



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Filogenia del Género *Heloderma*

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

Carlos Alberto Hernández Jiménez

Tutor: Dr. Oscar Alberto Flores Villela

Dr. Adrian Nieto Montes de Oca  
Dra. Virginia León Regañón  
M en C. Luis Canseco Marquez  
Dra. Irene Goyenechea Meyer

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

OFICIO FCIE/DEP/278/11

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

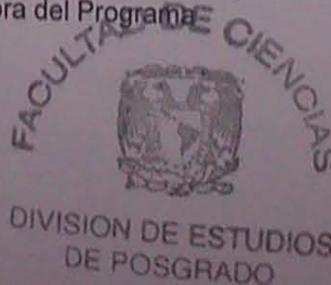
Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de noviembre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA)** del (la) alumno (a) **HERNÁNDEZ JIMÉNEZ CARLOS ALBERTO** con número de cuenta **506021381** con la tesis titulada "**FILOGENIA DEL GÉNERO *Heloderma***", realizada bajo la dirección del (la) **DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA**:

Presidente: DRA. VIRGINIA LEÓN REGAGNON  
Vocal: DRA. IRENE GOYENECHEA MAYER-GOYENECHEA  
Secretario: DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA  
Suplente: M. EN C. LUIS CANSECO MÁRQUEZ  
Suplente: DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA

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

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de mayo de 2011.

*Mi del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



MCAA/DCRV/ASR/ipp

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la universidad Nacional Autónoma de México, por haberme permitido cumplir uno de mis sueños, “ser estudiante de la mejor universidad de Latinoamérica”

A CONACYT una de las grandes instituciones en el país, sin la cual no hubiera sido posible la realización de mis estudios de maestría por la beca para estudios de posgrado y la beca mixta.

Al Dr. Oscar A. Flores Villela por haber aceptado dirigir este proyecto, por sus enseñanzas y consejos, por sus críticas, por abrirme las puertas y haber ampliado mi panorama de lo que pero sobre todo por su amistad y por haberme dado la confianza para formar parte de su equipo de trabajo. Gracias Oscar

A los revisores de este trabajo Dr. Adrian Nieto, Dra. Virginia León, Dra Irene Goyenechea, M en C. Luis Canseco Márquez. Por su tiempo, comentarios y revisiones que permitieron enriquecer este proyecto.

## **Agradecimientos a título personal**

A los curadores y personal de las colecciones AMNH, USNM, UTA, FMNH, IBUNAM, BYU, MZFC. Por haberme prestado los ejemplares para la revisión morfológica. Dr. Jonathan Campbell, Carl Franklin, Dr. Alan Resetar, Dr. Víctor Hugo Reynoso, Edmundo Pérez, Jack Sites. En especial al Dr. Darrel Frost y al Dr. Roy Mc Darmin y al personal de las colecciones de herpetología del AMNH y USNM por haberme permitido realizar una estancia en las instalaciones de las colecciones a su cargo. A todas las personas que me ayudaron con ejemplares para la toma de muestras de DNA, Eric Smith, Paulino Ponce, Carlos Balderas, Martin Villa, Nils Santos, Carlos Vázquez, Lester, Antonio Ramírez, Uri García, Alberto Mendoza, Jacobo Reyes, al Centro Ecológico de Sonora, Museo Universum, Zoológico Miguel Álvarez del Toro, Zoológico de la Aurora, Museo de Historia Natural de Guatemala, Universidad de San Carlos. UMA mata de Ajo.

A todos los que me ayudaron con el difícil trabajo de laboratorio, Dra, Lura Márquez, Dra Norma Manríquez, Dr Gastón Zamora, en especial a la Dra Sandra Raquel Reyes gracias amiga x ayudarme cuando pensé que todo estaba perdido. A mis compañeros y amigos del Museo de Zoología, Cesar Nanda, Gaby, Isrrael, Itzel, Uri, Beto, Itzue, Luis, Manolo, Manuel feria, Erick, Loco, Guicho, gracias por su compañía y camaradería durante mi larga estancia en el museo.

A todas las personas que me apoyaron durante las salidas de campo, Constantino, Joanna López, Cheli, Gracias por su valiosa ayuda.

A mis padres Roció Jiménez, Alberto Hernández, a mis hermanos, Oyuki e Ivan, a mis abuelos Ricardo Jiménez y Aida Sánchez, a mi tío Francisco Jiménez. Gracias por estar a mi lado siempre. En especial a mi hermana Jocelyn por ser la que sufrió más de cerca los desvelos frustraciones y alegrías de este proceso.

A Joanna López, por todo el amor y apoyo que me diste y por haber aceptado el mío, aunque ya no estemos juntos este logro también es tuyo, gracia JOA.

A mis compañeros ya amigos de cuarto, de desveladas, de café y platicas interminables, Jocelyn Hernández, Prisca y Jazmín. Gracias por todo su tiempo y apoyo nunca olvidare las cosas vividas juntas.

Al Dr. Jorge Cebada a la Dra Angélica Trujillo, al M en C. Carlos Castañeda, a la M en C. Concepción López, Biol, Pedro Serrano. Por su apoyo y amistad durante esta nueva etapa como profesor de la Escuela de Biología de la BUAP.

A los estudiantes, Eloy, Luis Rosalía Pérez, Astrid Villagrán, Oscar Olivares, Pacho, Eris Mena, luis y toño, en especial a Tania Ramírez y sobre todo a Ariana Figueroa gracias por ser mi mano derecha, mis amigas y las mejores estudiantes. Siempre contarán conmigo.

A los amigos de NYC en especial a Elias, Isrrael y Alejandro por su amistad desinteresada y por haberme acompañado en esos días lejos de casa.

A Marisol Mendoza por querer compartir tu existencia conmigo, por tu apoyo, y energía, pero sobre todo por amarme como me amas y por darme tanta vida.

A todos mis amigos herpetólogos, por sus porras, apoyo y amistad. A mis amigos de toda la vida y a mis nuevos amigos, así como a todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron con este logro y que en este momento se pierden en los laberintos de mi mala memoria. GRACIAS.

***A mi madre Roció Jiménez***

***Por creer en mí por tu amor y apoyo  
incondicional***

## INDICE

1. RESUMEN.....	8
1.1. ABSTRACT.....	9
2. INTRODUCCIÓN.....	10
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	10
2.2. DISTRIBUCIÓN Y HÁBITAT.....	11
3. ANTECEDENTES.....	14
3.1. HISTORIA TAXONÓMICA.....	14
3.2. CONCEPTO DE ESPECIE.....	20
4. OBJETIVOS.....	22
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1. PARTE 1. REVISIÓN MORFOLÓGICA DE EJEMPLARES.....	23
5.1.1. CARACTERES EXAMINADOS.....	24
5.1.1.1. CARACTERES CUALITATIVOS.....	25
5.1.1.2. CARACTERES CUANTITAVOS.....	32
5.1.1.2.1. MERISITICOS.....	32
5.1.1.2.2. MORFOMÉTRICOS.....	33
5.2. PARTE 2. TRABAJO A NIVEL MOLECULAR.....	35
5.2.1. EXTRACCIÓN DE SANGRE.....	37
5.2.2. PRESERVACIÓN DE SANGRE.....	38
5.2.3. EXTRACCIÓN DE DNA.....	39
5.2.4. AMPLIFICACIÓN DE DNA POR MEDIO DE PCR.....	40
5.2.5. PURIFICACIÓN Y SECUENCIACION.....	42
5.2.5. EDICIÓN Y ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS.....	42
5.3. PARTE 3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	42
5.3.1. ANÁLISIS FILOGENÉTICO CON DATOS MORFOLÓGICOS.....	43
5.3.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO CON DATOS MOLECULARES.....	44
6. RESULTADOS.....	48
6.1 DATOS MORFOLÓGICOS.....	48
6.2 DATOS MOLECULARES.....	51
7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	65

## RESUMEN

A lo largo de su distribución actual el Género *Heloderma* presentan variaciones morfológicas que han llevado a reconocer seis subespecies (*H. h. horridum*, *H. h. exasperatum*, *H. h. alvarezzi*, *H. h. charlesbogerti*, *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum*). A pesar de la existencia de dos trabajos previos, su status taxonómico no ha sido resuelto. Este estudio pretende aclarar las relaciones entre las subespecies utilizando métodos cladistas proponiendo una hipótesis filogenética con caracteres morfológicos y moleculares. Para esto se revisaron un total de 35 caracteres morfológicos y 893 pb del gen mitocondrial ND4. Para el análisis filogenético los sets de datos se analizaron de forma separada bajo el criterio de máxima parsimonia y el criterio de inferencia Bayesiana. Los resultados sugieren que *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum* representan dos especies distintas. *H. h. horridum* está formado por tres linajes. El más norteño debe ser considerado parte de *H. exasperatum*. El segundo, distribuido en el centro de la costa del Pacífico Mexicano y cuenca del Balsas, representa el taxón nominal *H. horridum*. Finalmente, el de la costa de Guerrero y Oaxaca representa a una especie nueva. En el caso de *H. h. alvarezzi* forma un grupo exclusivo que se distribuye en la Depresión Central de Chiapas que debe ser elevado a nivel de especie. *H. h. charlesbogerti* forma un grupo exclusivo distinto a *H. alvarezzi* distribuido en el Valle Del Río Motagua en Guatemala que debe ser elevado a nivel de especie.

## ABSTRACT

Throughout its current distribution the *Heloderma* genus has morphological variations that have led to recognize six subspecies (*H. h. horridum*, *H. h. exasperatum*, *H. h. alvarezii*, *H. h. charlesbogerti*, *H. s. suspectum* and *H. s. cinctum*). Despite the existence of two previous works, its taxonomic status has not been resolved. This study aims to clarify the relationships between the subspecies by using cladistic methods proposing a phylogenetic hypothesis with morphological and molecular characters. For this, a total of 35 morphological characters and 893 bp of the ND4 mitochondrial gene were reviewed. For phylogenetic analysis, data sets were analyzed separately under the criteria of maximum parsimony and Bayesian inference criteria. The results suggest that *H. s. suspectum* and *H. s. cinctum* represent two distinct species. *H. h. horridum* consists of three different lineages. The most northern lineage needs to be considered *H. exasperatum*. The second, distributed in the middle of the Pacific coast of Mexico and Balsas Basin, represents the nominal taxon *H. horridum*. Finally, the lineage of Guerrero and Oaxaca coast represents a new species. *H.h. alvarezii* and *H.h.charlesbogerti* are different and differentiated lineages. *H. h. alvarezii* is an exclusive group, distributed in the Central Depression of Chiapas and should be elevated to species level. *H. h. charlesbogerti* form an exclusive group, distributed in the Motagua River Valley in Guatemala and should be elevated to species level.

## INTRODUCCIÓN

La familia de lagartijas Helodermatidae se encuentra ubicada dentro del clado de los Anguimorpha formado a su vez por las familias Anguidae, Helodermatidae, Xenosauridae, Varanidae, Shinisauridae y Lanthanotidae (Townsend *et al.* 2004; Kumazawa, 2007). A pesar de que existen seis géneros fósiles de la familia Helodermatidae actualmente se encuentra representada por un solo género (Beck, 2005)

El género *Heloderma* cuenta con una especie extinta (*Heloderma texanum*) y dos especies vivientes (*Heloderma horridum* y *Heloderma suspectum*) divididas en seis subespecies (*H. h. horridum*, *H. h. exasperatum*, *H. h. alvarezi*, *H. h. charlesbogerti*, *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum*), distribuidas de manera general desde el suroeste de Estados Unidos a lo largo del Río Colorado, la franja costera del Pacífico Mexicano, cuenca del Río Balsas y los valles de los ríos Grijalva-Motagua en Chiapas y Guatemala, respectivamente (Campbell y Lamar, 2004; Beck, 2005).

### **Características generales.**

Tanto *Heloderma horridum* como *Heloderma suspectum* eran consideradas hasta hace poco como las únicas especies de saurios vivientes que poseían glándulas especializadas para la producción de veneno. Sin embargo recientemente Fry *et al.* (2006) descubrieron que varias especies de lagartijas dentro del grupo de los Anguimorpha también poseen glándulas productoras de veneno, aunque estos venenos son menos potentes que el producido por los helodermátidos. Este clado junto con las serpientes fue nominando Toxicophera (Vidal y Hedges, 2005; Fry *et al.* 2006).

Los helodermátidos son organismos de cabeza alargada, hocico redondeado, glándulas venenosas en la mandíbula, párpados móviles relativamente pequeños y ojos más o menos protuberantes. Tienen cola gruesa que le sirve como reserva de grasa y que no se autotomiza fácilmente. Su lengua es bífida y junto con el órgano de Jacobson es importante en la quimiorrecepción. El esqueleto es robusto y corto, el hueso postorbital por encima del arco temporal,

así como el foramen temporal están ausentes. Los dientes son largos y curvados, algunos están modificados con surcos en la cara anterior y posterior para la conducción de veneno. Poseen escamas no imbricadas redondeadas y convexas que cubren el dorso de la cabeza, cuerpo, cola, gran parte de la región gular y las extremidades. Las escamas en el dorso de la cabeza, los lados del cuerpo, la cola, extremidades, y la superficie ventral de la región preanal presentan pequeños elementos óseos llamados osteodermos. El vientre está cubierto por escamas cuadrangulares alargadas. El patrón de color consiste en negro o marrón oscuro con combinaciones de amarillo o rosa en forma de manchas, barras, anillos o bandas. (Bogert y Martín del Campo, 1956; Campbell y Lamar, 2004; Beck, 2005)

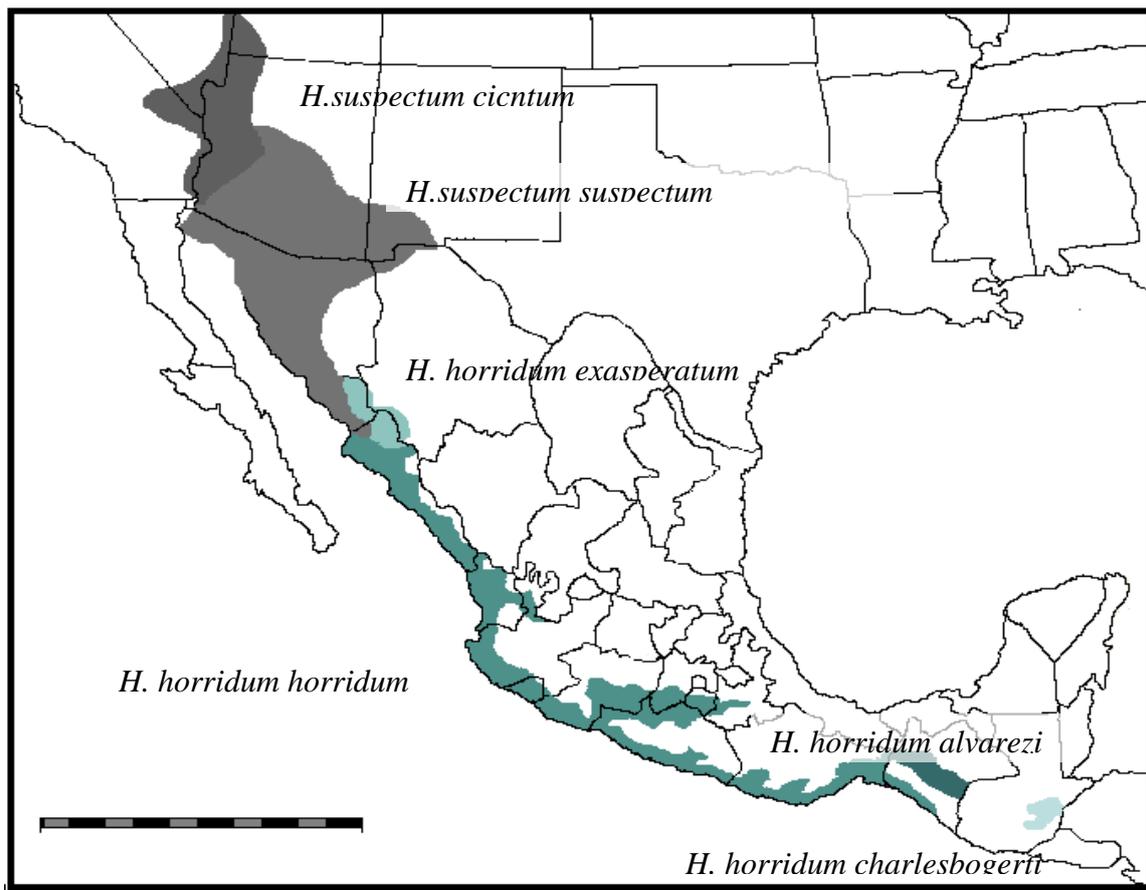
En cuanto al aparato venenoso puede decirse que es de poca eficiencia (comparado con el de una serpiente solenoglifa) aunque su hábito de morder con fuerza y sujetar fuertemente a su presa permite equilibrar la supuesta ineficiencia. Asimismo el veneno actúa de manera fundamental en la digestión del alimento, éste es secretado por medio de glándulas salivales especializadas, y se descarga a partir de las glándulas a través de unos conductos que se localizan muy cerca de la base de los dientes. Las glándulas del veneno se encuentran situadas en la mandíbula inferior, cada glándula es multilobulada con un ducto separado que descarga el veneno en un orificio único para el caso de *Heloderma horridum*, o de tres a cinco orificios para *Heloderma suspectum*. El veneno es liberado al interior de un pliegue de membrana mucosa entre el labio y la mandíbula, el veneno alcanza los dientes acanalados y asciende por acción capilar para introducirse en la herida al tiempo que se muerde a la víctima. (Bogert y Martín Del Campo, 1956; Campbell y Lamar, 2004).

### **Distribución y Hábitat.**

*Heloderma suspectum* se distribuye en Estados Unidos desde el extremo Suroeste de Nevada, al Suroeste de Utah, Sureste de California y Noroeste de Arizona y Suroeste de Nuevo México. En México se distribuye en Sonora ocupando gran parte del territorio del estado exceptuando la región de la costa noroeste del estado, se tiene registrado un espécimen al norte de Sinaloa.

Habita desde el nivel del mar en desiertos y matorrales hasta los 1708 m, en bosques de *Juniperus* o de robles. (Bogert y Martín del Campo, 1956; Campbell y Lamar, 2004; Figura 1).

*Heloderma horridum* se distribuye desde el Norte de México hasta Guatemala. En México, se distribuye desde la parte sur de Sonora y el extremo suroeste de Chihuahua a lo largo de la costa del Pacífico Mexicano por los Estados de Sinaloa, Nayarit, Zacatecas, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas; a través de la Cuenca del Río Balsas en los estados de Michoacán Guerrero, Morelos, Estado de México y Puebla; además en la región central del Río Grijalva en Chiapas. En Guatemala se distribuye al oeste en el Valle del Río Motagua. (Figura 1) Habita desde el nivel del mar hasta los 1600 metros en selva baja caducifolia, matorral xerófilo y bosque de pino-encino (Bogert y Martín del Campo, 1956; Campbell y Lamar, 2004; Lemos-Espinal *et al.* 2004).



