



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Taxonomía integrativa de la lagartija caimán sureña  
*Gerrhonotus liocephalus* (Squamata: Anguidae)

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Romina Itzel Cervantes Burgos

Codirectores

Dr. Uri Omar García Vázquez

Dr. Aníbal Helios Díaz de la Vega Pérez

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2021





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Taxonomía integrativa de la lagartija caimán sureña  
*Gerrhonotus liocephalus* (Squamata: Anguidae)

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Romina Itzel Cervantes Burgos

Codirectores

Dr. Uri Omar García Vázquez

Dr. Aníbal Helios Díaz de la Vega Pérez

Tutores

Dr. Andrés Ramírez Ponce

Dra. Itzel Arias del Razo

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2021

## FINANCIAMIENTO

- El trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Sistemática Molecular, Laboratorio 9, 2do piso, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México y en el Laboratorio de Ecofisiología y Diversidad de Reptiles y Anfibios, Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC), Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Los recursos para la elaboración de este trabajo provinieron de los fondos de los proyectos:

- Proyecto PAPIIT IN-216619, otorgado por la Dirección General de Apoyo al Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México a Uri Omar García Vázquez.
- Proyecto CONACYT A1-S-37838, otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a Uri Omar García Vázquez.
- Proyecto de Cátedras CONACYT: Aproximación ecofisiológica para la conservación del Parque Nacional La Malinche (Número de proyecto: 883).
- Beca de maestría CONACYT (Número: 962595).

La Maestría en Ciencias Biológicas está registrada en el Programa para el Fortalecimiento del Posgrado Nacional, Padrón Nacional de Posgrado (PNP).



**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Romina Itzel Cervantes Burgos** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Taxonomía integrativa de la Lagartija Caimán Sureña *Gerrhonotus liocephalus* (Squamata:Anguidae)”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., ENERO 13 DE 2021

DR. ANDRÉS RAMÍREZ PONCE

DR. ANÍBAL HELIOS DÍAZ DE LA VEGA PÉREZ

DR. ALEJANDRO VALDEZ MONDRAGÓN

DR. URI OMAR GARCÍA VÁZQUEZ

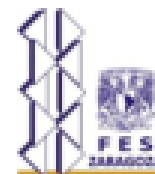
DR. MANUEL FERIA ORTIZ





# Carrera de Biología

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza ♦ Universidad Nacional Autónoma de México



Ciudad de México a 21 de enero de 2021

## Comité Académico

Posgrado en Ciencias Biológicas.  
Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Por medio de la presente hago constar que la tesis de la alumna Romina Itzel Cervantes Burgos con nombre: "Taxonomía integrativa de la lagartija caimán sureña *Gerrhonotus liocephalus* (Squamata: Anguidae)" fue revisada con el programa Turnitin para detectar similitud con textos previamente publicados. Después del análisis de similitud se detectó 1% de coincidencias.

Sin más por el momento, agradezco a usted su atención.

Atentamente

*Por mi raza Hablará el Espíritu*

---

Dr. Uri Omar García Vázquez  
Profesor de Carrera Titular "A" de Tiempo Completo

## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta y a la Universidad Autónoma de Tlaxcala por el apoyo obtenido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca (Número: 962595) obtenida.

A los proyectos de investigación CONACYT A1-S-37838 y PAPIIT IN-216619, por los recursos aportados para este proyecto.

A mis codirectores Dr. Uri Omar García Vázquez, Dr. Aníbal Helios Díaz de La Vega Pérez y a mi comité integrado por el Dr. Andrés Ramírez Ponce y la Dra. Itzel Arias del Razo, por el tiempo y apoyo brindado.

Agradezco a mi jurado, Dr. Uri Omar García Vázquez, Dr. Aníbal Helios Díaz de La Vega Pérez, Dr. Andrés Ramírez Ponce, Dr. Alejandro Valdez Mondragón y Dr. Manuel Feria Ortiz por la revisión, comentarios y aportes realizados a este trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Jonathan Campbell, al Dr. Eric Smith, al M. en C. Daniel Ariano Sánchez, Eric Centenero Alcalá y Alejandro Calzada por las fotografías proporcionadas para el presente trabajo.

Al Dr. Adrián Nieto Montes De Oca, al Biol. Miguel de La Torre Loranca, al Sr. Marco Antonio Martínez Ortiz y a toda la comunidad de Santa María Guienagati en Oaxaca por su apoyo en la obtención de ejemplares para realizar este trabajo.

Agradezco a Uri García, Antonio Valdenegro, Diego García, Gabriel Martínez, Carlos Sánchez, Andrés Perea, Uriel García, Jorge Villagómez y a todo el Laboratorio de Sistemática Molecular de la Facultad de estudios Superiores Zaragoza, por su ayuda tanto en trabajo de laboratorio como en campo y sus comentarios del presente trabajo.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer principalmente a mi madre Carmen Cervantes, por darme todo y más de lo que merezco, gracias a ti he llegado hasta aquí y soy lo que soy, todos y cada uno de mis logros son tuyos, gracias por estar para secar mis lágrimas y darme ese pequeño empujón que necesitaba cuando sentía que no podía más. A mi abuela, tíos, primos y la pequeña Emma que han seguido paso a paso este camino y me han alentado para seguir.

A mi compañero de vida Alan Vázquez que estas siempre a cada paso que doy, siempre impulsándome a ser mejor, a nunca rendirme. Tú que siempre estas para secar mis lágrimas o pintarme una gran sonrisa, este logro también es tuyo, este sueño lo comenzamos juntos y vamos por más.

Toño y Diego que les puedo decir que no sepan, les agradezco tantas risas, lágrimas y enojos, sin ustedes la vida no sería tan divertida, gracias por toda la ayuda que recibí estos dos años y todos los años que hemos estado juntos, son los mejores del mundo mundial global universal.

Gabin no tengo como agradecer tanto, que a pesar de tener momentos difíciles siempre estabas ahí, respondiendo cuatro días después, pero más vale tarde que nunca, gracias de verdad por la ayuda y el tiempo que me regalaste.

Toño, Diego, Gabo (otra vez), Charly, Andrés, Uriel, Jorge y Gaby, les agradezco por todo el apoyo recibido tanto en campo como en laboratorio, por estar ahí para cualquier duda que tenía.

Eli Espinosa gracias por estar en esas noches de desvelo, interrumpiendo con memes y tonterías que me hacían amena la madrugada, por conseguirme cuijis para este estudio y por estar sin importar la hora.

A la señora Marisol, al señor José y Abril, gracias por brindarme su apoyo y por permitirme tener un techo donde dormir estos dos años, gracias por recibirme en su casa como parte de su familia, por alimentarme y aguantarme.

Jocelyn y Mario fueron pocos momentos compartidos pero las risas nunca faltaron.

Eli (Flaca), Fer, Krys, Are, Lalo, Memo, ustedes que directa e indirectamente me animaban y hasta regañaban para que este trabajo llegara a su fin y que hicieron mis días y noches tan agradables.

Y, por último, pero para nada menos importante Uri García, gracias por la confianza que me brindaste al permitirme ejecutar este proyecto, por todo el apoyo que he recibido no solo en el ámbito escolar o laboral también en la vida, por responder una y cada una de mis preguntas



que para nada fueron pocas, gracias por permitirme ser parte de ese laboratorio que poco a poco va creciendo.

## **Resumen**

La taxonomía integradora se ha considerado como uno de los objetivos centrales de la sistemática moderna. En este estudio se emplearon datos moleculares y morfológicos para evaluar los límites de especie dentro de la lagartija caimán sureña *Gerrhonotus liocephalus* (Wiegmann, 1828). El conjunto de datos moleculares utilizados incluye un fragmento mitocondrial del gen que codifica la proteína subunidad 4 de la deshidrogenasa NADH, fragmentos de los genes nucleares que codifican el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el receptor de prolactina (PRLR). Se emplearon métodos de reconstrucción filogenética, métodos coalescentes y variación morfológica para evaluar los límites de especie). Los resultados se discutieron en el contexto de la delimitación integradora de especies y sugieren que *G. liocephalus* representa tres especies distintas, compuesta por linajes poco diferenciados morfológicamente, uno de ellos es microendémico en la región del Istmo de Tehuantepec en Oaxaca. Además, uno de los grupos obtenidos puede estar compuesto por un complejo de especies.

## **Abstract**

Integrative taxonomy has been considered one of the central objectives of modern systematics. Here, we used molecular and morphological procedures to assess species boundaries within the southern caiman lizard *Gerrhonotus liocephalus* (Wiegmann, 1828). Molecular data included mitochondrial locus of the gene coding for the NADH dehydrogenase subunit 4 protein, and the nuclear genes coding the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the prolactin receptor (PRLR). We combined phylogenetic reconstruction, coalescent methods, and morphological variation, to assess the species limits. The results were discussed in the context of integrative species delimitation and suggest that *G. liocephalus* is composed by three different species and lineages poorly morphologically differentiated, one them microendemic to the Istmo de Tehuantepec, Oaxaca. Furthermore, within one of the recovered groups might be indeed a complex of species.

## **Glosario**

**Alelo.** Cada una de las variantes o versiones que se encuentran en un gen (Doyle, 1995).

**Alopátria.** Área de distribución de dos especies que se encuentran completamente separadas la una de la otra. Es importante saber que el concepto de alopatria se aplica solo a especies similares entre sí y no a poblaciones separadas de una misma especie (Sites y Marshall, 2003)

**Coalescencia genética.** En una población provista de variabilidad genética, y para genes neutros que no alteren a la viabilidad de un individuo, los alelos presentes deben tener un solo ancestro común (Pons y cols, 2006).

**Conespecífico.** Se considera que dos o más individuos, poblaciones o taxones son conespecíficos si pertenecen a la misma especie. De igual manera, dos individuos, poblaciones o taxones son heteroespecíficos si pertenecen a especies diferentes.

**Escamas quilladas.** Es una característica que tiene algunos grupos de reptiles, la quilla es una protuberancia o cresta en el centro de cada una de las escamas (Smith, 1946).

**Especie focal.** Especie que es el objeto principal de una investigación o proyecto (Wiens y Penkrot, 2002).

**Especies crípticas.** Especies que son extremadamente similares en apariencia, lo que hace casi imposible su determinación con morfología (Hoyos y cols., 2003).

**Fenotipo.** Agrupación de caracteres visibles que un individuo muestra como resultado de la correlación entre el genotipo y el medio (Lee y cols., 2007).

**Filogenia no ultramétrica.** Filogenia en donde las ramas no se encuentran equidistantes del nodo principal (Goyache y cols., 2006).

**Grupo monofilético.** Organismos que comparten un mismo antepasado como origen, la totalidad de los integrantes de este grupo provienen de cierta forma ancestral (Sites y Marshall, 2003; Sáez, 2009).

**Homoplasia.** Cambio evolutivo en organismos que no tienen el mismo origen (Goyenechea, 2007).

**Linaje.** Secuencia de individuos con una línea directa de descendencia, dado como resultado de la evolución de una especie desde un ancestro inmediato (Fujita y cols., 2012).

**Marcadores moleculares.** Segmento de DNA con un emplazamiento físico indudable cuya herencia genética se puede rastrear. Este puede ser un gen, o una sección de DNA sin función conocida (Valdéz-Alarcón y cols., 2002).

**Metapoblación.** Grupo de poblaciones de una especie aisladas en el espacio que se interrelacionan a cierto nivel (De Queiroz, 2007).

**Morfotipo.** Características físicas que definen a un grupo de organismos.

**Nodo.** Punto de ramificación representativo de un evento de divergencia o separación de un grupo. En cada punto de ramificación se encuentra el ancestro común más reciente de todos los grupos que descienden de la ramificación (Cuevas-Cardona, 2007).

**Taxonomía.** Ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación científica, esta se ocupa de la clasificación de los seres vivos en categorías como orden, familia, género, especie (Llorente y Michán, 2000).

