



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"Análisis morfológico y de ADNmt en las salamandras
del género Thorius (Plethodontidae) de la Sierra Madre
del Sur en Guerrero, México."

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA

NORMA ELIZABETH ALBARRÁN MEJÍA



DIRECTOR DE TESIS: DRA. GABRIELA PARRA OLEA

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Norma Elizabeth Albarrán Mejía

FECHA: 03 - Sept - 2009

FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

" **Análisis morfológico y de ADNmt en las salamandras del género Thorius (Plethodontidae) de la Sierra Madre del Sur en Guerrero, México "**

realizado por **Norma Elizabeth Albarrán Mejía**

con número de cuenta **09959903-6** , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario **Dra. Gabriela Parra Olea**

Propietario **Dra. Virginia León Rêgagnon**

Propietario **M. en C. René Cerritos Flores**

Suplente **M. en C. Georgina Santos Barrera**

Suplente **Biol. Luis Canseco Márquez**

Consejo Departamental de **Biología**

[Signature]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

A mis padres Jorge y Mary por todo el amor, la comprensión por estar siempre en los mejores y peores momentos de mi vida para apoyarme, porque sin ellos nunca hubiera logrado ser lo que soy ahora. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermanos Jorge y Nora que aguantaron gritos, rabietas y mil y una más expresiones de frustración, pero también por compartir junto conmigo mis éxitos. Son lo mejor de mi vida.

A mi tía Margarita: fuiste mi mejor inspiración, el mejor ejemplo de una mujer luchadora en todos los sentidos y aunque te hayas ido antes de tiempo siempre vas a estar en mi corazón, te amo mucho.

A mis abuelos, Elenita, Soledad y Victoriano, por ser mi incentivo para seguir luchando por lo que quería, siempre están en mi corazón donde quiera que voy.

A Rocío: por estar ahí siempre y por haberme permitido compartir contigo tantas experiencias, risas, lágrimas y enojos, te quiero comadrta de toda la vida.

Agradecimientos

A la Dra. Gabriela Parra Olea directora de este proyecto: por la oportunidad de trabajar contigo, por tu enorme paciencia, por compartir conmigo todos tus conocimientos en el laboratorio y sobre salamandras (gracias por hacer que me enamorara de ellas) y sobre todo por tu amistad, es lo mejor que me llevo.

A todos los miembros de mi comité sinodal: Dra. Virginia León Regagnòn, M. en C. Georgina Santos Barrera, M. en C. René Cerritos Flores, Biol. Luis Canseco Márquez por leer el presente trabajo y hacer en todo momento comentarios, sugerencias y críticas que lo enriquecieron muchísimo.

A la M. en C. Laura Márquez Valdelamar: por aguantarme en el laboratorio tanto tiempo enseñándome y dirigiéndome junto con Gaby hacia el camino de la Biología Molecular.

A Víctor Serrano y su esposa por compartir conmigo sus conocimientos y excelentes consejos académicos sobre morfología.

A mis maestros en la parte de geografía: Biól. Luis Canseco Márquez del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias así como al Geóg. René Ramos del Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica en el Instituto de Geografía por la ayuda enorme en la realización de dos mapas del estado de Guerrero.

A toda la Banda Warrior (José, Ana, Omar, Karina y Jacsani) que han sabido siempre comportarse como los grandes amigos y los mejores que puede tener una persona, los quiero mucho a todos mantos.

A las miembros del desaparecido y ya bien disperso Six Pack (Jacsani, Diana, Rocío, Miriam y Estrella) siempre estarán en mi corazón los momentos tan divertidos, los tristes, los importantes pero sobre todo haberlas conocido.

A Ismael, por los preciosos recuerdos que me dejas; a Jacko, Diana y Miriam por las canciones, los chismes y la diversión a todas horas.

A Angel (Troglodita) por ser un amigo maravilloso e incondicional y un ejemplo claro de que el trabajo, el estudio y la diversión no están peleados, te quiero mucho.

A Raúl por estar en el momento y el lugar adecuados.

A Rocío y Estrella por haber estado presentes desde el primer día en el camino hacia la Biología, por su amistad, por su cariño, el apoyo en el peor momento de mi vida, por su hombro a la hora de las lágrimas, por haber hecho más grande el amor hacia los anfibios y reptiles. Aunque estemos lejos en muchos sentidos siempre les estaré eternamente agradecida porque los mejores momentos de mi vida en la Facultad los pasé con ustedes.

"La virtud como el arte, se consagra constantemente a lo que es difícil de hacer y cuanto más dura es la tarea más brillante es el éxito".

Aristóteles

Índice	1
Resumen	2
Introducción	3
Sistemática del género <i>Thorius</i>	6
Objetivos	8
Sitio de estudio	9
Capítulo I: Análisis Morfológico.	
1.1 Métodos	
1.1.1 Ejemplares y sitios de colecta	10
1.1.2 Análisis Estadístico	13
1.2 Resultados	
1.2.1 ANCOVA	15
1.2.2 Análisis de Componentes Principales	17
1.2.3 Análisis Discriminante	20
1.3 Discusión	24
Capítulo II: Análisis Filogenético.	
2.1 Métodos	
2.1.1 Técnicas de laboratorio	27
Extracción de ADN	
Amplificación de ADN. Técnicas de PCR	
Purificación de PCR	
Técnica de Secuenciación	
2.1.2 Análisis Filogenético	29
2.2 Resultados	
2.2.1 Productos amplificados del gen mitocondrial ND4	30
2.2.2 Análisis de Secuencias de ADNmt	31
2.2.3 Matrices de Distancia	32
2.2.4 Análisis Filogenético	32
2.3 Discusión	
2.3.1 Las especies de <i>Thorius</i> en Guerrero	39
2.3.2 Distribución de especies y fragmentación genética	39
Conclusiones	41
Apéndice 1	42
Literatura citada	44

RESUMEN

El género *Thorius*, es un grupo endémico de México presentando una distribución restringida a sólo cuatro estados a través de la meseta sur mexicana: Oaxaca, Veracruz, Puebla y Guerrero. El género está conformado por 23 especies, las cuales presentan pocas diferencias en morfología externa. Se examinaron datos morfológicos y genéticos de las especies *Thorius grandis* y *Thorius omiltemi* pertenecientes al estado de Guerrero que ayudaron a su diferenciación. Asimismo se identificó una especie simpátrida a *T. grandis* identificada en el presente trabajo como *Thorius* sp. Nueva Delhi.

Un análisis morfológico detallado sugiere la existencia de dimorfismo sexual en *T. grandis* y *T. omiltemi*, asimismo, la realización de un análisis de componentes principales y un análisis discriminante aportan información suficiente para asegurar que la diferencia entre cuatro caracteres (LC, Anc, *shoulder* y LI) ayudan a la diferenciación entre *T. grandis*, *T. omiltemi* y *T. sp.* Nueva Delhi.

El análisis filogenético, incluyó tres especies del estado de Guerrero, así como especies presentes en el estado de Oaxaca descritas y aún por describir, tanto para Máxima Parsimonia como para Máxima Verosimilitud, indicando un agrupamiento en tres clados para los individuos del estado de Guerrero asignando a una de ellas como especie nueva debido a que no se agrupó con ninguna de las dos especies ya descritas, analizadas en este trabajo (*T. grandis* y *T. omiltemi*). Cabe notar que una muestra de la localidad tipo de *T. omiltemi* se agrupa con las muestras de *T. grandis* en el análisis de MP, pero en el análisis de verosimilitud no se agrupa con ninguna de las dos especies por lo que se asigna a *T. sp?*.

Los resultados obtenidos tanto con el análisis morfológico como con el análisis filogenético, en conjunto con los datos ecológicos fueron importantes en la separación de tres especies: *T. grandis*, *T. omiltemi* y *T. sp.* Nueva Delhi.

INTRODUCCIÓN

El orden Caudata está compuesto por 10 familias, 61 géneros y 515 especies, las cuales se distribuyen principalmente de la región holártica, en América y Eurasia. Dentro de este grupo, las familias más diversas son: Ambystomatidae, Salamandridae y Plethodontidae (Duellman y Trueb, 1986).

La familia Ambystomatidae se encuentra presente exclusivamente en Norteamérica con 31 especies, distribuidas desde el sureste de Canadá y oeste de Alaska, hasta el Eje Neo Volcánico Transversal, en México (Huacúz-Elias, 2001). La familia Salamandridae tiene 62 especies, con dos géneros endémicos en América: *Notophthalmus*, presente en el este de Estados Unidos y extremo noreste de México, y *Taricha*, endémico de la región del Pacífico del Estados Unidos y noroeste de México. El resto de los géneros representantes de esta familia se distribuyen principalmente en Europa, desde las Islas Británicas y Escandinavia al este de los Montes Urales en Rusia y al sur en la Península Ibérica; y en Asia desde el norte de la India, Tailandia y Vietnam (Duellman y Trueb, 1986).

La familia Plethodontidae es el grupo más diverso con un total de 356 especies, constituyendo más del 65% de todas las especies del orden Caudata. Esta familia se distribuye desde Nueva Escocia en Norteamérica, hasta Colombia, Bolivia Central y Brasil en Sudamérica (Duellman y Trueb, 1986). La mayor diversidad de plethodontidos se presenta en la región neotropical en México y Centroamérica (Wake, 1993).

Sistemática de la familia Plethodontidae y del supergénero *Bolitoglossa*

El primer intento de clasificación de salamandras americanas fue realizado por Cope (1889), quien además de los grupos ya reconocidos para entonces, registra dos nuevas familias: Desmognathidae (exclusiva para el género *Desmognathus*) y Thoridae (que solo incluía al género *Thorius*), ambas diferenciadas de las demás familias por la presencia de vértebras opistocélicas (Wake, 1993).

Dentro de los miembros de la familia Plethodontidae Cope (1889) reconoció dos grupos:

1. Plethodontae: que agrupaba a los géneros *Plethodon*, *Hemidactylum*, *Batrachoseps*, *Stereochilus* y *Autodax* (actualmente llamado *Aneides*).
2. Spelerpes: con los géneros: *Geotriton* (actualmente *Hydromantes*), *Gyrinophilus*, *Manculus*, *Spelerpes* (actualmente separado en los géneros *Eurycea* y *Pseudotriton*), *Oedipina* y *Oedipus* (que incluía a todos los géneros del actual supergénero *Bolitoglossa*, excepto *Thorius*).

La diferencia fundamental entre estos dos grupos, era que los miembros de Plethodontae tenían una lengua fija en su parte anterior, mientras que los miembros de Spelerpes presentaban lengua libre (Wake, 1993).

Posteriormente, Dunn (1926) en otro intento de clasificación reconoce 16 géneros y 72 especies de salamandras pletodóntidas. Para el grupo neotropical Dunn (1926) reconoce 31 especies (cerca del 44% del número total de pletodóntidos), y las agrupa dentro del género *Oedipus*, propuesto por Cope (1889). El nombre *Oedipus*, fue retirado de la clasificación por Taylor (1940), debido a que ya había sido previamente asignado a un grupo de insectos del orden Orthoptera por Berthold en 1827. Este nombre fue sustituido por todos los géneros del actual supergénero *Bolitoglossa*, exceptuando al género *Thorius* (Wake y Elias, 1983 y Wake, 1993).

Taylor (1941) describió diversos géneros y especies de salamandras, como *Phaeognathus* y *Haideotriton* y en 1944, realizó una revisión del grupo neotropical, describiendo 4 géneros más: *Chiropterotriton*, *Parvimolge*, *Magnadigita* y *Pseudoeurycea* (Taylor, 1944) reconociendo un total de 7 géneros para lo que actualmente se conoce como el supergénero *Bolitoglossa*, mientras que Tanner (1952) reconoció 8 incluyendo *Magnadigita*. Wake y Brame (1963), sinonimizan *Magnadigita* con *Bolitoglossa*. Finalmente, Wake y Johnson (1989) y García-París y Wake (2000) describen dos géneros más, llegando así a un total de 13 géneros la cual es la composición actual del supergénero *Bolitoglossa*.

En un estudio detallado de morfología y de sistemática del grupo, Wake (1966) propone que los pletodóntidos derivaron de un grupo de Ambistomátidos, subdivide a la familia Plethodontidae en dos subfamilias: Desmognathinae y Plethodontinae. Al mismo tiempo, divide a la subfamilia Plethodontinae en tres tribus:

1. Plethodontini: con los géneros *Plethodon*, *Aneides* y *Ensatina*
2. Bolitoglossini: que incluía 13 géneros: *Bolitoglossa*, *Chiropterotriton*, *Lineatriton*, *Oedipina*, *Parvimolge*, *Pseudoeurycea*, *Thorius*, *Batrachoseps*, *Hydromantes*, *Nototriton*, *Ixalotriton*, *Bradytriton* y *Nyctanolis*.
3. Hemidactyliini: incluye a los géneros *Stereochilus*, *Gyrinophilus*, *Pseudotriton*, *Hemidactylium*, *Eurycea*, *Typhlotriton*, *Haideotriton* y *Typhlomolge*.

La tribu Bolitoglossini, incluye cerca de la mitad de todas las especies de salamandras que pertenecen al orden Caudata. Dentro de esta tribu se reconocen tres supergéneros: *Hydromantes*, que se encuentra en Europa y el oeste de Norteamérica, *Batrachoseps*, presentes en el oeste de Norteamérica, y *Bolitoglossa* que está presente principalmente en América tropical desde el norte de México hasta Brasil, Bolivia y Perú (Wake, 1966 y 1993).

Dentro del supergénero *Bolitoglossa*, se encuentran tres géneros monotípicos (*Bradytriton*, *Parvimolge* y *Nyctanolis*). *Pseudoeurycea* es parafiletico con base en datos moleculares (Maxson y Wake, 1981; Lynch, *et al.*, 1983 y Parra-Olea, 2002) ya que algunos de sus miembros están cercanamente relacionados a *Parvimolge*, *Ixalotriton* y *Lineatriton*. A su vez, *Lineatriton* es un género polifilético ya que sus especies están relacionadas con diferentes clados de *Pseudoeurycea* (Parra-Olea y Wake, 2001 y Parra-Olea, 2002). *Bolitoglossa* es el género más grande, con una cuarta parte de todas las especies de salamandras de América (Wake, 1993), encontrándose en hábitats muy diversos. Presenta altos niveles de diferenciación genética (Hanken y Wake, 1982; Parra-Olea *et al.*, 2004) y se conoce muy poco de la historia natural de la mayoría de las especies que lo conforman (Hanken y Wake, 1982).