**Figura 1** Distribución del Género *Heloderma* según Bogert y Martín del Campo (1956); Campbell y Lamar (2004); Lemos-Espinal *et al.* (2004); Beck (2005), modificado para este estudio.

## ANTECEDENTES

Hasta el momento se han realizado muchos trabajos descriptivos ecológicos y conductuales acerca de las dos especies del género entre los cuales destacan los siguientes: Balderas (2000); Beck (1986, 1990, 2005); Beck y Lowe (1991); Beck y Ramírez (1991); Bogert y Martín del Campo (1956); Campell y Lamar (1989, 2004). Sin embargo debido al propósito de este estudio solo se trata con detalle los estudios de carácter taxonómico y evolutivo.

### Historia taxonómica

Por lo que se sabe la descripción más temprana del género *Heloderma* es la de Hernández en 1615 (citado en Bogert y Martín del Campo, 1956) quién describió al “acaltetepon” con base en un ejemplar perteneciente al estado de Morelos. Posteriormente Wiegmann (1829) quien publicó el primer trabajo con nomenclatura binominal linneana, aplicó el nombre *Trachyderma horridum* a un espécimen recolectado en una localidad aparentemente cercana a Cuernavaca Morelos, México. Wiegmann (1829) notó que este animal era el mismo al que Hernández, en 1615, hizo referencia como “acaltetepon”. El mismo Wiegman (1829) se dió cuenta que el nombre de *Trachyderma* estaba ocupado por otro taxón. En consecuencia propuso el nombre *Heloderma* para sustituirlo por *Trachyderma*.

*Heloderma suspectum*, el otro miembro del género, fue en principio confundido con un ejemplar de *Heloderma horridum* por Baird (1859), quien registró un ejemplar recolectado en la Sierra de Moreno, Sonora en los límites de México con Estados Unidos identificándolo como *Heloderma horridum*.

Diez años después Cope (1869), se dió cuenta que los ejemplares de la región de Sonora descritos por Baird (1859) se diferenciaban del resto de los ejemplares conocidos de *H. horridum* por poseer mayor número de escamas sobre la cabeza, así como una cola más corta y coloración diferente. Por lo cual le asignó el nombre de *Heloderma suspectum* al nuevo taxón.

Morfológicamente *Heloderma horridum* difiere a nivel específico de *Heloderma suspectum* por tener la cola más larga (más del 65 % por ciento de la LHC); carecer de escamas preanales alargadas; y usualmente las dos primeras escamas infralabiales en contacto con los escudos geniales. Mientras que *H.suspectum* tiene la cola más corta (menos del 55% de la LHC), un par de escamas preanales alargadas y únicamente la primera infralabial en contacto con los escudos geniales.

Bogert y Martín del Campo (1956) analizaron la variación, distribución, hábitos y conducta de la familia Helodermatidae basándose en una revisión morfológica reconocieron dos subespecies de *Heloderma suspectum* (*Heloderma suspectum suspectum* y *Heloderma suspectum cinctum*) y tres de *Heloderma horridum* (*Heloderma horridum horridum*, *Heloderma horridum exasperatum* y *Heloderma horridum alvarezii*).

Finalmente, Campbell y Vannini (1988) describieron una cuarta subespecie de *Heloderma horridum*; *H. h. charlesbogerti*, que se distribuye al oeste de Guatemala en el Valle del Río Motagua.

A nivel subespecífico *H. h. exasperatum* de Guirocoba, Sonora, difiere de las otras subespecies de *H. horridum*, por tener la supranasal en contacto con la postnasal (en el resto de las subespecies la supranasal está separada de la postnasal por la primera cantal), por la presencia de 8 escamas interorbitales; (mientras que el resto de las subespecies presentan 6 o 7) y por tener la segunda supralabial siempre en contacto con la nasal o prenasal, (mientras que solo algunos ejemplares de *H.h.horridum* presentan esta condición y en *H.h.alvarezii* y *H.h.charlesbogerti* esta condición nunca se presenta). *Heloderma h. alvarezii* de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas difiere del resto de las subespecies, por la pérdida de la coloración amarilla conforme avanza la edad de los individuos, de tal forma que los individuos adultos son negros o marrón oscuro con algunos vestigios de color amarillo (mientras que en el resto de las subespecies la coloración amarilla se conserva hasta la etapa adulta). Finalmente *H. h. charlesbogerti* de Rancho Espíritu Santo, El progreso, Guatemala, difiere del

resto de las subespecies de *H. horridum*, por tener un patrón de coloración distintivo en color negro o marrón oscuro, con pocas manchas pequeñas y de forma irregular que cubren el dorso desde de la cola hasta antes de la inserción de los miembros delanteros; además de que se encuentra aislada geográficamente del resto de las subespecies en el Valle del Río Motagua, Guatemala (Campbell y Vannini, 1988).

Por otra parte, a nivel subespecífico *Heloderma suspectum cinctum* (Las vegas, Clark country, Nevada) difiere de *H. s. suspectum* por el patrón de coloración de el dorso (cuatro bandas claramente definidas de color negro, intercaladas con bandas claramente definidas de color rosado con manchas más o menos circulares de color negro dentro de casa banda) y de la cola (anillos simples gruesos, continuos y bien definidos en la cola), mientras que en *H.s.suspectum* el patrón dorsal consiste en bandas reticuladas e irregulares de color rosado intercaladas con bandas negras reticuladas e irregulares, y en la cola presenta cuatro o tres anillos simples o dobles, gruesos, a veces discontinuos y no bien definidos. Por otra parte *H.s.cinctum* presenta la retención de este patrón de coloración a lo largo de todas las edades, mientras que en *H. s. suspectum* el patrón de coloración varía de los jóvenes a adultos (Bogert y Martín del Campo, 1956).

En cuanto a estudios de carácter evolutivo solo se ha realizado el de Pregill *et al.* (1986), quienes realizaron un estudio de la evolución de la familia Helodermatidae, basados en el registro fósil, en el cual proponen un dendograma donde reconocen a los helodermatidos como un grupo monofilético relacionado con los Varánidos y señalan que en América del Norte se desarrollaron dos linajes de la familia Helodermatidae a mediados del terciario, de los cuales uno solo es el que permanece en el Reciente con dos diferentes especies *Heloderma horridum* y *H. suspectum*.

Se han realizado varios estudios de carácter filogenético donde se incluye a una o a las dos especies reconocidas actualmente de *Heloderma*, ya sea como grupo externo o para entender las relaciones entre distintas familias o grupos más inclusivos de reptiles (Fuller *et al.* 1998; Macey *et al.* 1999; Ast, 2001;

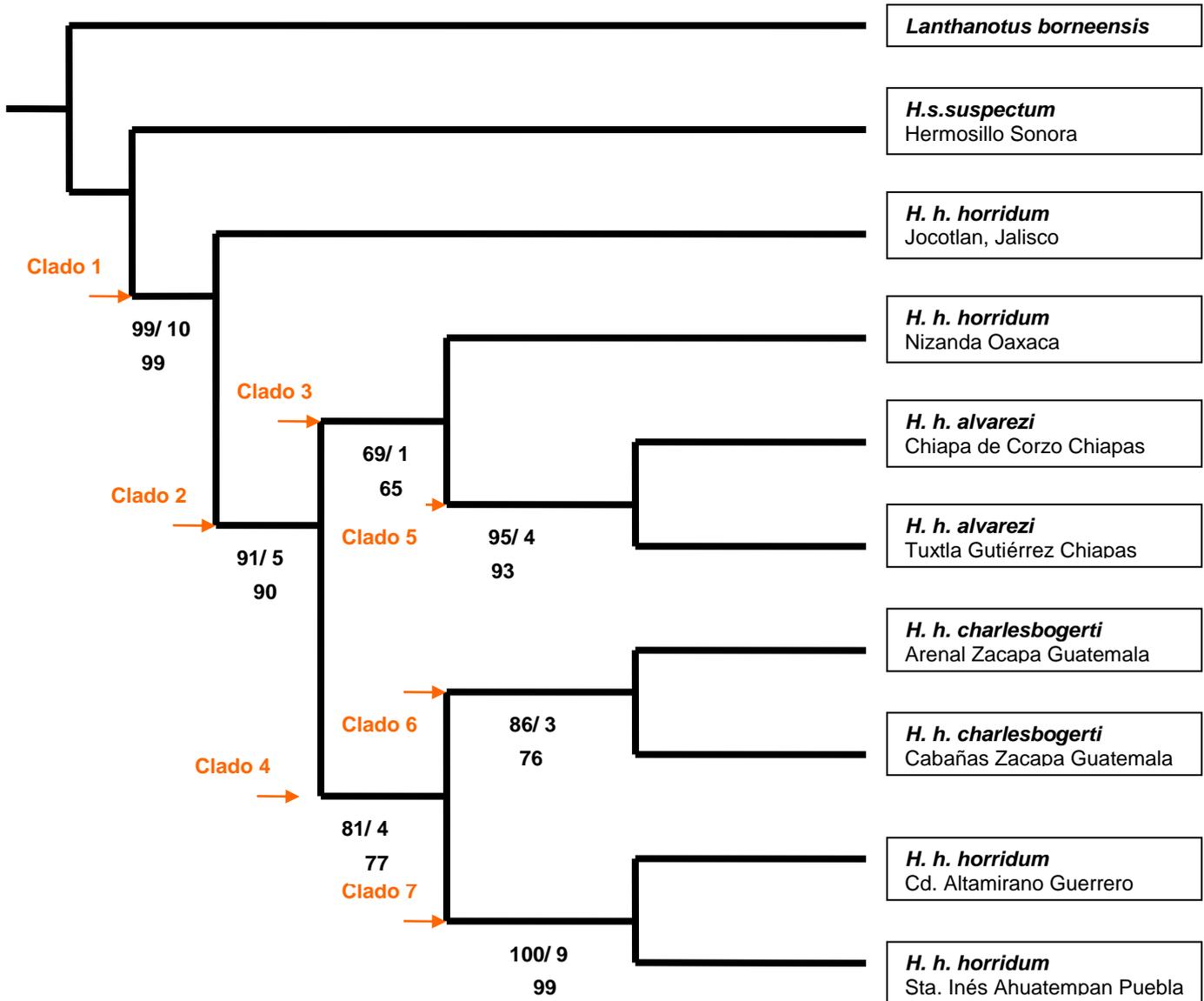
Canseco Márquez, 2005; Townsed *et al.* 2004; Vidal y Hedges, 2005; Kumazawa, 2007, por citar los mas recientes). Sin embargo el interés por las relaciones filogenéticas al interior del grupo es reciente y solo se conocen tres estudios que analizan desde distintas perspectivas las relaciones entre las subespecies cuestionando la validez de éstas. El primero de ellos es el de (Douglas *et al.* 2003) quienes estudian la diversidad molecular entre las subespecies del género por medio de las secuencia de 800pb de dos genes mitocondriales: ATPasa 8 y 6. Concluyen que *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum* presentan niveles muy bajos de divergencia genética lo cual sugiere que deberían ser considerados como un solo taxón, aunque también concluyen que necesitan más evidencia para proponer el cambio. En cuanto a los niveles de divergencia entre las subespecies de *H. horridum* los autores sugieren que deberían reconocerse tres especies. *H. horridum* y *H. exasperatum* (los cuales muestran niveles de divergencia suficientemente grandes como para ser considerados especies distintas) y *H. alvarezii* (ya que los niveles de divergencia entre *H. h. alvarezii* y *H. h. charlesbogerti* son muy bajos por lo cual deberían de considerarse como la misma especie). Sin embargo dichos autores no han publicado ningún cambio oficial (Tabla 1).

**Tabla1.** Porcentaje de divergencia entre las secuencias de los genes ATPasa 8 y 6 (Douglas *et al.* 2003).

	2	3	4	5	6	7
<b>1 <i>H.h.alvarezii</i></b>	1.0%	5.2%	9.6%	20.0%	21.0%	35.0%
<b>2 <i>H.h.charlesbogerti</i></b>	-----	6.0%	10.1%	20.6%	21.5%	35.8%
<b>3 <i>H.h.horridum</i></b>		-----	6.1%	18.2%	19.0%	33.6%
<b>4 <i>H.h.exasperatum</i></b>			-----	20.3%	21.3%	35.7%
<b>5 <i>H.s.suspectum</i></b>				-----	0.5%	34.0%
<b>6 <i>H.s.cinctum</i></b>					-----	34.6%
<b>7 <i>Elgaria</i></b>						

Por otra parte Hernández-Jiménez (2005) basándose en la secuencia de un fragmento de 450pb (tRNA-Trp, tRNA-Ala, tRNA-Asn, tRNA-Cys, tRNA-Tyr) de DNA mitocondrial, propuso una hipótesis filogenética y analizó las relaciones

entre tres de las subespecies de *Heloderma horridum* (*H. h. horridum*, *H. h. alvarezii*, *H. h. charlesbogerti*). Concluyendo que: *H. h. alvarezii* y *H. h. charlesbogerti* se mantienen cada uno como taxones independientes y monofiléticos; aunque sugiere que hace falta mas evidencia molecular y morfológica para elevarlos al nivel de especie. También concluye que *H. h. horridum* es un grupo polifilético en el cual posiblemente se encuentra involucrado mas de un taxón (Figura 2)

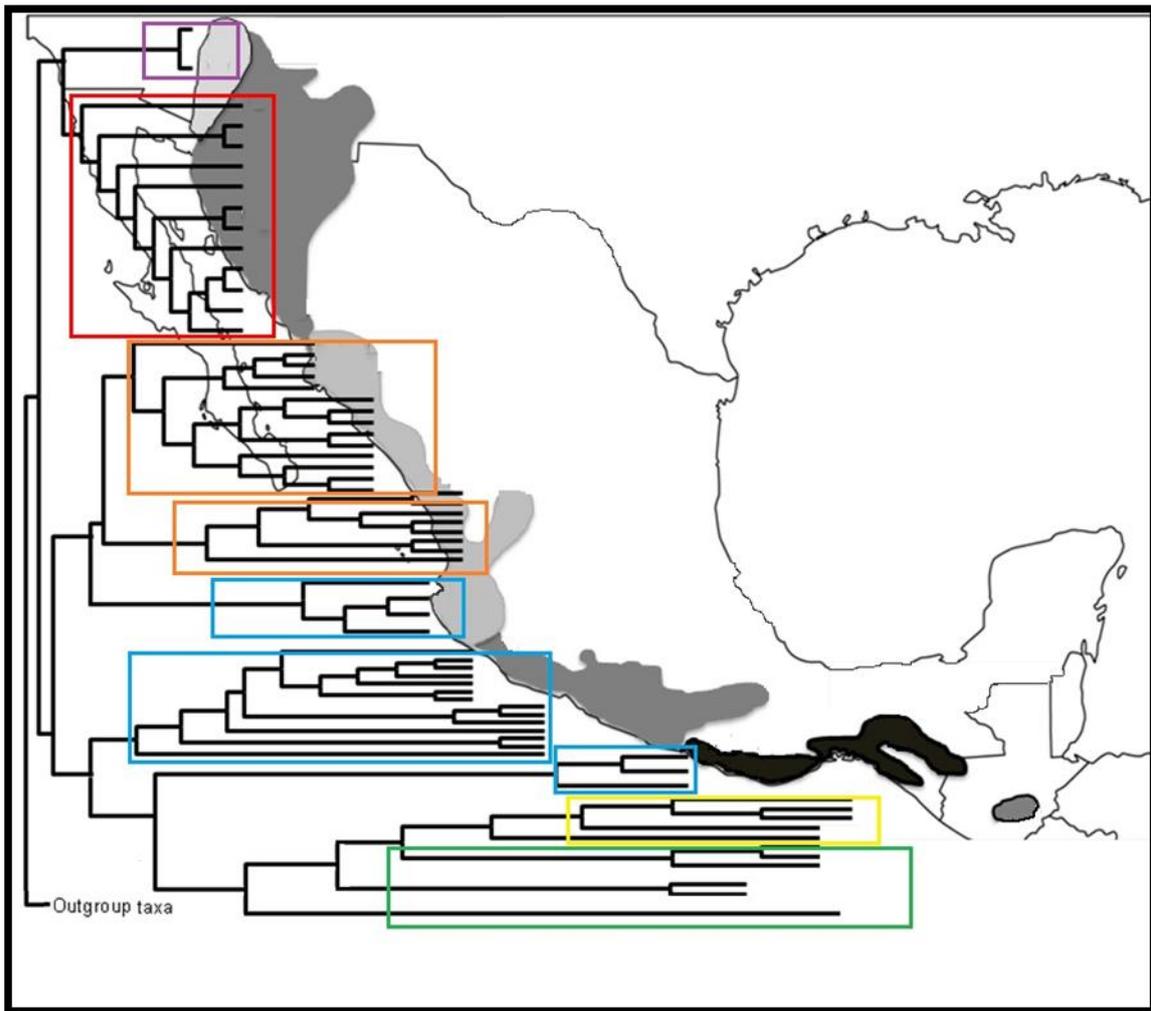


**Figura 2.** Hipótesis sobre las relaciones entre las subespecies de *Heloderma horridum*. Los números bajo las ramas corresponden a los valores de Bootstrap (números a la izquierda de la diagonal) e Índice de Bremer (número a la derecha de la diagonal) y valores de Jackknife [número bajo la diagonal] tomada de Hernández-Jiménez (2005).

Hernández-Jiménez (2005) propone que para aclarar las relaciones filogenéticas del grupo, se debe tener un muestreo más homogéneo de las zonas de distribución de las diferentes subespecies en especial de las poblaciones de la subespecie *H. h. horridum*. Además, aclara que se deben incluir ejemplares de las subespecies no incluidas en este estudio. Por último sugiere el uso de otros marcadores moleculares además de la revisión detallada de caracteres morfológicos.

Por último (Douglas *et al* 2010) proponen una hipótesis filogenética basada en genes nucleares y mitocondriales donde concluyen que *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum* no muestran evidencias de ser linajes diferenciados, mientras que para el caso *H. horridum* concluyen que lo más probable es que se trate de varios linajes distintos, sin embargo por la falta muestras de la mayor parte de su distribución no es posible asegurarlo.

El trabajo más reciente es el de (Hernández-Jiménez *et al.* 2011) donde por medio de marcadores moleculares, nucleares y mitocondriales se presenta una filogenia (Figura 3) y se analizan la relaciones filogeneitcas y genética de poblaciones de la subespecies de *Heloderma horridum*.



