1738-1747.
- Schubart, C. D. (2009). Mitochondrial DNA and Decapod phylogenies: The importance of pseudogenes and primer optimization. *Crustacean*. (18), 47-65.
- Silvia-Domínguez, R., Paredes-Solís, S., Cortés-Guzmán, J. A., Flores-Moreno, M., Baldazo-Monsivaiz, G. J., Anderson, N., Cockcroft, A. (2019). Factores asociados con la picadura de alacrán en escolares: estudio transversal en dos comunidades rurales de Guerrero, México. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 76: 79-86.

- Sissom, W. D. (1995). Redescription of the scorpion *Centruroides thorelli* Kraepelin (Buthidae) and description of two new species. *Journal of Arachnology*. 23(2): 91-99.
- Soberón, J. (2008). Grinnellian and Eltonian niches and geographic distribution of species. *Ecology Letters*. 10(12): 1115-1123.
- Soberón, J., Osorio-Olvera, L., Peterson, T. (2017). Diferencias conceptuales entre modelación de nichos y modelación de áreas de distribución. *Revista mexicana de biodiversidad*, 88(2), 437-441.
- Soleglad, M. E., Fet. V. (2003). High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni). *Euscorpius*. 11: 1-56.
- Soleglad, M. E., Fet. V. (2003). The scorpion sternum: Structure and phylogeny (Scorpiones: Orthosterni). *Euscorpius*. 5: 1-34.
- Soleglad, M. E., Fet. V. (2005). Contribution to scorpion systematics. I. One recent changes in high-level taxonomy. *Euscorpius*. 31: 1-13.
- Stockwell, S. A. (1989). Revision of the phylogeny and higher classification of scorpions (Chelicerata). PhD dissertation. University of California, Berkley.
- Stockwell, S. A. (1992). Systematic observations of North American Scorpionida with a key and checklist of the families and genera. *Journal of Medical Entomology*. 29(3): 407-422.
- Sukumaran, J., Knowles, L. (2018). Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 114: 1607-1612.
- Teruel. R., Fet, V., Graham, M. R. (2006). The first mitochondrial DNA phylogeny of Cuban Buthidae (Scorpiones: Buthoidae). *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*. 39: 219-226.
- Teruel. R., Kovarik, F., Baldazo-Monsivaiz, G. J., Hoferek, D. (2015). A new species of *Centruroides* of the “nigrovaryatus” group (Scorpiones: Buthidae) from southern Mexico. *Revista Ibérica de Aracnología*. 26: 3-14.
- Towler, I. W., Ponce-Saavedra, J., Gantenbein, B., Fet, V. (2001). Mitochondrial DNA reveals a diverget phylogeny in tropical *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from México. *Biogeographica*. 77(4): 157-172.
- Ureta, C., González, J. E., Ramírez-Barrón, M., Contreras-Félix, A. G., Santibáñez-López, E. C. (2020). Climate change will have an important impact on scorpion's fauna in its most diverse country, Mexico. *Perspectives in Ecology and Conservation*. 18(2): 116-123.
- Waichert, C., Wilson, S. J., Pitts, P. J., von Dohlen, D. C. (2019). Phylogenetic species delimitation for the widespread spider wasp *Ageniella accepta* (Hymenoptera: Pompilidae), with new synonyms. *Insect Systematics and Evolution*. 62(5): 1-18.

- Ward, J. M., Ellsworth, A. S., Nystrom, S. G. (2018). A global accounting of medically significant scorpions: Epidemiology, major toxins, and comparative resources in harmless counterparts. *Toxicon*. 151: 137-155.
- Warren, L. D., Seifert, N. S. (2011). Ecological niche modelling in Maxent: The importance of model complexity and the performance of model selection criteria. *Ecological Applications*. 21(2): 335-342.
- Wheeler, D. (2002). Selecting the right protein-scoring matrix. *Current Protocols of Bioinformatics*. Chapter 3. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0305s00>
- Wheeler, W. (2012). Systematics. A Course of Lectures. John Wiley y Sons.
- Weiller, F.G. (1998). Phylogenetic Profiles: A Graphical Method for Detecting Genetic Recombinations in Homologous Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 15(3):326–335.
- Wilson, E. B. (1916). The distribution of chondriosomes to spermatozoa in scorpions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2: 321-324.
- Wilson, E. B. (1931). The distribution of sperm-forming materials in scorpions. *J. Morphol.* 60: 429-464.
- Wilson, E. B., Pollister, A.W. (1937). Observation of sperm formation in Centruroid scorpions with special reference to the Golgi material. *J. Morphol.* 60: 407-443.
- Yamashita, T., Rhoads, D. D. (2013). Species delimitation and morphological divergence in the scorpion *Centruroides vittatus* (Say, 1821): Insights from phylogeography. *Plos One*. 8(7): e68282.
- Yang, Z., Rannala, B. (2003). Bayes estimation of species divergence times and ancestral population sizes using DNA sequences form multiple loci. *Genetics*. 164(4): 1645-1656.
- Yang, Z., Rannala, B. (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 9264-9269.
- Yang, Z., Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practices. *Natura Reviews Genetics*.
- Yang, Z., Rannala, B. (2014). Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Molecular Biology and Evolution*. 31(12): 3125-3135.
- Yang, Z. (2015). The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Current Zoology*. 61(5): 854-865.
- Zhang, C., Scornavacca, C., Molloy, K. E., Mirarab, S. (2020). ASTRAL-Pro: Quarted-based species-tree inference despite paralogy. *Molecular Biology and Evolution*. 37(11): 3292-3307.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamakis, A. (2013). A general species delimitation method with application to phylogenetic placement. *Bioinformatics*. 29(22): 2869-2876.