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Introducción</b> .....                                      | 1  |
| <b>1.1. Concepto de especie</b> .....                             | 1  |
| <b>1.2. Técnicas moleculares en análisis filogenéticos</b> .....  | 2  |
| <b>1.3. Límite de especies</b> .....                              | 3  |
| <b>1.4. Métodos de descubrimiento de especies</b> .....           | 5  |
| <b>1.5. Métodos de validación de especies</b> .....               | 7  |
| <b>1.6. Grupo de estudio</b> .....                                | 8  |
| <b>1.7. <i>Gerrhonotus liocephalus</i> (Wiegmann, 1828)</b> ..... | 9  |
| <b>1.8. Historia taxonómica</b> .....                             | 10 |
| <b>2. Justificación</b> .....                                     | 12 |
| <b>3. Hipótesis</b> .....   | 13 |
| <b>4. Objetivo general</b> .....                                  | 13 |
| <b>5. Objetivos particulares</b> .....                            | 13 |
| <b>6. Metodología</b> .....                                       | 14 |
| <b>6.1. Zona de estudio</b> .....                                 | 14 |
| <b>6.2. Muestreo</b> .....  | 14 |
| <b>6.3. Trabajo de gabinete</b> .....                             | 15 |
| <b>6.3.1. Caracteres morfológicos</b> .....                       | 15 |
| <b>6.3.2. Caracteres morfométricos</b> .....                      | 15 |
| <b>6.3.3. Caracteres merísticos</b> .....                         | 17 |
| <b>6.3.4. Caracteres cualitativos</b> .....                       | 17 |
| <b>6.3.5. Análisis multivariados</b> .....                        | 18 |
| <b>6.4. Secuencias de DNA</b> .....                               | 18 |
| <b>6.4.1. Extracción</b> .....                                    | 18 |
| <b>6.4.2. Amplificación</b> .....                                 | 19 |
| <b>6.4.3. Purificación y secuenciación</b> .....                  | 20 |
| <b>6.4.4. Hipótesis filogenéticas</b> .....                       | 20 |
| <b>6.5. Delimitación de especies</b> .....                        | 21 |
| <b>6.5.1. Descubrimiento de especies</b> .....                    | 21 |
| <b>6.5.2. Inferencia del árbol de especies</b> .....              | 22 |

|  |    |
|--|----|
| 6.5.3. Validación de especies .....  | 23 |
| 7. Resultados .....  | 25 |
| 7.1 Revisión morfológica .....   | 25 |
| 7.2. Análisis multivariados.....   | 28 |
| 7.3. Análisis moleculares .....  | 29 |
| 7.4. Análisis de Máxima Verosimilitud (ML).....  | 29 |
| 7.5. Análisis Bayesiano .....  | 30 |
| 7.6. Límite de especies .....  | 31 |
| 7.6.1 Redes de haplotipos.....   | 31 |
| 7.6.2. Análisis Poisson Tree Processes (PTP) .....                                       | 32 |
| 7.6.3. Análisis Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) .....                           | 34 |
| 7.6.4. Distancias genéticas.....   | 35 |
| 7.6.5. Árbol de especies .....   | 36 |
| 7.7. Análisis de Validación de especies .....  | 36 |
| 7.7.1. Analisis Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP) .....                    | 36 |
| 7.7.2. Bayesian Factor Delimitation (BFD) .....  | 37 |
| 8. Discusión .....   | 38 |
| 8.1. Sistemática en el grupo <i>Gerrhonotus liocephalus</i> .....                        | 38 |
| 8.2. Límite de especies dentro de <i>Gerrhonotus liocephalus</i> .....                   | 39 |
| 8.3. Biogeografía de <i>Gerrhonotus liocephalus</i> .....                                | 40 |
| 8.4. Taxonomía integradora de especies.....  | 41 |
| 8.5. Taxones catalogados como <i>Gerrhonotus liocephalus</i> .....                       | 41 |
| 8.5. Sugerencias taxonómicas .....   | 44 |
| 9. Conclusiones .....  | 45 |
| 10. Perspectivas .....   | 45 |
| 11. Literatura citada .....  | 47 |
| 12. Apéndices .....  | 54 |
| 12.1. Apéndice 1. Clave taxonómica para el complejo <i>Gerrhonotus liocephalus</i> ..... | 54 |
| 12.2. Apéndice 2. Muestras de DNA .....  | 55 |
| 13. Publicaciones .....  | 56 |



## **1. Introducción**

La sistemática es una disciplina que se enfoca en investigar el origen y las causas de la diversidad biológica (Fujita y cols., 2012) y tiene como objetivos principales; descubrir y describir especies y determinar las relaciones filogenéticas entre ellas (Wiens, 2007). Si bien, las especies representan la unidad fundamental de estudio en biología orgánica, incluyendo la ecología, evolución, filogenética, sistemática y biología de la conservación, es un reto el desarrollar métodos operacionales y objetivos para delimitarlas (Wiens y Penkrot, 2002; Sites y Marshall, 2004). Tradicionalmente la delimitación de especies se ha basado en uno o más caracteres morfológicos, cuya variación no muestra superposición entre especies, o si existe superposición hay una combinación única de caracteres que permite diferenciarlas (Wiens, 2007). Sin embargo, considerar únicamente el fenotipo para delimitar especies es poco útil en especies que son morfológicamente similares, como las especies crípticas (Hoyos y cols., 2003; Lee y cols., 2007).

### **1.1. Concepto de especie**

El concepto de especie ha jugado un papel importante en todas las áreas de la biología, además, ha sido objeto de debate, ya que no se ha llegado a un acuerdo de cuál es el idóneo. En la actualidad existen diversos conceptos para definirlos y el uso de un concepto u otro depende del criterio del investigador (Wiens y Servedio, 2000).

Es importante destacar que algunos conceptos de especie tienen defensores entre los biólogos contemporáneos. Además, muchos de los conceptos de especie son al menos parcialmente incompatibles (De Queiroz, 2007). Lo que dio como resultado que se haya fomentado el interés por formular conceptos de especie que carezcan de las desventajas morfológicas, tipológicas, ecológicas, entre otras, de los conceptos propuestos en la historia de la biología.

Ante los problemas para aplicar un concepto en particular, Luna-Vega y Llorente (1994) mencionan que la tendencia general fue la propuesta de un concepto en el que se tome en cuenta el proceso de la evolución, con el fin de que las especies pudieran ser utilizadas como base para la reconstrucción filogenética e historia biogeográfica. Además, que estuviera acorde con la historia evolutiva de los grupos y que se pudiera aplicar en un mayor número de condiciones de tiempo, espacio, sexualidad y flujo genético, esto es, de alopátria,



alocronía, a especies asexuales, unisexuales, sexuales, híbridas, extintas y en general a todos los tipos de especiación posibles (Luna-Vega y Llorente, 1994). En taxonomía no solo es fundamental el reconocimiento de las especies como unidades básicas, sino también se ha utilizado como unidad funcional en las teorías sobre los procesos ecológicos y evolutivos (Llorente y Michán, 2000; Mishler y De Luna, 1997).

La gran diversidad de conceptos de especie ha causado conflictos entre investigadores. Debido a esto, De Queiroz (2007) da a conocer el concepto unificado de especie en el que menciona que las especies son linajes divergentes de metapoblaciones, que reúnen un conjunto de características morfológicas únicas que las hacen diferentes de otras entidades, que están en el mismo espacio geográfico o que son filogenéticamente cercanas. De Queiroz (2007) alude que, a pesar de las diferencias entre los conceptos y definiciones de especies contemporáneas, tienen una unidad conceptual subyacente, que proporciona una base para un concepto unificado de especies. También menciona que la clave para conciliar los conceptos de especies es identificar un elemento común, lo que implica un concepto único, más general de especie. Y dice que uno de los beneficios más significativos de un concepto unificado de especies es que permite a los biólogos abordar el problema de la delimitación de especies de una manera concreta.

## **1.2. Técnicas moleculares en análisis filogenéticos**

La aparición de conjuntos de datos moleculares y genómicos, junto con métodos de delimitación de especies específicos para este tipo de datos, ha llevado a la delimitación de especies a un debate en el que se encuentran diversos enfoques metodológicos y filosóficos. La delimitación de especies es un campo integrador que depende de tipos de datos cada vez más diversos (Fujita y cols., 2012) y su incorporación en conjunto ha sido necesaria para resolver problemas taxonómicos.

Las secuencias génicas son usadas en la mayoría de los estudios sistemáticos, ya que representan un gran número de caracteres y distintas tasas de evolución (González, 1997), ofreciendo una capacidad sin precedentes para investigar el pasado evolutivo de las especies a diferentes modelos de profundidad taxonómica (Lindell y cols., 2017).

Las técnicas moleculares representaron una revolución en la forma de realizar estudios de relaciones entre taxones y han promovido un aumento exponencial en la

identificación de especies crípticas (Sáez, 2009). El obtener la información genética de un organismo a partir de una pequeña cantidad de tejido, ha contribuido a que la técnica de amplificación de DNA por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sea la más usada en sistemática molecular (Grechko, 2013). Adicional a esto, los marcadores genéticos son segmentos que están dispersos en todo el DNA (Guimaráes y cols., 2007), pueden ubicarse en la secuencia de un gen (codificante) o secuencias que se encuentren cerca de un gen (no codificante) (Sambrook y cols., 2001). Además, los diferentes marcadores moleculares se utilizan también para estudios de identificación individual (huella genética) y grupal (especie, familia, línea), establecimiento y cálculo de distancia y diversidad genética (Zavala-Páramo y cols., 2002).

La tasa de mutación del DNA mitocondrial (mtDNA) es aproximadamente 10 veces mayor a la del DNA nuclear (nDNA). Es por esto, que existe una gran variación de secuencias entre las especies y, esto podría darse también entre individuos de la misma especie (Cuadros, 2013).

Específicamente, la filogenética molecular infiere la historia evolutiva del grupo taxonómico de estudio con base en su DNA, para ello el progreso teórico y metodológico en la construcción de filogenias, han tenido un gran impacto al momento de inferir relaciones filogenéticas, principalmente utilizando tres tipos de análisis: los de parsimonia que buscan el árbol más corto o con el menor número de pasos, los de máxima verosimilitud (MV) que encuentran el resultado general óptimo, y los de inferencia bayesiana (IB) que permiten la cuantificación directa de las medidas estadísticas para cada parámetro (Leache y Reeder, 2002).

### **1.3. Límite de especies**

Descubrir y describir especies es esencial para contestar algunas de las preguntas más básicas, relevantes e interesantes sobre la diversidad biológica tales como reconstruir las relaciones evolutivas, descubrir patrones biogeográficos y de distribución, conocer la diversidad de áreas específicas, entre otras (Cracraft, 2002; Wheeler, 2010). La tarea de delimitar especies es necesaria para mejorar la precisión en nuestra evaluación de la biodiversidad (Puerto y cols., 2001). Además, para contar con estrategias de conservación

exitosas dependemos del reconocimiento preciso de los límites de las especies (Bickford y cols., 2007).

Recientemente, la delimitación de especies parece estar alcanzando una madurez metodológica que consolida aún más el reconocimiento de la taxonomía como un campo riguroso e impulsado por las hipótesis de la biología evolutiva (Flot, 2015; Wägele y cols., 2011; Pavón-Vázquez y cols. 2018). Para ello se requiere de la evidencia de propiedades únicas que demuestren la monofilia de una población o de poblaciones con distribuciones alopátricas o parapátricas (Sites y Marshall, 2003; Sáez, 2009). Si bien, los datos moleculares brindan una fuente de información confiable, no pueden resolver por sí solos la asignación de especies, una hipótesis de delimitación de especies bien soportada debe tener información de múltiples evidencias (morfológica, molecular, ecológica, etc.), para asegurar una buena delimitación de especies (De Queiroz, 2007). Entre más tiempo haya pasado desde la divergencia de una población, mayor será el número de evidencias que se puedan tomar para este propósito. Los datos fenotípicos presentan un menor número de homoplasias que los datos genéticos y la existencia de múltiples haplotipos no es un criterio suficiente para delimitar una especie, por ello, Hillis y cols. (1996) sugieren que los caracteres morfológicos pueden ser utilizados como complemento. Al incluir ambos datos en un análisis se puede aumentar en gran medida el soporte y credibilidad del mismo (Lee y cols., 2007; Grechko, 2013).

Existen muchos métodos para delimitar especies con base en datos moleculares, éstos pueden utilizar un solo locus o funcionar con datos multiloci, o requerir o no de un árbol ultramétrico, de modo que la elección del método adecuado para un estudio está en función del tipo de datos de entrada que se tengan disponibles y el enfoque que se quiera dar al trabajo (Ence y Carstens, 2011).

Entre estos métodos se encuentran los que examinan el flujo genético (Porter, 1990; Téllez, 2006), analizan las distancias génicas (Good y Wake, 1992; Téllez, 2006), la inserción o delección de alelos (Doyle, 1995; Téllez, 2006) y en los que las especies son delimitadas mediante cualidades observables como el análisis de agregación de sus poblaciones (AAP) (Nixon, 1992). Otros métodos toman como base las topologías de árboles filogenéticos, a partir de las cuales se hacen inferencia de los límites (Braum y Shaw, 1995; Téllez, 2006). Entre estos, destacan los métodos basados en coalescencia, que consideran el

tiempo para describir las relaciones entre antepasados y descendientes en una población, integran las funciones de espacio y tiempo para inferir la genealogía de las poblaciones y proporciona un marco conceptual para identificar objetivamente las especies crípticas y alopátricas. Además, muestra que la historia genética de dos alelos puede ser rastreada hasta el momento en que convergen (evento de coalescencia) con el ancestro común más próximo, a su vez puede seguirse un par más de loci mucho más atrás en el tiempo, hasta otro evento de coalescencia; siguiendo este método se puede completar la historia genética de todo un conjunto de alelos y llegar a la especie ancestral en común (Zúñiga cols., 2009).

El proceso por el cual se determinan los límites de las especies con base en secuencias de DNA, ha tomado importancia recientemente (Fujita y cols., 2012; Carstens y cols., 2013; Caviedes-Solis y cols., 2015). Actualmente existen métodos filogenéticos de descubrimiento y validación que agrupan a las especies en linajes evolutivos (taxones biológicos con un ancestro en común), cuya diversificación es compatible con procesos poblacionales (por tanto, pueden ser reconocidos como la misma especie) (Fujita y cols., 2012).

Adicionalmente, se han propuesto diversos métodos para analizar caracteres como el análisis de componentes principales (PCA) y los análisis canónicos que ayudan al reconocimiento y soporte de la información morfológica que se emplea (James y McCulloch, 1990; Wiens y Penkrot, 2002; Martínez-Fuentes, 2019). Las desventajas que existen al implementar la delimitación de especies basada en morfología es que no es posible reconocer patrones de flujo génico y la muestra debe ser extensa para ser estadísticamente confiable (Wiens y Penkrot, 2002).

#### **1.4. Métodos de descubrimiento de especies**

Los métodos de descubrimiento proponen hipótesis de límites de especies sin tener una hipótesis a priori (Fujita y cols., 2012). Entre los métodos de descubrimiento más utilizados, está el propuesto por Wiens y Penkrot (2002) que se basa en un árbol de DNA mitocondrial (mtDNA) y en la procedencia geográfica de los ejemplares. Este enfoque considera a una “especie focal” o de interés, la cual representará una sola especie si en una filogenia con haplotipos no recombinantes aparece como un grupo monofilético con respecto a especies cercanamente emparentadas, o también si a pesar de aparecer en un grupo parafilético existe

congruencia geográfica para sustentar que existe flujo génico entre los nodos basales (Wiens y Penkrot, 2002; Sites Jr y Marshall, 2003).