**FIGURA 3** Filogenia tomada de (Hernández-Jiménez *et al.* en preparación),. En naranja aparecen los clados de *H. h. exasperatum*, en azul los de *H. h. horridum*, en amarillo el de *H. h. alvarezii*, en verde el grupo de *H. h. charlesbogerti*, en rojo el clado de *H. s. suspectum* y finalmente el cuadro morado representa el clado de los haplotipos de *H. h. cinctum*.

### Concepto de Especie.

Las metas principales de la sistemática moderna son delimitar especies y reconstruir las relaciones filogenéticas entre ellas (Wheeler y Meier, 2000; Wiens, 1999). Históricamente se han propuesto varios conceptos de especie, de entre los que destacan el concepto biológico de especie (Mayr, 1969) el evolutivo (Simpson 1961; Wiley, 1978) y el filogenético (Frost y Hillis, 1990; Cracraft, 1992). Sin embargo, a pesar de la histórica y polémica discusión acerca de cuál es el concepto de especie que mejor describe la realidad, la

mayoría de los conceptos contemporáneos propuestos comparten un elemento en común en la conceptualización de qué es lo que tiene que constituir a una especie y a menudo la incompatibilidad entre estos conceptos se encuentra en el criterio usado para delimitar las especies en la práctica

Solo recientemente este problema empieza a resolverse a partir de las publicaciones de de Queiroz (1998, 2005, 2007). Este autor recalca que la mayoría de los conceptos propuestos coinciden fundamentalmente en la noción de que las especies son linajes de meta poblaciones que evolucionan por separado. Este concepto ha sido llamado “Metapopulation lineage concept“

Sin embargo el reto permanece en determinar en qué punto en este proceso gradual de divergencia de linajes se logra la especiación. Desde el punto de vista taxonómico la zona de interconexión de linajes divergiendo y su contacto secundario se da a menudo a nivel de lo que se ha denominado “subespecífico”, un término controversial en la sistemática moderna.

Según Mayr (1969) y Mayr y Ashlock (1991) el término subespecie se define como: “Un agregado de poblaciones locales que habitan en una subdivisión geográfica del margen de la especie y que difieren taxonómicamente de otras poblaciones de la especie” entendiéndose por diferencia taxonómica la existencia de caracteres morfológicos con valor diagnóstico.

Originalmente este concepto se utilizó para delimitar especies incipientes potenciales pero después se empleó únicamente para nombrar variaciones geográficas. Históricamente muchos linajes de vertebrados han sido descritos como subespecies basados en mínimas diferencias morfológicas incluyendo patrones de coloración o de escutelación para el caso de algunos reptiles; aunque a menudo estas subespecies representan extremos morfológicos en caracteres que más tarde han sido descritos como variación clinal (Mulcahy, 2007).

Actualmente como parte del cambio de la taxonomía tradicional a la taxonomía basada en la sistemática filogenética existe un consenso general en eliminar los nombres trinomiales (Frost y Hillis, 1990; Grismer, 1999; Mainer, 2004).

Se considera que grupos geográficamente aislados y morfológicamente distinguibles lograron especiación. (Frost *et al.* 1990). Por el contrario, si la variación morfológica es producto de una clina o asociada a algún aspecto ecológico en particular, la subespecie debe de ser considerada como sinónimo de la especie (Mainer 2004).

A pesar de los trabajos realizados por Douglas *et al.* (2003), Hernández-Jiménez (2005) y Douglas *et al.* (2010) las relaciones entre las subespecies de *Heloderma* no han sido claramente resueltas. Así mismo, el status taxonómico de las subespecies necesita ser reevaluado. Por lo tanto resulta necesario revisar las relaciones filogenéticas entre las subespecies del género *Heloderma* utilizando métodos cladísticos con base en caracteres morfológicos y moleculares para determinar si dichas subespecies son en realidad especies bajo el concepto de linajes de metapoblaciones (de Queiroz, 1998, 2005, 2007) aplicando el criterio propuesto por Wiens y Penkrot (2002) explicado mas adelante.

## **OBJETIVOS**

### **General**

- Proponer una hipótesis filogenética de las especies y subespecies del género *Heloderma* basada en caracteres morfológicos y moleculares.

### **Particulares**

- Investigar la monofilia de cada una de las subespecies género *Heloderma*.
- Determinar el status taxonómico de las subespecies del género *Heloderma*.

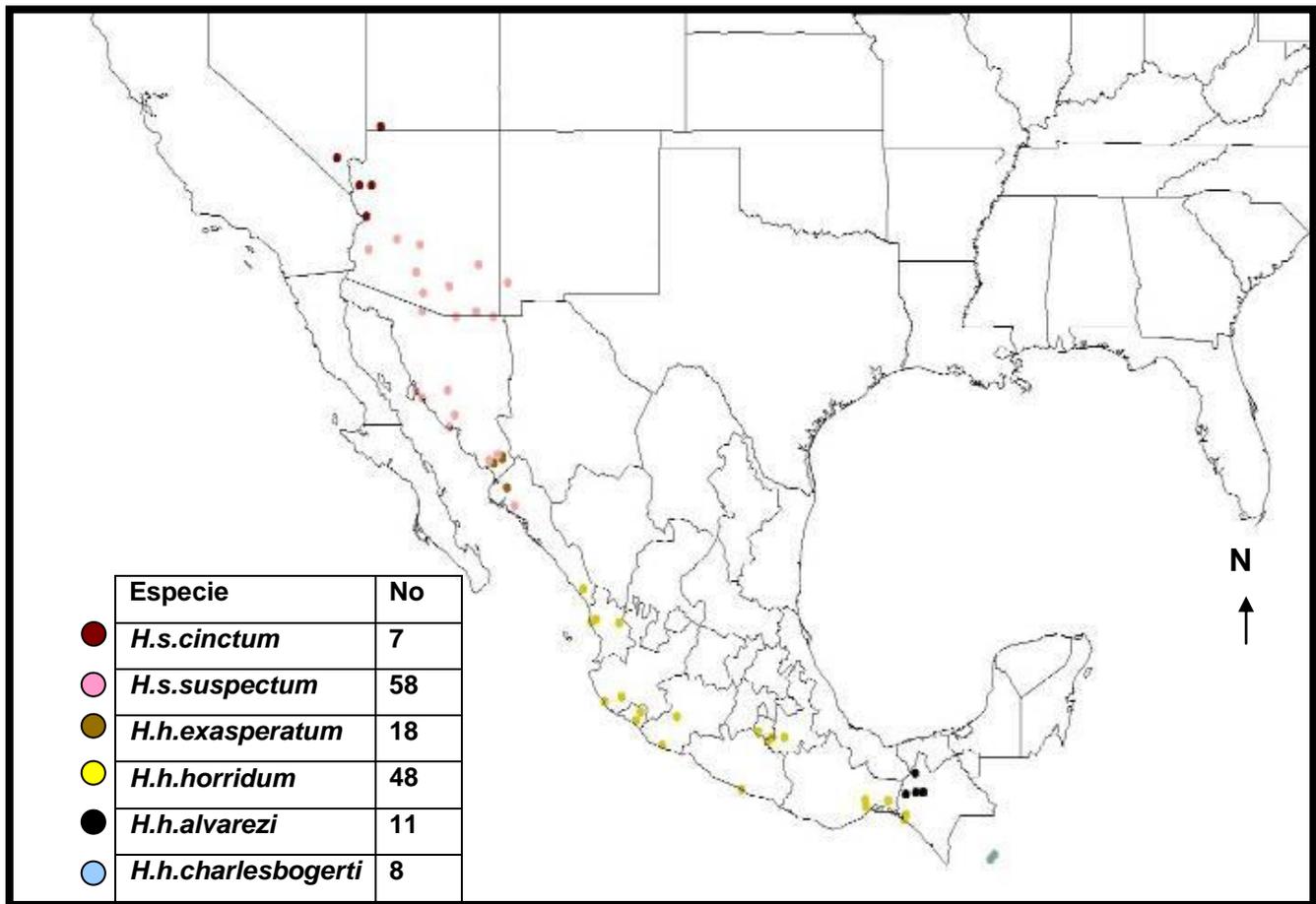
## **METODOLOGÍA**

### **PARTE 1**

#### **Revisión morfológica de ejemplares**

Se revisó detalladamente la morfología externa de 150 ejemplares (Figura 4) de todas las formas existentes del género *Heloderma*, provenientes de siete colecciones: Colección Nacional de Anfibios y Reptiles UNAM (CNAR) de Museo de Zoología Alfonso L. Herrera Facultad de Ciencias UNAM (MZFC) American Museum of Natural History (AMNH), Field Museum of Natural History ( FMNH ), Brigham Young University (BYU), University of Texas at Arlington (UTA), United States National Museum of Natural History (USNM).

Cabe mencionar que entre el material examinado se encontraban ejemplares de la serie tipo de *Heloderma suspectum suspectum*, *Heloderma suspectum cinctum*, *Heloderma horridum exasperatum* y *Heloderma horridum alvarezii*. Además de ejemplares de las localidades tipo de *Heloderma horridum horridum* y *Heloderma horridum charlesbogerti*. También se tomó un archivo fotográfico detallado de cada uno de los ejemplares con el fin de poder volver a revisar algunos caracteres en caso necesario.



**Figura 4.** Mapa que muestra los puntos de recolecta de los ejemplares utilizados para la revisión morfológica y el número de ejemplares por cada subespecie.

#### **Caracteres examinados.**

Se tomaron en cuenta los caracteres empleados en trabajos anteriores (Wiegmann, 1829; Cope, 1869; Bogert y Martín Del Campo, 1956; Campbell y Vannini, 1988), además de otros que no habían sido tomados en cuenta y que pudieran ser potencialmente informativos. Se revisaron en total 35 caracteres (cualitativos y cuantitativos) de escamación, patrón de coloración, caracteres merísticos y morfométricos (se describen abajo).

Los caracteres se examinaron con ayuda de un microscopio estereoscópico, un vernier electrónico y una regla de un metro. Éstos se tomaron en el lado

izquierdo de los ejemplares cuando no existía variación entre ambos lados, en caso contrario se registraba la condición en ambos lados del cuerpo.

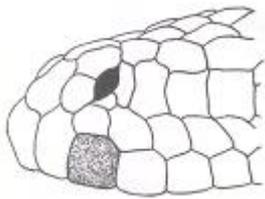
Los caracteres examinados fueron los siguientes:

### Caracteres Cualitativos.

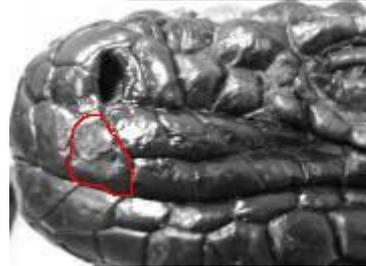
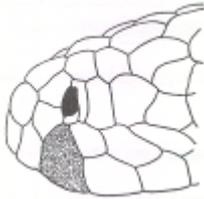
#### Escamación

1. Segunda supralabial en contacto con la prenasal o nasal.

0 = ausente.



1 = presente.

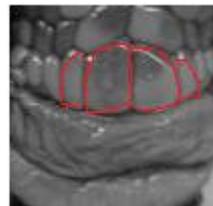


2. Escamas preanales agrandadas.

0 = ausentes.

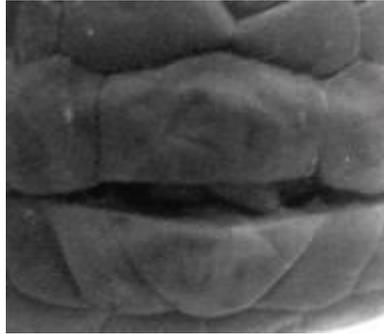


1 = presentes.



**3. Forma de la escama menta**

1 = Forma uno



2 = Forma dos



3 = Forma tres

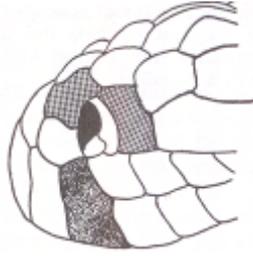


**4. Supranasal en contacto con la escama postnasal.**

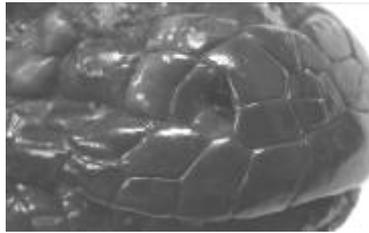
0 = Ausente o sin contacto.



1 = Presente o contacto completo.



2 = Contacto medio.



## Coloración

1. Color de las manchas.

0 = Sin manchas de colores en adultos.



1 = Manchas amarillas en adultos.

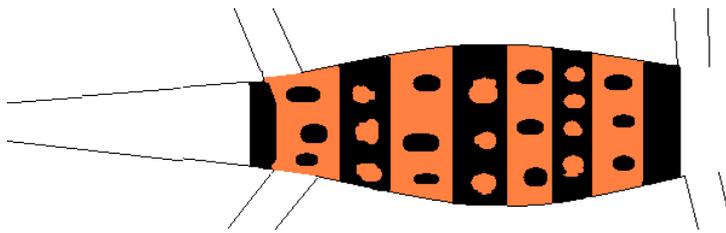


2 = Manchas rosadas en adultos.

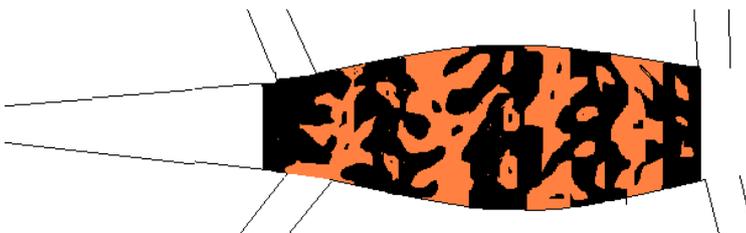


2. Patrón de coloración dorsal del cuerpo.

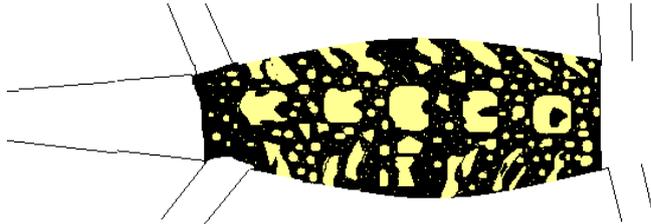
1 = Cuatro bandas claramente definidas de color negro con manchas mas o menos circulares de color rosa o anaranjado dentro de cada banda. Intercaladas con bandas claramente definidas de color rosa o anaranjado con manchas mas o menos circulares de color negro dentro de cada banda.



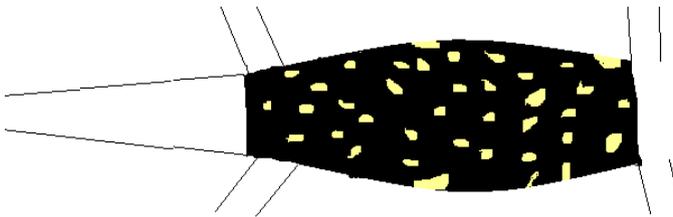
2 = Bandas reticuladas de color rosa o anaranjado con manchas irregulares de color negro. Intercaladas con bandas negras reticuladas con manchas de forma irregular de color rosa o anaranjado.



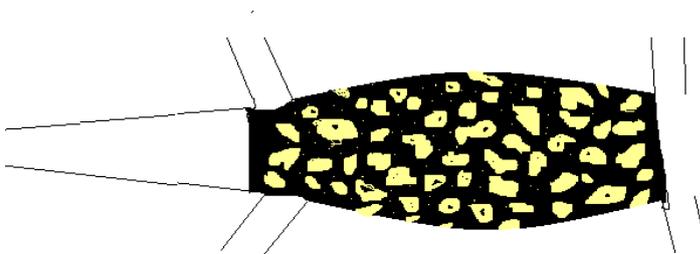
3 = Negro o marrón oscuro con un gran número de manchas amarillas y de distinto tamaño y forma que cubren casi en su totalidad el dorso, pequeñas bandas reticuladas incompletas que van desde los flancos hacia el centro.



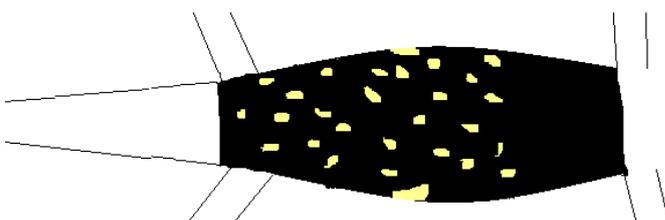
4 = Color negro o marrón oscuro, con manchas pequeñas y relativamente separadas unas de otras.



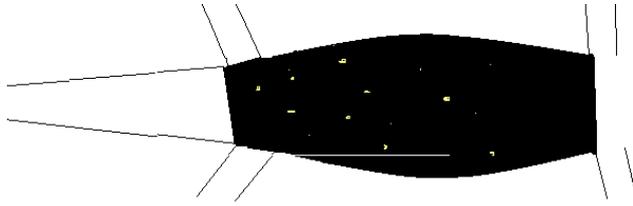
5 = Color negro o marrón oscuro, con manchas abundantes, grandes y con poca separación entre ellas.



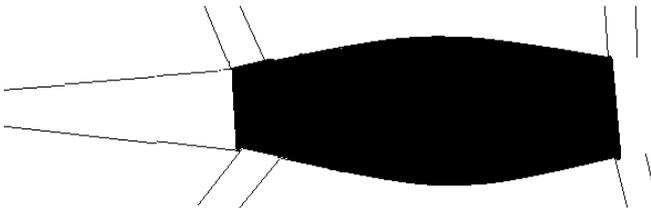
6 = Color negro o marrón oscuro, con pocas manchas pequeñas y de forma irregular que cubren el dorso desde de la cola hasta antes de la inserción de los miembros delanteros.



7 = Color negro o marrón oscuro, con muy pocas manchas o con reminiscencias de haber tenido manchas en etapa juvenil.

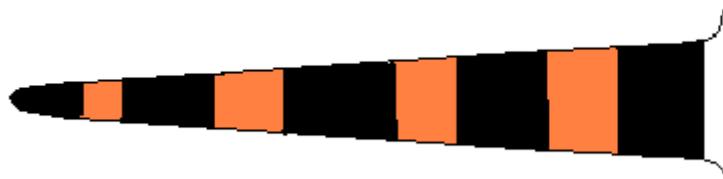


8 = Color negro oscuro con ausencia de manchas o reminiscencia de haber tenido manchas en el cuerpo.



### 3. Patrón de coloración de la cola.

1 = Cuatro anillos simples gruesos continuos y bien definidos.



2 = Cuatro anillos gruesos a veces discontinuos y no bien definidos.



3 = Tres o cuatro anillos dobles no siempre bien definidos.



4 = cinco anillos dobles a veces discontinuos y no bien definidos, intercalados con varios anillos más pequeños y con una notable abundancia de manchas pequeñas e irregulares a lo largo de toda la cola.