La reducción de tamaño (miniaturización) ha evolucionado repetidamente en la tribu Bolitoglossini, dando como resultado varios grupos miniatura: *Thorius*, *Parvimolge*, *Bradytriton*, *Nototriton* y *Cryptotriton*. De todos estos grupos, el caso más extremo en terminos de tamaño y también el mejor estudiado a nivel osteológico es el género *Thorius*.

En el género *Thorius*, se ha observado que los adultos de algunas especies alcanzan madurez sexual con una longitud de cuerpo de tan solo 13 mm, colocándolos dentro de los vertebrados más pequeños. Wake (1970) describió la morfología única que distingue al género *Thorius* de todos los demás géneros, la cual parece estar muy conservada dentro de éste. La morfología externa, presenta pocas diferencias, la mayoría de las cuales solo están presentes a nivel de cráneo, e incluyen caracteres que distinguen a sus especies, como la ausencia o presencia de dientes maxilares (Wake, 1970 y Hanken, 1983).

Hanken (1984), examinó las consecuencias de la miniaturización en la morfología del cráneo, en varias especies del género (*T. pennatulus*, *T. minutissimus*, *T. narisovalis* y *T. maddougalli*). Encontró que el cráneo de individuos adultos del género *Thorius* se encuentra poco osificado, y que hay reducción en varios huesos. La columna está ausente, mientras que algunos otros elementos adicionales, se encuentran presentes aunque muy reducidos, como por ejemplo el maxilar, nasal, prefrontal y premaxilar, los cuales no se articulan con ningún otro hueso, contribuyendo poco al soporte y rigidez del cráneo. Hanken (1984) concluye que el cráneo de *Thorius* es paedomórfico en comparación con los de otros géneros, como *Pseudoeurycea*.

Estas características, que han hecho sujeto de muchos estudios a estas salamandras, han demostrado ser problemáticas en los intentos por resolver la biología sistemática y taxonómica dentro del grupo; por esto las técnicas moleculares proporcionan una herramienta potencial a los problemas taxonómicos asociados a la miniaturización en este grupo,

estableciendo así, la identidad entre especies y sus relaciones filogenéticas (Hanken y Wake, 1998).

Sistemática del género *Thorius*

El género *Thorius* fue descrito hace 130 años por Cope (1869) como una familia, Thoriidae. Es un género endémico de México y presenta una distribución restringida a sólo cuatro estados a través de la meseta sur mexicana: Oaxaca, Veracruz, Puebla y Guerrero (Wake y Lynch, 1976). Dentro del género se conocían hasta 1993, nueve especies (Duellman, 1993), pero debido a los estudios realizados principalmente por Hanken y Wake, actualmente este género está constituido por 23 especies (ver Apéndice 1) (Hanken, 1984; Hanken y Wake, 1983, 1994, 1998, 2001; Hanken, *et al.*, 1999).

Hanken (1983), realizó un análisis de electroforesis de proteínas de 69 poblaciones del género, para proponer una hipótesis de relaciones evolutivas dentro del género, así como la identificación y delimitación de especies. Con base en este estudio, Hanken reconoce las nueve especies descritas y sugiere que hay por lo menos siete especies por describir, (sp A-G). Posteriormente, entre 1994-2001 Hanken y Wake describen las siguientes 10 especies: Para el estado de Oaxaca: *T. aureus*, *T. arboreus*, *T. boreas*, *T. smithi*, *T. insperatus*, *T. papaloe* (Hanken y Wake, 1994 y 2001) y para Veracruz y Puebla: *Thorius spilogaster*, *T. lunaris*, *T. munificus*, *T. minydemus*, *T. magnipes* (Hanken y Wake, 1998).

Para el estado de Guerrero, Hanken *et al.* (1999) describen 3 especies: *Thorius omiltemi* para las poblaciones cercanas al río Atoyac, en Omiltemi y Carrizal de Bravo, *Thorius grandis*, para el área de Puerto del Gallo y *Thorius infernalis*, para el área de Atoyac. *T. omiltemi* y *T. grandis* son habitantes del bosque mesófilo (pino-encino) y bosque de abetos, mientras que *T. infernalis* se encuentra a altitudes más bajas (1140 m) en cafetales. Las tres especies de Guerrero son distinguibles de las demás especies de *Thorius* por una combinación de caracteres dentales y de proteínas, presentando una gran diferenciación genética con las especies de Veracruz y Puebla, mientras que al compararlas con aquellas de Oaxaca, la diferenciación es menor (Hanken *et al.*, 1999).

Thorius omiltemi es una de las especies de mayor tamaño dentro del género y es de color oscuro dorsolateralmente, con ausencia de dientes maxilares en los machos adultos y presencia de éstos en la mayoría de las hembras. *Thorius grandis* es también una especie de tamaño relativamente grande, presenta dimorfismo sexual, extremidades moderadamente largas, nostrilos ovalados y dientes maxilares presentes en las hembras, pero ausentes en los machos adultos (Hanken, *et al.*, 1999). Las diferencias entre *T. omiltemi* y *T. grandis* son diversas, incluyendo la forma en V o Y en la parte dorsal de la cabeza para *T. grandis* y algunos individuos de *T. omiltemi*, los cuales presentan glándulas dorsales conspicuas con aperturas

relativamente amplias. Una de las diferencias más significativas es el rango altitudinal en que habitan, *T. grandis* puede encontrarse a más de 3000 m. mientras que *T. omiltemi* se ha encontrado en lugares hasta los 2800 m., aproximadamente. *T. infernalis* es una de las especies más pequeñas dentro del género alcanzando una longitud de 20 mm en organismos adultos, además de esta característica presentan colas muy largas, cabeza angosta con un hocico puntiagudo, nostrilos en forma elíptica, extremidades relativamente cortas y ausencia de dientes maxilares. Se diferencia de *T. grandis* y *T. omiltemi* en el tamaño, la forma del hocico, en la forma de su cabeza y la forma más puntiaguda de su dedos y en extremidades más cortas. Es una especie poco conocida y no existe información genética debido a que fue descrita a partir de un par de ejemplares preservados (Hanken *et al.*, 1999).

De acuerdo a el análisis de proteínas realizado por Hanken (1983), *T. grandis* y *T. omiltemi* (*sp. F*) están cercanamente relacionadas con *T. minutissimus* del estado de Oaxaca (Hanken, 1983). Posteriormente, Hanken, *et al.*, (1999) sugieren que *T. grandis* y *T. omiltemi* están cercanamente relacionadas a las especies de *Thorius* de la parte sur y este de Oaxaca.

Dado que las relaciones filogenéticas del género *Thorius* no son claras con base en análisis de proteínas, Hanken y Parra-Olea (com. per.) proponen hacer un estudio de sistemática del género basándose esta vez en secuenciación de ADN mitocondrial. Con base en los muestreos, análisis morfológicos y de ADN del género *Thorius* Parra-Olea *et al.*, (2001) han detectado dos características únicas en este grupo: a) El área de distribución de cada especie se reduce prácticamente a la localidad tipo, y poblaciones cercanas (de hasta 5-10 km) presentan un porcentaje alto de divergencia o una estructura de especies muy distinta entre las dos poblaciones y b) en casi todas las localidades hay dos especies simpátricas que son morfológicamente indistinguibles y que no son grupo hermano (Parra-Olea, *et al.*, 2001).

Estos resultados dan como pauta el estudio realizado para el presente trabajo, ya que los análisis preliminares de Parra Olea *et al.* (2001) no incluyeron muestras del estado de Guerrero. Este estudio consistió en hacer muestreos a los largo de la Sierra Madre del Sur en Guerrero para obtener muestras de las especies descritas para el estado, tanto de las localidades tipo como de todos los sitios que tuvieran las condiciones ambientales adecuadas para la presencia de salamandras. Considerando las características únicas del género antes mencionadas y los análisis de proteínas publicados por Hanken *et al.* (1983) se espera encontrar lo siguiente: 1) la distribución de las especies se restringe a la localidad tipo, 2) la presencia de más de una especie por localidad, 3) la monofilia de las especies de Guerrero.

OBJETIVO GENERAL

Diferenciar las especies descritas de *Thorius* a lo largo de la Sierra Madre del Sur en Guerrero, con base en análisis morfológicos y genéticos (ADN mitocondrial).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Diferenciar las especies descritas de *Thorius* para el estado de Guerrero, con base en análisis morfológicos.
- Diferenciar las especies descritas de *Thorius* para el estado de Guerrero, con base en análisis de ADN mitocondrial.
- Detectar si existen especies simpátricas en las localidades tipo de *Thorius grandis* y *Thorius omiltemi* con base en análisis de ADN mitocondrial.
- Determinar si las especies de *Thorius* de Guerrero forman un grupo monofilético con base en ADN mitocondrial.

SITIO DE ESTUDIO

Carizal de Bravo está caracterizado principalmente por bosque de Pino-Encino con altitudes que van desde los 2000 m hasta los 2900 m en la cual se encuentra la elevación principal de esta localidad, Cerro Corral-Cuate. Este tipo de vegetación está caracterizada principalmente por las especies *Pinus oocarpa*, *P. pseudostrobus*, *Quercus castanea* y *Q. obtusata*. El nivel mayor de precipitación se encuentra entre los meses de junio a septiembre (INEGI, 2000).

El municipio de Atoyac de Álvarez, al que pertenece la localidad de Puerto del Gallo, presenta un tipo de clima A(w2), cálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad. Caracterizado por Bosque de Pino y Bosque de Pino Encino, representadas por las siguientes especies: *P. ayacahuite*, *P. tenuifolia*, *P. teocote*, *Q. salicifolia*, *Q. rugosa*, *Alnus glabrata*. Los meses más cálidos, en promedio son de Mayo hasta Agosto, presentando una precipitación promedio anual de 1211.8 mm/m² (INEGI, 2000).

CAPITULO I ANALISIS MORFOLOGICO

Con el propósito de diferenciar morfológicamente las especies de salamandras del género *Thorius*, pertenecientes a la Sierra Madre del Sur en Guerrero, se tomaron medidas morfométricas y merísticas, con las cuales se realizaron análisis estadísticos. La especie *T. infernalis* no pudo ser incluida en este análisis debido a que no pudo ser colectada en ninguna de las salidas de campo.

1.1 METODOS

1.1.1 Ejemplares y sitios de colecta.

Los ejemplares fueron colectados en dos salidas de campo durante la primavera y verano del 2002, en los meses de marzo y junio, obteniendo 34 individuos de seis localidades (Tabla 1). Cada uno de los ejemplares fue colectado a mano y fueron encontrados en troncos caídos de pinos, encinos o abetos, dentro de la madera podrida y con un alto porcentaje de humedad. Se describieron todas las características de color en el campo para después extraer tejido proveniente de hígado, intestino o cola y se preservó en alcohol al 70%. Cada individuo fue etiquetado y preservado en formol buffer al 10% para después ser separado por localidades.

Tabla 1. Localidades de colecta para individuos del género *Thorius* provenientes del estado de Guerrero México. Se indica la localidad marcada con número, la ubicación por unidad UTM y el nombre de ésta. El número de clasificación de cada individuo colectado en donde JAC= Jonatan A. Campbel y gp= Gabriela Parra.

Localidad	Altitud	Latitud	Longitud	Número
1 MQ 3, 4 Carrizal de Bravo	2666 m	17.58671	99.83701	JAC 22275-22277; gp 740-742
2 MQ 2, 4 Carrizal de Bravo	2372 m	17.60354	99.83419	JAC 22290-22296
3 LQ 1, 3 Puerto del Gallo	2850 m	17.47258	100.0866	JAC 22310-22319

4 LQ 1, 3 Puerto del Gallo	2812 m	17.45513	100.0897	JAC 22323-22325
5 MQ 1, 3 Carretera hacia Nueva Delhi	2879 m	17.50753	100.1999	JAC 22206-22208
6 MQ 3, 3 Carrizal de Bravo	2560-2590 m	17.60350	99.83425	JAC 22150-22155

Cada localidad fue ubicada en un mapa, que hizo más precisa la localización de los sitios de colecta (Fig. 1).