Se encuentran además los métodos basados en la teoría de coalescencia, estos permiten analizar polimorfismos genéticos, donde ponen a prueba modelos que se basan en las fuerzas evolutivas (deriva génica, mutación, recombinación, selección natural), se basan en la teoría de genética de poblaciones, ya que toman en cuenta fuerzas que trabajan y sustentan la variación genética, pero a diferencia de procedimientos tradicionales, se apoyan en un marco matemático, estadístico y probabilístico (Avice, 2000; Esquivel, 2014).

Entre los métodos coalescentes de descubrimiento de mayor relevancia para delimitar especies, están el GMYC (generalized mixed Yule-coalescent), que es un modelo estadístico el cual evalúa los cambios previstos en las tasas de ramificación en el límite de especies. El objetivo general de este procedimiento es clasificar los intervalos de tiempo de ramificación observados definidos por los nodos en un filograma con un reloj restringido, este modelo requiere un árbol ultramétrico de entrada para ajustar modelos de ramificación interespecíficos (“diversificación”) o intraespecíficos (“coalescentes”) (Pons y cols., 2006). Con el supuesto simplificador de que las especies son monofiléticas, se puede especificar la divergencia de los ancestros comunes más recientes (MRCA, por sus siglas en inglés) que determina el tipo de eventos de ramificación. Las ramas que descienden de los nodos del MRCA son ramas coalescentes dentro de la especie y los clados definidos por cada nodo del MRCA son grupos de especies (Zhang y cols., 2013).

El método de Poisson Tree Processes (PTP: Zhang y cols, 2013) puede delimitar especies utilizando filogenias no ultramétricas, ya que modela la tasa de especiación empleando directamente el número de sustituciones. Este modelo considera dos clases independientes; la primera clase describe la especiación de tal manera que el número promedio de sustituciones hasta el próximo evento de, dado el árbol de especies, podemos estimar la tasa de mutación de una manera directa; la segunda clase describe eventos de ramificación dentro de las especies que son análogos a los eventos coalescentes, supone que el número de sustituciones hasta el próximo evento de ramificación dentro de las especies. Por lo tanto, este modelo asume que las longitudes de las ramas del árbol de entrada han sido generadas por dos clases de proceso independientes (Zhang y cols., 2013).

Para expresar el tamaño de la semejanza genética (similitud) o su complemento (distancia) entre individuos distinguido molecularmente, se necesita elegir un método que vaya acorde a la naturaleza de los datos. Los modelos de distancias genéticas son diseñados para representar en un único número, la diferencia genética entre dos poblaciones y son representadas en función de la frecuencia alélica de la población (Bruno y Balzarini, 2010).

### **1.5. Métodos de validación de especies**

Los métodos de validación se encargan de verificar con modelos estadísticos hipótesis de límites de especies previamente establecidas (Fujita y cols., 2012). Entre los métodos de validación, destacan el de Bayes Factor Delimitacion (BFD), que proporciona un apoyo decisivo para el modelo de delimitación de especies (Grummer y cols., 2014), este método se realiza designando hipótesis de las especies que se desea comprobar, bajo un marco bayesiano (Drummond y Rambaut, 2007). Trabaja obteniendo las verosimilitudes obtenidas de cada hipótesis y la diferencia de sus logaritmos para obtener los factores de bayes, estos valores son utilizados después para comparar las hipótesis. Tiene la ventaja de no necesitar un árbol ultramétrico de entrada, ya que reconstruye las relaciones filogenéticas y el modelo de especies al mismo tiempo. Funciona estimando la probabilidad del cambio en la frecuencia de los alelos con distribuciones posteriores, tiempos de divergencia y tamaños efectivos de población (Grummer y cols., 2014).

Bayesian phylogenetics and phylogeography (BPyP), es un método que utiliza un modelo coalescente para comparar diferentes hipótesis de delimitación de especies en un marco bayesiano, tomando en cuenta datos de secuencia de múltiples loci como entrada (Yang y Rannala, 2010). BPP utiliza algoritmos Bayesianos MCMC que acomodan la filogenia de las especies, así como procesos coalescentes en especies ancestrales existentes y extintas. Se utiliza un árbol guía para reducir el número de posibles delimitaciones de especies sobre las que el programa debe integrarse. En cada nodo del árbol, el programa evalúa si los datos de secuencia son compatibles con un modelo de una especie o si se debe invocar un modelo de dos o más especies para explicar los datos. La filogenética y filogeografía bayesiana incorpora un modelo que incluye los tiempos de divergencia ( $\tau$ ) de las especies y parámetros de tamaño de la población tales como  $\theta = 4N\mu$  donde N es el tamaño efectivo y  $\mu$  es la tasa de sustitución por sitio por generación. Las distribuciones

previas razonables para estos parámetros pueden ser difíciles de determinar, y potencialmente pueden tener un gran efecto en las probabilidades posteriores (Bailey y cols., 2013).

## **1.6. Grupo de estudio**

Las lagartijas del género *Gerrhonotus* (Wiegmann 1828), son un componente conspicuo de la herpetofauna del Centro-Sur de Estados Unidos, México, Guatemala y tierras bajas del Pacífico desde el centro de Costa Rica hasta Panamá (García-Vázquez cols., 2018a; Mata-Silva y cols., 2019). El género se caracteriza por la pérdida de al menos una escama en la serie cantal/loreal y la posesión de cinco o menos temporales por fila vertical, cuatro pares de escamas grandes y un escudo genial, en algunas especies dentro de este género la coloración en el dorso tiene un patrón de bandas cruzadas que van de claro a oscuro (Good, 1998; García-Vázquez y cols., 2018a).

Actualmente se reconocen 10 especies de *Gerrhonotus*, cinco con escamas dorsales lisas y cinco con escamas quilladas; cinco de estas 10 especies, tienen distribución restringida al norte de México: *Gerrhonotus parvus* (Knight y Scudday, 1985) y *G. lazcanoii* (Banda-Leal y cols., 2017) se extienden por el centro de Nuevo León; *G. farri* (Bryson y Graham, 2010) solo se ha registrado en una pequeña región de Tamaulipas; *G. lugoi* (Mccoy, 1970) se distribuye en las cordilleras que rodean la cuenca de Cuatro Ciénegas en el estado de Coahuila, México y una población aislada en el centro de nuevo León (García-Vázquez y cols., 2016); y *G. mccoii* (García-Vázquez y cols., 2018) con distribución restringida a la cuenca de Cuatro Ciénegas, Coahuila (García-Vázquez y cols., 2018a). *Gerrhonotus rhombifer* (Peters, 1876) es endémico de la región suroeste de Costa Rica y Panamá (Lamar, 2015). Una especie no descrita, *Gerrhonotus* sp. tiene su distribución restringida en la Vertiente Pacífica (Castiglia y cols., 2010; García-Vázquez y cols. 2018a). Tres especies tienen una amplia distribución, *G. infernalis* (Baird, 1859) se distribuye desde el centro de Texas, USA, al sur de Hidalgo, México, con poblaciones aisladas en el centro-sur de Chihuahua, suroeste de Coahuila y Durango (Good, 1994; Ramírez-Bautista y cols., 2010); *G. ophiurus* (Cope, 1867) se distribuye en el sureste de San Luis Potosí, sureste de Tamaulipas, Veracruz y Puebla (García-Padilla y Villegas-Ruiz 2010), finalmente, *G. liocephalus* se ha reportado para Zacatecas (Lamas y Sigala, 2020), Aguascalientes (Vázquez-Díaz y Quintero-Díaz, 2005), Jalisco (Dávalos-Martínez y cols., 2017), el centro

y sur de México en los estados de México, Puebla, Morelos, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Veracruz y Chiapas (Good, 1994) y parte adyacente de Guatemala (Morales y cols., 2015).

### **1.7. *Gerrhonotus liocephalus* (Wiegmann, 1828)**

*Gerrhonotus liocephalus* (Fig. 1) es una lagartija de cuerpo alargado, en la adultez su longitud hocico-cloaca (LHC) tiene un promedio de 155 mm y su cola llega a medir lo doble que su cuerpo, son de color café claro y tienen escamas marrones más oscuras dispersas en el dorso, en la superficie inferior de la cola son más claras, immaculadas o con escamas más oscuras y dispersas en la parte lateral de una o dos filas de ancho, en el pliegue lateral tienen 10-12 barras oscuras muy prominentes de una o dos escamas dorsales de ancho que contrastan fuertemente con el dorso y el vientre es immaculado o casi immaculado. Las extremidades, la cabeza y la superficie dorsal de la cola son similares al color del dorso, excepto que las escamas del hocico son más claras que el resto de la cabeza, y se aproximan al color del vientre (Good, 1994).

A menudo hay una línea oscura que corre post-ventralmente desde el ojo y que separa las escamas del hocico que son de color amarillo claro o crema y las escamas temporales más oscuras, esta línea es prominente en especímenes más pequeños y se desvanece a medida que los especímenes aumentan de tamaño; sin embargo, todavía se encuentra en algunos individuos relativamente de talla grande (Good, 1994).



En ocasiones, se encuentran bandas irregulares dorsales que consisten en una banda blanca de una escama de ancho flanqueada por escamas oscuras dispersas. Las barras de pliegue lateral en especímenes del sur de México son a menudo menos prominentes que las de otras zonas (Good, 1994).



Figura 1. Ejemplar de *Gerrhonotus liocephalus* de la localidad de Silacayoapam, Oax.

### 1.8. Historia taxonómica

Wiegmann (1828) describe a *Gerrhonotus liocephalus* con base en un ejemplar joven, especificando solo como localidad tipo “México”. Debido a la falta de una designación clara de localidad tipo, Smith y Taylor en 1950, intentando corregir la falta de precisión designaron como localidad tipo a Tlapancingo, Oaxaca. Con base en el estado del conocimiento que existía en ese momento, restringieron la localidad tipo solo a la localidad en la cual se tomaron especímenes y/o aquellas en las que existía una posibilidad razonable de que el tipo haya sido extraído.

Peale y Green (1830) con base en tres ejemplares describen a *Scincus ventralis*, designan como localidad tipo el distrito minero de México, restringido a Magdalena, D.F., estos autores aparentemente desconocían el trabajo de Wiegmann (1828) y no compararon

los dos taxones, por lo que más tarde, Wiegmann (1834) refiere como *Gerrhonotus liocephalus* al ejemplar joven que había descrito, pero conserva el nombre anterior para los especímenes adultos examinados por Peal y Green (1830), por lo que Wiegmann (1834) designo a la especie *Gerrhonotus tessellatus*, este nombre fue posteriormente utilizado por Cope (1866, 1878), Duméril (1851), Gray (1838, 1845) y O'Shaughnessy (1873). Cope (1866) reconoció como válido a *S. ventralis*, sin embargo, O'Shaughnessy (1873) lo relega a sinonimia de *G. tessellatus*. Con base en su similitud, los taxones reconocidos como subespecies de *G. liocephalus* fueron sinonimizados con *G. liocephalus* por Bocourt (1878), en general, se han considerado sinónimos desde entonces.

Hartweg y Tihen (1946) describieron la subespecie *G. l. austrinus* con base en un ejemplar colectado en Cerro Malé, Chiapas. Consideraron que esta forma estaba más estrechamente relacionada con *G. liocephalus* que con el "complejo *G. infernalis* / *G. ophiurus*", ya que *G. l. austrinus* y *G. l. liocephalus* (Wiegmann 1820) poseen solo tres elementos cantales / loreales, una sola escama preocular, una ventral completa, y carece de bandas cruzadas dorsales prominentes. Por otro lado, diferenciaron a *G. l. austrinus* de *G. l. liocephalus* por la ausencia de supranasales, la presencia de un frontonasal larga en lugar de ancha, frontal e interparietal separadas y segunda escama temporal primaria y la lateral posterior supraocular en contacto. También informaron que el número de filas transversales de las escamas dorsales en *G. l. austrinus* se encuentra en el límite inferior para *G. l. liocephalus*.

Tihen (1954) y Smith y Álvarez del Toro (1963) reportan el segundo y tercer espécimen de *G. liocephalus* para el estado de Chiapas respectivamente. Estos especímenes provienen de la localidad de Tuxtla Gutiérrez y coincidían con la descripción de *G. l. liocephalus* en lugar de *G. l. austrinus*. Tihen (1954) menciona que *G. l. liocephalus* y *G. l. austrinus* "son en realidad dos razas diferentes", pero no dio más detalles.

Good (1994), en una revisión taxonómica del género alego que con las evidencias que Tihen (1954) proporciono, no hay forma de determinar si la característica distintiva de este espécimen se debe a la diferenciación de la población o simplemente a la variación individual, por lo que formulo una hipótesis tentativa donde menciono que *G. l. austrinus* y *G. l. liocephalus* deben considerarse como conespecíficos y que con más especímenes sería más fácil justificar el estado de especies separadas.

Adicionalmente, Good (1997) remitió tentativamente ciertas poblaciones de *Gerrhonotus* en el Occidente de México (desde Durango, Sinaloa, Jalisco y Colima) a *G. liocephalus*. Sin embargo, recientemente, se ha proporcionado evidencia molecular (Castiglia y cols. 2010; García-Vázquez y cols. 2018a; García-Vázquez y cols., 2018b) que demuestra que los ejemplares de *Gerrhonotus* del occidente de Jalisco representan una especie sin describir.

Posteriormente García-Vázquez y cols. (2018a), encontraron evidencias moleculares, respaldadas por la morfología del fenotipo del espécimen que revisaron, que los registros de *G. liocephalus* en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, reportados por Good (1994) son consistentes con el de otras poblaciones de *G. ophiurus*, por lo que no se tiene la certeza de que *G. liocephalus* habite realmente en esa zona.