5 = Cinco anillos dobles a veces discontinuos y no siempre bien definidos e intercalados con anillos simples y más pequeños.



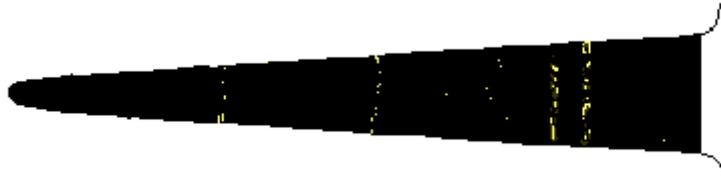
6 = Cinco anillos dobles a veces discontinuos y no siempre bien definidos. Y con pocas manchas pequeñas y de forma irregular a lo largo de toda la cola.



7 = Cuatro o cinco anillos a veces discontinuos y no siempre bien definidos.



8 = Reminiscencias de anillos o sin ellos pero con algunas manchas pequeñas e irregulares a lo largo de toda la cola.



9 = Sin anillos o reminiscencia de ellos color uniformemente oscuro.



4. Patrón de coloración de adultos.

0 = adultos con patrón de coloración distinto al de las crías.

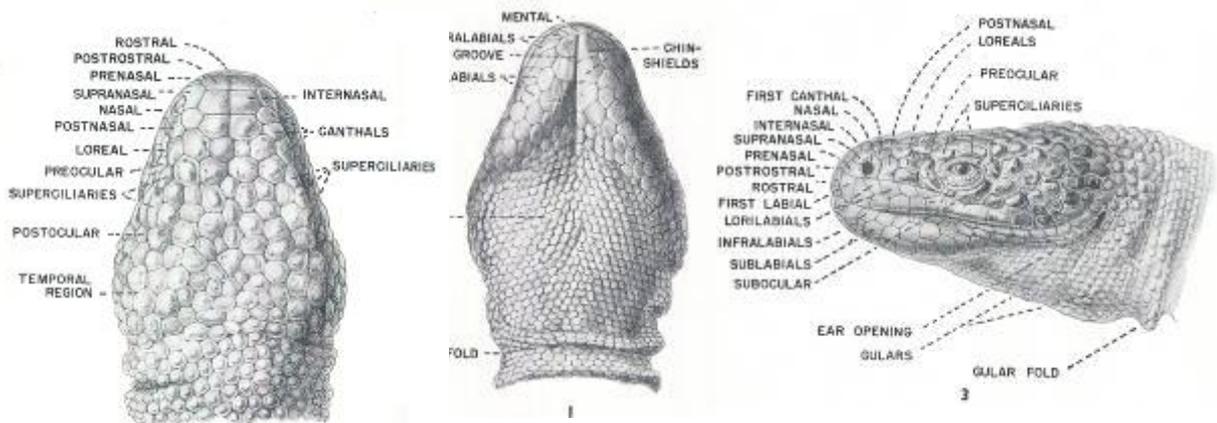
1 = adultos con patrón de coloración igual al de las crías.

## **Caracteres Cuantitativos**

### **Merísticos (Figura 5)**

1. Número de postrostrales.
2. Número de internasales.
3. Número de cantales.
4. Número de superciliares.
5. Número de loreales.
6. Número de preoculares.
7. Número de lorilabiales.
8. Número de supralabiales.
9. Número de infralabiales.
10. Número de subcaudales.
11. Número de escamas desde la zona occipital hasta las internasales.

12. Número de interorbitales.
13. Número de infralabiales en contacto con los escudos geniales.
14. Número de escudos geniales en contacto.
15. Número de hileras de escamas ventrales (desde el pliegue gular hasta la cloaca).
16. Número de hileras de escamas ventrales (desde la axila hasta la ingle).
17. Número de escamas alrededor del cuerpo.
18. Número de lamelas presentes bajo el cuarto dedo de la extremidad anterior.
19. Número de lamelas presentes bajo el cuarto dedo de la extremidad posterior.



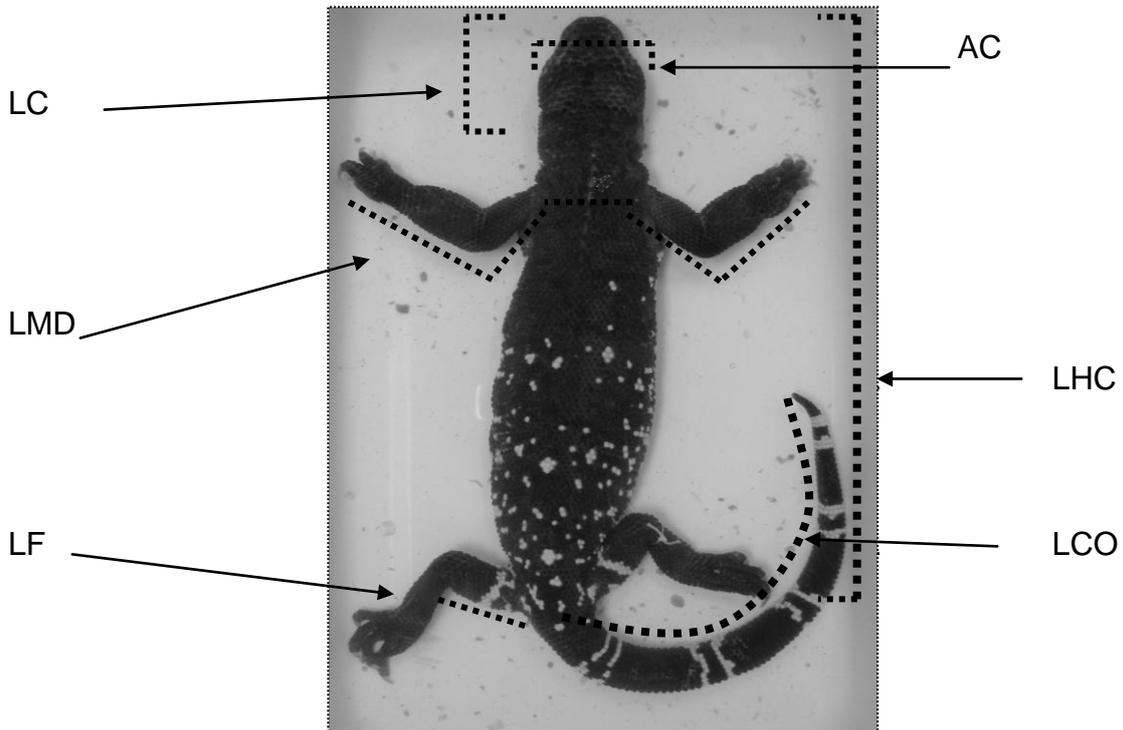
**Figura 5.** Esquema de la vista dorsal ventral y lateral de la cabeza de *Heloderma* mostrando los caracteres merísticos principales (tomado de Bogert y Martín Del Campo, 1956)

### **Morfométricos** (Figura 6).

1. Longitud hocico-cloaca (LHC). Distancia desde la punta del hocico hasta el margen distal de la cloaca.
2. Longitud de la cabeza (LC). Distancia desde la punta del hocico hasta el punto de inserción de los miembros delanteros.
3. Ancho de la cabeza (AC). Distancia entre los extremos de la región temporal donde se aprecia la región mas ancha de la cabeza.
4. Longitud de la cola. Distancia entre la cloaca y la punta de la cola. (LCO).
5. Largo del fémur (LF). Distancia desde la rodilla hasta la ingle.

6. Largo de los miembros delanteros (LMD). Distancia entre la punta del cuarto dedo de la extremidad anterior izquierda hasta la punta del cuarto dedo de la extremidad anterior derecha.

7. Largo de los miembros traseros (LMT). Distancia entre la punta del cuarto dedo de la extremidad posterior izquierda hasta la punta del cuarto dedo de la extremidad posterior derecha.



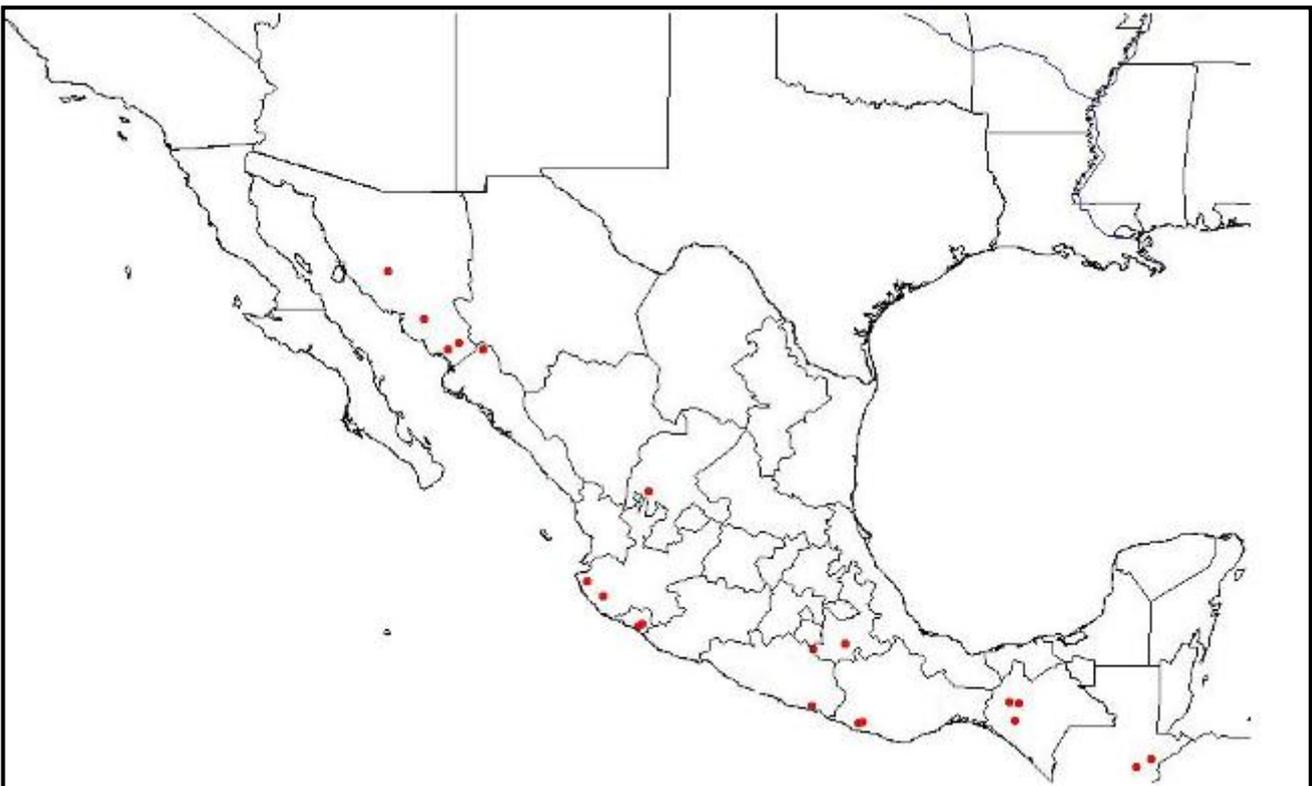
**Figura 6.** Ubicación de los caracteres morfométricos considerados en este estudio.

Con los datos obtenidos se construyó una matriz de datos para realizar el posterior análisis filogenético.

## PARTE 2

### Trabajo a nivel molecular

Debido a la escasez de tejidos preservados en colecciones científicas se trabajó con sangre preservada de ejemplares de zoológicos o colecciones privadas con datos confiables de recolecta. Además de tejidos obtenidos por la recolecta de ejemplares en el campo. En total se recolectaron 24 tejidos de todas las subespecies. (Figura 7) (Tabla 2)



**Figura 7.** Mapa que muestra los puntos de recolecta de los tejidos utilizados para el análisis molecular

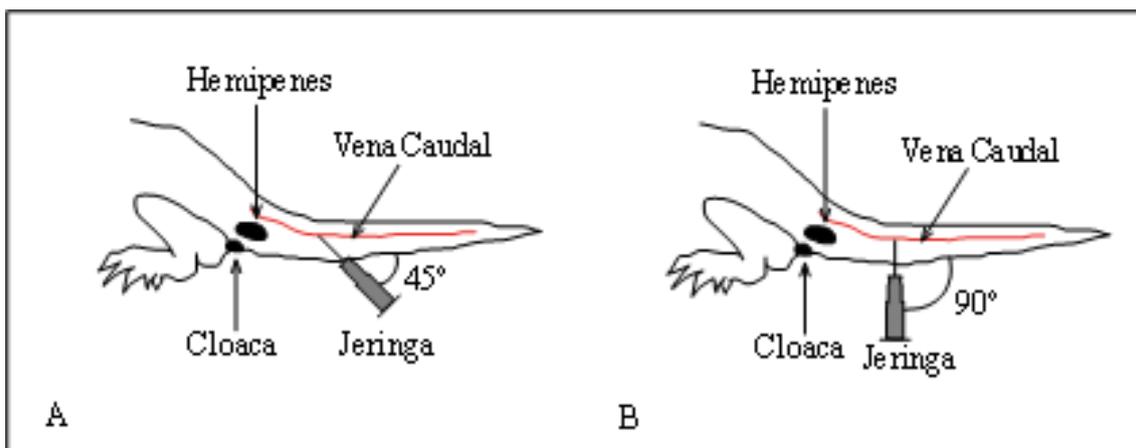
**Tabla 2.** Ejemplares utilizados para el análisis molecular.

	<b>Especie</b>	<b>País</b>	<b>Estado</b>	<b>Localidad y Municipio</b>	<b>Lugar de Procedencia</b>
1	<i>H.s.cinctum</i>	Estados Unidos	UTAH	Sin localidad	Zoológico de Atlanta
2	<i>H.s.suspectum</i>	Estados Unidos	Arizona	Sin localidad	Zoológico de Atlanta
3	<i>H.s.suspectum</i>	México	Sonora	Hornos	Centro ecológico de Sonora
	<i>H.s.suspectum</i>	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Gen Bank
4	<i>H.s.suspectum</i>	México	Sonora	Hermosillo	Centro ecológico de Sonora
5	<i>H.h.exasperatum</i>	México	Sonora	Álamos	Centro ecológico de Sonora
6	<i>H.h.exasperatum</i>	México	Sonora	Guircoba	Centro ecológico de Sonora
7	<i>H.h.horridum</i>	México	Sinaloa	Choix	Trabajo de campo
8	<i>H.h.horridum</i>	México	Zacatecas	Valparaíso	Trabajo de Campo
9	<i>H.h.horridum</i>	México	Jalisco	Tomatlan	Trabajo de Campo
10	<i>H.h.horridum</i>	México	Jalisco	Villa Purificación, Jocotlan	Museo Universum
11	<i>H.h.horridum</i>	México	Jalisco	Cihuatlan	Trabajo de Campo
12	<i>H.h.horridum</i>	México	Colima	Tecomán	Trabajo de Campo
13	<i>H.h.horridum</i>	México	Colima	Ixtlahuaca	Trabajo de Campo
14	<i>H.h.horridum</i>	México	Puebla	El Saldo, Jolalpan	Trabajo de Campo
15	<i>H.h.horridum</i>	México	Puebla	Santa Inés Ahuatempan	Trabajo de Campo
16	<i>H.h.horridum</i>	México	Oaxaca	San Pedro Tututepec	UMA mata de AJO
17	<i>H.h.horridum</i>	México	Oaxaca	Santa Rosa de Lima	UMA mata de AJO
18	<i>H.h.horridum</i>	México	Guerrero	Cópala	Trabajo de Campo
19	<i>H.h.alvarezi</i>	México	Chiapas	Tuxtla Gutiérrez	ZOOMAT
20	<i>H.h.alvarezi</i>	México	Chiapas	Villa Flores	ZOOMAT
21	<i>H.h.alvarezi</i>	México	Chiapas	Cozocuauxtla	ZOOMAT
22	<i>H.h.charlesbogerti</i>	Guatemala	Zacapa	El Arenal	Zoológico de la Aurora
23	<i>H.h.charlesbogerti</i>	Guatemala	Zacapa	San Vicente Cabañas	Universidad San Carlos
24	<i>H.h.charlesbogerti</i>	Guatemala	Zacapa	Sin Localidad	Museo de Historia Natural de Guatemala

## Extracción de Sangre

La sangre se extrajo haciendo una pequeña modificación al método de extracción de sangre para lagartijas sugerido por Birchard y Sherding (1996), según el cual la sangre se extrae de la vena caudal de la siguiente manera: La vena caudal se ubica en la línea media de la cola vista en posición ventral, cerca de 1/3 de la distancia entre la cloaca y el extremo de la cola. La aguja se coloca en un ángulo de 45° y se penetra la piel hasta alcanzar la vértebra, después se extrae la sangre lentamente mientras se hace una aspiración cuidadosa con la jeringa.

La modificación a este método consiste únicamente en el ángulo de entrada de la aguja en la cola. En este caso el ángulo de entrada fue de 90° con el fin de dañar lo menos posible el tejido muscular de la cola, Figuras 8 y 9.



**Figura 8:** Explicación del método de extracción de sangre según Birchard y Sherding (1996) (A) y el método usado para este trabajo (B).



**Figura 9:** Muestra la forma en la que se sujetaban y colocaban los organismos durante la toma de las muestras de sangre.

### **Preservación de la Sangre**

Después de la extracción de la sangre esta se preservó en tubos Eppendorf (1.5ml) diluida en buffer de lisis (25 g de SDS, 15/14 g de TRIS disueltos en un litro de agua destilada con un ph ajustado de 8.0). Se mezclaron tres volúmenes de buffer por uno de sangre (com. pers. J. W. Sites, 2003). Una vez en el laboratorio se colocaron las muestras en el refrigerador (4° C) hasta la posterior extracción de DNA.

### **Extracción del DNA**

La extracción del DNA a partir de la sangre recolectada se llevó a cabo con una modificación de la técnica usada en el Kit DNA isolation Puregene, Gentra Systems (Mineapolis MN; USA) propuesta por Fetzner (1999).

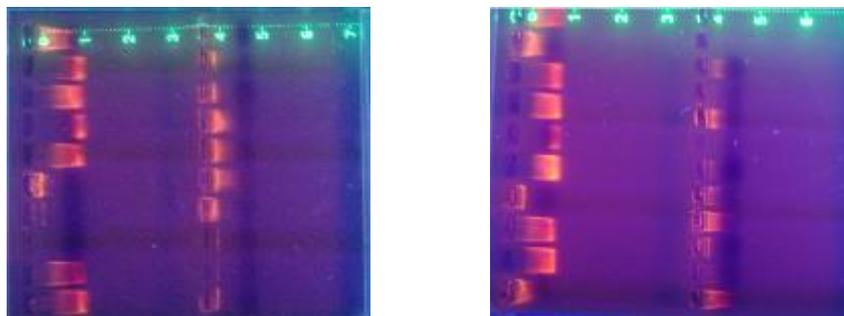
La técnica modificada es la siguiente:

1. Se colocaron de 100 a 300  $\mu$ l de sangre (Previamente preservada) en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml con 900  $\mu$ l del buffer cell Lysis (10mM Tris, 100mM EDTA, 2%SDS, pH.8.0) junto con 9  $\mu$ l de Proteinasa K (20 mg/ml). Se mezclaron minuciosamente y se pusieron en un baño maría por toda la noche a 55° C.