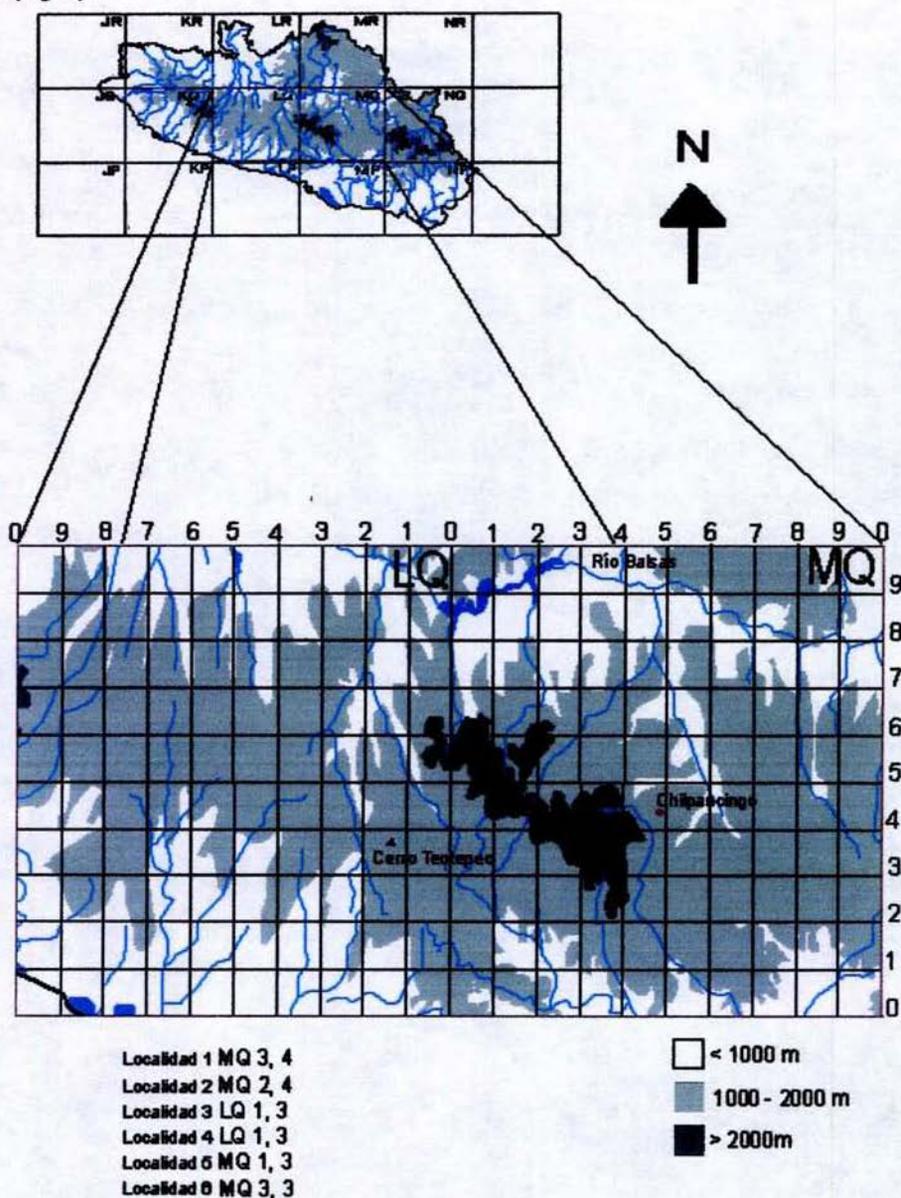


Fig. 1. Sitios de colecta ubicados por medio de unidades UTM (Universal Transverse Mercator).

1.1.2 Análisis Estadístico

Para realizar este análisis solo se utilizaron individuos adultos. Se determinó la presencia o ausencia de dientes maxilares, que como ya se mencionó anteriormente, están presentes en la mayoría de las hembras de *T. omiltemi* y *T. grandis* pero se encuentran ausentes en la mayoría de los machos. La determinación del sexo de cada individuo fue a través de características morfológicas de la cloaca, presentándose en forma de pliegues en las hembras y con gránulos en los machos, según lo indica Sever (1991).

Los caracteres que se tomaron en cuenta para la obtención de datos morfométricos son: (1) tamaño total del cuerpo (LHC), (2) longitud de la cola (LC), (3) ancho de la cabeza (AnC), (4) alto de la cabeza (AIC), (5) longitud de pata posterior izquierda (LPPI), (6) longitud de la pata anterior izquierda (LPAI), (7) longitud de la cabeza (SG), (8) pliegue gular (PG), (9) anchura de hombros (*shoulder*); y un carácter merístico: (1) surcos intercostales, cuando las patas están pegadas al cuerpo (LI).

Cada variable fue transformada a \log_{10} y analizada a través de las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Levene para probar distribución normal y homogeneidad de las varianzas respectivamente. Se realizó una ANCOVA para observar presencia de dimorfismo sexual entre las especies.

Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales, para cada sexo con el fin de verificar que los caracteres analizados ayudaran a definir especies. Para cada carácter analizado, los criterios utilizados para el cálculo del número de factores extraídos fueron:

- Porcentaje de la varianza: que se basa en obtener un porcentaje acumulado específico de la varianza total hasta un 80% (Peña, 2002).
- Contraste de caída: a través de la representación gráfica de cada uno de los factores se puede estimar cuantos pueden ser extraídos y analizados en los datos a interpretar (Peña, 2002).

Cada variable agrupada en un factor fue examinada tomando en cuenta como la más significativa aquella con mayor carga factorial.

Se realizó un análisis de discriminantes, el cual determina que variables son importantes en el agrupamiento de individuos. Para esto, se realizó un análisis estándar que excluye o incorpora variables al modelo de acuerdo a los valores más altos obtenidos en cada factor de acuerdo a los valores de *F*. De esta manera se estima una función que sea discriminante para cada uno de los grupos que forman parte del análisis.

En el caso de datos faltantes en las variables, se sustituyeron estos por los valores de las medias de cada localidad.

Posterior al Análisis de Discriminantes se realizó un Análisis Canónico que determina de manera sucesiva raíces canónicas o valores propios (eigenvalores) asociados a cada función. Se interpretaron los datos tomando en cuenta que el coeficiente con el mayor valor contribuye de manera significativa a la discriminación entre grupos.

Las variables significativas en el análisis discriminante fueron analizadas a través de pruebas de ANDEVA (ANOVA) y Kruskal-Wallis. Se utilizaron pruebas a posteriori de Tukey y Nemenyi. Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa STATISTICA ver. 6.0.

1.2 RESULTADOS

Todos los caracteres presentaron normalidad a través de la prueba Kolmogorov-Smirnov para las tres especies (Tabla 2).

Tabla2. Valores de normalidad Kolmogorov-Smirnov (K-S) para todos los caracteres de las especies *T. omiltemi*, *T. grandis* y *T. sp.* Nueva Delhi, con un valor de $p > 0.2$.

Caracter	<i>T. omiltemi</i>	<i>T. grandis</i>	<i>T. sp.</i> Nueva Delhi
	K-S $p > 0.2$	K-S $p > 0.2$	K-S $p > 0.2$
LHC	0.14	0.12	0.34
LC	0.16	0.28	0.2
CG	0.22	0.13	0.35
AnC	0.14	0.14	0.36
PG	0.2	0.14	0.33
LPAI	0.19	0.2	0.18
LPPI	0.17	0.11	0.18
Shoulder	0.16	0.18	0.2
AIC	0.13	0.12	0.2
LI	0.15	0.25	0.24

1.2.1 ANCOVA

En el presente análisis se utilizó el carácter LHC (longitud hocico-cloaca) como covariante para los demás caracteres indicando una diferencia significativa entre los sexos de *T. grandis* para cuatro caracteres (Tabla 3), mientras que *T. omiltemi* solo hay dos caracteres que indican que los sexos de esta especie presentan diferencias a nivel morfológico (Tabla 4).

Tabla 3. ANCOVA entre hembras y machos de *T. grandis* indicando los valores significativos de los caracteres en negritas.

Carácter	<i>T. grandis</i>		Regresión		Valor Estadístico	Nivel de significancia																																																																																													
	Media±SD	N	r ²	F																																																																																															
LHC*																																																																																																			
hembras	31.5±2.2	6			$t_{(11, p < 0.05)} = 4.57$	p=0.0008																																																																																													
machos	25.5±2.5	7					LC							hembras	30.38±1.8	6	0.54	$F_{(2,10)} = 2.06$	$F_{(1,10)} = 34.8$	p=0.0002	machos	28.8±1.8	7		$p = 0.18$	SG							hembras	5.18±0.5	6	0.96	$F_{(2,10)} = 60.3$	$F_{(1,10)} = 0.51$	$p = 0.5$	machos	4.46±0.4	7		$p < 0.001$	AnC							hembras	3.96±0.18	6	0.94	$F_{(2,10)} = 35.4$	$F_{(1,10)} = 11.7$	p=0.007	machos	3.41±0.23	7		$p < 0.001$	PG							hembras	18.5±1.5	6	0.99	$F_{(2,10)} = 390.4$	$F_{(1,10)} = 18.56$	p=0.001	machos	13.84±2.4	7		$p < 0.001$	LPAI							hembras	4.9±0.3	6	0.8	$F_{(2,10)} = 8.92$	$F_{(1,10)} = 1.76$	$p = 0.21$	machos	4.3±0.5	7
LC																																																																																																			
hembras	30.38±1.8	6	0.54	$F_{(2,10)} = 2.06$	$F_{(1,10)} = 34.8$	p=0.0002																																																																																													
machos	28.8±1.8	7		$p = 0.18$			SG							hembras	5.18±0.5	6	0.96	$F_{(2,10)} = 60.3$	$F_{(1,10)} = 0.51$	$p = 0.5$	machos	4.46±0.4	7		$p < 0.001$	AnC							hembras	3.96±0.18	6	0.94	$F_{(2,10)} = 35.4$	$F_{(1,10)} = 11.7$	p=0.007	machos	3.41±0.23	7		$p < 0.001$	PG							hembras	18.5±1.5	6	0.99	$F_{(2,10)} = 390.4$	$F_{(1,10)} = 18.56$	p=0.001	machos	13.84±2.4	7		$p < 0.001$	LPAI							hembras	4.9±0.3	6	0.8	$F_{(2,10)} = 8.92$	$F_{(1,10)} = 1.76$	$p = 0.21$	machos	4.3±0.5	7		$p = 0.006$																	
SG																																																																																																			
hembras	5.18±0.5	6	0.96	$F_{(2,10)} = 60.3$	$F_{(1,10)} = 0.51$	$p = 0.5$																																																																																													
machos	4.46±0.4	7		$p < 0.001$			AnC							hembras	3.96±0.18	6	0.94	$F_{(2,10)} = 35.4$	$F_{(1,10)} = 11.7$	p=0.007	machos	3.41±0.23	7		$p < 0.001$	PG							hembras	18.5±1.5	6	0.99	$F_{(2,10)} = 390.4$	$F_{(1,10)} = 18.56$	p=0.001	machos	13.84±2.4	7		$p < 0.001$	LPAI							hembras	4.9±0.3	6	0.8	$F_{(2,10)} = 8.92$	$F_{(1,10)} = 1.76$	$p = 0.21$	machos	4.3±0.5	7		$p = 0.006$																																				
AnC																																																																																																			
hembras	3.96±0.18	6	0.94	$F_{(2,10)} = 35.4$	$F_{(1,10)} = 11.7$	p=0.007																																																																																													
machos	3.41±0.23	7		$p < 0.001$			PG							hembras	18.5±1.5	6	0.99	$F_{(2,10)} = 390.4$	$F_{(1,10)} = 18.56$	p=0.001	machos	13.84±2.4	7		$p < 0.001$	LPAI							hembras	4.9±0.3	6	0.8	$F_{(2,10)} = 8.92$	$F_{(1,10)} = 1.76$	$p = 0.21$	machos	4.3±0.5	7		$p = 0.006$																																																							
PG																																																																																																			
hembras	18.5±1.5	6	0.99	$F_{(2,10)} = 390.4$	$F_{(1,10)} = 18.56$	p=0.001																																																																																													
machos	13.84±2.4	7		$p < 0.001$			LPAI							hembras	4.9±0.3	6	0.8	$F_{(2,10)} = 8.92$	$F_{(1,10)} = 1.76$	$p = 0.21$	machos	4.3±0.5	7		$p = 0.006$																																																																										
LPAI																																																																																																			
hembras	4.9±0.3	6	0.8	$F_{(2,10)} = 8.92$	$F_{(1,10)} = 1.76$	$p = 0.21$																																																																																													
machos	4.3±0.5	7		$p = 0.006$																																																																																															

LPPI						
hembras	5.54±0.36	6	0.75	F _(2,10) =6.24	F _(1,10) =11.2	p=0.007
machos	4.82±0.35	7		p=0.02		
Shoulder						
hembras	3.23±0.22	6	0.92	F _(2,10) =28.29	F _(1,10) =8.52	p=0.02
machos	2.51±0.15	7		p<0.001		
AIC						
hembras	2.48±0.13	6	0.93	F _(2,10) =33.34	F _(1,10) =5.84	p=0.036
machos	2.07±0.16	7		p<0.001		
LI						
hembras	5.83±0.41	6	0.8	F _(2,10) =8.95	F _(1,10) =9.68	p=0.01
machos	4.71±0.49	7		p=0.006		

Tabla 4. ANCOVA entre hembras y machos de *T. omiltemi* indicando los valores significativos de los caracteres en negritas.

<i>T. omiltemi</i>		Regresión			Valor Estadístico	Nivel de significancia
Carácter	Media±SD	N	r ²	F		
LHC						
hembras	26.82±0.01	3			t _(16,p<0.05) =1.86	p=0.08
machos	25.3±1.35	15				
LC						
hembras	31.5±2.83	3	0.77	F _(2,15) =10.62	F _(1,15) =0.39	p=0.5
machos	1.4±0.03	15		p<0.001		
SG						
hembras	4.61±0.01	3	0.56	F _(2,15) =3.45	F _(1,15) =1.54	p=0.23
machos	4.56±0.28	15		p=0.07		
AnC						
hembras	3.33±0.01	3	0.55	F _(2,15) =3.3	F _(1,15) =1.71	p=0.21
machos	3.18±0.21	15		p=0.07		
PG						
hembras	15.23±0.01	3	0.92	F _(2,15) =38.64	F _(1,15) =1.58	p=0.23
machos	14.2±1.01	15		p<0.001		
LPAI						
hembras	4.15±0.01	3	0.12	F _(2,15) =0.12	F _(1,15) =9.27	p=0.008
machos	4.08±0.3	15		p=0.89		
LPPI						
hembras	4.73±0.01	3	0.31	F _(2,15) =0.81	F _(1,15) =2.62	p=0.13
machos	4.62±0.35	15		p=0.5		
Shoulder						
hembras	2.35±0.01	3	0.51	F _(2,37) =2.67	F _(1,15) =0.34	p=0.63
machos	0.42±0.06	15		p=0.1		
AIC						
hembras	2.17±0.01	3	0.43	F _(2,15) =1.7	F _(1,15) =0.08	p=0.78
machos	1.9±0.26	15		p=0.2		
LI						
hembras	5±0.0	3	0.46	F _(2,15) =1.97	F _(1,15) =0.6	p=0.46
machos	5.4±0.5	15		p=0.17		

No se realizó ANCOVA para *T. sp.* Nueva Delhi debido a que es una muestra que solo presenta hembras por lo que con base en los ANCOVA para *T. grandis* y *T. omiltemi*, se realizaron análisis independientes de componentes principales y de discriminantes.