## **2. Justificación**

García-Vázquez y cols. (2018a) en un estudio biogeográfico del género *Gerrhonotus* encontraron la existencia de tres linajes fuertemente apoyados con valores de bootstrap  $\geq 70$  y probabilidades posteriores  $\geq 0.95$ , geográficamente delimitados y a veces moderadamente divergentes dentro de *G. liocephalus* (Sierra Madre del Sur y la Faja Volcánica Transmexicana, Oaxaca-Chiapas en la Costa del Pacífico al este del Istmo de Tehuantepec y la región Mixteca, Oaxaca en la Costa del Pacífico al Oeste del Istmo de Tehuantepec), por lo que sugieren que esta especie puede estar compuesto por múltiples linajes evolutivos independientes y concluyen que para determinar el número de linajes evolutivos independientes, se requiere un estudio integrativo de delimitación de especies de las especies de *Gerrhonotus* con escamas quilladas.

En particular, para *G. liocephalus* estos autores no incluyeron representantes de zonas intermedias como la cuenca del Balsas y de zonas periféricas como las poblaciones de Guatemala. Además, existen reportes de esta especie para el sur del Altiplano, que tampoco han sido evaluados (Vázquez Díaz y Quintero Díaz, 2005; Dávalos-Martínez y cols., 2017; Campos-Rodríguez y cols., 2017).

Actualmente, algunos autores mencionan la presencia de tres subespecies dentro de *G. liocephalus* sin justificación alguna; *Gerrhonotus liocephalus liocephalus*, *Gerrhonotus*

*liocephalus austrinus* y *Gerrhonotus liocephalus loweryi* (Tihen, 1948) (Uetz y Hošek, 2018).

*Gerrhonotus liocephalus* es una especie con problemas taxonómicos debido a que su morfología varía a lo largo de su distribución. Sin embargo, la considerable divergencia genética no siempre va acompañada de diferenciación morfológica. Hay estudios que sugieren que podría tratarse de un complejo de especies, pero no se han realizado trabajos integrativos que ayuden a sustentar estas evidencias. Por lo que este trabajo pretende aportar información morfológica, molecular y de distribución que permitirá conocer con mayor certeza por cuántas especies está compuesto el complejo *G. liocephalus*, de esta manera se podrán evaluar con mayor precisión su estatus de conservación y determinar su grado de endemismos. Además de ser punta de lanza para futuros trabajos relacionados con otras especies del género.

### **3. Hipótesis**

El taxón *Gerrhonotus liocephalus* está compuesto por más de un linaje, los cuales representan especies diferentes.

### **4. Objetivo general**

Realizar taxonomía integradora de la lagartija caimán sureña *Gerrhonotus liocephalus*, con base en evidencia morfológica y molecular para así poder reconocer sus límites de especie.

### **5. Objetivos particulares**

1. Analizar las diferencias morfológicas de los grupos propuestos de *Gerrhonotus liocephalus*.
2. Mediante taxonomía integradora evaluar los límites de las especies dentro de los grupos propuestos *Gerrhonotus liocephalus*.
3. Determinar la distribución de las distintas especies resultantes de *Gerrhonotus liocephalus*.
4. De ser el caso, proponer cambios taxonómicos para la especie *Gerrhonotus liocephalus*.

## **6. Metodología**

### **6.1. Zona de estudio**

El estudio se llevó a cabo en toda la zona de distribución de *Gerrhonotus liocephalus*, abarcando los estados de Aguascalientes, Estado de México, Puebla, Morelos, Michoacán, Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y en Huehuetenango, Guatemala, en las localidades donde se contaba con registro de presencia de la especie.

### **6.2. Muestreo**

La recopilación de los datos se dividió en tres principales etapas: i) Se realizó una búsqueda de secuencias en genbank de *G. liocephalus* y especies relacionadas, ii) Se solicitaron ejemplares, y tejidos de colecciones herpetológicas, iii) Se realizó trabajo de campo exhaustivo, enfocado en localidades documentadas como Santa María Guienagati y San Francisco Tlapancingo, Oaxaca, Cerro Malé en Chiapas y de las cuales no se tenían muestras de tejido (Fig. 2). Debido a que algunos autores consideran algunas subespecies se tomaron en cuenta 73 ejemplares de grupos externos; 23 de la colección del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias (MZFC), nueve del Museo de Zoología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (MZFZ), 130 de la Colección Nacional de Anfibios y Reptiles del Instituto de Biología (CNAR) y cuatro de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB).

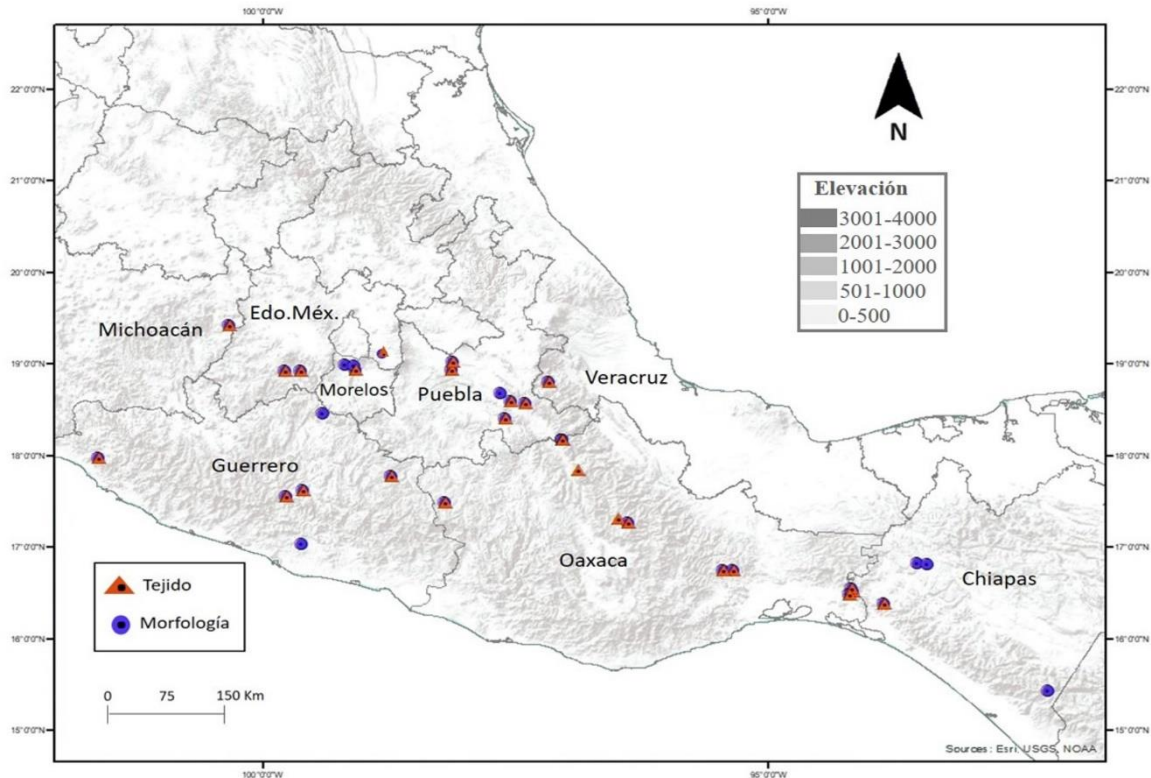


Figura 2. Localidades de los ejemplares revisados con morfología (circulo azul) y tejidos (triangulo naranja) para los análisis moleculares.

### 6.3. Trabajo de gabinete

#### 6.3.1. Caracteres morfológicos

Los caracteres examinados incluyen aquellos usados por Smith (1946), García-Vázquez (2018a) y Good (1994). Estos caracteres corresponden al patrón de escamación, morfométricos y patrón de coloración, fueron divididos de acuerdo con su naturaleza en morfométricos, merísticos y cualitativos. Se eligieron cinco caracteres morfométricos, 19 cuantitativos.

#### 6.3.2. Caracteres morfométricos

Se evaluaron 11 caracteres morfométricos lineales (Fig. 3) utilizando un vernier electrónico con una precisión de 0.01 mm para su medición:

1. Longitud hocico-cloaca (LHC), medida de la punta del hocico al margen anterior de la cloaca.
2. Longitud de la cola (LC), medida del margen posterior de la cloaca hasta la punta de la cola.

3. Ancho máximo de la cabeza (AC), medido al nivel de la región postorbital.
4. Longitud de la cabeza (Lca), medida de la punta del hocico al margen posterior de la membrana timpánica.
5. Diámetro vertical del tímpano (DT).
6. Longitud de la extremidad anterior (LA), medida desde la axila hasta la punta del tercer dedo
7. Longitud de la extremidad posterior (LP), medida tomada desde la ingle hasta la punta del cuarto dedo.
8. Longitud del cuarto dedo de la extremidad posterior (LD).
9. Longitud de la tibia (Lti).
10. Longitud del tronco (LAI), medida de la axila a la ingle.
11. Longitud total (Lto), medida tomada de la punta del hocico a la punta de la cola.

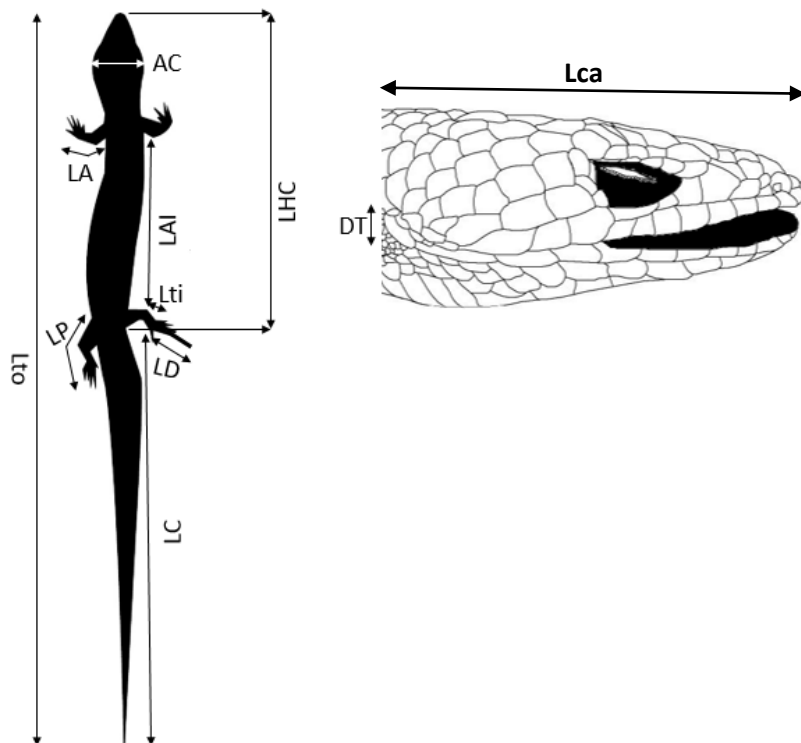


Figura 3. – Representación visual de los caracteres morfométricos considerados en este estudio.

### **6.3.3. Caracteres merísticos**

Con base en estudios taxonómicos previos del género *Gerrhonotus* (Good, 1994; García-Vázquez y cols., 2018a) y moleculares (Castiglia y cols., 2010) se consideró un total de 21 caracteres merísticos:

1. Número de laminillas subdigitales en el cuarto dedo de la extremidad posterior derecha.
2. Número de escamas rostrales
3. Número de escamas supranasales
4. Número de escamas internasales.
5. Número de escamas superciliares derechas.
6. Número de escamas superciliares izquierdas.
7. Número de escamas posoculares.
8. Número de escamas prefrontales.
9. Número de escamas suboculares derechas.
10. Número de escamas suboculares izquierdas.
11. Número de escamas en la hilera temporal derecha.
12. Número de escamas en la hilera temporal izquierda
13. Número de escamas frontoparietales.
14. Número de escamas interoccipitales.
15. Número de escamas nucales.
16. Numero de escamas infralabiales.
17. Número de escamas posmentales.
18. Número de escamas sublabiales
19. Número de escamas de la barbilla.
20. Número de escudos geniales.
21. Número de bandas dorsales (de la nuca a la altura de la cloaca, tomando en cuenta bandas bifurcadas).

### **6.3.4. Caracteres cualitativos**

Se tomaron en cuenta caracteres cualitativos sugeridos por Good (1994), y otros sugeridos el presente trabajo.



1. Escama nasal.
2. Escama cantoloreal.
3. Escamas de la cabeza con manchas blancas.
4. Bandas dorsales blancas.
5. Vientre, immaculado o con manchas

### **6.3.5. Análisis multivariados**

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de los caracteres morfométricos, los cuales fueron estandarizados dividiendo los caracteres morfométricos entre LHC y en Excel utilizando el logaritmo natural para disminuir la influencia que pudieran causar las diferencias de tamaño entre especímenes y los caracteres revisados (Sánchez-García, 2018). El PCA se llevó a cabo en el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.02.04 (StatPoint technologies, 2013), este programa conserva las variables que explican de mejor forma los datos. Se tomaron en cuenta valores positivos tanto como negativos. Para la obtención de caracteres diagnósticos se tomaron en cuenta solo valores mayores al 60% (Vicente-Villardón, 2006).

El PCA permitió observar los patrones de expresión morfológica el cual posteriormente se utilizó para validar los grupos por la técnica de análisis discriminantes. El análisis de discriminantes se realizó en el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.02.04 (StatPoint technologies, 2013), este se realizó con el objetivo de observar la aptitud de los caracteres usados para formar los grupos y verificar la congruencia de los grupos formados en los análisis moleculares (Sánchez-García, 2018).