2. Después las muestras se pusieron a enfriar a temperatura ambiente y se les agregó 4 µl de RNasa A (10 mg/ml) poniéndolas en baño maría a 37° C por una hora.
3. Las muestras se pusieron a enfriar y se les agregó 300 µl de acetato de amonio con una concentración de 7.5 M. La muestra se agitó en el vortex por 10 segundos y se puso en hielo por 15 minutos.
4. La muestra se removió del hielo y se centrifugó a (13,000 rpm) durante 3 minutos.
5. Todo el sobrenadante posible se pasó a un tubo nuevo de 1.5 ml y se centrifugó nuevamente por 3 minutos.
6. El sobrenadante obtenido de la segunda centrifugación se transfirió a un nuevo tubo de 2 ml. que contenía 900 µl de isopropanol, se invirtió suavemente 20 veces (dependiendo si el pellet fue observado después de la adición de el supranadante al isopropanol, la muestra además podía colocarse a -20°C por toda la noche). Luego se centrifugó a (16,000 rpm) durante 2 minutos para obtener el pellet de DNA en el fondo del tubo.
7. Después de la centrifugación, el isopropanol es vertido fuera y el pellet se lavó con 500 µl de etanol al 70%. La muestra se re-centrifugó por otros 2 minutos. El etanol se removió y los tubos se dejaron abiertos a temperatura ambiente hasta que los restos de etanol se evaporaron.
8. El pellet de DNA se resuspendió en 30 - 100 µl de H<sub>2</sub>O, dependiendo del tamaño del pellet.
9. Finalmente la muestra se mantuvo refrigerada a 4° C.

Una vez realizado el proceso de extracción, se verificó la calidad y cantidad de DNA genómico corriendo 1.5 µl de la muestra mezclada con 1.5 µl de azul de bromofenol (1x) en un gel de agarosa al 1% (0.4 gr de agarosa en 40 ml de

TAE buffer), al gel se le agregó 4.5 µl de bromuro de etidio a una concentración de 1000 ul/ml, la visualización del gel se llevó a cabo por medio de un transluminador de luz ultravioleta (Figura 10).



**Figura 10.** Visualización de un gel de agarosa después del proceso de electroforesis donde se observa el DNA obtenido de las muestras de sangre recolectadas hasta el momento.

### **Amplificación del DNA por medio la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se amplificó un fragmento de aproximadamente 893 pb que corresponde a un fragmento del gen mitocondrial ND4 y a tres tRNAs ( tRNA<sub>his</sub>, tRNA<sub>ser</sub>, tRNA<sub>leu</sub>) usando los primers (5` TGACTACCAAAGCTCATGTAGAAGC 3`) y LEU (5` TCTTTTACTTGGATTGACCA 3`; Arevalo *et al.* 1994). Bajo las siguientes condiciones: 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94° C por 30 segundos, de acoplamiento a 48° C por 30 segundos, de extensión a 70° C por cinco minutos y una extensión final a 75° C por cinco minutos.

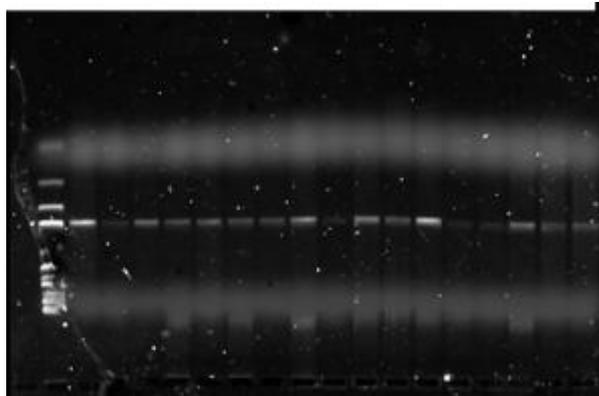
Las reacciones se realizaron en un volumen total de 25 µl usando las siguientes cantidades y concentraciones:

- 0.5 µl Primer 1 (10 mM)
- 0.5 µl Primer 2 (10 mM)
- 2.5 µl Buffer de amplificación (10x)
- 1.2 µl Buffer de Mg Cl<sub>2</sub> (10mM)

1.2  $\mu$ l DNTPs (10mM)

0.13  $\mu$ l de Taq polimerasa (5unid/ml) (Taq DNA polimerase recombinant Invitrogen).

Una vez realizada la reacción de PCR se verificó la calidad y cantidad de los productos amplificados corriendo 2  $\mu$ l de la muestra con 1  $\mu$ l de azul de bromofenol (1x) en un gel de Agarosa al 1% (0.4gr de Agarosa en 40ml de TAE buffer) al gel se le agregó 4.5  $\mu$ l de bromuro de etidio a una concentración de 1000  $\mu$ l/ml., la visualización del gel se llevó a cabo por medio de un transluminador de luz ultravioleta. (Figura 11)



**Figura 11.** Gel de agarosa (1%) después del proceso de electroforesis donde se observa el fragmento amplificado de aproximadamente 1000 pb correspondiente al GEN ND4.

## **Purificación y secuenciación**

Los productos amplificados se purificaron siguiendo la técnica de Polietylen Glycol (PEG) la cual precipita los fragmentos de DNA de menor tamaño separando las moléculas de DNA de otras partículas orgánicas como exceso de proteína, sales, nucleótidos libres y otros residuos, conservando únicamente los fragmentos deseados (Hillis *et al.* 1996).

## **Secuenciación**

Con los fragmentos purificados se llevaron a cabo las reacciones de secuenciación utilizando el kit de secuenciación Big Dye v. 3. 1 (Applied Biosystems). La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático de capilar modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems).

## **Edición y Alineamiento de las Secuencias**

Las secuencias se editaron con el programa Staden Package v. 1.5.3 (Staden, *et al.* 1998) y fueron alineadas con el programa CLUSTAL X v. 1.81 (Thompson *et al.* 1997), los alineamientos obtenidos fueron corregidos manualmente con ayuda del programa MEGA version 2.1 (Tamura *et al.* 2007) Con las secuencias alineadas se construyó la matriz de datos para el posterior análisis filogenético.

## **PARTE 3**

### **Análisis Filogenético. (Morfológico)**

Se revisaron un total de 150 ejemplares los cuales fueron divididos en 29 OTU'S terminales, correspondientes a grupos de poblaciones geográficamente cercanas y con morfología similar. Como grupo externo se utilizó a un ejemplar de la familia Xenosauridae (*Xenosaurus grandis*) y un ejemplar de la familia Anguidae (*Gerrhonotus liocephalus*), ya que estas dos familias han sido consideradas como familias estrechamente relacionadas con Helodermatidae (Townsend *et al.* 2004; Kumazawa, 2007)

Debido a que algunos de los caracteres morfológicos analizados presentaban variación dentro de los taxones terminales (caracteres polimórficos) estos fueron codificados utilizando la técnica de Generalized Frequency Coding (GFC) propuesta por Smith y Gutberlet (2001). Este método incorpora las metodologías propuestas por Thiele (1993) y Wiens (1995) de pesaje de caracteres y codificación por frecuencias, por lo que cual es aplicable tanto a caracteres cuantitativos como a cualitativos, ya sean binarios o no.

Dicha metodología divide a los caracteres polimórficos multiestado en subcaracteres con el objetivo de que cada estado observable sea tratado por si mismo como un carácter, codificando la variación dentro de cada carácter usando la tabla de frecuencias de Wiens (1995), asignándoles peso dependiendo de su contribución dentro del análisis, de manera que su contribución total sea igual a la de un carácter no polimórfico.

Siguiendo esta metodología la matriz obtenida por la revisión morfológica de ejemplares se trató mediante el programa Fast Morphology 1.0 (Chang y Smith, 2001). Este programa realiza un análisis de los datos tanto por taxón como por carácter para codificar los caracteres como grupos de subcaracteres pesados incluyendo la variación intraespecífica que existe en cada taxón, con lo cual construye una segunda matriz de especies por subcaracteres pesados que es mas grande que la original. Este programa está diseñado para incluir cualquier tipo de caracteres polimórficos convirtiendo la matriz original de datos en una matriz de subcaracteres en formato NEXUS. Con ayuda del programa PAUP versión 4.0b10 (Swofford, 2002) se analizó la matriz de subcaracteres obtenida.

El programa Fast Morphology genera dos sets de caracteres All Freq (asume que los caracteres no son ordenados) y All CumF (asume que los caracteres son ordenados) en este caso se escogió el set de datos All Freq (asumiendo que los caracteres no son ordenados). El programa también genera dos tipos distintos de pesaje para cada uno de los subcaracteres. USW (unequal subcharacter weighting) y ESW (equal subcharacter weighting). USW asume

que los estados raros dentro de los caracteres (los cuales poseen frecuencias bajas) tienen información filogenética importante, por lo tanto los subcaracteres presentan pesos diferentes. Por otra parte ESW asigna pesos iguales a los subcaracteres derivados de un solo carácter, asumiendo que los estados raros y los estados que ocurren en frecuencias altas presentan la misma importancia. En este caso se utilizó ESW.

El análisis se realizó bajo el criterio de máxima parsimonia utilizando el programa PAUP 4.0 b10 (Swofford, 2002), mediante una búsqueda heurística, utilizando el algoritmo de intercambio de ramas de TBR (tree bisection and reconnection) con 1000 réplicas de secuencia de adición de taxones al azar. Posteriormente se realizó un análisis de bootstrap con 1000 pseudoréplicas; cada pseudoréplica consistió en una búsqueda heurística con 100 réplicas de adición de secuencias al azar y TBR. Esto con la finalidad de evaluar la robustez de los clados resultantes.

### **Análisis Filogenético. (Datos moleculares)**

El análisis se realizó a partir de la matriz elaborada con las secuencias alineadas además de las secuencias de *Varanus niloticus* (YP\_980239), *Barisia imbricata* (AY660760.1) y *Xenosaurus grandis* (UGV4092) utilizadas como grupo externo (Townsend *et al.* 2004; Kumazawa, 2007).

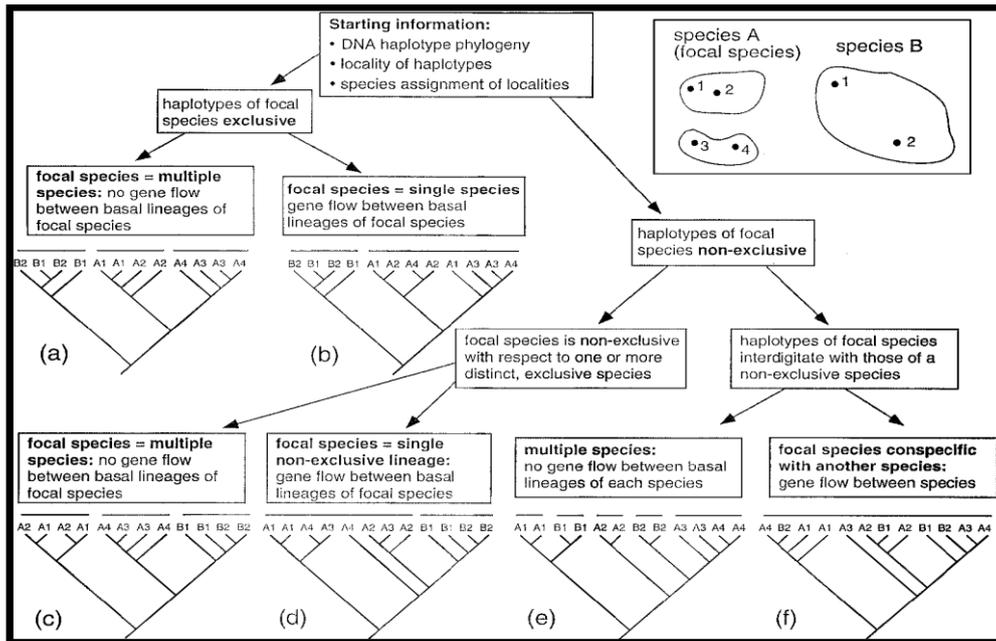
Al igual que con el conjunto de datos morfológicos, la búsqueda se realizó bajo el criterio de máxima parsimonia utilizando el programa PAUP 4.0 b10 (Swofford, 2002), mediante una búsqueda heurística, utilizando el algoritmo de intercambio de ramas de TBR (tree bisection and reconnection) con 1000 réplicas de secuencia de adición de taxones al azar. Los "Gaps" se trataron como datos faltantes y como 5º estado sin que se encontrara diferencia en la topología de los árboles resultantes. Para evaluar el soporte de los clados se aplicó un análisis de Bootstrap con 1000 pseudoréplicas; cada pseudoréplica consistió en una búsqueda heurística con 100 réplicas de adición de secuencias al azar y TBR.

También se realizó un análisis bajo el criterio de inferencia Bayesiana con ayuda del programa Mr Bayes 3.1 (Huelsenbeck y Ronquist 2001). Para este análisis se delimitaron cuatro particiones (Tabla 3), el modelo de evolución para cada una de las particiones se eligió mediante el programa Model test ver 3.7 (Posada y Crandall, 1998). Para el análisis bayesiano se realizaron dos análisis simultáneos con 5000000 de generaciones empleando cuatro cadenas de Markov con una temperatura de la cadena calentada de 0.2. En cada análisis se muestrearon los árboles cada 1000 generaciones. Un árbol de consenso de mayoría (50%) fue obtenido a partir de los árboles muestreados excluyendo los árboles eliminados como burn-in. Estos árboles se obtuvieron al graficar el número de generaciones vs  $-\ln L$ , después de obtener la gráfica se eliminan los árboles anteriores a la estabilidad de la curva. La robustez de los clados se evaluó mediante las probabilidades posteriores para cada nodo.

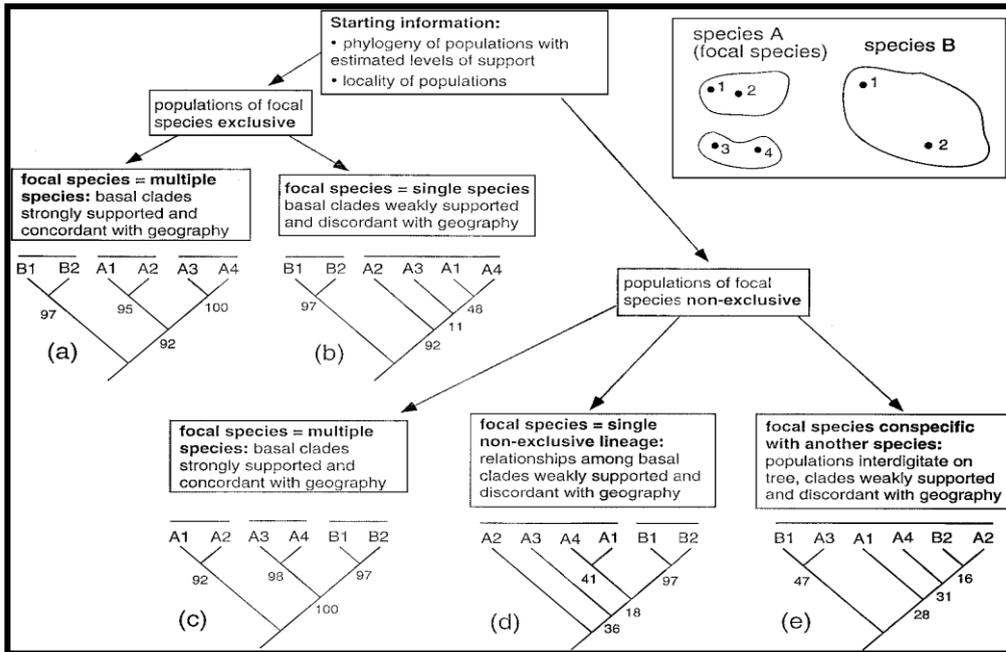
**Tabla 3.** Particiones realizadas para el análisis de inferencia bayesiana y el modelo utilizado para cada partición.

<b>Partición</b>	<b>Modelo de evolución nucleotídica</b>
<b>ND4 1ª posición</b>	TVM + G
<b>ND4 2ª posición</b>	HKY + I +G
<b>ND4 3ª posición</b>	TrN +G
<b>tRNAs</b>	HKY + G

Para evaluar los límites de las especies se utilizó el método sugerido por Wiens y Penkrot (2002). Por medio de este método se pueden evaluar hipótesis de filogenias de haplotipos (datos moleculares) o de poblaciones (datos morfológicos) con localidades conocidas, a través de una clave dicotómica que permite distintas alternativas para tomar decisiones a nivel de especie. (Figuras 12 y 13).



**Figura 12.** Ejemplo hipotético del protocolo de delimitación de especies con datos moleculares propuesto por Wiens y Penkrot (2002). El ejemplo involucra a dos especies, una con dos poblaciones disyuntas (especie A), la otra con una población contigua (Especie B). Se tienen muestras de dos individuos de cada población (por ejemplo: A1= haplotipo de la localidad 1 de la especie A) La línea sobre los taxones terminales indica los límites de especies.