1.2.2 Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales para los machos indicó que los primeros 3 componentes explicaban el 71.4% de la varianza (Tabla 5).

Tabla 5. Valores de los tres componentes principales derivados de dos especies (*T. grandis*, *T. omiltemi*) para todos los caracteres medidos, se indican en negritas los caracteres que aportan datos importantes al análisis.

Carácter	CP1	CP2	CP3
LHC	-0.86	-0.3	-0.27
LC	0.01	-0.75	0.18
CG	-0.8	-0.39	-0.07
AnC	-0.75	0.34	0.11
PG	-0.76	-0.42	-0.38
LPAI	-0.59	0.02	-0.22
LPPI	-0.58	0.51	0.05
Shoulder	-0.62	-0.03	0.61
AIC	-0.7	0.14	0.6
LI	-0.43	0.54	-0.47
Eigenvalor	4.27	1.65	1.26
% de Varianza	42.7	16.6	12.6

Cada uno de los componentes principales fueron ordenados por especie indicando pocas diferencias a nivel morfológico (Fig. 3).

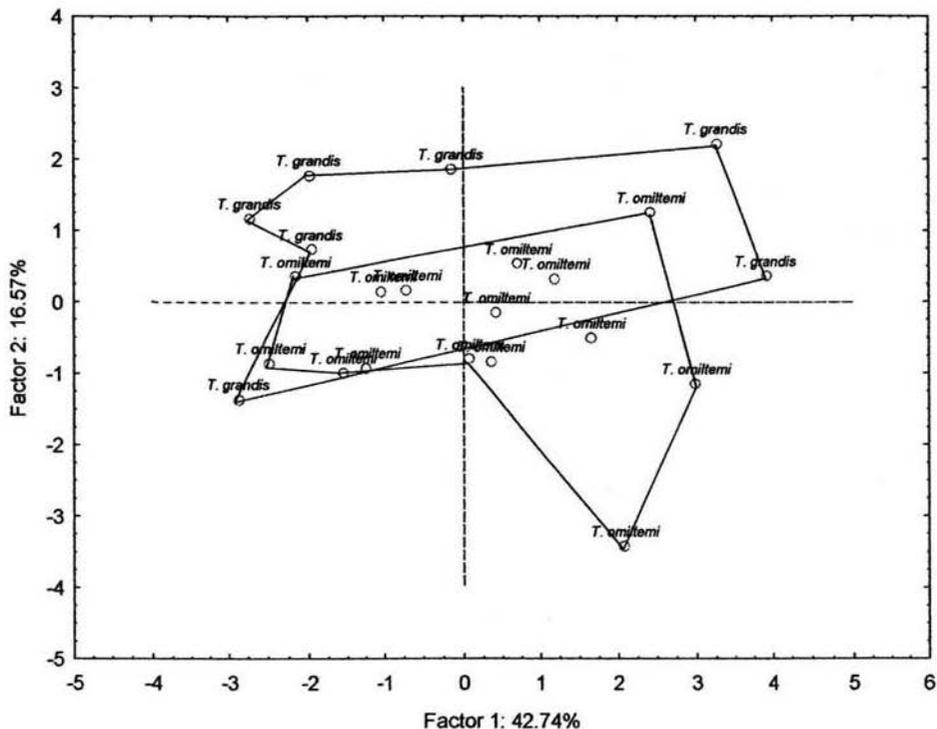


Fig. 3. Distribución de los valores de los dos primeros componentes principales para los machos de *T. grandis* y *T. omiltemi*.

Debido a que el análisis de componentes principales no explicó la separación clara entre grupos, se realizó un análisis de discriminantes y análisis canónico para explicar diferencias morfológicas entre especies.

El análisis de componentes principales para las hembras de *T. grandis*, *T. omiltemi* y *T. sp.* Nueva Delhi, indicó que los dos primeros componentes principales presentaron el 83.08% de la varianza para todos los caracteres medidos (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de los dos componentes principales derivados de tres especies (*T. grandis*, *T. omiltemi* y *T. sp. Nueva Delhi*) para todos los caracteres medidos indicando en negritas los caracteres que aportaron datos importantes al análisis.

Carácter	CP1	CP2
LHC	-0.96	0.19
LC	-0.26	-0.89
CG	-0.9	0.27
AnC	-0.98	-0.001
PG	-0.95	0.2
LPAI	-0.9	0.04
LPPI	-0.84	-0.35
Shoulder	-0.86	-0.2
AIC	-0.92	0.2
LI	0.62	0.25
Eigenvalor	7.12	1.21
% de Varianza	71.2	12.06

Cada uno de los componentes principales fueron ordenados apoyando la existencia de tres especies, bien diferenciadas a nivel morfológico (Fig. 4).

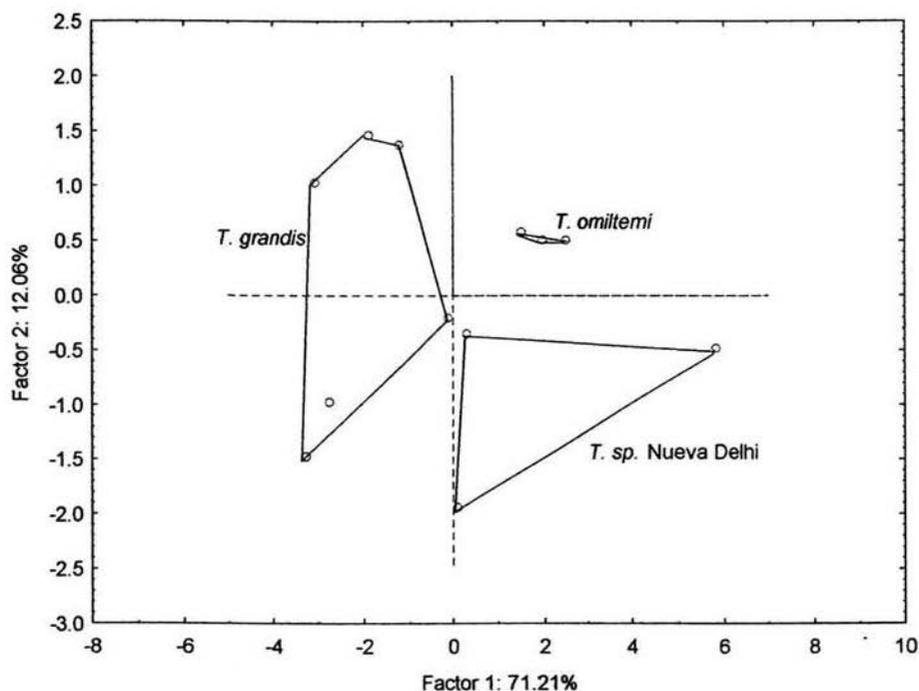


Fig. 4. Distribución de los valores de los dos primeros componentes principales para las hembras de *T. grandis*, *T. omiltemi* y *T. sp. Nueva Delhi*, indicando el patrón para tres grupos taxonómicos.

1.2.3 Análisis de Discriminantes

El análisis de discriminantes se utilizó para determinar el patrón de variación dentro de las especies, obteniendo dos variables canónicas con todos los caracteres medidos (Tabla 7) y encontrando separación entre grupos de especies por hembras y machos (Fig. 5).

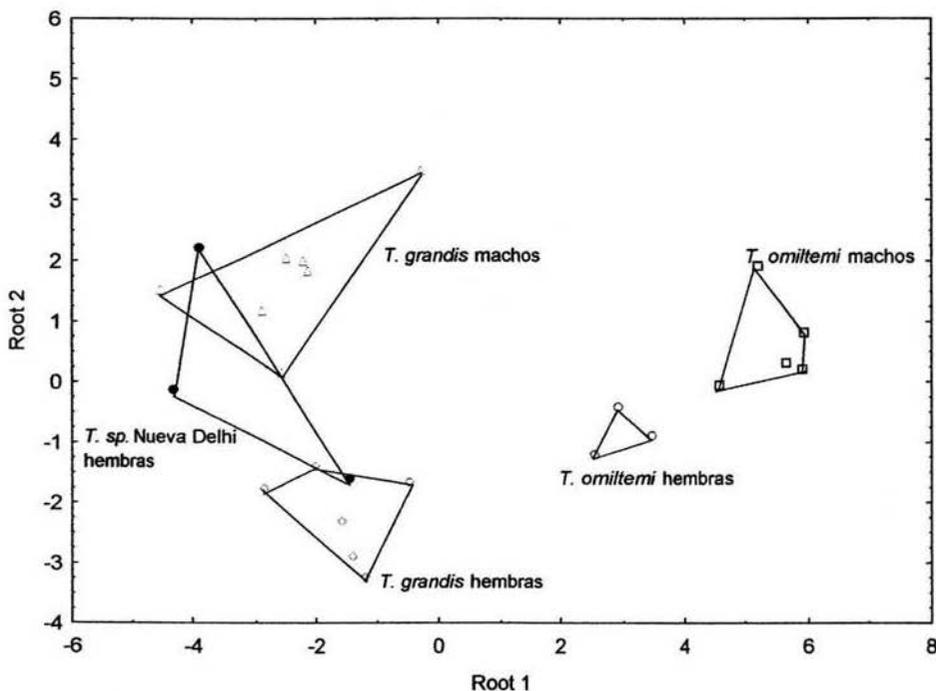


Fig. 5. Patrón de variación expresado por las dos principales variables canónicas por individuos, agrupados por taxón en el análisis canónico para *T. grandis* y *T. omiltemi*.

Tabla 7. Valores de cada variable incluida en el modelo dentro del análisis para *T. omiltemi*, *T. grandis* y *T. sp. Nueva Delhi*. Wilks' Lambda: 0.003 $F_{(4,39)}=3.51$ $p < .0001$ son los valores para todo el grupo.

Carácter	Wilks'		
	Lambda	$F_{(4,10)}$	p
LHC	0.004	0.440	0.777
LC	0.010	4.947	0.018
CG	0.005	1.097	0.409
AnC	0.011	5.950	0.010
PG	0.004	0.775	0.566
LPAI	0.004	0.413	0.796
LPPI	0.004	0.771	0.568
Shoulder	0.008	3.786	0.040
AIC	0.011	6.123	0.009
LI	0.003	0.156	0.956

El análisis discriminante consideró un total de 24 individuos, tres para las hembras y cinco para los machos de *T. omiltemi*, siete y seis para hembras y machos de *T. grandis* respectivamente y tres hembras de *T. sp. Nueva Delhi* (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación entre grupos del análisis canónico para las tres especies, separadas por sexo.

	<i>T. omiltemi</i> hembras	<i>T. omiltemi</i> machos	<i>T. grandis</i> hembras	<i>T. grandis</i> machos	<i>T. sp. Nueva Delhi</i> hembras
n. de significancia	$p=0.125$	$p=0.208$	$p=0.25$	$p=0.29$	$p=0.125$
<i>T. omiltemi</i> hembras	3	0	0	0	0
<i>T. omiltemi</i> machos	0	5	0	0	0
<i>T. grandis</i> hembras	0	0	6	0	0
<i>T. grandis</i> machos	0	0	0	6	1
<i>T. sp Nueva Delhi</i> hembras	0	0	1	0	2
Total	3	5	7	6	3

Se realizaron comparaciones estadísticas (Tabla 9) indicando diferencias significativas entre las tres especies del género, para hembras y machos. Cada taxón indicó diferencias entre taxones para machos, de la siguiente manera: *T. grandis* en LC y AnC; *T. omiltemi* en LI; mientras que para hembras las diferencias fueron las siguientes: *T. grandis*, y *T. sp. Nueva Delhi* en LHC, PG *T. sp. Nueva Delhi* en LC; *T. grandis* en AnC, Shoulder y LI.

Tabla 9. Estadística descriptiva y pruebas de significancia entre las medias de los caracteres de los machos y las hembras de *T. grandis*, *T. omiltemi* y *T. sp.* Nueva Delhi. Se indican las medias y las desviaciones estándar juntas, el tamaño de la muestra se indica entre paréntesis. A través de una línea se indican las similitudes entre especies por carácter obtenidas en un ANOVA para las hembras y en pruebas de *t* para los machos con una $p < 0.05$.

Carácter	Taxón					
			N		N	
LHC						
hembras	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>		<i>nueva delhi</i>	
	31.5±2.2	(6)	26.8±0.01	(3)	24.6±4.86	(3)
machos	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>			
	25.51±2.5	(7)	25.33±1.35	(15)		
LC						
hembras	<i>omiltemi</i>		<i>grandis</i>		<i>nueva delhi</i>	
	31.5±2.8	(3)	30.4±1.8	(6)	20.2±6.4	(3)
machos	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>			
	28.8±1.7	(7)	24.5±0.36	(15)		
SG						
hembras	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>		<i>nueva delhi</i>	
	4.61±0.5	(6)	5.2±0.01	(3)	4.15±0.67	(3)
machos	<i>omiltemi</i>		<i>grandis</i>			
	6.35±0.3	(15)	4.5±0.4	(7)		
AnC						
hembras	<i>grandis</i>		<i>nueva delhi</i>		<i>omiltemi</i>	
	3.96±0.18	(6)	3.34±0.4	(3)	3.36±0.01	(3)
machos	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>			
	3.41±0.23	(7)	3.18±0.21	(15)		
PG						
hembras	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>		<i>nueva delhi</i>	
	18.55±1.52	(6)	15.23±0.01	(3)	13.48±3.5	(3)
machos	<i>omiltemi</i>		<i>grandis</i>			
	14.16±0.03	(15)	13.84±2.4	(7)		
LPAI						
hembras	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>		<i>nueva delhi</i>	
	4.93±0.3	(6)	4.15±0.02	(3)	4.11±0.7	(3)
machos	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>			
	4.29±0.5	(7)	4.08±0.3	(15)		

LPPI

	<i>grandis</i>		<i>nueva delhi</i>		<i>omiltemi</i>	
hembras	5.54±0.3	(6)	4.88±0.7	(3)	4.73±0.01	(3)
	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>			
machos	4.82±0.3	(7)	4.62±0.35	(15)		

Shoulder

	<i>grandis</i>		<i>nueva delhi</i>		<i>omiltemi</i>	
hembras	3.23±0.22	(6)	2.65±0.25	(3)	2.35±0.01	(3)
	<i>omiltemi</i>		<i>grandis</i>			
machos	2.67±0.15	(15)	2.5±0.02	(7)		

AIC

	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>		<i>nueva delhi</i>	
hembras	2.48±0.13	(6)	2.17±0.2	(3)	2.17±0.04	(3)
	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>			
machos	2.07±0.16	(7)	1.99±0.41	(15)		

LI

	<i>grandis</i>		<i>omiltemi</i>		<i>nueva delhi</i>	
hembras	5.8±0.41	(3)	5±0.0	(6)	5±0.0	(3)
	<i>omiltemi</i>		<i>grandis</i>			
machos	5.41±0.5	(7)	4.7±0.5	(15)		

1.3 DISCUSION

El género *Thorius* es un grupo de salamandras cuya morfología ha sido afectada por el proceso evolutivo de la miniaturización. Algunos de los caracteres morfológicos asociados a este proceso son la reducción en tamaño corporal, reducción de extremidades y de estructuras craneales. La taxonomía de *Thorius* es conflictiva dado que no existen muchos caracteres morfológicos externos que ayuden a discriminar entre especies y se ha tenido que recurrir a estudios detallados de osteología y a la obtención de datos moleculares para proponer hipótesis de relaciones filogenéticas.