## **6.4. Secuencias de DNA**

### **6.4.1. Extracción**

La extracción de DNA genómico se realizó a partir de tejido hepático y/o muscular preservado en alcohol absoluto, mediante la técnica de acetato de amonio (Fetzner 1999). Para las muestras antiguas de más de 15 años, se utilizó con el kit de extracción DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Una vez realizada la extracción, se visualizó la cantidad y calidad de DNA, corriendo 1.5 µl de muestra y un marcador de peso molecular de 1kb Plus

(100-12,000 pb) en un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

#### 6.4.2. Amplificación

Las secuencias de los primers para ND4 se tomaron de Arévalo y cols. (1994), para BDNF y PRLR de Townsend cols. (2008), adicionalmente se diseñaron nuevos primers para este estudio (Cuadro 1).

La amplificación se realizó por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando para ello los primers ND4, ND4 IntR, Leu y ND4 Int fdw, para el gen ND4. Los primers utilizados para el gen PRLR fueron F1, PRLRfdw, R3 y PRLRrev; para el gen BDNF fueron BDNF-F, BDNF-R, BDNFfdw2 y BDNF-rev2 (cuadro 1). Las condiciones del PCR para ND4 iniciaron con una temperatura de desnaturalización de 94° C por 2 minutos, seguida por 38 ciclos de 94° C por 30 segundos, alineamiento a 48-50° C por 45 segundos y 72° C por 45 segundos y una extensión final a 72° C por 7 minutos. Para BDNF y PRLR se inició la desnaturalización con una temperatura de 94° C por 2.45 minutos, seguida por 38 ciclos de 94° C por 15 segundos, alineamiento a 51-39.6°C (reduciendo 0.3°C cada ciclo) por 20 segundos, y 72° C por 1 minuto y extensión final de 72° C por 7 minutos (García-Vázquez y cols., 2018).

Los productos obtenidos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% mediante un transluminador de luz ultravioleta para determinar la calidad y el tamaño del fragmento logrado.

Cuadro 1. Oligonucleótidos usados en el presente estudio.

| Primer         | Secuencias (5'→3')                    | Fuente                       |
|----------------|---------------------------------------|------------------------------|
| ND4            | TGACTACCAAAAAGCTCATGTAGAAGC           | Arevalo y cols, 1994.        |
| GerrND4 Intfdw | AA YACTAACTAYGAACGAAC                 | García-Vázquez y cols, 2018. |
| GerrND4 IntR   | AA YACYAACTATGAACGAAC                 | García-Vázquez y cols, 2018. |
| LEU            | TRCTTTTACTTGGATTGCACCA                | Arevalo y cols, 1994.        |
| BDNF-F         | GACCATCCTTTTCCTKACTATGGTTATTTTCATACTT | Townsend y cols, 2008.       |
| BDN- R         | CTATCTTCCCCTTTTAATGGTCAGTGTACAAAC     | Townsend y cols, 2008.       |
| BDNF-fdw2      | AGCCTCCACTGCTCTTTCTGCTCGA             | Diseñado en este estudio     |
| BDNF-rev2      | GACAATGGGTAAGCGACCATGACAG             | Diseñado en este estudio     |
| PRLR-F1        | GACARYGARGACCAGCAACTRATGCC            | Townsend y cols, 2008.       |
| PRLR-R3        | GACYTTGTGRACCTTCYACRTAATCCAT          | Townsend y cols, 2008.       |

|          |                           |                          |
|----------|---------------------------|--------------------------|
| PRLR-fdw | AGCATGTGGGAAACACCAAACATAG | Diseñado en este estudio |
| PRLR-rev | GACAAAATGTAGGTGGGTGTCACAG | Diseñado en este estudio |

### 6.4.3. Purificación y secuenciación

La purificación de los productos se llevó a cabo utilizando la técnica de Polyethylene Glycol (PEG), que 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 y cols., 1996).

Los productos purificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% mediante un transluminador de luz ultravioleta para determinar la calidad y el tamaño del fragmento purificado. Posteriormente las muestras resultantes fueron enviadas para su secuenciación a la empresa Macrogen Korea Inc.

### 6.4.4. Hipótesis filogenéticas

Todas las secuencias se editaron y ensamblaron en el programa Sequencher v 4.8 (Gene Codes Corp. 2007). El alineamiento obtenido con este programa fue refinado manualmente con el programa MEGA 7.0 (Kumar y cols., 2004).

Se usó PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear y cols. 2012) para determinar el esquema de partición y los modelos de sustitución que mejor se ajustaron a cada partición, siguiendo criterio de información de Akaike corregido (AICc). Para el análisis de reconstrucción filogenética se utilizó los métodos de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). El análisis de MV se llevó a cabo en RAxML HPC 7.4.2 (Stamatakis, 2016) en la interfaz raxmlGUI 1.3 (Silvestro y Michalak, 2012), implementando el modelo GTRGAMMA, con las estrategias de partición sugeridas por PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear y cols., 2012). La evaluación del soporte de nodos se hizo con un Bootstrap no paramétrico con 3,000 réplicas al azar, donde los nodos con valores de  $\geq 70$  se consideraron como soportados (Hillis y Bull, 1993).

El análisis bayesiano (IB) se ejecutó en el programa MrBayes 3.2.2 (Ronquist y cols., 2012), con las estrategias de partición y modelos sugeridos por PartitionFinder 2.1.1 (Lanfear y cols., 2016), se corrieron dos cadenas paralelas de Markov (MCMC) con  $3 \times 10^8$  generaciones cada una, muestreando cada 5000 generaciones, el 25% de generaciones

iniciales se eliminó como burn-in (Ruane y cols., 2014; Smart y cols., 2017). Los resultados de las cadenas de Markov se unieron y se corroboró su convergencia en TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007). A partir de los árboles obtenidos, se construyó un árbol de máxima credibilidad en el software TreeAnnotator v1.8.0 (Drummond y Rambaut 2007) con un límite de probabilidad posterior de 0.0 y una altura de nodo media. El soporte de los clados se evaluó mediante probabilidades posteriores donde los clados fuertemente apoyados fueron aquellos con valores  $\geq 0.95$  (Leaché y Reeder, 2002).

## **6.5. Delimitación de especies**

### **6.5.1. Descubrimiento de especies**

Debido a que los análisis filogenéticos pueden reflejar una estructura genética somera (presencia de politomías) resultado de una divergencia genética baja a nivel intraespecífico, se implementó una red de haplotipos para visualizar las posibles relaciones entre individuos (Barber y Klicka, 2010), mediante el programa Popart 1.7 (Leigh y Bryant, 2015), implementando los algoritmos Neighbor-Net y median-joining (Bandelt cols., 1999).

Para establecer los límites de especies se implementaron dos métodos coalescentes de descubrimiento de especies:

- 1) GMYC, para lo cual se generó un árbol ultramétrico en BEAST v2.4.8 (Bouckaert y cols., 2014), se utilizaron las mismas particiones que en los análisis de IB, los modelos utilizados fueron evaluados mediante bModelTest (Bouckaert y Drummond, 2017), se corrieron dos análisis por separado de  $1 \times 10^8$  generaciones cada uno, muestreando cada 1000 generaciones y descartando como burn-in el 25% de los árboles iniciales, los parámetros utilizados fueron: relaxed clock lognormal y yule model prior. Para comprobar la convergencia de los datos los archivos resultantes fueron visualizados y combinados en TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond, 2017). Se elaboró un árbol de máxima credibilidad con base en los árboles obtenidos, mediante TreeAnnotator v1.8.0 (Drummond y Rambaut 2007). El árbol resultante se utilizó como entrada para el método GMYC (Pons y cols., 2006), se implementaron los métodos single threshold y multiple threshold a partir del paquete “SPLITS” implementado en el software estadístico “R” (Development Core Team, 2010).

- 2) PTP, se corrieron dos análisis de  $1 \times 10^6$  generaciones con los siguientes parámetros: Thinning 100, burn-in 0.1 y seed 123, mediante en el servidor web de Exelixis

Lab (<http://species.hits.org/ptp/>). (Ezard y cols., 2009; <http://rforge.rproject.org/projects/splits>), se utilizó como árbol de entrada el obtenido en RAxML HPC 7.4.2 (Stamatakis, 2006), descartando el grupo externo. Se tomaron en cuenta los resultados de PTP tanto con Máxima Verosimilitud como los de soporte bayesiano (bPTP) (Zhang y cols., 2013).

Finalmente se estimaron las distancias génicas en el programa MEGA 7.0 (Kumar y cols., 2004). Para este análisis se seleccionó el modelo K2P, en este método se evaluaron estadísticamente las distancias existentes dentro y entre de cada clado recuperado en los análisis previos.

### **6.5.2. Inferencia del árbol de especies**

Se infirió un árbol de especies de *Gerrhonotus liocephalus* para evaluar las hipótesis recuperadas por el método de GMYC con ambos umbrales y también los recuperados por PTP. Se utilizaron las secuencias de los tres loci para inferir el árbol de especies en \*BEAST como se implementó en BEAST v2.4.8 (Bouckaert y cols., 2014). Cada grupo obtenido por GMYC/PTP de *G. liocephalus* se consideró como una especie diferente para el análisis en \*BEAST. Fueron recuperadas tres propuestas de especies (GMYC con umbral single threshold y PTP) y cuatro propuestas de especies (GMYC con umbral multiple threshold). A cada locus se le asignó su propia partición y se seleccionó el modelo evolutivo más adecuado para cada partición utilizando AICc en jModelTests 2.1.10 (Darriba y cols., 2012; Guindon y Gascuel, 2003).

La prueba de los aspectos temporales de las hipótesis biogeográficas requiere una filogenia calibrada en el tiempo (Colston y cols., 2013; García-Vázquez y cols., 2018a). Con este fin, los tiempos de divergencia y la filogenia se estimaron simultáneamente.

Para calibrar el árbol se utilizó como referencia tres fósiles diferentes, en primera instancia, la edad del fósil *Primaderma* (Nydman, 2000) que representa el ancestro común más reciente (ACMR) de Anguidae, Aniellidae y Helodermatidae se calibró usando una media lognormal de 0,01 y una desviación estándar lognormal de 0,7, que representa una edad de 99 millones de años (Ma) (Nydman, 2000; Mulcahy et al., 2012). El nodo del ACMR de Anguidae y Aniellidae representado por el fósil *Odaxosaurus* se calibró con una media lognormal de 0.01 y una desviación estándar lognormal de 0.68, que representa una edad de

70 Ma (Gilmore, 1928; Mulcahy et al., 2012). Para el nodo del ACMR del género *Gerrhonotus* se utilizó como referencia a "*Gerrhonotus*" *mungerorum* y *Paragerrhonotus ricardensis* (Estes, 1963; Holman, 1975) los cuales fueron calibrados con una media lognormal de 0.01 y una desviación estándar lognormal de 0.85, que representa una edad de 8 Ma (Estes, 1963; Holman, 1975) (García-Vázquez y cols., 2018a). Para el análisis, se especificó un reloj estricto y un modelo de Yule para el árbol. Se realizaron dos corridas independientes de  $3 \times 10^8$  generaciones cada una y muestreando cada 5000 generaciones. Los resultados fueron combinados y revisados en TRACER 1.5 (Rambaut y Drummond, 2007) donde se corroboró la convergencia. Se generó un árbol de máxima credibilidad utilizando alturas medias para los nodos y una probabilidad posterior de 0.0 después de descartar el 10% de los árboles iniciales, implementado en TreeAnnotator v1.8.0 (Drummond y Rambaut 2007).

### **6.5.3. Validación de especies**

Finalmente se utilizaron dos métodos de validación con los cuales se evaluaron las cuatro hipótesis obtenidas por los métodos anteriores como se muestra en la figura 4.

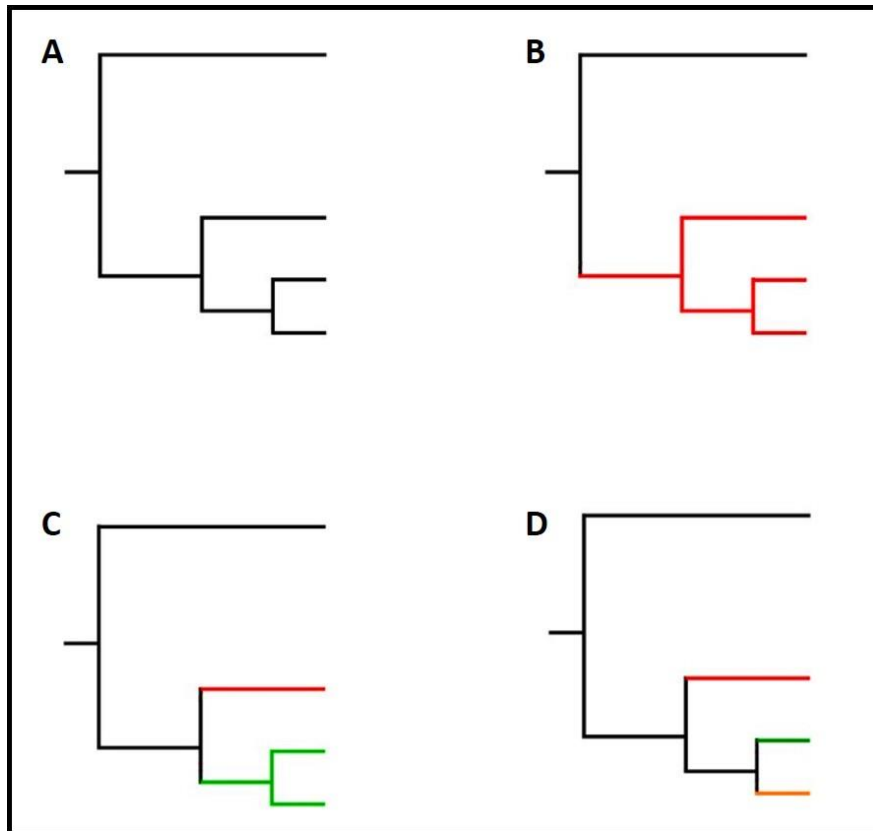


Figura 4. Hipótesis probadas y obtenidas de los métodos de descubrimiento de especies y de la agrupación morfológica. Cada color representa una especie diferente. A) Todos los ejemplares representan una sola especie; B) Los especímenes del centro (Negro) representan una especie y los del sur (Rojo) otra; C) Representa tres especies (Centro en color negro, Oeste del Istmo de Tehuantepec en color rojo y Este del Istmo de Tehuantepec en color verde; D) Simboliza cuatro especies, Negro. - Centro, Rojo. - Oeste del Istmo de Tehuantepec, Verde. - Oaxaca al Este del Istmo y Naranja. - Norte de Chiapas.