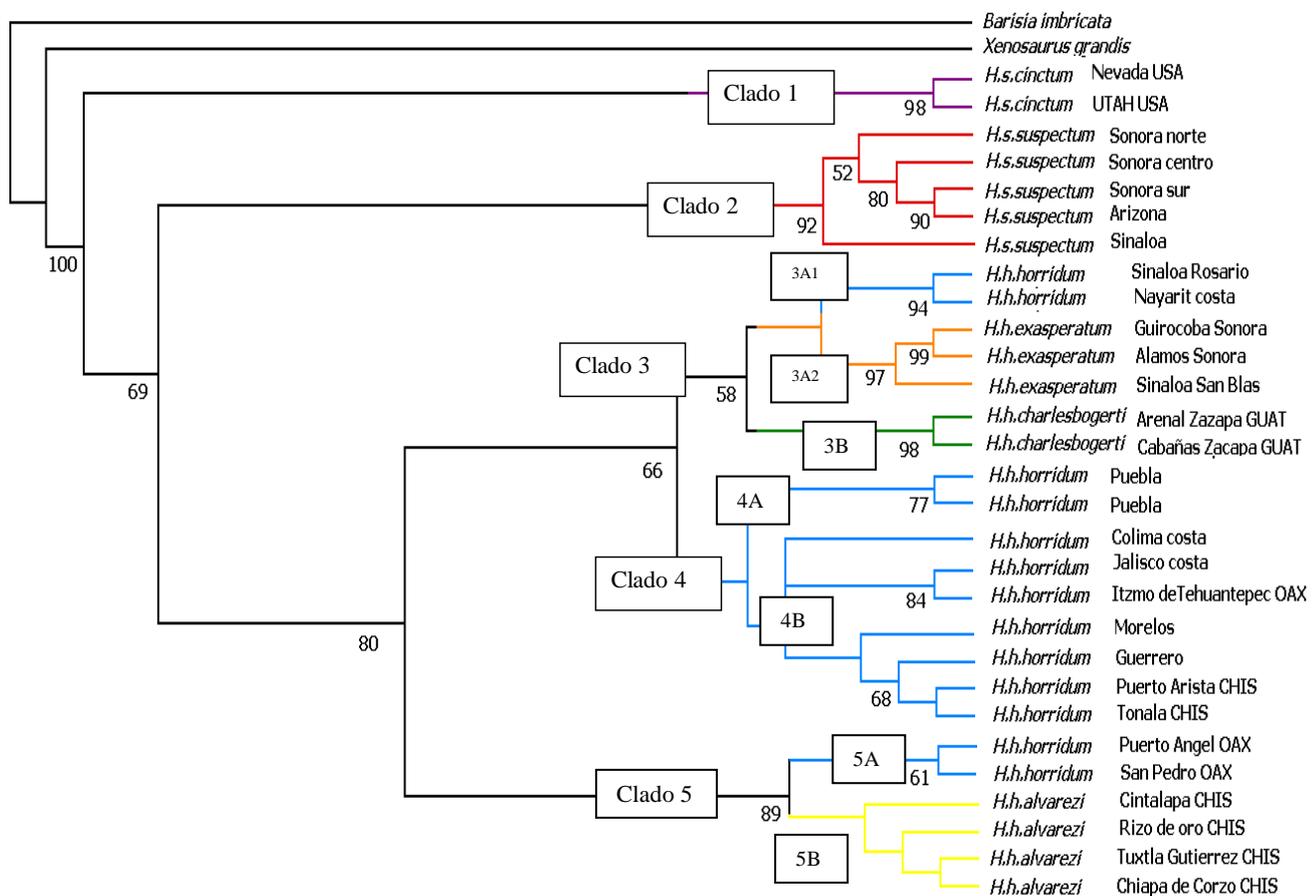
**Figura 13.** Ejemplo hipotético del protocolo de delimitación de especies con datos morfológicos propuesto por Wiens y Penkrot (2002). El ejemplo involucra a dos especies, una con dos poblaciones disyuntas (especie A), la otra con una población contigua (Especie B). La línea sobre los taxones terminales indica los límites de especies. Los números en los nodos indican valores hipotéticos de bootstrap.

Una vez identificados los linajes en la hipótesis filogenética se realizó una matriz de distancias génicas entre los grupos identificados con ayuda del programa MEGA version 2.1 (Tamura *et al.* 2007). El análisis fue conducido usando el el Modelo de Kimura-2 incluyendo todas las posiciones.

## RESULTADOS.

### Análisis filogenético con caracteres morfológicos

La búsqueda heurística de la matriz de 706 caracteres (276 caracteres constantes, 206 caracteres informativos y 224 caracteres no informativos) dió como resultado un total de tres árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 553.62 pasos, un índice de consistencia CI = 0.7767 y un índice de retención RI = 5572. Se realizó un árbol de consenso estricto de los tres árboles obtenidos (Figura 14).



**Figura 14.** Árbol de consenso estricto obtenido a partir de los tres árboles más parsimoniosos, utilizando caracteres morfológicos. Los números bajo los nodos indican el valor de bootstrap, los nodos sin número indican que el valor de bootstrap fue menor a 50.

En el cladograma de consenso a partir de los datos morfológicos se pueden observar cinco clados principales.

El clado uno es el más basal con respecto al resto de las especies; presenta un valor de bootstrap de 98 y está conformado por las poblaciones *H. s. cinctum* de Nevada y Utah, Estados Unidos de América. Este se presenta como grupo hermano del resto de las subespecies que se encuentran al interior del otro gran clado que incluye a su vez a los clados dos, tres, cuatro y cinco.

El clado dos se encuentra resuelto con un valor de bootstrap de 92 y está formado por las poblaciones de *H. s. suspectum* de Arizona, Sonora y Sinaloa, y se presenta como el grupo hermano del clado que incluye todas las poblaciones de *H. horridum*.

El clado tres con valor de bootstrap de 58, está formado a su vez por dos clados el primero (3A) contiene a las poblaciones de *H. h. exasperatum* de Sonora y Sinaloa con un valor de bootstrap de 97 dentro del clado (3A1) que a su vez forma el grupo hermano de las poblaciones de *H. h. horridum* de Nayarit y Sinaloa (clado 3A2) con 94 de bootstrap. El segundo de estos clados (3B) está formado por las poblaciones de *H. h. charlesbogerti* de Guatemala y tiene un valor de bootstrap de 98 El clado tres forma el grupo hermano del clado cuatro.

El clado cuatro presenta un valor de bootstrap menor a 50, está formado por distintas poblaciones de *H. h. horridum* y se divide a su vez en dos clados; el primero de éstos (4A), está formado por las poblaciones de Puebla y tiene un valor de 77 de bootstrap; en el segundo (4B) se encuentra una politomía entre tres grupos, por un lado la población de la costa de Colima, en el otro grupo las poblaciones de la costa de Jalisco e Istmo de Tehuantepec con valor de 84 en el bootstrap, y el tercer grupo formado por las poblaciones de Guerrero, Morelos y costa de Chiapas.

Finalmente el clado cinco con valor de 89 de bootstrap (grupo hermano del clado que incluye a los clados tres y cuatro), se encuentra dividido a su vez en dos clados; el primero (5A) con un valor de 61, incluye a las poblaciones de

*H.h.horridum* de la costa de Oaxaca (San Pedro Tututepec y Pto Ángel.) que aparecen como grupo hermano del clado (5B) formado por las poblaciones de *H. h. alvarezii* de la región central de Chiapas con un valor menor a los 50.

*Heloderma suspectum*, aparece como un grupo polifilético y las dos subespecies con sus poblaciones correspondientes, están agrupadas en dos clados diferentes. Por un lado las poblaciones de *H. s. cinctum* (Nevada y Utah) se encuentran en el clado uno. Las poblaciones de *H. s. suspectum* (Sonora, Sinaloa y Arizona) constituyen el clado número dos con valor de bootstrap de 92; al interior de este grupo no existe una concordancia geográfica.

De acuerdo con esta hipótesis, las poblaciones de *H. horridum* forman entre sí un grupo exclusivo soportado con un valor de 80 en bootstrap, en cuanto a las poblaciones de *H. h. horridum* aparecen asociadas a tres clados distintos. Por un lado se encuentra la población de Rosario Sinaloa y la costa de Nayarit (clado 3A1) que aparece filogenéticamente más cercana a las poblaciones de *H. h. exasperatum*. Por otra parte se encuentra el clado número 5A donde se agrupan las poblaciones de La costa de Oaxaca (Puerto Ángel y San Pedro Tututepec) apareciendo como grupo hermano de las poblaciones de *H. h. alvarezii*. El resto de las poblaciones de *H. h. horridum* constituyen el clado número cuatro.

Por su parte las poblaciones de *H. h. exasperatum* se encuentran formando un grupo exclusivo dentro del clado 3 A2 con un valor alto de bootstrap (97) y como ya se mencionó anteriormente forma el grupo hermano de las poblaciones de *H. h. horridum* del norte (Sinaloa y Nayarit).

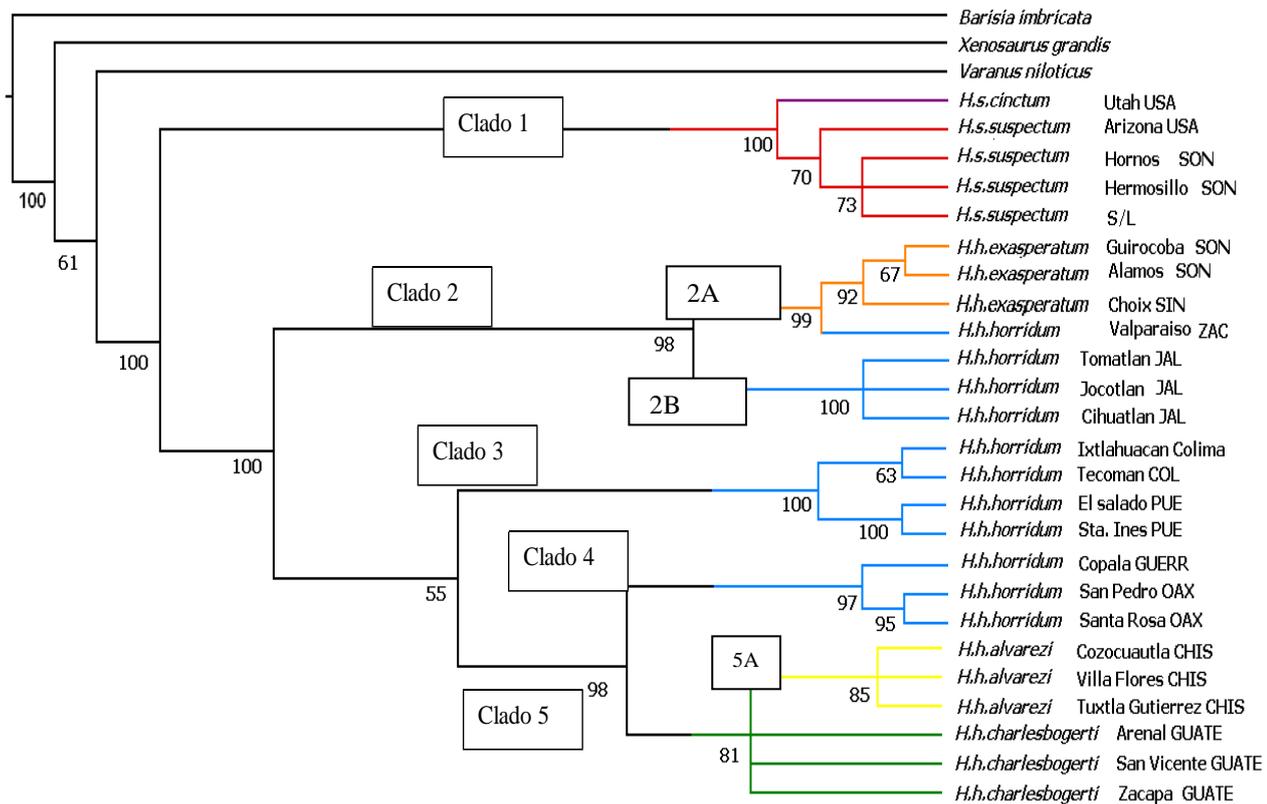
Con relación a las poblaciones de *H. h. alvarezii*, estas forman un grupo exclusivo dentro del clado 5B con valores bajos de bootstrap (menores a 50) y forman el grupo hermano de las poblaciones de *H. h. horridum* de la costa de Oaxaca.

Las poblaciones de *H. h. charlesbogerti* se encuentran como un grupo exclusivo dentro del clado tres en el clado 3B con un valor alto de bootstrap y

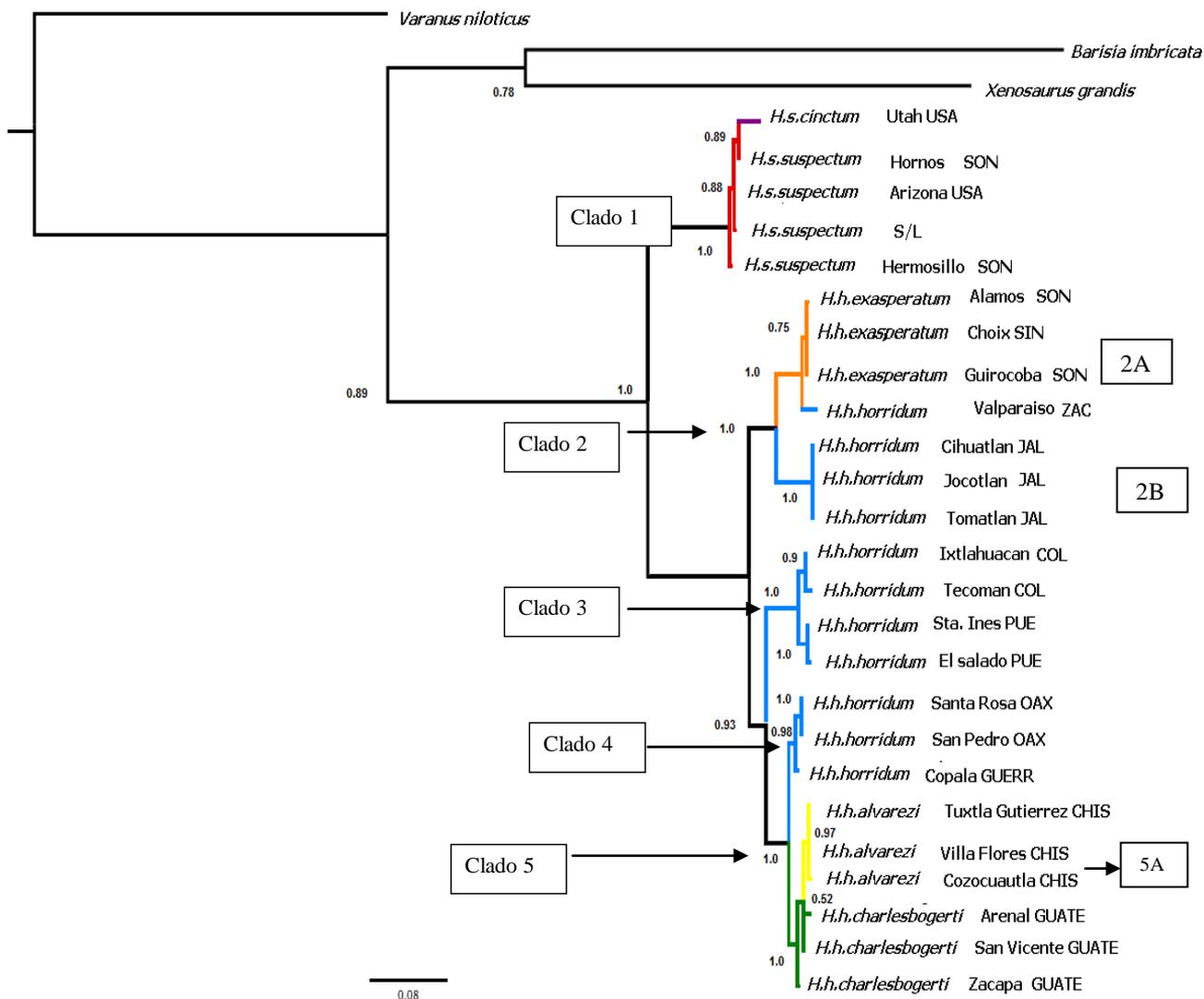
formando un grupo hermano del clado 3A, cuestión que no presenta ninguna congruencia geográfica.

### Análisis filogenético con caracteres moleculares.

La búsqueda heurística bajo el criterio de máxima parsimonia con la matriz de 873 caracteres moleculares (235 constantes, 324 no informativos y 314 informativos) dió como resultado un total de 406 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 1048 pasos, un IC = 0.843 y un IR = 0.854 (Figura 15). El cladograma obtenido por medio del criterio de inferencia bayesiana se muestra en la Figura 16.



**Figura 15.** Árbol de consenso estricto obtenido a partir de los 406 más parsimoniosos. Los números grandes bajo los nodos indican el valor de bootstrap, Los nodos sin número indican que el valor de bootstrap fue menor a 50.



**Figura 16.** Árbol de consenso de mayoría obtenido a partir del análisis bayesiano, los números representan el valor de probabilidad posterior. Los nodos sin número indican que el valor fue menor a 0.50 de probabilidad posterior.

Debido a que la topología de los árboles obtenidos con los métodos de parsimonia y distancias bayesianas son prácticamente iguales, se describen en conjunto. Se pueden observar cinco clados principales en ambas hipótesis (Figuras 15 y 16). En la hipótesis de parsimonia el clado número uno presenta un valor de bootstrap de 100. Dentro de éste y de forma basal se encuentra el haplotipo de *H. s. cinctum*, como grupo hermano del clado que contiene a los haplotipos de *H. s. suspectum* de Arizona y Sonora. El clado número uno se recupera también en la hipótesis bayesiana con un valor de probabilidad

posterior de 1.0, sin embargo a su interior las relaciones son diferentes pues *H. s. suspectum* se encuentra como un grupo parafilético respecto a *H. s. cinctum*, ya que el haplotipo de *H. s. cinctum* de Utah se encuentra formando el grupo hermano del haplotipo de Hornos Sonora. Esta relación se encuentra soportada con un valor de probabilidad posterior de 0.89. En ambas hipótesis el clado número uno forma el grupo hermano del clado que contiene a todos los haplotipos de las subespecies de *H. horridum*.

El clado número dos se encuentra resuelto con un valor de bootstrap de 98 y de 1.00 de probabilidad posterior. A su vez este clado contiene los clados 2A y 2B; el primero está formado por los haplotipos de *H. h. exasperatum* de Sonora y Sinaloa además del haplotipo de *H. h. horridum* de Valparaíso, Zacatecas. Este clado presenta valores altos de bootstrap (100) y de probabilidad posterior (1.00). Por otra parte el clado 2B con valores de 100 y 1.00 de bootstrap y probabilidad posterior respectivamente, contiene una politomía entre los tres haplotipos de *H. h. horridum* de Jalisco (Jocotlán, Tomatlán, Cihuatlán). El clado número dos forma el grupo hermano del grupo que incluye a los clados tres, cuatro y cinco (haplotipos de *H. h. horridum* del centro y sur además de los haplotipos de *H. h. alvarezi* y *H. h. charlesbogerti*).

El clado número tres tiene un valor de 100 de bootstrap y de 1.00 de probabilidad posterior. Está formado a su vez por dos sub clados con valores altos de bootstrap y probabilidad posterior con poblaciones de *H. h. horridum*. El primero que contiene a los haplotipos de Ixtlahuacán y Tecomán, Colima (63 y 0.9). El clado formado por los haplotipos del Rancho el Salado y Santa Inés Ahuatempan, Puebla (100 y 1.00). El clado número tres se presenta en la base y como grupo hermano del grupo que incluye a los clados cuatro y cinco, relación que está soportada por un valor alto de probabilidad posterior (0.98) aunque para el bootstrap el valor es bajo (55).

Dentro del clado cuatro se encuentran los haplotipos de *H. h. horridum*, pertenecientes a la costa sur de Guerrero (Copala) y Norte de Oaxaca (San Pedro Tututepec y Santa Rosa de Lima). Presenta valores altos tanto en

bootstrap (97) como en probabilidad posterior (0.98) y forman el grupo hermano del clado cinco.