Las especies de *Thorius* de la Sierra Madre del sur, se diferencian de otras especies del género en que son de mayor longitud corporal (Hanken et al. 1999), pero hasta la fecha no se había analizado la morfología externa entre las especies de esta zona.

En el presente análisis, se incluyeron nueve caracteres de morfología externa y se demuestra por medio de un ANCOVA que hay dimorfismo sexual en *T. omiltemi* y *T. grandis*. Para *T. omiltemi* se encontró un carácter que es significativo (LPAI) este resultado puede ser influido por el tamaño de la muestra (18 individuos: tres hembras y quince machos); y para *T. grandis* los caracteres que demuestran diferencias entre los sexos son: longitud de la cola (LC), el ancho y alto de la cabeza (AnC y AIC), pliegue gular (PG), longitud de la pata posterior izquierda (LPPI) y longitud de los hombros (shoulder). Los datos obtenidos para la especie encontrada en las cercanías de Nueva Delhi denominada como *Thorius* sp. Nueva Delhi no son precisos debido a que se obtuvieron solo hembras en la colecta, pero todas presentan presencia de dientes premaxilares. En cuanto a su morfología externa es mucho más parecida a *T. omiltemi* (Tabla 9), en varios caracteres.

El análisis de componentes principales realizado para los machos de *T. grandis* y *T. omiltemi* (Tabla 5) indicó que todos los caracteres, excepto LI, aportan datos para demostrar que hay diferencias entre ambas especies, pero esto no se justifica en la Fig. 3 que muestra a las dos especies encimadas. A diferencia de los machos, en el análisis realizado para las hembras de *T. omiltemi*, *T. grandis* y *T. sp.* Nueva Delhi tomando en cuenta todos los caracteres, excepto LI (Tabla 6) se apoya la existencia de tres especies bien diferenciadas a nivel morfológico (Fig. 4): *T. grandis* habitante de localidades cercanas a Puerto del Gallo y a *T. omiltemi*, perteneciente a Carrizal de Bravo y *Thorius* sp. Nueva Delhi, grupo incluido por tres individuos hembras encontrados en las cercanías del pueblo Nueva Delhi.

Por otro lado, el análisis de discriminantes demuestra que son cuatro caracteres significativos en la diferenciación de especies del género *Thorius* en Guerrero (LC, AnC, AIC y *shoulder*) (Tabla 7), los cuales definen cinco grupos (Fig. 5) que corresponden a las tres especies analizadas y separadas por sexos, lo que corrobora también la presencia de

dimorfismo sexual. *Thorius* sp. Nueva Delhi se encuentra agrupada muy cerca de *T. grandis*, lo que indica la cercanía geográfica entre ambas, mientras que *T. omiltemi* se encuentra en dos grupos (hembras y machos) muy lejos de las otras dos especies, lo que aclara la lejanía geográfica a la que se encuentran.

A diferencia del análisis discriminante, los datos obtenidos en las pruebas de significancia (Tabla 9) indican que son cuatro los caracteres que diferencian a nivel morfológico entre especies (LC, AnC, *shoulder* y LI) pero excluyen el carácter AIC porque para las tres especies en hembras y dos especies en machos no hay diferencias que ayuden a diferenciarlas, mientras que el número de surcos intercostales (LI) mostró ser un carácter que indica diferencias entre especies, es decir, las hembras de *T. grandis* presentan en promedio mayor número de surcos cuando las patas están pegadas al cuerpo que *T. omiltemi* o *T. sp. Nueva Delhi*, asimismo los machos de *T. omiltemi* presentan más surcos que *T. grandis*; en el caso de las hembras de *T. omiltemi* y *T. grandis* presentan colas más largas que las hembras de *T. sp. Nueva Delhi*, mientras que los machos de *T. grandis* tienen colas más largas que los machos de *T. omiltemi*, por otro lado, las hembras de *T. grandis* tienen una cabeza más grande que las de *T. omiltemi* y *T. sp. Nueva Delhi* y al igual que con el carácter anterior, la longitud de la cabeza de los machos de *T. grandis* es más grande que para los machos de *T. omiltemi*; en el caso de la anchura de los hombros (*shoulder*) las hembras de *T. grandis* presentan hombros más anchos, lo que se justifica debido al tamaño de su cabeza.

Todos los caracteres anteriores también indicaron que las hembras tanto de *T. grandis* como de *T. omiltemi* son de mayor tamaño que los machos de las mismas especies.

Para el caso de la especie *T. sp. Nueva Delhi* no se pudo demostrar dimorfismo, ni diferencias entre las tres especies para machos porque únicamente se lograron coleccionar hembras en el trabajo de campo, por lo que este estudio puede servir de base para análisis similares para ambos sexos y todas las especies presentes descritas y por describir presentes en el estado de Guerrero (*T. grandis*, *T. omiltemi*, *T. infernalis* y el grupo propuesto en el presente estudio como *T. sp. Nueva Delhi*).

Las diferencias presentes en *T. omiltemi* según Hanken *et al* (1999) son menos marcadas en ambos sexos, el cráneo está poco desarrollado, debido a que no está tan articulado como el de *T. grandis*, no hay diferencias significativas entre la presencia o ausencia de dientes premaxilares y maxilares entre sexos, aunque Hanken *et al.* (1999) encontró pocos dientes premaxilares en machos, en el presente estudio no se encontraron para ningún sexo. Para la presencia o ausencia de dientes maxilares, los datos obtenidos por Hanken *et al.* (1999) también son poco claros.

Es importante señalar que el análisis de morfometría en el presente estudio demostró que un análisis detallado de la morfología externa nos arroja información sobre la variación morfológica de las especies de *Thorius* que puede ser utilizada para discernir entre especies, y esto complementado con datos moleculares y ecológicos nos puede llevar a formular hipótesis evolutivas o de relaciones filogenéticas robustas.

CAPITULO II ANALISIS FILOGENETICO MOLECULAR

Con el propósito de dilucidar las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Thorius*, presentes a lo largo de la Sierra Madre del Sur en Guerrero, se obtuvieron secuencias de ADN mitocondrial del gen ND4. A través del análisis de las secuencias de ADN se pretende proponer una hipótesis de relaciones filogenéticas entre las especies de Guerrero así como entre éstas y las especies del estado de Oaxaca. De forma secundaria se pretende también detectar o delimitar la distribución de las especies a lo largo de la cordillera, así como la detección de áreas en simpatria o de especies nuevas que no se habían detectado para la zona. Como se había mencionado anteriormente a pesar de los esfuerzos de muestreo no se pudo coleccionar muestras de *T. infernalis* por lo que éste taxon no se incluye en el análisis de ADN mitocondrial.

2.1 METODOS

2.1.1 Técnicas de laboratorio

Las técnicas de laboratorio fueron realizadas en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

Extracción de ADN

LA extracción de ADN se realizó por medio de la técnica fenol-cloroformo, que se describe a continuación:

1. Al tejido (proveniente de hígado, intestino o cola), previamente preservado en alcohol al 70%, agregar 700 μ l de tampón de extracción (10mM Tris-HCl, pH = 8; 100mM EDTA; 100 mM NaCl; 1% SDS).
2. Incubar a 56°C, con agitación constante, durante dos horas.
3. Añadir 250 μ l de fenol y 250 μ l de cloroformo (diclorometano + isoamílico 24:1). Agitar y centrifugar durante un minuto a 13200 r.p.m.
4. Recoger el sobrenadante en una segunda serie de tubos. Agregar 500 μ l de cloroformo, agitar bien y volver a centrifugar un minuto.
5. Recoger el sobrenadante en una tercera serie de tubos y agregar 700 μ l de etanol puro frío. Dejar precipitar durante toda la noche en la cámara de 4°C.
6. Centrifugar durante 10 minutos a 13200 r.p.m. Tirar el alcohol y agregar 700 μ l de etanol frío al 70%.
7. Centrifugar 10 minutos.
8. Tirar el alcohol y secar el precipitado en una centrifuga de vacío.
9. Resuspender en 200 μ l de agua esterilizada.

Las extracciones fueron examinadas a través de geles de agarosa, en buffer TBE 10%.

Amplificación de ADN. Técnicas de PCR

Se amplificaron secuencias parciales de ADN mitocondrial del gen ND4, en un volumen final de 25 μ l, utilizando para cada muestra: 4.5 μ l de agua doble destilada, previamente esterilizada, 2.5 μ l de buffer, 2 μ l de $MgCl_2$, 0.5 μ l de primers ND4 y gp leu-1 para cada uno y 1 μ l de producto de extracción, por medio de las siguientes condiciones de amplificación:

Fase	ND4
Desnaturalización	94°C 3 min.
Alineación	48°C 1 min.
Extensión	72°C 1 min.
Temperatura de mantenimiento	4°C ∞
Número de ciclos	38

Purificación de PCR

La purificación se realizó a través de la precipitación de etanol, técnica que es descrita a continuación:

1. Centrifugación de la muestra de ADN amplificada por 10 seg. a máxima velocidad. Pasar la muestra a un tubo de 1.5 ml.
2. Agregar 80 μ l. de agua, 10 μ l de acetato de sodio (3M, pH = 6.8), y 200 μ l de etanol 100%.
3. Centrifugar a 13200 r.p.m. a temperatura ambiente por 17 min.
4. Vaciar el alcohol y agregar 290 μ l de alcohol frío 70%.
5. Centrifugar a 13200 r.p.m. a temperatura ambiente durante 11 minutos.
6. Vaciar el sobrenadante.
7. Centrifugar al vacío a temperatura ambiente por 10 minutos o hasta que seque la muestra.
8. Agregar 20 μ l de agua destilada estéril y poner a 4°C.

Técnica de secuenciación

Posteriormente, se realizó una reacción de secuenciación, con un volumen final de 10 μ l, utilizando, para cada muestra, 2 μ l de big dye, 2 μ l de Half BD, 4.5 μ l de agua destilada estéril y 1 μ l de producto de PCR; con una temperatura inicial de 96°C, durante tres minutos, para después iniciar con la segunda desnaturalización a la misma temperatura en 10 seg., la temperatura de alineación era de 50°C durante 5 seg., para finalizar con la extensión a 60°C por 4 minutos; esta reacción se lleva a cabo por 25 ciclos.

Cada una de las muestras fue purificada previamente, antes de ser secuenciada, por medio de la utilización de Sephadex, descrita a continuación:

1. Colocar 750 μ l de Sephadex en columnas Centrisesp con tapa y dejar reposar por 10 minutos.
2. Dejar precipitar en tubos de colección por 5 minutos y centrifugar a 2.7 r. p. m. por 2 minutos.
3. Agregar 10 μ l de agua destilada estéril a la muestra y colocar en las columnas con Sephadex en tubos de 1.5 ml.
4. Centrifugar a 2.7 r. p. m. por 2 minutos.
5. Colocar tubos en centrifuga de vacío por aproximadamente 20 minutos hasta que se seque la muestra.

La secuenciación se llevó a cabo por medio de la utilización de un secuenciador de ADN marca Applied Biosystems, en el laboratorio antes mencionado.

2.1.2 Análisis Filogenético

Se realizó la lectura de secuencias en ambas hebras, en la edición y alineamiento, a ojo, con la ayuda del programa SEQUENCE NAVIGATOR, Ver. 1.0.1 (Applied Biosystems). Dicho alineamiento se llevó a cabo para todos los individuos del estado de Guerrero. Posteriormente, fueron alineados con individuos de diferentes especies del estado de Oaxaca (*Thorius minutissimus*, *T. macdougalli*, *T. boreas*, *T. narisovalis*, *T. papaloe*, *T. aureus*, *T. pulmonaris*) y con el grupo externo (un individuo del género *Batrachoseps*).

Se realizó un análisis de Máxima Parsimonia a través de una búsqueda heurística, con 20 repeticiones al azar y con los siguientes parámetros: "steepest descent option", "accelerated character transformation optimization (ACCTRAN)", "tree bisection-reconnection (TBR)", "branch swapping" y "zero-length branches collapsed to yield polytomies". Se realizaron análisis de "bootstrap (1000 réplicas)" para obtener el soporte de los diferentes clados.

Se utilizó el programa Model Test (Posada y Crandall, 1998) para estimar el mejor modelo evolutivo para estos datos, para posteriormente realizar el análisis de Verosimilitud (ML).

Para la realización del análisis filogenético se utilizó el programa PAUP 4.0b 10 (PPC) (D. Swofford, 1998).