Para el método de BFD los modelos de especies que se pusieron a prueba fueron los contruidos a partir de los resultados de los análisis filogenéticos y los criterios de GMYC y PTP. Se generaron archivos de salida (.xml) para cada modelo en BEAUti v2.4.8 8 (Bouckaert y cols., 2014), mediante StartBeast Template. Por cada una de las hipótesis se realizaron dos corridas en BEAST de  $3 \times 10^8$  generaciones muestreando cada 3000 generaciones, y desechando como burn-in el primer 20% de generaciones. Se corrió una cadena adicional de Markov con 100 “pasos”, cada uno de  $3 \times 10^5$  generaciones (en total  $3 \times 10^7$  generaciones) muestreando cada 3000 con una frecuencia Alpha= 0.3 y desechando el 20% como burn-in. Para calcular las verosimilitudes marginales finales de cada hipótesis se usó Path sampling analyser (Bouckaert y cols., 2014), los resultados de cada par de réplicas fueron promediados y se ordenaron los modelos de acuerdo a su verosimilitud final. Después se obtuvieron los valores de los factores de bayes (FB), con la formula  $FB = 2 \times [\text{modelo1} -$

modelo2], en relación con la hipótesis con el valor más alto (Yu y cols., 2017), donde solo se toman en cuenta los valores  $\geq 10$  como concluyentes (Grummer y cols., 2014; Nieto-Montes de Oca y cols., 2017; Solano-Zavaleta y Nieto-Montes de Oca, 2018).

En segundo lugar, se empleó BPP 4.2.9 (Yang, 2015), para delimitar especies permitiendo que variara la topología del árbol de especies (Yang, 2015; Yang y Rannala, 2014). Se generaron tres archivos de salida, uno que contenía las secuencias de cada individuo separados por genes (.txt), en el segundo archivo se asignan los especímenes a las especies/poblaciones (.imap) y el tercero con el árbol de especies, frecuencia de muestreo (5), burnin (10,000) y el número de generaciones ( $3 \times 10^7$ ) (.ctl).

El método de BPP no requiere de grupos externos y supone un reloj estricto (Pavón-Vázquez y cols., 2018). Por lo tanto, se especificó la topología del árbol de especies como árbol inicial. Se especificó la distribución gamma G (1, 10) como anterior para el tamaño de población ancestral ( $\theta$ ) y la distribución gamma G (2, 2000) como anterior para la raíz ( $\tau_0$ ). Se utilizó el logaritmo 0 de Yang y Rannala (2010). Todos los análisis consistieron en un periodo de 10,000 generaciones, seguido de un periodo de pos-burn-in de 2.5 millones de generaciones muestreando cada 5000 generaciones.

## **7. Resultados**

### **7.1 Revisión morfológica**

Con base en la revisión morfológica se diferenciaron tres grupos dentro del complejo *Gerrhonotus liocephalus*, los cuales presentan diferencias entre sí.

El primer grupo está conformado por organismos de los estados de México, Puebla, Morelos, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Veracruz, estos representan el morfotipo de la zona centro el cual, tiene una coloración que varía entre marrón y amarillo, el dorso puede ser de color liso (Fig. 5A) o poseer escamas de color marrón oscuro o negro dispersas por el dorso (Fig. 5B), presentan de 13-16 hileras de escamas dorsales y cuatro escamas posoculares, un promedio de 16.5 (14-19) escamas en el cuarto dedo.





Figura 5. Morfotipo distinguible del centro de México. A) morfotipo liso, fotografía tomada por Eric Centenero-Alcalá; B) morfotipo moteado fotografía tomada por Alejandro Calzada

El segundo grupo lo conforman haplotipos del Este del Istmo de Tehuantepec en los estados de Oaxaca y Norte de Chiapas, su coloración dorsal es marrón oscuro, todos los organismos revisados poseen 9-10 ( $x = 9.5$ ) bandas cruzadas dorsales de color blanco con algunas escamas de color marrón oscuro o negro, además de poseer 14 hileras de escamas dorsales, presentan cuatro escamas postoculares y 17-20 ( $x = 18.6$ ) escamas en el cuarto dedo (Fig. 6).



Figura 6. Morfotipo distinguible del Este del Istmo de Tehuantepec al Sur del estado de Oaxaca y Norte de Chiapas. Fotografía tomada por Eric Centenero-Alcalá

El tercer grupo está representado por especímenes del Oeste del Istmo de Tehuantepec en el estado de Oaxaca en el municipio de Santa María Guianagati, su coloración dorsal es marrón, poseen 10-11 ( $x = 10.5$ ) bandas cruzadas blancas con algunas escamas de color marrón claro, la cuarta banda puede o no estar fusionada con la tercera o quinta banda, que da aspecto de una banda bifurcada, adicionalmente tienen 16 hileras de escamas dorsales y poseen tres escamas postoculares y poseen 15 escamas en el cuarto dedo (Fig. 7).



Figura 7. Morfotipo distinguible de Santa María Guienagati, Oaxaca. Fotografía tomada por Eric Smith.

El estudio morfológico mostro que a pesar de tener características similares existen combinaciones de caracteres que diferencian a los organismos de una zona de otra (cuadro 2).

Cuadro 2. Caracteres diagnósticos para los tres morfotipos identificados dentro del complejo *Gerrhonotus liocephalus*. Los promedios aparecen entre paréntesis.

| Morfotipo  | Escamas del 4° dedo | Posoculares   | Prefrontales | sublabiales  | Escudos geniales | N° de bandas blancas dorsales | Hileras a mitad del dorso |
|------------|---------------------|---------------|--------------|--------------|------------------|-------------------------------|---------------------------|
| Centro     | 14-19 (x= 16.5)     | 2-4 (x =2.91) | 2            | 5-11 (x =7)  | 4-7 (x =5.3)     | -                             | 13-16 (x=14.5)            |
| OaxS-ChiaN | 17-20 (x= 18.6)     | 3-4 (x =3.75) | 2            | 7-8 (x =7.6) | 5-6 (x =5.8)     | 9-10 (x =9.5)                 | 14                        |
| SMG        | 15                  | 3             | 2-3 (x= 2.5) | 6-8 (x =7)   | 6                | 10-11 (x =10.5)               | 16                        |

## 7.2. Análisis multivariados

Este análisis indica que solo siete de los 24 caracteres analizados proporcionaron información relevante, solo estos siete caracteres representan el 93.12% del total de la variación explicada

(Fig. 8). Este análisis indica que los ejemplares de SMG forman un grupo separado, mientras las diferencias de las poblaciones del centro y OaxS-ChiaN no están claras.

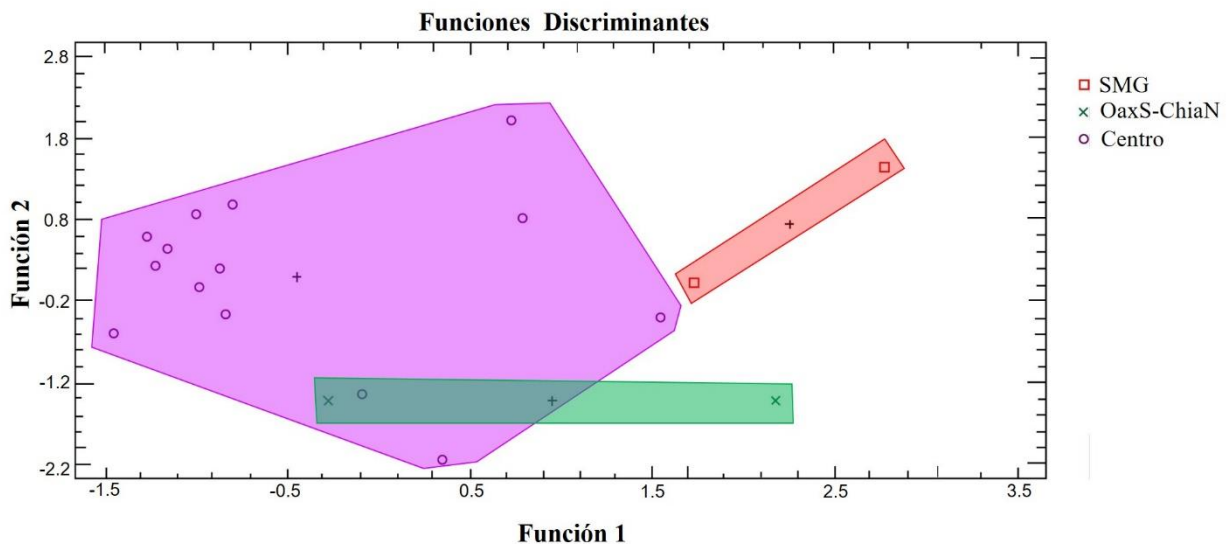


Figura 8. Análisis de funciones discriminantes de los caracteres morfológicos de *Gerrhonotus liocephalus*.

### 7.3. Análisis moleculares

Para los análisis filogenéticos se contó con 33 tejidos para la extracción de DNA. Se obtuvieron 31 secuencias para el gen ND4 y tRNAs asociados que incluyen 878 pb, para el gen PRLR se obtuvieron 29 secuencias (551 pb) y para BNDF se obtuvieron 23 secuencias (213 pb).

### 7.4. Análisis de Máxima Verosimilitud (ML)

En el árbol resultante de este análisis (Fig. 9) el complejo *G. liocephalus* es monofilético con respecto a las otras especies del género. Este grupo contiene tres clados principales. El primero de estos clados (Centro) contiene las poblaciones con haplotipos de los estados de Puebla, Estado de México, Morelos, Michoacán, Guerrero, Veracruz y centro y norte de Oaxaca; un segundo clado (SMG) contiene haplotipos del municipio de Santa María Guienagati, Oaxaca; y el tercer clado (OaxS-ChiaN) compuesto por haplotipos del este del Istmo de Tehuantepec en los estados de Oaxaca y norte de Chiapas.

Los tres clados están bien soportados (bp >70), pero en el clado E del Istmo a pesar de estar bien apoyado, la relación entre los haplotipos de Chiapas no está apoyada.

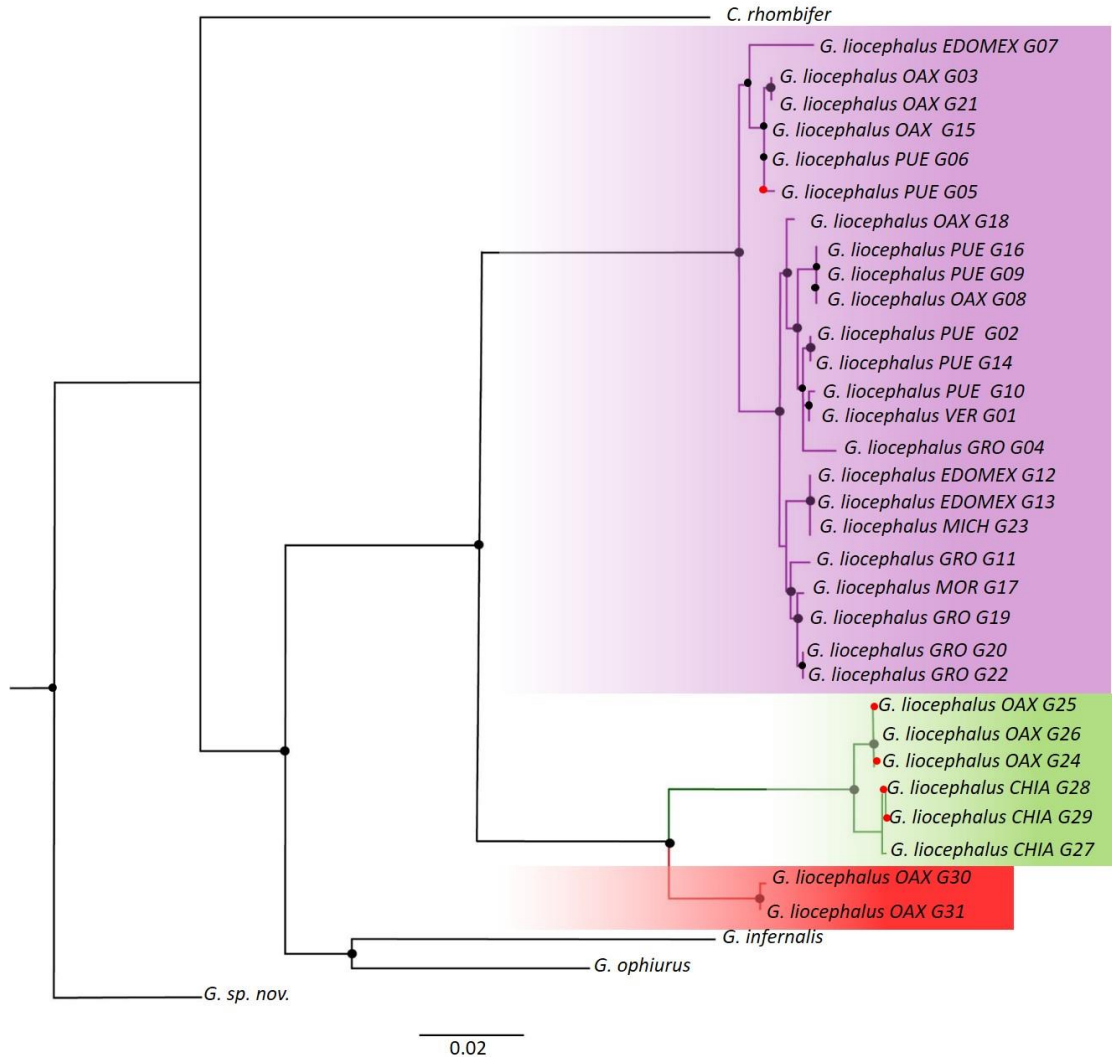


Figura 9. Árbol obtenido del análisis ML de los caracteres moleculares. Los puntos negros representan los nodos con soporte  $\geq 70$ . Los puntos rojos representan los valores bajos de soporte ( $\leq 70$ ). Los tres principales clados recuperados son: Centro (morado), OaxS-ChiaN (verde) y SMG (Rojo).