Finalmente el clado número cinco con valores de 81 en bootstrap y 1.0 de probabilidad posterior difiere en su interior entre ambas hipótesis, por un lado en la hipótesis de parsimonia está formado en su base por una politomía entre los tres haplotipos de *H. h. charlesbogerti* y el clado 5A que a la vez tiene un valor de 85 de bootstrap y y que incluye a los haplotipos de *H. h. alvarezi*. Mientras que en la hipótesis bayesiana si bien *H. h. alvarezi* se encuentra también como grupo exclusivo con valor de 0.97 en el clado 5<sup>a</sup> este clado forma una politomía en su base con los haplotipos de Arenal y San Vicente, mientras que el haplotipo de Zacapa es basal a este grupo; esto tiene la consecuencia de que *H. h. chalesbogerti* se podría interpretar como un taxón parafilético.

*H. suspectum* se presentan como un grupo exclusivo con valores altos tanto de bootstrap (100) como de de probabilidad posterior (1.0) pero no es posible evaluar el estatus taxonómico de las subespecies *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum* debido a que solo se cuenta con un haplotipo de *H.s.cinctum* para este estudio. Además de que la posición del único haplotipo de *H. s. cinctum* es distinta en ambas hipótesis.

En las dos hipótesis basadas en datos moleculares los haplotipos de *H. horridum* forman un grupo exclusivo con un valor alto de Bootstrap y de probabilidad posterior (100 y 1.00 respectivamente). En cuanto a los haplotipos de *H. h. horridum* podemos observar que se presentan como un grupo polifilético (no exclusivo) dentro del cual pueden observarse tres linajes sin aparente flujo genético entre ellos y representados por los clados 2B, 3 y 4.

Los haplotipos de *H. h. exasperatum* junto con el haplotipo de Valparaiso Zacatecas forman un grupo exclusivo (2A) y hermano del clado que incluye los haplotipos de Jalisco de *H. h. horridum* (2B). Los haplotipos de *H. h. alvarezi* forman un grupo exclusivo en ambas hipótesis (5A), sin embargo *H. h. charlesbogerti* se encuentra formando una politomia con el clado que contiene los haplotipos de *H. h. alvarezi* en la hipótesis de parsimonia mientras que en la

hipótesis bayesiana se encuentra como parafilético con respecto a a *H. h. alvarezii*

### **Distancias génicas**

Las distancias génicas se calcularon entre los grupos de haplotipos identificados en las hipótesis con datos moleculares *H. s. cinctum*, *H. s. suspectum*, (haplotipos de Arizona y Sonora), *H. h. exasperatum* (incluyendo los haplotipos de Sonora, Sinaloa y el haplotipo de *H. h. horridum* de Zacatecas), *H. h. horridum* del norte (incluye a los haplotipos de Jalisco), *H. h. horridum* del centro (incluye a los haplotipos de Colima y Puebla), *H. h. horridum* del Sur (incluye los haplotipos de Guerrero y Oaxaca), el grupo de *H. h. alvarezii* (haplotipos de Chiapas) y el grupo de *H. h. charlesbogerti* (haplotipos de Guatemala).

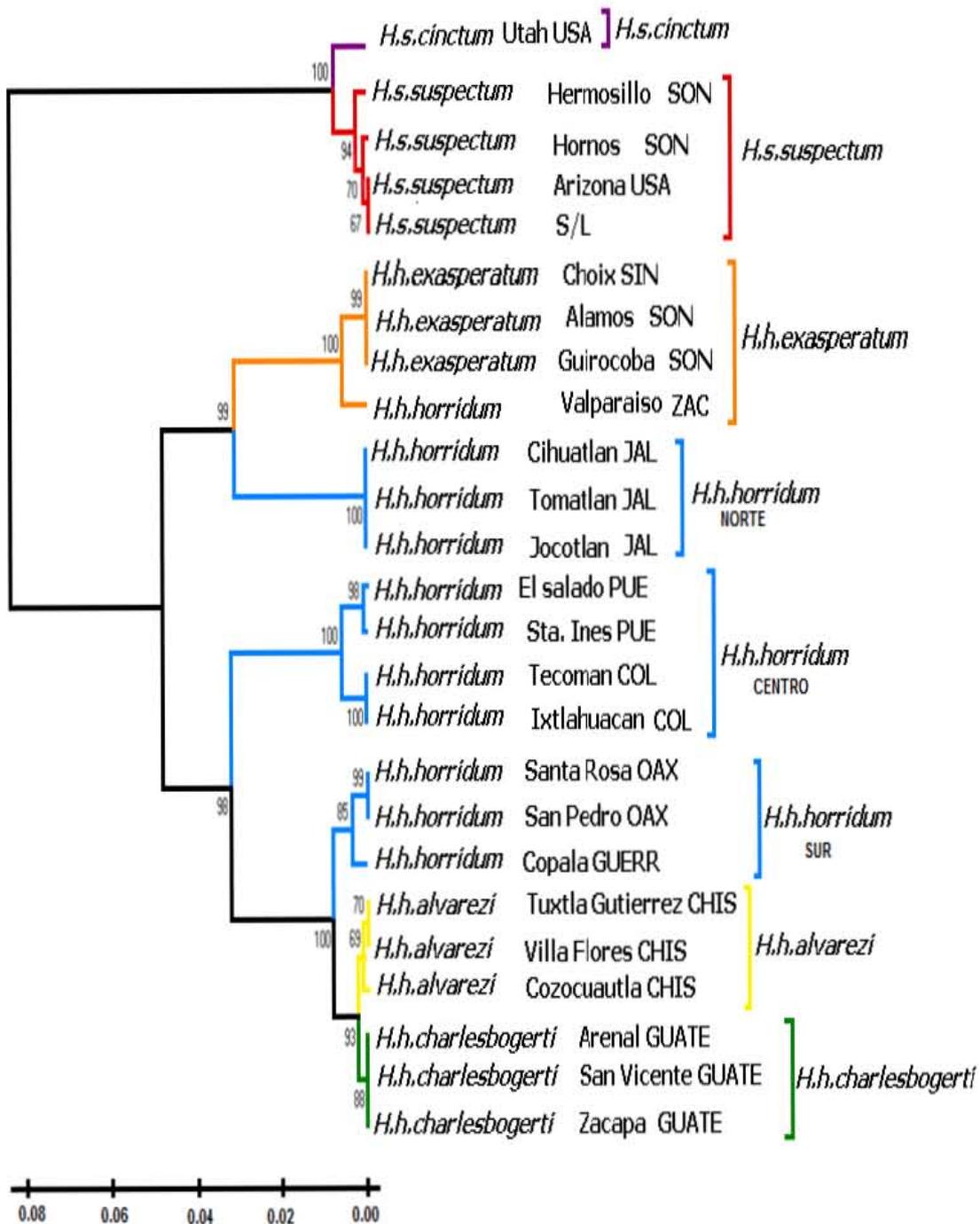
En cuanto a las distancias génicas calculadas (Tabla 4) se observa que los valores más altos de distancia se dan entre los linajes del grupo externo y los linajes del grupo de estudio con valores por encima de 0.4, por otra parte en general los valores de distancia al interior del grupo son bajos.

Sin embargo, los valores más altos de distancia dentro del grupo de estudio se encuentran entre los linajes de *H. s. suspectum* y *H. h. horridum* del norte, como era de esperarse, con un valor de 0.175. Los linajes de *H. s. cinctum* con *H. h. horridum* del norte con un valor de 0.174 y entre los linajes de *H. s. suspectum* y *H. h. horridum* del centro con un valor de 0.169. Por otra parte, los valores más bajos son aquellos entre *H. h. alvarezii* y *H. h. charlesbogerti* con un valor de 0.004, entre *H. h. charlesbogerti* y *H. h. horridum* del sur 0.014 y finalmente entre los linajes de *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum* 0.015.

**Tabla 4.** Distancias génicas entre los linajes identificados en la hipótesis filogenética con caracteres moleculares.

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>Barisia</i>	0.788	0.391	0.486	0.489	0.507	0.507	0.495	0.495	0.498	0.503
2. <i>Varanus</i>		0.746	0.555	0.555	0.559	0.558	0.513	0.531	0.522	0.524
3. <i>Xenosaurus</i>			0.486	0.489	0.500	0.508	0.505	0.517	0.523	0.522
4. <i>H. s. cinctum</i>				0.015	0.170	0.174	0.166	0.150	0.164	0.158
5 <i>H. s. suspectum</i>					0.167	0.175	0.169	0.155	0.167	0.162
6. <i>H. h. exasperatum</i>						0.049	0.103	0.091	0.090	0.085
7. <i>H. h. horridum nte.</i>							0.106	0.099	0.100	0.095
8. <i>H. h. horridum cto.</i>								0.070	0.063	0.059
9. <i>H. h. horridum sur</i>									0.018	0.014
10. <i>H. h. alvarezi</i>										0.004
11. <i>H. h. charlesbogerti</i>										

Se construyó un árbol con las distancias génicas (UPGMA), con la finalidad de mostrar cómo se separan los grupos utilizando esta medida de distancia (Figura 17). También se construyó un árbol con Neighbor Joining, el cual resultó ser muy similar al anterior, por lo que no se muestra aquí. Se puede observar que existen distancias significativas entre los grupos principales de este trabajo, por arriba del 3% (distancias recalculados por el UPGMA) y valores altos de bootstrap en los nodos basales.



**Figura 17.** Árbol de distancias génicas construido con base en la matriz de distancias de la Tabla 3, utilizando el algoritmo de UPGMA con el programa Mega V.4 (Tamura et al. 2007). Los valores en los nodos corresponden al soporte de bootstrap.

## Discusión.

Douglas *et al.* (2003) y Douglas *et al.* (2010) mencionan que entre *H. s. suspectum* y *H. s. cinctum* existen niveles bajos de divergencia genética (0.5% en el Cuadro 2 de Beck 2005, p23) lo cual sugiere que deberían de ser considerados un solo taxón. Las distancias génicas calculadas en este estudio entre ambos taxones sugieren que la divergencia es un poco mayor (0.15=1.5 %), aunque siguen siendo bajas. Sin embargo el hecho de que sean grupos exclusivos en la filogenias molecular realizada por (Hernández-Jiménez *et al.* 2011) y la filogenia basada en morfológica presentada en este estudio sugieren lo contrario. No obstante, a pesar de que en el extremo sur de la distribución de *H. s. cinctum* y extremo norte de la distribución de *H. s. suspectum* son simpátridos, sus poblaciones poseen caracteres exclusivos como el patrón de coloración de la cola (cuatro anillos simples gruesos continuos y bien definidos para el caso de *H. s. cinctum* y tres o cuatro anillos dobles no siempre bien definidos para el caso de *H. s. suspectum*), el patrón de coloración del dorso (cuatro bandas claramente definidas de color negro con manchas más o menos circulares de color rosado o anaranjado dentro de cada banda intercaladas con bandas claramente definidas de color rosado o anaranjado con manchas más o menos circulares de color negro dentro de cada banda para el caso de *H. s. cinctum* y bandas reticuladas de color rosado o anaranjado con manchas irregulares de color negro intercaladas con bandas negras reticuladas con manchas de forma irregular de color rosado o anaranjado para el caso de *H. s. suspectum*), y la ausencia de cambio ontogenético en la coloración en el caso de *H. s. cinctum*. Aunque en este trabajo solo se cuenta con un haplotipo de *H. s. cinctum*, y cuatro de *H.s.suspectum* lo cual hace difícil evaluar el status de estas subespecies con las hipótesis basadas en datos moleculares, en el trabajo de Hernández-Jiménez *et al.* (2011) se observan mas haplotipos de *H. s. suspectum*, mismos que se encuentran en un clado distinto a las poblaciones de *H. s. cinctum* sin que se muestre evidencia de flujo genético entre estos linajes. Por otro lado las distancias génicas encontradas en este trabajo contrastadas con las de Douglas *et al.* (2003), y Douglas *et al.* (2010) son ligeramente más elevadas 1.5%. Por lo cual aplicando los criterios de Wiens y Penkrot (2002), de

exclusividad, tanto morfológica (Figura 14) como molecularmente (Figura 3), a estos dos taxones simpátricos, con diferencias morfológicas, sin evidencia de flujo génico. Deben ser elevadas a nivel de especie y tratadas como especies distintas, *H. suspectum* y *H. cinctum* (Figura 18).

Los resultados tanto a nivel morfológico como a nivel molecular (Figuras 14, 15, 16, 17) sugieren la existencia de al menos tres linajes distintos dentro de lo que es considerado *H. h. horridum*, lo cual coincide con lo mencionado en trabajos de (Hernández-Jiménez, 2005 y Hernández-Jiménez *et al.* 2011). Los linajes del extremo norte (Valparaiso Zacatecas y Tomatlán, Jocotlán y Cihuatlán Jalisco) se encuentran en el mismo clado con *H. h. exasperatum*; en particular la muestra de Valparaiso, Zacatecas está en la base del clado de *H. h. exasperatum*, mientras las otras poblaciones forman un clado hermano (clado 2 A, Figs. 15 y 16). Desafortunadamente en la filogenia morfológica (Figura 14) no se cuenta con poblaciones de Zacatecas, sin embargo las poblaciones geográficamente más cercanas (Nayarit y Sinaloa) se encuentran también dentro del grupo de *H. h. exasperatum* (clado 3); mientras que las poblaciones de la costa de Jalisco se encuentran en el clado 4 emparentadas con el resto de las poblaciones de la costa del Pacífico, Istmo de Tehuantepec y Cuenca del Balsas sin que exista una congruencia geográfica al interior del mismo. Esto debido a la morfología tan conservada que no difiere claramente entre las poblaciones de este clado. No obstante, la topología de las filogenias moleculares sugiere que habría cierto flujo génico entre las poblaciones que van desde el sur de Sonora hasta la costa suroeste de Jalisco, incluyendo la población de Valparaiso, Zacatecas y que no lo existe entre el grupo anterior y las poblaciones que van de Colima a la Cuenca del Balsas. Considerando los argumentos anteriores, los valores elevados de soporte en el nodo 2 de las figuras 15 y 16, y con base en la exclusividad molecular de los linajes del sur de Sonora a Jalisco, incluyendo Zacatecas, se propone elevar a esta subespecie a *H. exasperatum*. Esto ya lo habían sugerido Douglas *et al.* (2003), pero con poca evidencia molecular y morfológica.

Con relación a las poblaciones de Nayarit, Valparaiso, Zacatecas y Jalisco, considerados previamente como *H. h. horridum* (Bogert y Martín del Campo,

1956; Beck, 2005; Campbell y Lamar, 2004), parecen estar formando parte del mismo grupo que *H. exasperatum*. Esto coincide con lo dicho por (Hernández-Jiménez *et al.* 2011), quienes mencionan que algunos haplotipos de Jalisco se encuentran dentro del clado de *H. h. exasperatum* y que al interior de este grupo divergen tres linajes distintos. En la figura 17, se puede observar la poca distancia génica entre las muestras de *H. h. exasperatum* y la población de Valparaíso Zacatecas; y con las poblaciones de *H. h. horridum* del norte (casi 5%, Tabla 3). Por el poco número de muestras entre Sonora y Jalisco en este estudio no es posible evaluar la existencia de estos tres linajes, y tomando una posición conservadora es preferible considerarlos tentativamente como parte de un solo taxón (*H. exasperatum*). Cabe hacer notar que con la propuesta taxonómica de arriba, se extiende el área de distribución de *H. exasperatum* hacia el sur hasta el suroeste de Jalisco, limitado al sur por las cuencas de los Ríos Cihuatlán y Armería (Figura 18).

El segundo linaje identificado es el de los haplotipos del centro de la costa pacífica mexicana (Ixtalhuacán y Tecomán, Colima) y la Cuenca del Balsas (Rancho el Salado y Santa Inés Ahuatemapan, Puebla) los cuales se mantienen como un linaje exclusivo e independiente con valores altos de soporte de ramas y con posible mantenimiento de flujo génico. Estas poblaciones aparecen en la topología obtenida por los datos morfológicos en el clado 4 formando un grupo exclusivo (debido a que prácticamente no existen diferencias morfológicas entre estas poblaciones) junto con las poblaciones del istmo de Tehuantepec, Costa de Jalisco, Costa de Chiapas, Cuenca del Balsas de Guerrero y Morelos, sin embargo las relaciones al interior de la hipótesis con datos morfológicos no son claras por la discordancia geográfica y los bajos valores del soporte de ramas. Desafortunadamente para el análisis molecular no se incluyeron especímenes del resto de la cuenca del Río Balsas, del Istmo ni de la costa de Chiapas, lo cual podría haber resuelto esta discordancia entre las hipótesis morfológica y molecular. No obstante, a nivel génico los haplotipos de este grupo incluidos en este análisis representan un clado exclusivo, además presentan una diferencia génica del 10% con las poblaciones al norte y de un 4% con las del sur. Por su distribución, estas poblaciones se pueden

considerar como representantes del taxón nominal *H. horridum*, cuya distribución queda limitada al sur por la Cuenca del Río Omitlán (Fig. 18).

El tercer linaje que se recupera en ambas hipótesis (clado 5A de datos morfológicos y 4 de datos moleculares) y q además coincide con la hipótesis realizada por Hernández-Jiménez *et al.* (2011) corresponde a las poblaciones de la costa de Guerrero y Oaxaca; las poblaciones de esta zona son ejemplares que poseen caracteres morfológicos que los distinguen del resto de las poblaciones (color negro con ausencia de manchas o reminiscencia de haber tenido manchas tanto en el cuerpo como en el dorso) este patrón de coloración es muy similar al de *H. h. alvarezi*; sin embargo, en *H. h. alvarezi* la coloración en algunos ejemplares no es completamente oscura llegando a presentar manchas de color amarillo o reminiscencia de haber tenido manchas en alguna etapa de su vida de forma irregular en el dorso o en forma de anillos en la cola. Además las poblaciones de la costa de Guerrero y Oaxaca, con la información geográfica disponible al parecer se encuentran aisladas de las de *H. h. alvarezi*, pero pueden ser parapátridas con poblaciones del Istmo de Tehuantepec las cuales son morfológicamente mas similares a las poblaciones de Jalisco, Colima, Morelos y Guerrero. Por lo cual las poblaciones de la costa de Guerrero y Oaxaca deben ser consideradas como una especie nueva que necesita ser nombrada y descrita, aunque las distancias génicas entre este linaje y *H. h. alvarezi* son bajas (1.5%), lo cual podría estar indicando una divergencia reciente. Este linaje está limitado al oeste por la cuenca del Río Omitlán y al este por el Istmo de Tehuantepec cuyas poblaciones son morfológicamente distintas. (Figura 18).