2.2 RESULTADOS

2.2.1 Productos amplificados del gen mitocondrial ND4

Se obtuvieron 34 secuencias de 540 pares de bases del gen ND4, provenientes de 7 localidades de la Sierra Madre del Sur, Guerrero, México. De las 34 secuencias obtenidas, 16 son idénticas, por lo que para los análisis se contó con 18 haplotipos para la zona. A las secuencias obtenidas se les asignó un nombre según la localidad de la que provenían y también se les asignó un número de muestra para su fácil identificación en las topologías (Tabla 10).

Tabla 10. Número total de organismos utilizados en los análisis filogenéticos, separados por especies, localidad y número de clasificación. A cada organismo se le asignó un número de muestra identificado en las topologías.

Especie	Localidad	clasificación	Muestra
<i>Thorius omiltemi</i>	1	JAC 22275	1
<i>Thorius omiltemi</i>		JAC 22276	2
<i>Thorius omiltemi</i>		GP740	3
<i>Thorius omiltemi</i>		GP742	4
<i>Thorius omiltemi</i>		omiltemi 37.13	5
<i>Thorius sp?</i>		omiltemi 37.14	6
<i>Thorius omiltemi</i>	2	JAC 22290	7
<i>Thorius omiltemi</i>		JAC 22291	8
<i>Thorius omiltemi</i>		JAC 22292	9
<i>Thorius omiltemi</i>		JAC 22294	10
<i>Thorius omiltemi</i>		JAC 22295	11
<i>Thorius omiltemi</i>		6	JAC 22150
<i>Thorius omiltemi</i>	JAC 22151		13
<i>Thorius omiltemi</i>	JAC 22153		14
<i>Thorius omiltemi</i>	JAC 22155		15
<i>Thorius omiltemi</i>	JAC22296		30
<i>Thorius omiltemi</i>	GP867		31
<i>Thorius omiltemi</i>	GP870		34
<i>Thorius omiltemi</i>	GP869		32
<i>Thorius omiltemi</i>	GP866		33
<i>Thorius grandis</i>	3		JAC 22310
<i>Thorius grandis</i>		JAC 22312	17
<i>Thorius grandis</i>		JAC 22313	18
<i>Thorius grandis</i>		JAC 22317	19
<i>Thorius grandis</i>		JAC 22318	20
<i>Thorius grandis</i>		JAC 22323	21
<i>Thorius grandis</i>	4	JAC 22324	22
<i>Thorius grandis</i>		JAC 22325	23
<i>Thorius grandis</i>		ptogallo 58.4	24
<i>Thorius grandis</i>		thogro2971	29
<i>Thorius grandis</i>	7	thogro 2973	25
<i>Thorius sp. Nueva Delhi</i>		JAC 22206	26
<i>Thorius sp. Nueva Delhi</i>	5	JAC 22207	27
<i>Thorius sp. Nueva Delhi</i>		JAC 22208	28

2.2.2 Análisis de secuencias de ADNmt

Se obtuvieron 34 secuencias de 540 pares de bases del gen ND4, 266 caracteres fueron variables y de éstos, 200 fueron informativos filogenéticamente. Las gráficas de saturación de divergencias no corregidas (p) contra divergencias corregidas ($k2-p$) se muestran en la Fig. 6. Se muestran curvas de regresión, con propósitos heurísticos. Las gráficas del gen ND4, indican saturación en las transiciones de la tercera posición. La curva de regresión se vuelve plana y las transiciones en esta posición ya no se acumulan en forma lineal con respecto a la divergencia.

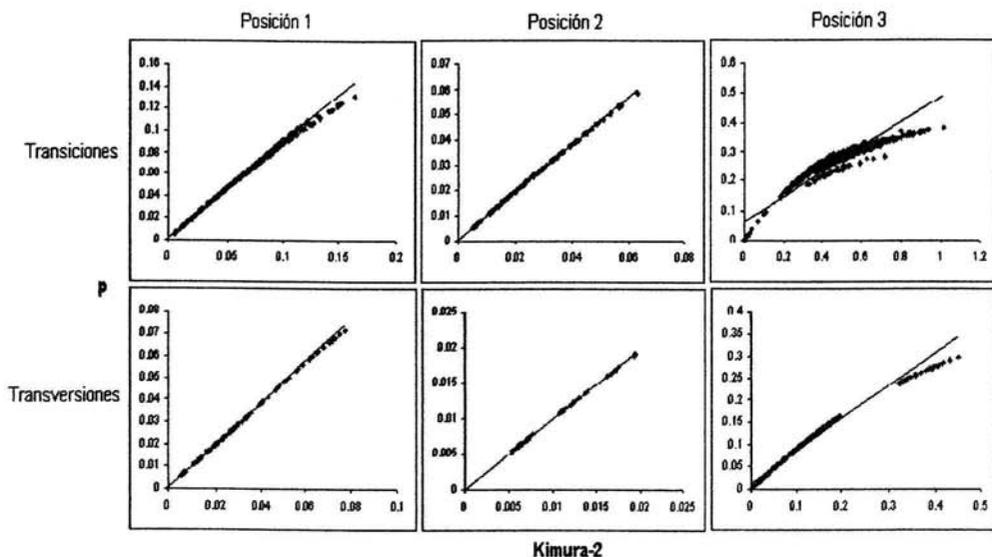


Fig. 6. Gráficas de saturación para el gen ND4 de divergencias no corregidas (p) contra divergencias corregidas ($k2-p$), graficados por posiciones y tipo de cambio.

La composición de las bases tiene un sesgo a A+T (53.4%). Cuando se analizan las tres posiciones de cada codón por separado, para la primera posición todos los pares de bases están presentes en cantidades similares, con un porcentaje ligeramente más alto de adenina, y en la segunda posición hay un exceso de timina. La adenina domina en la tercera posición, mientras que guanina y timina están presentes en cantidades muy similares (Tabla 11). De los dos tipos de sustituciones, las transiciones cuentan por un 55% y las transiciones TC son más comunes que las AG en un promedio de 1:2 La proporción de transiciones-transversiones para la base de datos es de 0.48.

Tabla 11. Composición de bases por cada posición en cada codón.

ND4	Pares de bases	Composición de bases					%ti	%tv	R
		A	C	G	T	A+T			
1a posición	163	29.7	27.2	19.6	23.5	53.2	5.5	1.7	3.1
2a posición	171	14.2	31.2	15.6	38.6	52.8	1.5	0.4	2.6
3a posición	123	36.1	34.9	10.8	18.3	54.4	35.9	9.2	2.9
Total	457	26.6	31.2	15.4	26.8	53.4			

2.2.3 Matrices de distancia

Al analizar las matrices de distancias pareadas de las secuencias del gen mitocondrial ND4 dentro de las poblaciones de algunas especies de *Thorius* generadas en este estudio, se observó que la variación intraespecífica es de la siguiente forma: *Thorius omiltemi* es de 1% (poblaciones 1 y 2), *Thorius grandis* 3.5% (poblaciones 3 y 4) y *T. sp.* Nueva Delhi 0.1%. Las divergencias entre especies es de 9.8% entre *T. omiltemi* y *T. grandis*, 11% entre *T. omiltemi* y *T. sp.* Nueva Delhi, 9.8% entre *T. grandis* y *T. sp.* Nueva Delhi, así como 12.3%, 9.4% y 10.6% entre *T. sp?* 6 y *T. omiltemi*, *T. grandis* y *T. sp.* Nueva Delhi, respectivamente.

2.2.4 Análisis Filogenético

El análisis filogenético incluyó las muestras de Guerrero obtenidas en este estudio, y también todas las especies de *Thorius* del estado de Oaxaca (Parra-Olea, datos sin publicar). Se analizaron un total de 540 pares de bases para 16 taxa.

Las muestras analizadas para el estado de Guerrero (34 individuos adultos), por medio de análisis filogenéticos se agrupan en tres clados y se les designó un nombre taxonómico a dos ellas porque provenían de la localidad tipo: *T. omiltemi* y *T. grandis*. El clado que forman las muestras de Nueva Delhi, se les asignó como especie nueva ya que no se agrupan con ninguna de las dos especies previamente mencionadas. Cabe notar que una muestra de la población 2 (muestra 6), quien correspondería geográficamente a *T. omiltemi*, se agrupa con las muestras de *T. grandis* en el análisis de MP por lo que se asigna a *T. sp?* pero se mantiene con un signo de interrogación porque en el Análisis de Verosimilitud no se agrupa con *T. grandis*.

El análisis de Máxima Parsimonia dando igual peso a todos los caracteres, dio como resultado 643 árboles igualmente parsimoniosos (TL=857 pasos, CI=0.435, RI=0.623, 200 pares de bases fueron informativas). En este análisis, la topología (Fig. 7) denota relaciones filogenéticas donde las especies de Guerrero están cercanamente relacionadas con especies de Oaxaca. Las muestras de *T. omiltemi* forman un clado que es grupo hermano de dos taxones del

estado de Oaxaca (*T. sp.* Lachixio + *T. sp.* Tlaxiaco). *T. grandis* es basal al clado anterior y las muestras de *T. sp.* Nueva Delhi son basales a todos los anteriores. La base del árbol esta estructurada de forma reticulada por diversas especies de *Thorius* de Oaxaca. La especie más es *T. minutissimus* del sureste de Oaxaca.

El apoyo para los diversos cladogramas de la topología de Máxima Parsimonia es relativamente bajo, y no hay apoyo de Bootstrap para el clado que contiene a los tres taxones de Guerrero, y otras especies de Oaxaca. La resolución de la base del árbol es baja y no se pueden inferir las relaciones filogenéticas entre la mayoría de las especies analizadas.

El análisis de los datos con el programa Model Test, dio como resultado que el mejor modelo evolutivo era GTR+G+I, por lo que el análisis de Verosimilitud (ML) bajo este modelo evolutivo produjo un árbol (Fig. 8) $-Ln= 4366.602$ que difiere del de parsimonia en los siguientes dos aspectos: a) las muestras de *T. omiltemi*, *T. grandis* y *T. sp.* Nueva Delhi forman un grupo monofilético, mientras que en el Análisis de Parsimonia, *T. omiltemi* es grupo hermano de otras dos especies de *Thorius* de Oaxaca, b) La muestra de la población 2 (haplotipo 6) no se agrupa con ninguna de las especies de Guerrero y mas bien es basal a un grupo que contiene las especies de Guerrero mas 4 especies de Oaxaca, mientras que en Parsimonia esta muestra se agrupa con *T. grandis* a pesar de que proviene de las localidades de *T. omiltemi*. Las relaciones filogenéticas de las demás especies a la base del árbol no difiere significativamente del árbol de Parsimonia.

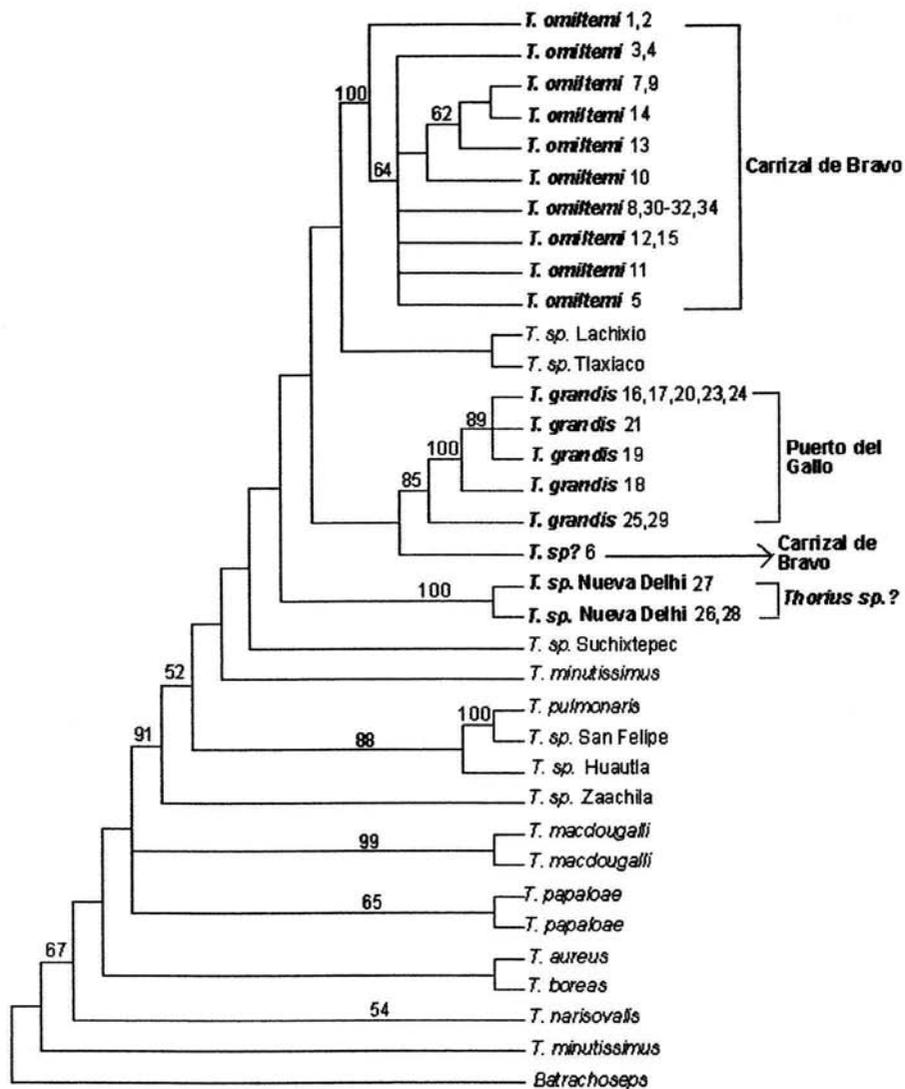


Fig. 7. Análisis de Máxima Parsimonia, con valores de Bootstrap > 50%. Se indica en negritas las especies de Guerrero y el número asignado de haplotipo a la derecha del nombre de la especie.