### 7.5. Análisis Bayesiano

Al igual que el análisis ML, en el análisis bayesiano, el complejo *G. liocephalus* forma un grupo monofilético con respecto a las otras especies del género, y se recuperan los mismo tres principales clados, con relaciones entre ramas soportadas con valores  $>0.90$ . Los clados resultantes fueron clado Centro con haplotipos de los estados de México, Puebla, Morelos, Guerrero, Michoacán, centro-norte de Oaxaca y Veracruz; clado OaxS-ChiaN con organismos de Oaxaca y Chiapas al este del Istmo de Tehuantepec y clado SMG, con especímenes del municipio de Santa María Guienagati en Oaxaca (Fig. 10).

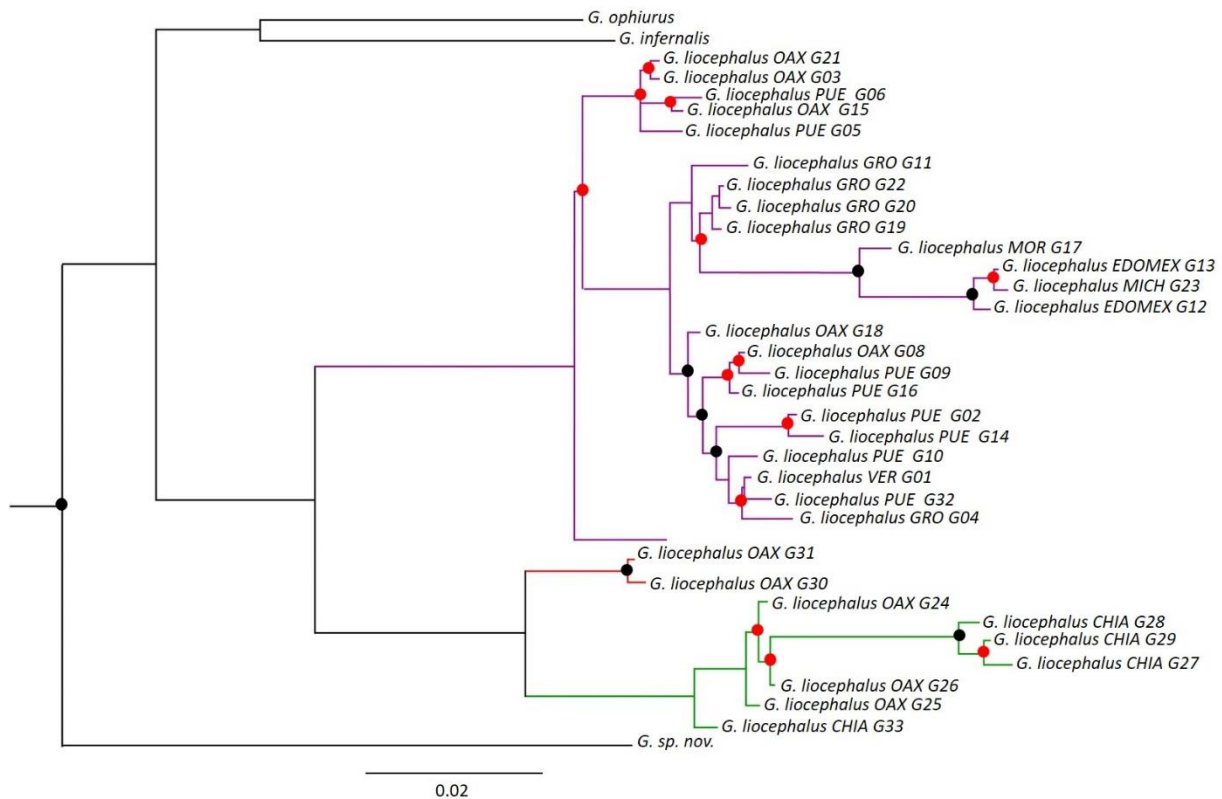


Figura 10. Árbol de máxima credibilidad obtenido del análisis bayesiano de los caracteres moleculares. Los círculos negros representan los valores de soporte altos ( $\geq 0.95$ ). Los puntos rojos representan los valores bajos de soporte ( $\leq 0.95$ ). Los principales clados obtenidos son: Centro (morado), OaxS-ChiaN (verde) y SMG (Rojo).

## 7.6. Límite de especies

### 7.6.1 Redes de haplotipos

Los resultados sugieren la existencia de tres filogrupos (Fig. 11), un grupo representa a los haplotipos del Centro, el segundo grupo representa los taxones del Oeste del Istmo de Tehuantepec y el tercer grupo muestra los haplotipos del Este del Istmo de Tehuantepec.

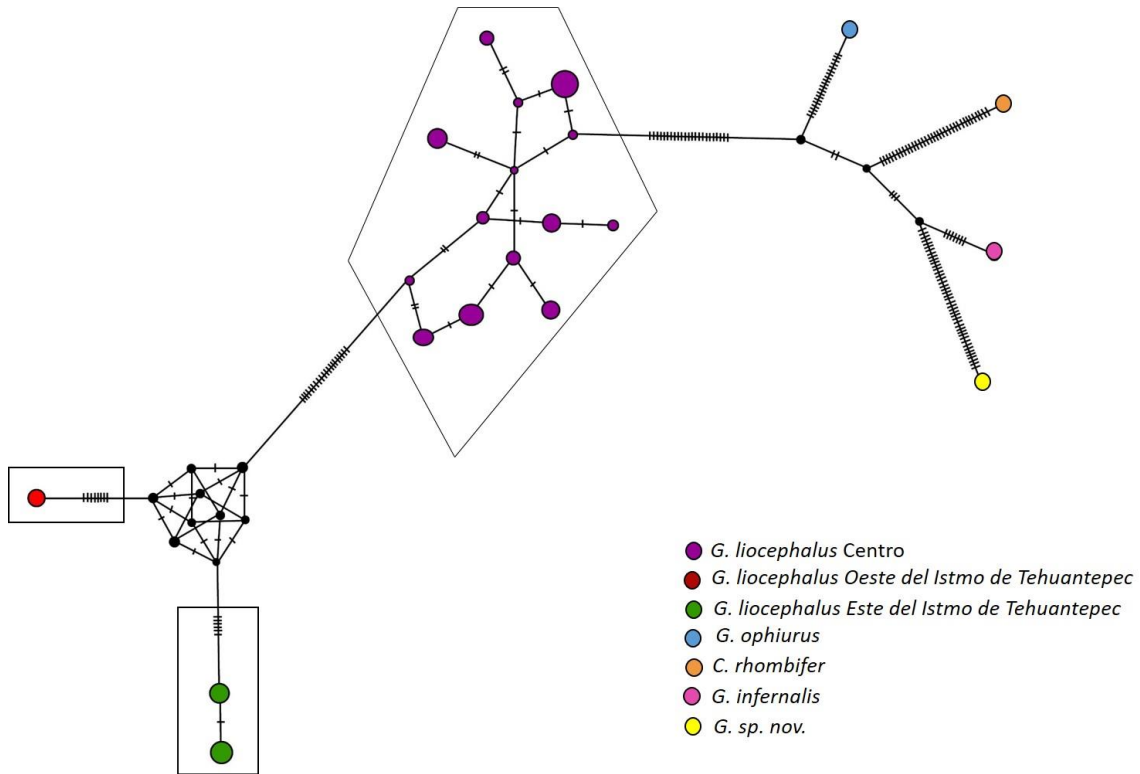


Figura 11. Red de haplotipos de secuencias de lagartijas del género *Gerrhonotus*. Los haplotipos dentro de los rectángulos y el pentágono representan el complejo *G. liocephalus*. Las pequeñas líneas representan las mutaciones existentes entre cada grupo.

### 7.6.2. Análisis Poisson Tree Processes (PTP)

Para el modelo PTP de límite de especies se utilizaron datos multilocus. Los resultados sugieren la existencia de tres posibles especies, mismas que son congruentes con los principales clados obtenidos en los análisis filogenéticos: 1) Clado del OaxS-ChiaN; formado por los haplotipos de Oaxaca y Chiapas, 2) Clado SMG; formado por haplotipos del municipio de Santa María Guienagati, Oaxaca y 3) Clado Centro representado por los haplotipos la Faja Volcánica Transmexicana y Sierra Madre del Sur en los estados de Puebla, Estado de México, Morelos, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y Veracruz (Fig. 12).

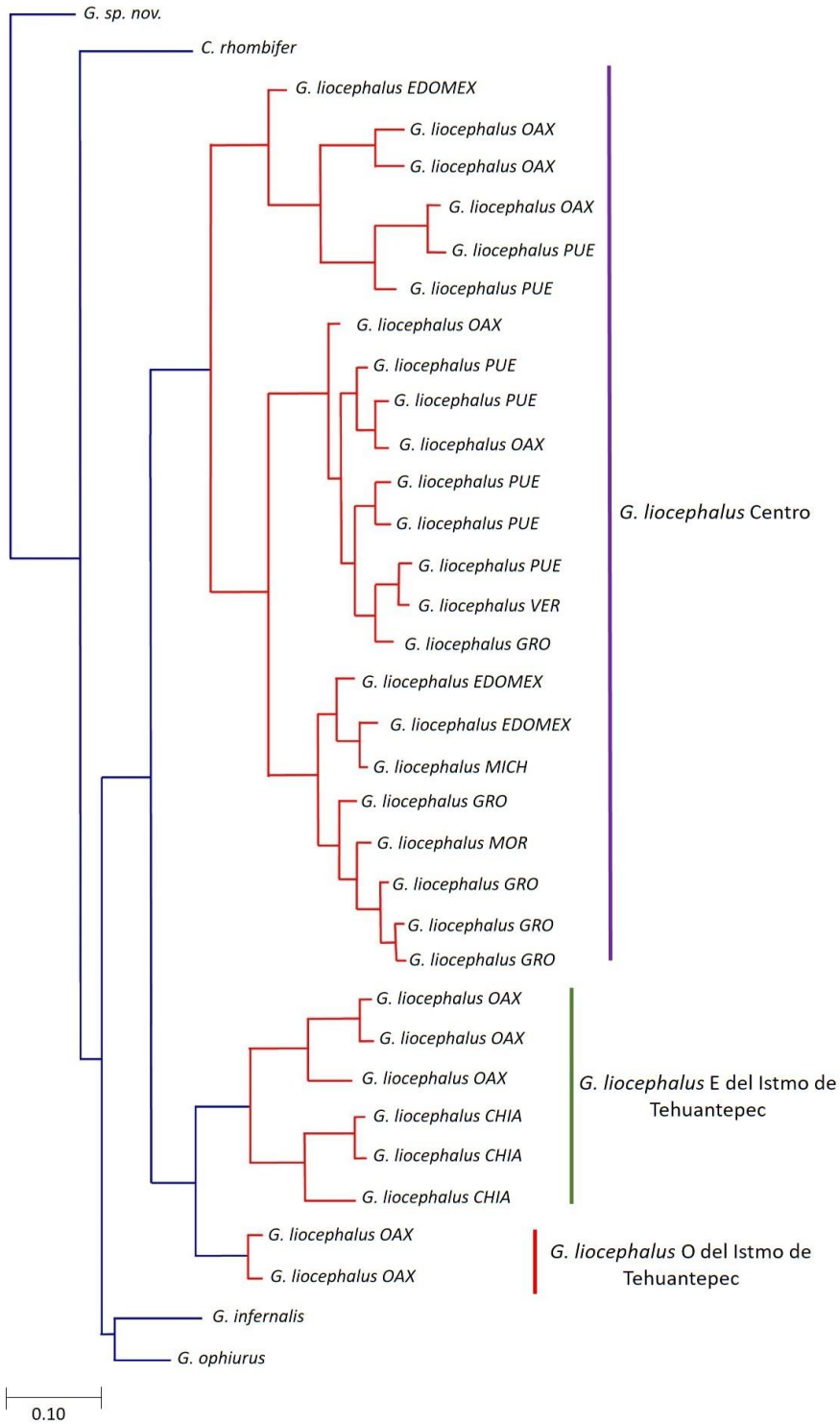


Figura 12. Hipótesis de límites de especies obtenida del análisis de PTP. Cada color representa una especie distinta.