A pesar de que solo uno de los tres linajes de *H. h. horridum* es recuperado en ambas hipótesis (morfológica y molecular), es notorio, por la topología de todas las filogenias presentadas, que el grupo tradicionalmente nombrado como *H. h. horridum* debe subdividirse en al menos los tres taxones mencionados arriba. La distribución de estos linajes es muy parecida a la de los grupos *siniferus* y *utiformis* del género *Sceloporus* (Flores-Villela *et al.* 2000) a la que presentan las subespecies de *Urosaurus bicarinatus* (González-Bernal, 2002) y las

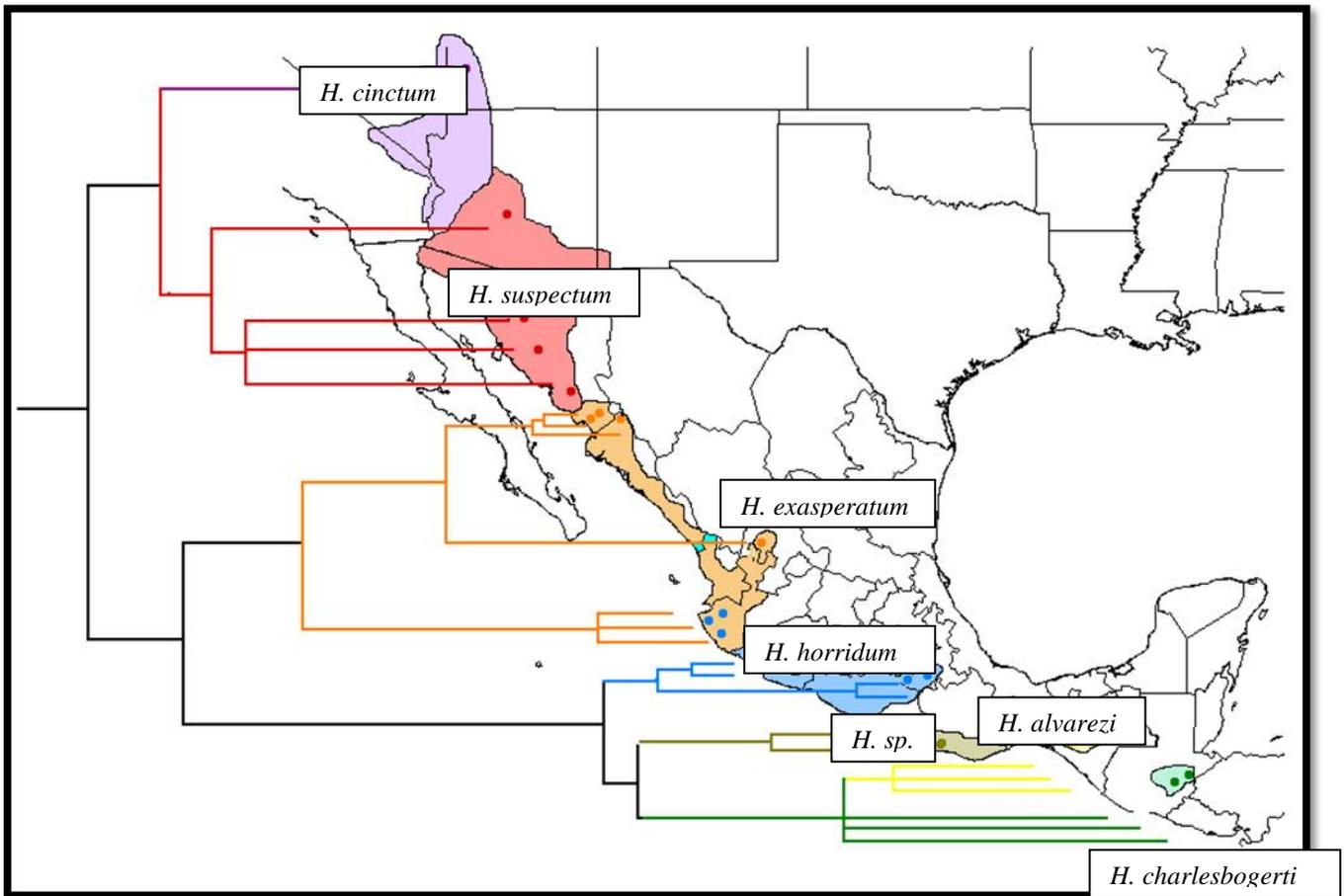
anteriormente consideradas subespecies de *Trimorphodon biscutatus* (Devitt, 2006).

*Heloderma h. alvarezii* aparece dentro del cladograma obtenido por morfología como un grupo exclusivo diferenciado completamente del resto de los otros linajes, lo cual sugeriría que debe ser considerado una especie distinta; sin embargo dentro del cladograma obtenido con datos moleculares se encuentra dentro del mismo clado que *H. h. charlesbogerti*, lo cual coincide con lo mencionado por (Hernández-Jiménez *et al.* 2011). Por otra parte Douglas *et al.* (2003) y Douglas *et al.* (2010) mencionan que *H. h. alvarezii* y *H. h. charlesbogerti* podrían ser considerados como la misma especie por que están poco diferenciadas. Los datos de distancias génicas entre estos linajes son los más bajos de este estudio, siendo (0.4%), lo cual coincide con la baja distancia (1%) registrada por Douglas *et al.* (2003) y Douglas *et al.* (2010) en el cual estas dos subespecies poseen las distancias génicas más bajas entre si. Vale la pena aclarar que en estos trabajos no se analiza la morfología de estos dos taxones. Por otra parte el hecho de que se encuentren dentro del mismo clado pudiera sugerir la existencia de flujo génico entre los haplotipos de *H. h. alvarezii* y *H. h. charlesbogerti*, sin embargo ambos taxones se encuentran aislados geográficamente por más de 200 km entre sus zonas de ocurrencia (Depresión Central de Chiapas en México y Valle del Río Motagua en Guatemala) y el hecho de que aparezcan dentro del mismo clado formando un solo grupo puede deberse a que la divergencia entre ambos taxones fue reciente y no existen diferencias fijas en esa parte del genoma. O posiblemente sea consecuencia del fenómeno descrito como “incomplete lineage sorting” que ocurre cuando el tiempo de separación entre linajes es corto (Wiens, 2008). Por ejemplo, si el tiempo de separación es corto entre dos linajes A (*H. h. horridum* del sur) y el ancestro de B-C (*H. h. alvarezii*-*H. h. charlesbogerti*) algunos de los alelos de la especie B-C estarán más cercanamente relacionados con la especie A que con algunos de los individuos de la especie B-C, pasando algún tiempo estos alelos habrán desaparecido por deriva génica, sin embargo si el tiempo de separación entre B (*H. h. alvarezii*) y C (*H. h. charlesbogerti*) ocurre poco tiempo después, estos alelos son retenidos y fijados por la especie B (*H. h. alvarezii*), provocando en este caso que la filogenia de genes (*H. h. alvarezii* y

*H. h. charlebogerti* formando un mismo grupo) difiera de la filogenia de las especies (*H. h. alvarezi* como un grupo distinto de *H. h. charlesbogerti*).

Además existen caracteres morfológicos que distinguen claramente a ambos taxones (patrón de colocación del dorso y de la cola). Por estas razones se considera que éstas deben ser tratadas como especies distintas, *H. alvarezi* con una distribución restringida a la parte central de Chiapas y *H. charlesbogerti* que se distribuye en el valle del río Motagua en Guatemala (Figura 18).

Finalmente, vale la pena aclarar que las distancias génicas obtenidas en este estudio son proporcionalmente similares a las registradas por Douglas *et al.* (2003), utilizando los genes mitocondriales ATPase 8 y 6. Aunque las del presente estudio son más conservadoras, siendo no mayores a 17.4%, mientras que los autores anteriores registran distancias de hasta un 21.5% entre los linajes de *H. suspectum* spp y *H. horridum* spp.



**Figura 18.** Distribución geográfica de los linajes de las especies de *Heloderma*. Se muestra la congruencia geográfica y topológica entre los distintos linajes de *Heloderma*.

## Conclusiones

*H. s. suspectum* y *H. s. cinctum* representan dos especies distintas, *Heloderma suspectum* y *Heloderma cinctum*.

*H. h. horridum* está formado por tres linajes monofileticos distintos. El mas norteño debe ser considerado como parte de *H. exasperatum*. El segundo linaje, distribuido en el centro de la costa del Pacífico Mexicano y cuenca del Balsas, representa el taxón nominal *H. horridum*. Finalmente, el de la costa de Guerrero y Oaxaca representa a una especie nueva que necesita ser descrita.

*H. h. alvarezii* forma un grupo exclusivo que se distribuye en la Depresión Central de Chiapas y debe ser elevado a nivel de especie y nombrado como *Heloderma alvarezii*.

*H. h. charlesbogerti* forma un grupo exclusivo y distinto a *H. alvarezii* distribuido en el Valle Del Río Motagua en Guatemala que debe ser elevado a nivel de especie y nombrado como *Heloderma charlesbogerti*

## LITERATURA CITADA

- Arevalo, E., Davis, S. K. y Sites, J. W. 1994. Mitochondrial-DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico. *Systematic Biology*, 43, 387–418.
- Ast, J. C. 2001. Mitochondrial DNA Evidence and Evolution in Varanoidea (Squamata). *Cladistics*, 17:211–226.
- Baird, S. F. 1859. Reptiles of the boundary. In United states and Mexican Boundary Survey, Washington, Dept. Interior, vol 3, pp 1-35.
- Balderas, V. C. 2000. Papel de la Quimiorecepción y la visión en el reconocimiento del alimento y de los depredadores de *Heloderma horridum*. Tesis para maestría en ciencias. Fac. de Ciencias div. De estudios de Posgrado . UNAM.
- Beck, D. D. 1986. The Gila Monster in Utha: Bioenergetic and Natural History Considerations. Masters Thesis, Utah State Univ. Logan. 95 pp.
- Beck, D. D. 1990 Ecology and Behavior of the Gila Monster in southwestern Utah. *Journal of Herpetology* 24 54-68.
- Beck, D. D. 2005. Biology of Gila monsters and beaded lizards. University of California Press. Berkeley, Los Angeles, London. 211pp.
- Beck, D. D. y C.H. Lowe. 1991. Ecology of the Beaded Lizard, *Heloderma horridum* in a Tropical Dry Forest in Jalisco, México *Journal. Herpetology* vol.25 n4 pp 395-406.
- Beck, D. D. y Ramírez B. A. 1991. Combat behavior of the beaded lizard *Heloderma horridum horridum* in Jalisco México *Journal Herpetology.*, 25: 481-483.
- Birchard, S. J. y R. G. Sherding. 1996. Manual Clínico de Pequeñas Especies Vol. 2. Mc. Graw-Hill México 48-89.
- Bogert, C. M., y R. Martín del Campo. 1956. The Gila Monster and its allies: the relationships, habits, and behavior of the lizards of the Family

- Helodermatidae. Bulletin of the American Museum of Natural History, 109:1-238.
- Campbell, J. A. y W. L. Lamar. 1989. The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University Press. Ithaca, NY:425 pp.
  - Campbell, J. A. y W. L. Lamar. 2004. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. Vol 1. Cornell University Press. USA.425pp.
  - Campbell, J. A. y J. P. Vannini. 1988. A New Subspecies of Beaded Lizard, *Heloderma horridum* from the Montagua Valley of Guatemala. Journal Herpetology; 22: 457-468.
  - Canseco-Márquez. L. 2005. Filogenia de las lagartijas del género *Xenosaurus* Peters (Sauria: Xenosauridae) basada en morfología externa. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, Mexico. 79 pp.
  - Chang V. y E. N. Smith. 2001. Fast Morphology GFC Version 1.0. <http://www3.uta.edu/faculty/ensmith>.
  - Cope, E. D., 1869. (Diagnosis of *Heloderma suspectum*). Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 21:4-5.
  - Cracraft, J. 1992. Species Concepts and Speciation Analysis in: M. Erenshefsky. The Units of Evolution. Essays on the Nature of Species. Messachusetts Institute of Tecnology Zpress. Masachusetts. Pp.93-120
  - de Queiroz, K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. In: Howarda D. J and S.H. Berlocher, (eds). Endless forms: Species and speciation. Oxford Univ. Press, Oxford, MA. Pp 57–75.
  - de Queiroz, K. 2005. A unified species concept and its consequences for the future of taxonomy. Proceeding of California Academy of Science. 56, 196-215.
  - de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. Systematic Biology 56, 879-886.
  - Devitt, T. J. 2006. Phylogeography of the Western Lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic–Neotropical transition. Molecular Ecology, 15:4387–4407.

- Douglas, M. E; M. R. Douglas, G. W. Schuett, D. D. Beck, y B. K. Sullivan. 2003. Molecular biodiversity of Helodermatidae (Reptilia, Squamata). Abstract and presentation. Joint Meeting of Ichthyologist and Herpetologists. Manaus, Amazonas, Brazil.
- Douglas, M. E; M. R. Douglas, G. W. Schuett, D. D. Beck, y B. K. Sullivan. 2010. Conservation phylogenetics of helodermatid lizards using multiple molecular markers and a supertree approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- Fetzner. J., 1999. Extracting High-Quality DNA from Shed Reptile Skins: A simplified Method. *BioTechniques* 26: 1052- 1054.
- Flores-Villela, O., K. M. Kjer, M. Benabib y J. W. Sites. 2000. Multiple data sets, congruence, and hypothesis testing for the phylogeny of the basal groups of the lizard genus *Sceloporus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Systematic Biology*, 49(4):713-739.
- Frost, D.R. y D.M. Hillis. 1990. Species concept and practice: *Herpetologica*, 46 (1): 876-104.
- Fuller, S, P. Baverstock, y D. King .1998. Biogeography origins of goannas (Varanidae): A molecular perspective. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 9: 294-307.
- Fry, B. G., Vidal, N., Norman, J. A., Vonk, F. J., Scheib, H., Ramjan, R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S. B., Richardson, M. K., Hodgson, W. C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., y Kochva, E. 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439(7076), 509-632.
- González Bernal, E. L. 2002. Estudio de la filogenia por métodos moleculares y morfológicos de las subespecies de *Urosaurus bicarinatus*. Universidad de Las Americas, Puebla.
- Grismer, L. 1999. An evolutionary classification of reptiles on islands in the Gulf of California. *Herpetologica*, 55, 446–469.
- Hernández F. 1648 (1615) *Rerum medicarum novae hispaniae thesaurus seu plantarum animalium mineralium mexicanorum historia* Mascardi, Rome. 950 + 90 pp  
Janvier, P. 1984.

- Hernández Jiménez C. A. 2005 Estudio Filogenético molecular de las subespecies de *Heloderma horridum* Tesis de Licenciatura Escuela de Biología BUAP. 44pp.
- Hernández-Jiménez, C. A, A. Feltoon , O, Flores-Villela y M. Fostner. 2011 Conservation Genetics of the Mexican Beaded Lizard *Heloderma horridum* (Lacertilia: Helodermatidae) (Manuscrito en preparación).
- Hillis, D. M, Mortiz, C, y Mable, B. K. 1996. Molecular Systematics 2ª Ed Sunderland, MA. Associattes, inc.
- Huelsenbeck J.P.y F. Ronquist 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754-755.
- Kumazawa, Y. 2007. Mitochondrial genomes from major lizard families suggest their phylogenetic relationships and ancient radiations. Gene 388: 19–26.
- Lemos-Espinal, J. E, H. M.Smith, y D. Chiszar. 2004 Introducción a los anfibios y reptiles del estado de Chihuahua UNAM-CONABIO México: 128 pp.
- Macey, J. R., Schulte, J. A., II, Larson, A., Tuniyev, B. S., Orlov N., y Papenfuss, T. J. (1999). Molecular phylogenetics, tRNA evolution, y historical biogeography in Anguid lizards and related taxonomic families. Molecular Phylogenetics and Evolution, 12:250–272.
- Mainer, MK. 2004. Geographic variation in the long-nosed snake *Rhinochelius lecontei* (Colubridae): beyond the subspecies debate. Biological Journal of Linnean .Society. 83, 65-85.
- Mayr, E. 1969. Principies of Sistematic Zoology. Mc Graw-Hill, USA.
- Mayr , E. y P. D. Ashlock. 1991. Principies of Sistematic Zoology. 2a ed. Mc Graw-Hill, USA.
- Mulcahy D. 2007. Phylogeography and species boundaries of the western North American Nightsnake (*Hypsiglena torquata*): Revisiting the species concept. Molecular Phylogenetics and Evolution 46, 1095-1115.
- Posada y Crandal. 1998. Modeltest: testing the modelo f DNA substitutionn. Bioinformatics 14: 817-818.
- Pregill, G. K, J. A. Gauthier., y W. H. Greene. 1986 The Evolution of Helodermatid Squamates With a Description of a New taxon an

Overview of Varanoidea. Transactions of the San Diego Society of Natural History, 21:167-202.

- Simpson, G. G. 1961. Principles of Animal Taxonomy. Columbia University Press, New York.
- Smith, E. N., y R. L. Gutberlet. 2001. Generalized Frequency Coding: A Method of Preparing Polymorphic Multistate Characters for Phylogenetic Analysis. Systematic Biology 50(2):156–169.
- Staden, R., K.F. Beal y J.K. Bonfield. 1998. The staden package. In: S. Misener and S.A. Krawets, Editors, Computer Methods in Molecular Biology 132: Bioinformatics Methods and Protocols, Humana Press, Totowa, pp. 115–130.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony version 4.0b. Sinauer, Sunderland Massachusetts.
- Tamura K, Dudley J, Nei M y S. Kumar 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 10.1093/molbev/msm092.
- Thiele, K. 1993. The Holy Grail of the perfect character: The cladistic treatment of morphometric data. Cladistics 9:275–304.
- Thompson, J. D. T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nuclei Acids Res.* 24, pp. 4876–4882.
- Townsend, T.M., A. Larson, E. Louis y J.R. Macey. 2004. Molecular Phylogenetics of squamata: The position of the snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamata trees. Systematic Biology. 53: 735-757.
- Vidal, N. y S. B. Hedges. 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. Comptes Rendus, Biologies, 328:1000-1008.
- Wiegman, A. F. A., 1829 Ueber das Acaltetepon oder Temacuicahuya des Hernandez, eine neue Gattung der Saurer, Heloderma. Isis von Oken, Leipzig, vol. 22, pp624-629.

- Wheeler Q, D. y R. Meier. Eds. 2000. Species concepts and phylogenetic theory: a debate. Columbia University Press. New York..
- Wiens, J. J. 1995. Polymorphic characters in phylogenetic systematics. *Syst. Biol.* 44:482–500.
- Wiens, J. J. 1999. Polymorphism in systematics and comparative biology *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:327–362.
- Wiens, J.J. 2008. Systematics and herpetology in the age of genomics. *Biosciences*. Vol. 58. No. 4.
- Wiens, J. J. y Penkrot. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*. 51, 69-91.
- Wiley, E. O.1978.The evolutionary species concept reconsider. *Systematic Zoology*. 27:17-26.