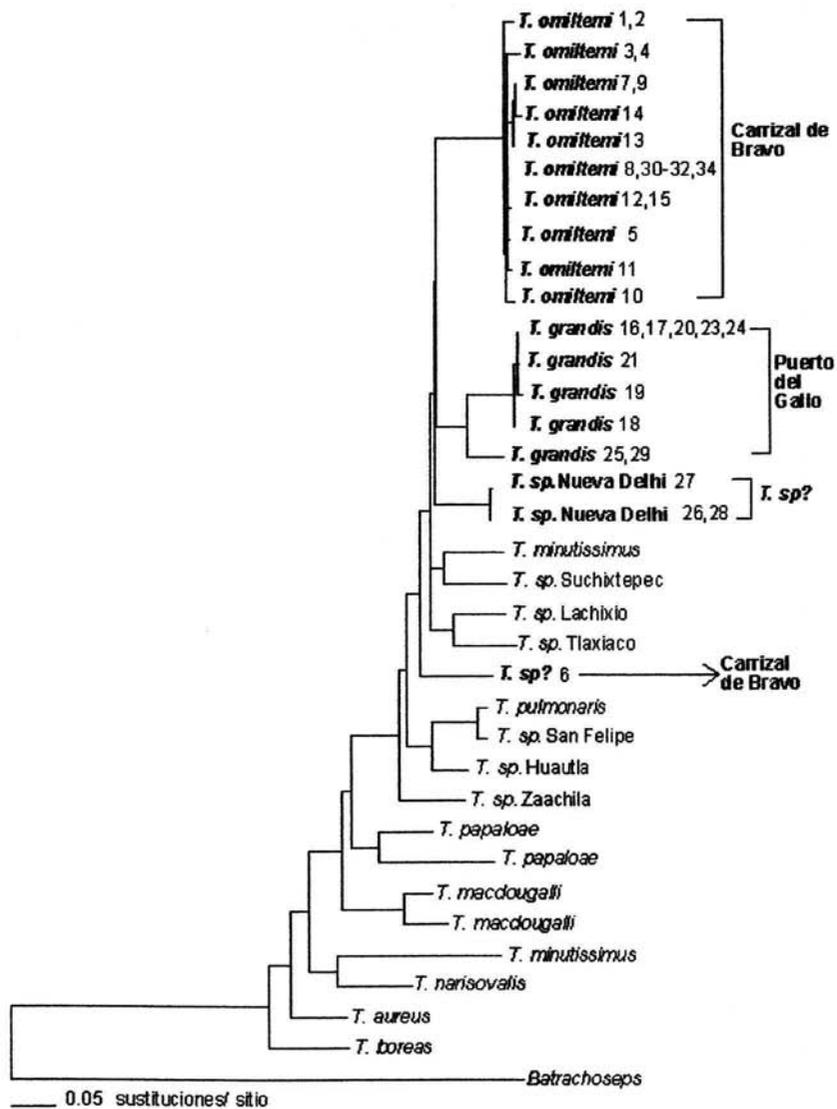


Fig. 8. Análisis de Máxima Verosimilitud. Se indica en negritas las especies de Guerrero y el número asignado de haplotipo a la derecha del nombre de la especie.

2.3 DISCUSION

Con el fin de establecer las relaciones filogenéticas de las especies del género *Thorius* de Guerrero entre ellas y con respecto a las especies del estado de Oaxaca, se utilizaron secuencias del gen mitocondrial ND4. La resolución de las topologías obtenidas por Máxima Parsimonia no está bien resuelta y presenta politomías a varios niveles dentro del árbol. Sin embargo, si existe apoyo de Bootstrap (91%) para un clado que contiene a las especies de Guerrero con otras de Oaxaca.

Existen diferencias significativas en las topologías obtenidas por los dos métodos de análisis. En el árbol de verosimilitud, tres especies de Guerrero forman un grupo monofilético, pero una de las muestras (muestra 6) está lejanamente relacionada a ellas. El apoyo obtenido por el análisis de Bootstrap para la topología de Máxima Parsimonia es bastante bajo para esos clados con lo cual cabe la posibilidad de que la topología de Verosimilitud este correcta. La hipótesis de Verosimilitud apoya la propuesta de Hanken (1983), a través de un estudio aloenzimático de que *Thorius grandis* y *Thorius omiltemi*, eran mucho más similares entre ellas que otras especies del mismo género, y que otras de las especies que parecían estar más relacionadas a ellas eran las habitantes del sur y este de Oaxaca.

La falta de resolución de la topología de Máxima Parsimonia podría deberse a que el número de sitios informativos no son suficientes para recuperar las relaciones filogenéticas del grupo. Esto puede ser por el número limitado de caracteres secuenciados (564 pb), por saturación de los posibles sitios informativos, o por el modo de evolución filética del grupo la cual pudo haberse dado como una radiación rápida en un periodo corto de tiempo o que es reciente sin que se pudieran acumular suficientes cambios. El fragmento secuenciado se ha encontrado que es altamente informativo en otros grupos de salamandras pletodóntidas, especialmente cuando se combina con otros genes como el Cytb y el 16S (Parra-Olea y Wake, 2001, Parra-Olea, 2002). Con los datos obtenidos, no se puede apoyar o descartar que el grupo haya tenido una radiación filética rápida a menos que se incluyan todas las especies de género y más datos moleculares. Las gráficas de saturación indican una cierta saturación en las transiciones de la tercera posición, pero aun se recuperan muchos sitios informativos de ésta posición. Se recomienda un análisis de las relaciones filogenéticas de todas las especies de *Thorius* y la secuenciación de otros genes para poder obtener una hipótesis que incluya a las especies de Guerrero.

2.3.1 Las especies de *Thorius* en Guerrero

A la fecha, se han descrito tres especies de *Thorius* para el estado de Guerrero: *T. omiltemi*, *T. grandis* y *T. infernalis*. Para este estudio se realizó un muestreo a lo largo de la Sierra Madre del Sur para coleccionar especímenes de estas especies en las localidades tipo y en otros lugares donde no se había coleccionado previamente. Durante nuestros muestreos no fue posible encontrar *T. infernalis*, pero si coleccionamos *T. omiltemi* y *T. grandis* de las localidades tipo, así como ejemplares de poblaciones nuevas (poblaciones 5 y 7). Con base a los análisis de ADN mitocondrial encontramos dos clados que representan *T. omiltemi* y *T. grandis*. Una de las poblaciones (población 5) la cual está cercana geográficamente a *T. grandis* no se agrupa con esa especie y se le ha designado como *T. sp.* Nueva Delhi. Las muestras de la población 7 se agrupan con *T. grandis* aunque tienen una divergencia del 6.3%. Otro resultado interesante, de éste análisis, es que una muestra de la localidad tipo de *T. omiltemi* se agrupa con el clado de *T. grandis* en el análisis de Máxima Parsimonia, pero está lejanamente relacionada con cualquiera de las especies de Guerrero en el análisis de Verosimilitud, por el momento hemos decidido dejarla como *T. sp?* pero se necesita seguir haciendo muestreos en esta zona para encontrar más muestras de este linaje y quizás secuenciar más genes para que la resolución de los árboles incremente.

2.3.2 Distribución de especies y fragmentación genética

T. grandis no se limita a su localidad tipo como otras *sp.* Esta presente en poblaciones con una distancia aproximada de 28 Km., aunque presenta una divergencia genética de 1%. Probablemente, según el análisis de parsimonia podría encontrarse de manera simpátrida con *T. omiltemi*, la cual solo se encontró en Carrizal de Bravo, por lo tanto, es necesario hacer muestreo en Cerro Omiltemi, ya que organismos provenientes de esta localidad forman parte de la serie tipo.

Las muestras de Nueva Delhi, forman un clado que no se agrupa con ninguna de las otras dos especies, por lo que se considera que se trata de una especie nueva. Durante nuestros muestreos encontramos 3 especímenes por lo que se recomienda coleccionar más ejemplares para poder hacer la descripción adecuada.

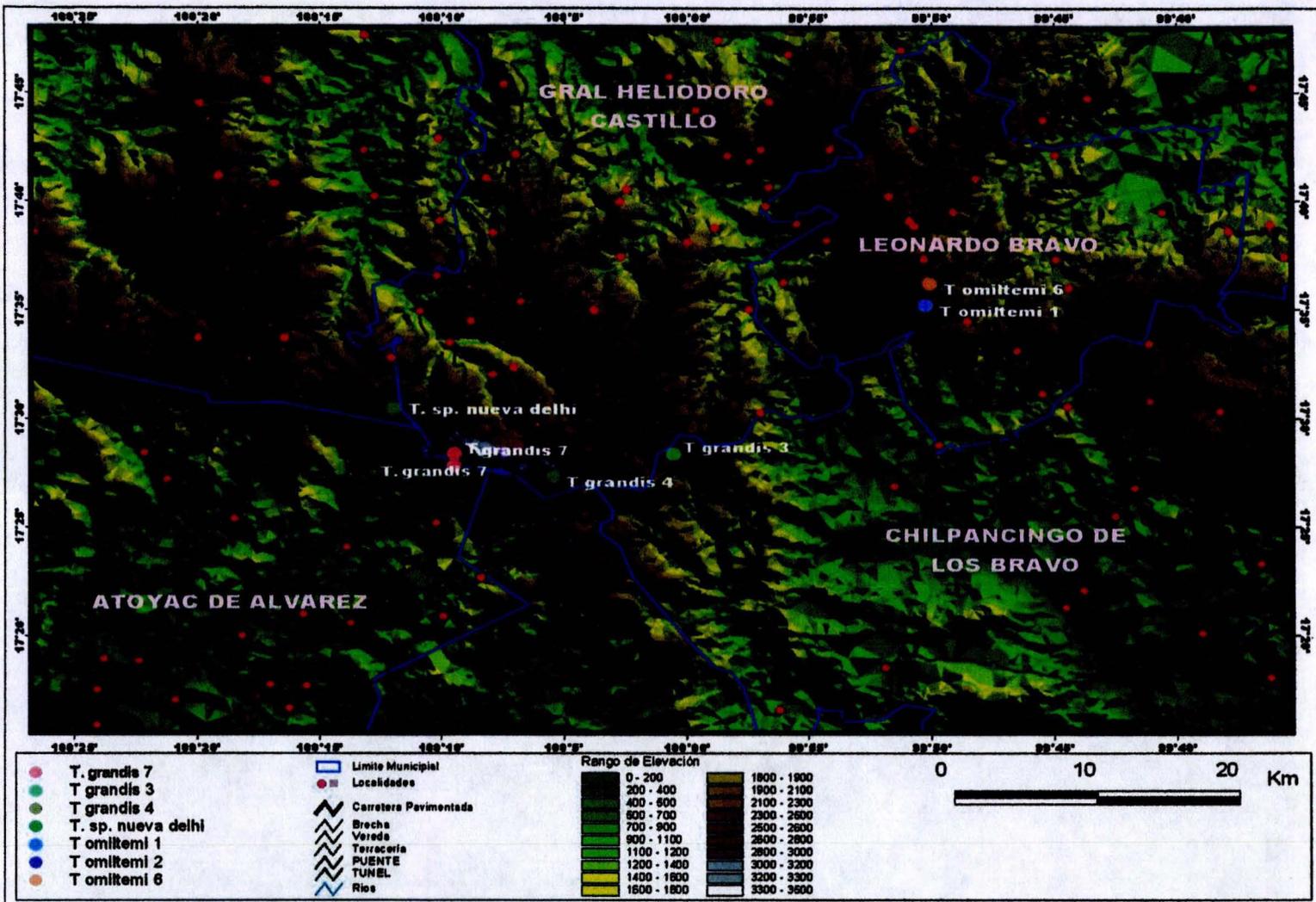


Fig. 9. Distribución de las tres especies de Guerrero analizadas en el presente estudio a lo largo de la Sierra Madre del Sur. Se indican con diferentes colores cada individuo colectado y se agregaron características de topografía e hidrografía a lo largo del transecto.

DISCUSION GENERAL

Algunas de las características más inusuales entre las especies del género *Thorius* presentes en Guerrero son un marcado polimorfismo craneal y dental en *T. grandis*. Las hembras adultas tienen mayor número de dientes maxilares así como presencia de dientes premaxilares y craneos más articulados, a diferencia de los machos que presentan total ausencia tanto de dientes maxilares como de premaxilares y presentan un cráneo débilmente formado (Hanken *et al.*, 1999).

Por otro lado, en cuanto a diferencias ecológicas, de acuerdo a lo que menciona Hanken *et al.* (1999), las especies del género *Thorius* en Guerrero (excepto por *T. infernalis*) se encuentran distribuidas a lo largo de bosques de pino-encino-aile a elevaciones mayores a los 2500 m, contrario a lo que menciona Adler (1996), que aparentemente se encuentran confinadas a hábitats a elevaciones sobre los 1700 m.

La distribución de las especies del género a elevaciones mayores a los 1700 m comprueba lo que menciona Wake *et al.* (1992), acerca de la riqueza de comunidades en cualquier región a elevaciones relativamente mayores, en áreas con una gran diversidad topográfica, como en este caso lo es la Sierra Madre del Sur.

Adler (1996), discute las relaciones biogeográficas entre diferentes especies de pletodóntidos, mencionando que las especies habitantes del estado de Guerrero se encuentran en una región de la Sierra Madre del Sur unida al Océano Pacífico en el sur y por una depresión semidesértica del río Balsas al norte y oeste, mientras que en el este por un paso de una longitud aproximada a la de Chilpancingo, que separa la parte oeste de la Sierra del resto de las elevaciones que pasan por el estado de Oaxaca. La topografía del estado también explica la restricción altitudinal de todas las especies del género, confinadas a las zonas más elevadas entre los 1000 y 2800 m, por el alto porcentaje de humedad (Adler, 1996 y Wake *et al.* 1992), que para el caso de *T. grandis* puede encontrarse a más de 3000 m. snm., mientras que *T. omiltemi* se ha encontrado en lugares hasta los 2800 m. snm., aproximadamente (Fig. 9). (Hanken *et al.*, 1999).

Para el caso de *T. grandis* y *T. omiltemi*, la principal característica fisiográfica que las separa es una depresión de cerca de 1700 m, cerca de la unión entre el río Yextla y el río Papagayo, entre el Cerro Teoteppec y el Cerro Cacho de Oro (Fig. 9) (Hanken *et al.*, 1999).

Por lo que refiere al origen de la diversidad biológica en el sur sureste de México, la importancia de esta historia orogénica reside en que las tasas de especiación se incrementan en las áreas de alta complejidad topográfica (Graham, 1998). Las diferencias entre la topología de las zonas en que se distribuyen estas especies, la especialización que presentan a diferentes elevaciones, la fragmentación genética, así como la poca vagilidad pudieron ser determinantes

en los procesos de especiación que dieron lugar a la mayoría de las especies del género (García París, *et al.*, 2000), haciéndolas endémicas a estas regiones. Larson (1984), asimismo, concluyó que los eventos de especiación en salamandras pletodontidas raramente estaban relacionados a cambios morfológicos.

Marshall (2000), sugiere la preexistencia de biota cosmopolita en ambos lados del Istmo que fue eventualmente aislada por hábitats a diferentes elevaciones así como factores tanto climáticos como geológicos, lo que también ayuda a la explicación de especies del género *Thorius* habitantes de zonas muy cercanas entre ellas, como en el caso de *T. grandis* y *T. omiltemi*. Alternativamente las diferencias en las historias de vida pueden estar acompañadas e incluso ser causa del aislamiento reproductivo.

Así como lo menciona Hanken (1999), la necesidad de muestrear las zonas intermedias entre las que habitan las especies de Guerrero y Oaxaca es necesaria para intentar establecer las relaciones filogenéticas más claras y proponer hipótesis biogeográficas acerca de su evolución geográfica. Es por esto, que desde hace unos años, la Dra. Parra Olea ha realizado búsquedas a lo largo de ambos estados, incluyendo también los estados de Puebla y Veracruz, en donde se distribuye este género, encontrando varios individuos de especies aún sin describir, como es el caso de nuestra muestra de Nueva Delhi la cual se propone como especie nueva en este trabajo.

CONCLUSIONES

Las especies analizadas del género *Thorius*, presentes en el estado de Guerrero presentan una serie de complejidades a nivel morfológico y molecular que hacen difícil su diferenciación.

Se encontraron cuatro caracteres morfológicos que presentan diferencias que son determinantes en la identificación de *T. grandis*, *T. omiltemi* y *T. sp.* Nueva Delhi.

Se determinó la presencia de dimorfismo sexual en las especies *Thorius grandis* y *T. omiltemi*.

Thorius grandis y *T. sp.* Nueva Delhi presentan diferencias morfológicas y moleculares que la separa entre ellas pero su cercanía geográfica sugiere que son especies simpátricas.

Se corroboran las relaciones filogenéticas entre *T. omiltemi*, *T. grandis* y *Thorius sp.* Nueva Delhi presentes en el estado de Guerrero con *T. minutissimus*, *T. pulmonaris*, *T. macedougalli*, *T. papaloe*, *T. narisovalis*, *T. aureus*, *T. boreas* y cinco especies más aún sin describir presentes en el estado de Oaxaca.

Se registra la existencia de una especie nueva del género *Thorius* presente en el estado de Guerrero, cercana geográficamente a *T. grandis* y similar morfológicamente a *T. omiltemi*.

Con base en los resultados obtenidos en el análisis filogenético, se sugiere la realización de más muestreos en el sitio de colecta del individuo designado como *Thorius sp.*? para resolver sus relaciones filogenéticas con *T. omiltemi* y *T. grandis*.

Sugerimos la secuenciación de más genes para obtener una mejor resolución de los árboles obtenidos en el análisis de parsimonia y máxima verosimilitud.

La morfología externa e interna de los individuos, así como los datos moleculares y ecológicos en conjunto aportan información sobre sus relaciones filogenéticas y la variación entre especies del género *Thorius* en Guerrero.

APÉNDICE 1

Especie	Descripción	Sitios de colecta
<i>T. arboreus</i>	Hanken y Wake, 1994	Sierra de Juárez, Oaxaca
<i>T. aureus</i>	Hanken y Wake, 1994	Sierra de Juárez, Oaxaca
<i>T. boreas</i>	Hanken y Wake, 1994	Sierra de Juárez, Oaxaca
<i>T. dubitus</i>	Taylor, 1941	Acultzingo Veracruz (Hanken, 1983).
<i>T. grandis</i>	Hanken, Wake y Freeman, 1999	Bosque de montaña de la Sierra Madre del Sur en el Estado de Guerrero (Hanken, <i>et al.</i> , 1999).
<i>T. infernalis</i>	Hanken, Wake y Freeman, 1999	Bosque de montaña de la Sierra Madre del Sur en el Estado de Guerrero (Hanken, <i>et al.</i> , 1999).
<i>T. insperatus</i>	Hanken y Wake, 1994	Sierra de Juárez al sur del estado de Oaxaca.
<i>T. lunaris</i>	Hanken y Wake, 1998	Xometla, Veracruz (Hanken y Wake, 1998).
<i>T. maccougalli</i>	Taylor, 1949	Cerro de Humo, Sierra de Juárez, Oaxaca (Hanken, 1983).
<i>T. magnipes</i>	Hanken y Wake, 1998	Acultzingo Veracruz y San Felipe, Puebla.
<i>T. minydemus</i>	Hanken y Wake, 1998	Localidades cercanas a La Joya, Veracruz.
<i>T. munificus</i>	Hanken y Wake, 1998	Las vigas, Veracruz (Hanken y Wake, 1998).
<i>T. minutissimus</i>	Taylor, 1949	Santo Tomás Tecpan en la Sierra Madre del Sur, Sierra de Juárez, Oaxaca (Hanken, 1983).
<i>T. narismagnus</i>	Reconocida por Shannon y Werler como una subespecie de <i>T. pennatulus</i> , 1955 Elevada a nivel de especie por Hanken, 1983	Volcán San Martín el sureste de Veracruz (Hanken, 1983).
<i>T. narisovalis</i>	Cope, 1869	Volcán Orizaba, Veracruz (Hanken, 1983).
<i>T. omiltemi</i>	Hanken, Wake y Freeman, 1999	bosque de montaña de la Sierra Madre del Sur en el Estado de Guerrero (Hanken, <i>et al.</i> , 1999).
<i>T. papaloe</i>	Hanken y Wake, 2001	Concepción de Pápalo, Oaxaca; al noroeste de la Sierra de Juárez en el Norte de Oaxaca (Hanken y Wake, 2001).
<i>T. pennatulus</i>	Cope, 1869	Volcán Orizaba, Veracruz (Hanken, 1983).
<i>T. pulmonaris</i>	Taylor, 1941	Bosques Templados cerca del Cerro San Felipe en Oaxaca (Hanken, 1983).

<i>T. schmidtii</i>	Gehlbach, 1959 Fue identificada como especie sinónima de <i>T. maxillabrochus</i> por Hanken y Wake, 1998.	Zoquitlán al extremo sur de Puebla (Hanken, 1983).
<i>T. smithi</i>	Hanken y Wake, 1994	Sierra de Juárez al sur del estado de Oaxaca.
<i>T. spilogaster</i>	Hanken y Wake, 1998	Xometla, Veracruz (Hanken y Wake, 1998).
<i>T. troglodytes</i>	Taylor, 1941	Montañas de Acultzingo Veracruz (Hanken, 1983).

LITERATURA CITADA

Adler, K. 1996. The salamanders of Guerrero, Mexico, with a description of five new species of *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae). *Occasional papers of the Natural History Museum. The University of Kansas*. 177: 1-28.

Cope, E. D. 1869. A review of the species of the Plethodontidae and the Desmognathidae. *Proceedings of National Academy of Sciences of Philadelphia*. 1869: 93-118.

Cope, E. D. 1889. The Batrachia of North America. *Bulletin of the United States Natural Museum* 34: 1-525.

Duellman, W. E. y L. Trueb. 1986. *Biology of Amphibians*. McGraw-Hill, New York.

Duellman, W. E. 1993. *Amphibian Species of the World: Additions and Corrections*. Univ. of Kansas Printing Service. Lawrence, KS.

Dunn, E. R. 1926. Salamanders of the family Plethodontidae. Smith College, Northampton, Massachusetts.

García-París, M. y D. B. Wake. 2000. Molecular phylogenetic analysis of relationships of the tropical salamander genera *Oedipina* and *Nototriton*, with descriptions of a new genus and three new species. *Copeia* 1: 42- 70.

—, D. A. Good, G. Parra-Olea y D. B. Wake. 2000. Biodiversity of costa rican salamanders: implications of high levels of genetic differentitaion and phylogeographic strucutre for species formation. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 1640- 1647.

Graham, A. 1998. Factores históricos de la diversidad biológica de México. 109- 127. En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa, eds. 1998. *Diversidad biológica de México. Orígenes y distribución*. IB-UNAM. pp.

Hanken, J. 1983 Genetic variation in a dwarfed lineage, the Mexican salamander genus *Thorius* (Amphibia: Plethodontidae). Taxonomic, Ecologic and Evolutionary implications. *Copeia* 4: 1051-1073.

Hanken, J. 1984. Miniaturization and its effects on cranial morphology in plethodontid salamanders, genus *Thorius* (Amphibia: Plethodontidae). I. Osteological variation. *Biological Journal of the Linnean Society* 23: 55-75.

— y D. B. Wake. 1982. Appendicular skeletal morphology in minute salamanders, genus *Thorius* (Amphibia: Plethodontidae): Growth regulation, adult size determination and natural variation. *Journal of Morphology* 174: 57-77.

— y —. 1994. Five new species of minute salamanders, genus *Thorius* (Caudata: Plethodontidae), from northern Oaxaca, México. *Copeia* 3: 573-590.

— y —. 1998. Biology of tiny animals: Systematics of the minute salamanders (*Thorius*: Plethodontidae) from Veracruz and Puebla, México, with descriptions of five new species. *Copeia* 2: 312-345.

— y —. 2001. A seventh species of minute salamander (*Thorius*: Plethodontidae) from the Sierra de Juárez, Oaxaca, México. *Herpetologica* 57 (4): 515-523.

— y — y H. L. Freeman. 1999. Three new species of minute salamanders (*Thorius*: Plethodontidae) from Guerrero, México. Including a report of a novel dental polymorphism in Urodeles. *Copeia* 4: 917-931.

Huacúz- Elías, Dolores del Carmen. 2001. Estado de conservación del género *Ambystoma* en Michoacán, México. Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo, UNAM.

INEGI. 2000. Carta Topográfica del Estado del Guerrero. Integración Territorial del XII Censo General de Población y Vivienda 2000.

Larson, A. 1984. Neontological inferences of evolutionary pattern and process in the salamander family Plethodontidae. En M. K. Hecht, B. Wallace y G. T. Prance, eds. *Evolutionary Biology* Vol.17 Cap. 4: 119-217.

Lynch, J. F., D. B. Wake y S. Y. Yang. 1983. Genic and morphological differentiation in mexican *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae) with a description of a new species. *Copeia* 4: 884-893.

Maxson, L. R. y D. B. Wake. 1981. Albumin evolution and its phylogenetic implications in the plethodontid salamander genera *Pseudoeurycea* and *Chiropterotriton*. *Herpetologica* 37: 109-117.

Marshall, C. J., J. K. Liebherr. 2000. Cladistic biogeography of the mexican transition zone. *Journal of Biogeography* 27: 203-216.

Parra Olea, G., J. Hanken y D. B. Wake (2001) Resumen congreso

Parra Olea, G., 2002. Systematics of salamanders, genus *Pseudoeurycea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 234-246.

—, M. García-Paris y D. B. Wake. 2004. Molecular diversification of the genus *Bolitoglossa* and its evolutionary and biogeographic consequences for the invasion of American tropics. *Biological Journal of the Linnean Society* 81:325-346.

— y D. B. Wake. 2001. Extreme morphological and ecological homoplasy in tropical salamanders. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 7888-7891.

Peña D. 2002. Análisis de datos multivariantes. Ed. MacGraw Hill. México, D.F. 359pp.

Posada, D. and K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.

- Sever, D. M. 1991. Comparative anatomy and phylogeny of the cloacae of salamanders (Amphibia: Caudata. I. Evolution at the family level. *Herpetologica* 47: 165-193.
- Swofford, D. L. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony *and other methods. Ver. 4.0b. Sinauer, Associates Sunderland. Massachusetts.
- Taylor, E. H. 1941. Herpetological miscellany. *University of Kansas Science Bulletin* 27: 105-133.
- Taylor, E. H. 1944. The genera of plethodont salamanders in Mexico. *University of Kansas Science Bulletin* 1: 189-232.
- Tanner, W. W. 1952. A comparative Study of the Throat Musculature in the Plethodontidae of Mexico and Central America. *The University of Kansas Science Bulletin*. 10: 583-677.
- Wake, D. B. 1966. Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae. *Memoirs of the Southern California Academy of Sciences* 4:1-111.
- Wake, D. B. 1970. The abundance of diversity of tropical salamanders. *American Naturalist* 104: 211-213.
- Wake, D. B. 1993. Phylogenetic and Taxonomic issues relating to salamanders of the family Plethodontidae. *Herpetologica* 49: 229-237.
- Wake, D. B. y A. H. Brame, Jr. 1963. The status of the plethodontid salamander genera *Bolitoglossa* and *Magnadigita*. *Copeia* 1963: 382-387.
- Wake, D. B. y P. Elias. 1983. New genera and a new species of Central American salamanders, with a review of tropical genera (Amphibia, Caudata, Plethodontidae). *Contribution of the Science Museum of Natural History of Los Angeles* 345: 1-19.

Wake, D. B. y J. D. Johnson. 1989. A new genus and species of plethodontid salamander from Chiapas, Mexico. *Contribution of the Science Museum of Natural History of Los Angeles*. 411: 1-10.

Wake, D. B. y J. F. Lynch. 1976. The distribution, ecology and evolutionary history of plethodontid salamanders in tropical America. *Natural History Museum of Los Angeles County Science Bulletin* 25:1-65.

Wake, D. B., T. J. Papenfuss y J. F. Lynch. 1992. Distribution of salamanders along elevational transects in Mexico and Guatemala. *Tulane Studies in Zoology and Botany* 1: 303- 319.