### 7.6.3. Análisis Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC)

El análisis GMYC se realizó con dos umbrales, Simple y Múltiple. El análisis single sugiere la presencia de tres especies dentro del complejo *G. liocephalus* (Fig. 13), lo que es consistente con todos los análisis anteriores. En umbral múltiple estima cuatro especies (Fig. 14), dos son congruente con los análisis anteriores (Centro y SMG), en cambio el clado OaxS-ChiaN lo divide en dos especies, una para el estado de Oaxaca y otra para Chiapas.

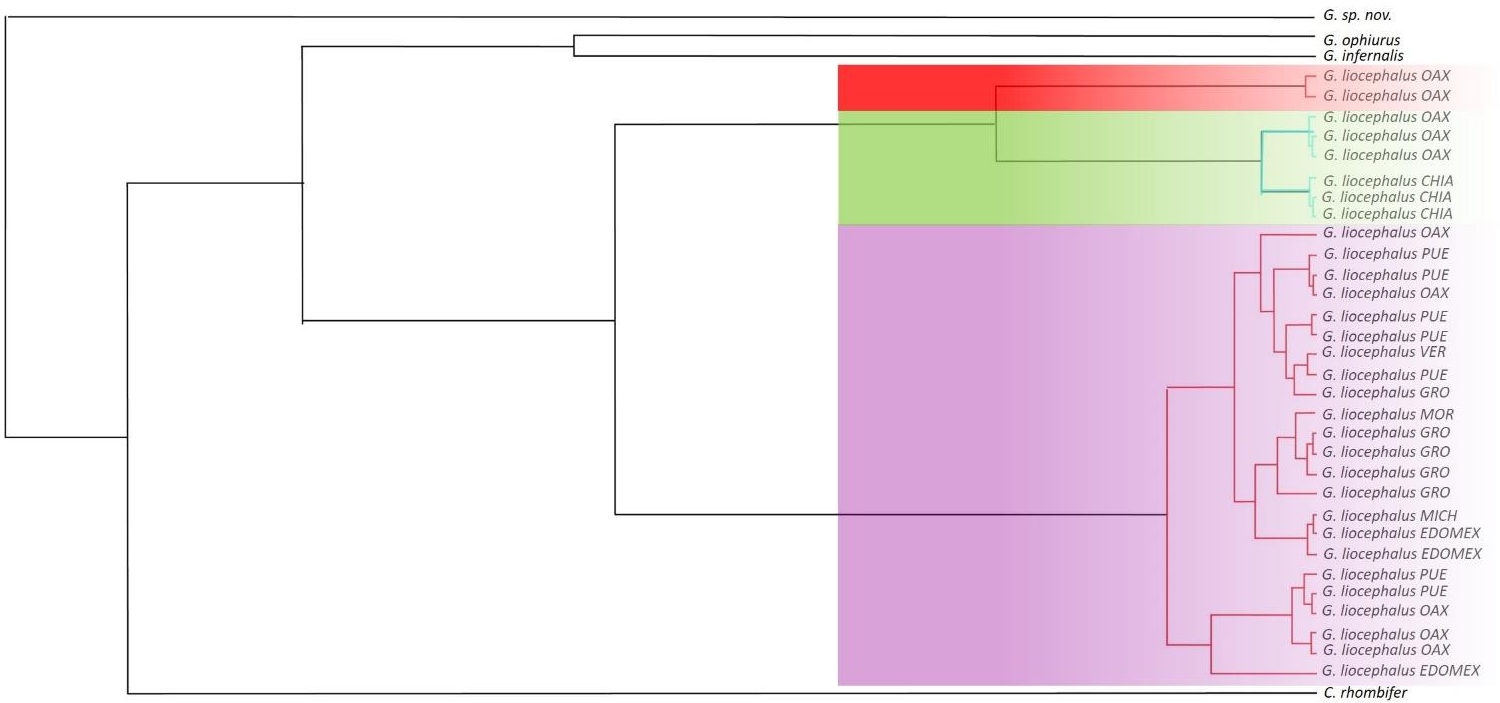


Figura 13. Hipótesis de límites de especies obtenida del análisis GMYC simple.

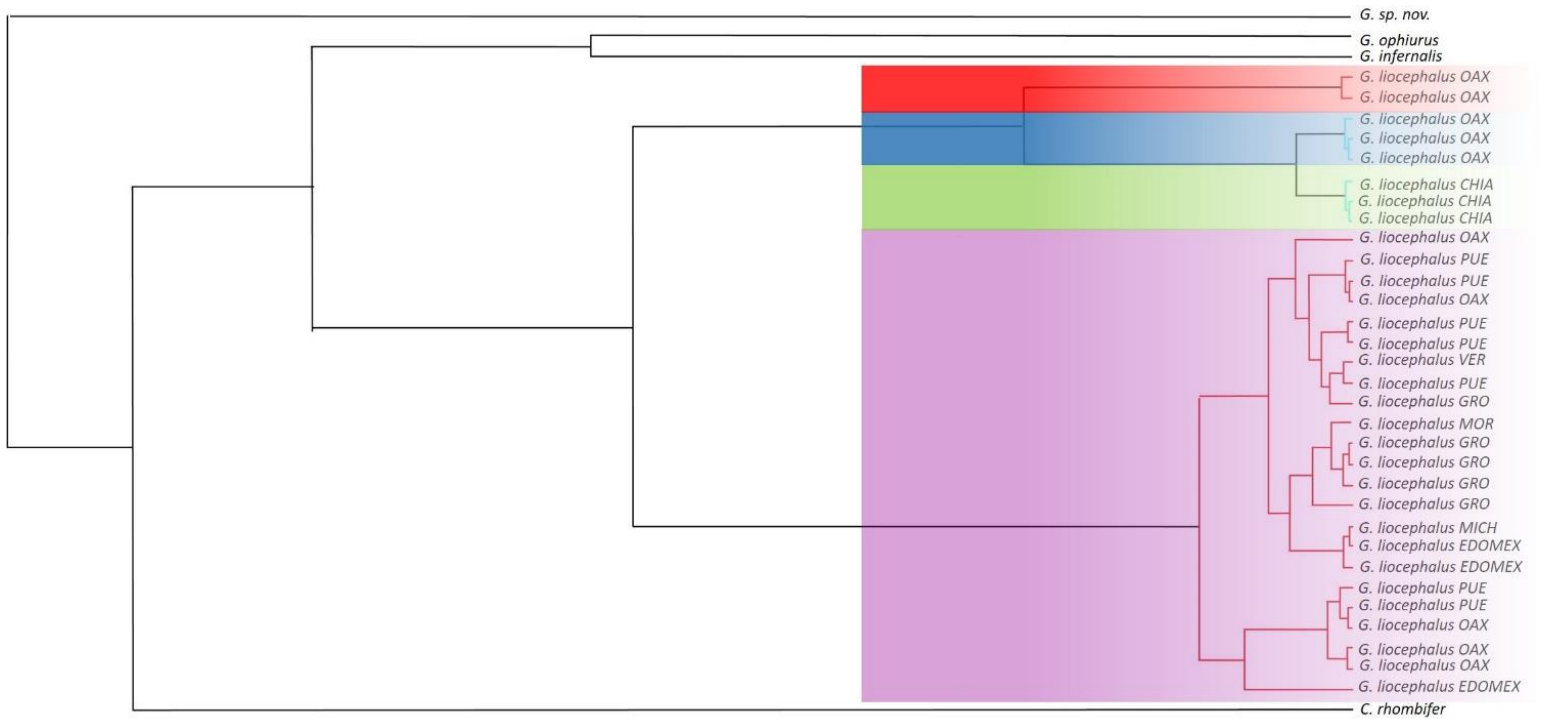


Figura 14. Hipótesis de límites de especies obtenida del análisis GMYC múltiple.

#### 7.6.4. Distancias genéticas

Las distancias genéticas dentro de los clados principales variaron de 0.01% en clado SMG a 0.09% en clado Centro, mientras que las distancias entre clados variaron de 4.7% en el clado SMG frente clado OaxS-ChiaN al 9.8% en el clado Centro frente al clado SMG (cuadro 3).

Cuadro 3. Distancias genéticas por pares de bases del mtDNA calculadas con el modelo K2P. Entre (debajo de la diagonal) y dentro (en diagonal) todos los clados principales obtenidos en el análisis filogenético.

|            | Centro        | OaxS-ChiaN    | SMG           |
|------------|---------------|---------------|---------------|
| Centro     | <b>0.0094</b> |               |               |
| OaxS-ChiaN | 0.094         | <b>0.0016</b> |               |
| SMG        | 0.098         | 0.047         | <b>0.0011</b> |

### 7.6.5. Árbol de especies

Las relaciones entre los cuatro grupos sugeridos por PTP/GMYC de *G. liocephalus* fueron las siguientes: (Centro (SMG (OaxS (ChiaN))). Se estimó que *G. liocephalus* Centro divergió de *G. liocephalus* SMG y OaxS-ChiaN hace 9.31 Ma., y *G. liocephalus* SMG de *G. liocephalus* E 5.69 Ma., la divergencia basal dentro del grupo OaxS-ChiaN entre los especímenes OaxS y ChiaN ocurrió hace 2.09 Ma. (Fig. 15).

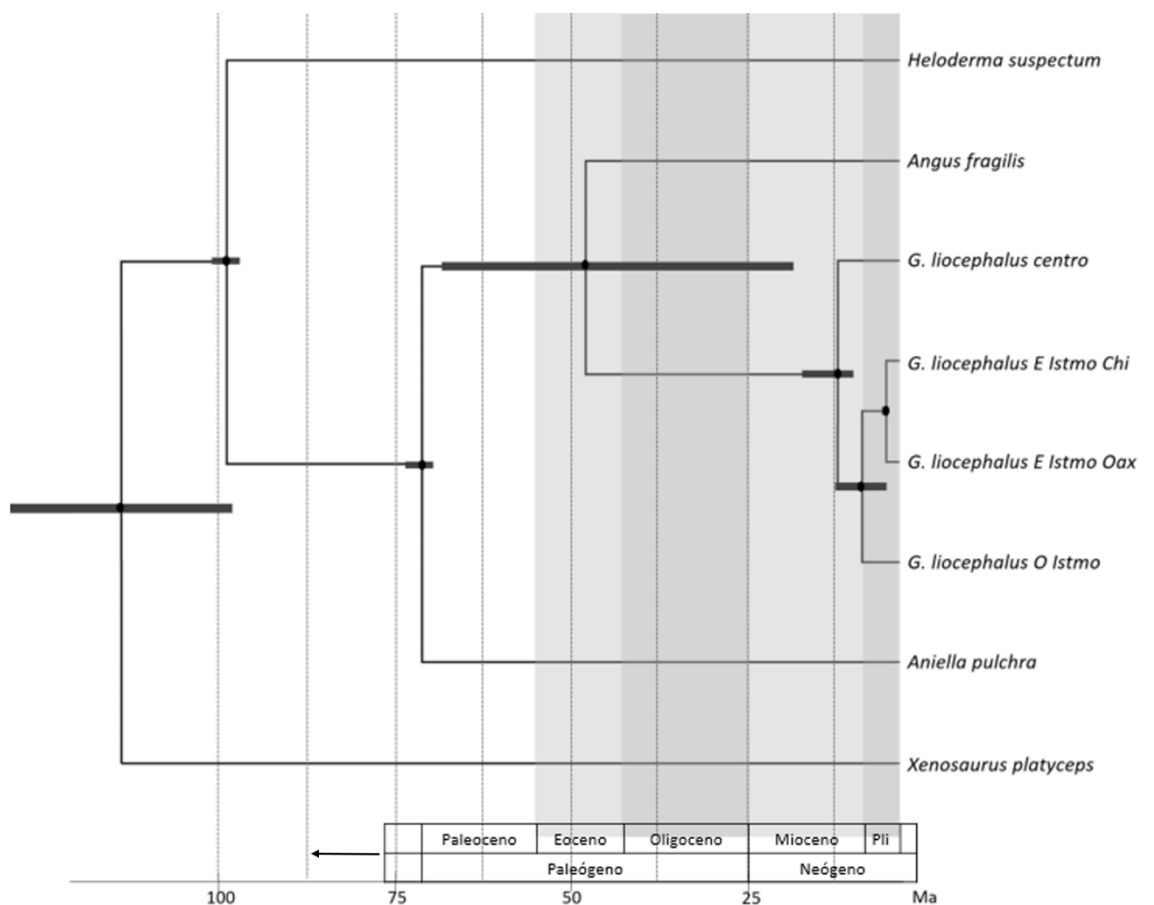


Figura 15. Estimación de tiempos de divergencia en *Gerrhonotus liocephalus* a partir de conjunto de datos multilocus utilizando BEAST. Las barras representan las probabilidades posteriores más altas de las fechas de divergencia, con estimaciones medias en millones de años (MA) dada en los nodos. Pli =Plioceno.

## 7.7. Análisis de Validación de especies

### 7.7.1. Analisis Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP)

En este análisis, se pusieron a prueba las hipótesis propuestas por los métodos PTP y GMYC, dentro del complejo *G. liocephalus*, la probabilidad de especiación de los haplotipos del

Centro respecto a OaxS-ChiaN y SMG del Istmo está representada por el valor máximo (1), validando que los haplotipos del centro representan una especie, a su vez la especiación de los organismos OaxS-ChiaN de los SMG es de 0.989, cercano al valor máximo lo que prueba que los especímenes OaxS-ChiaN y SMG representan dos especies distintas a las del Centro.

El análisis de GMYC con umbral múltiple propuso una hipótesis de cuatro especies (Centro, OaxS, ChiaN y SMG), esta se probó y fue rechazada debido a que el valor entre los haplotipos del este del Istmo en Oaxaca con los de Chiapas resulto ser bajo (0.39) (Fig. 16).

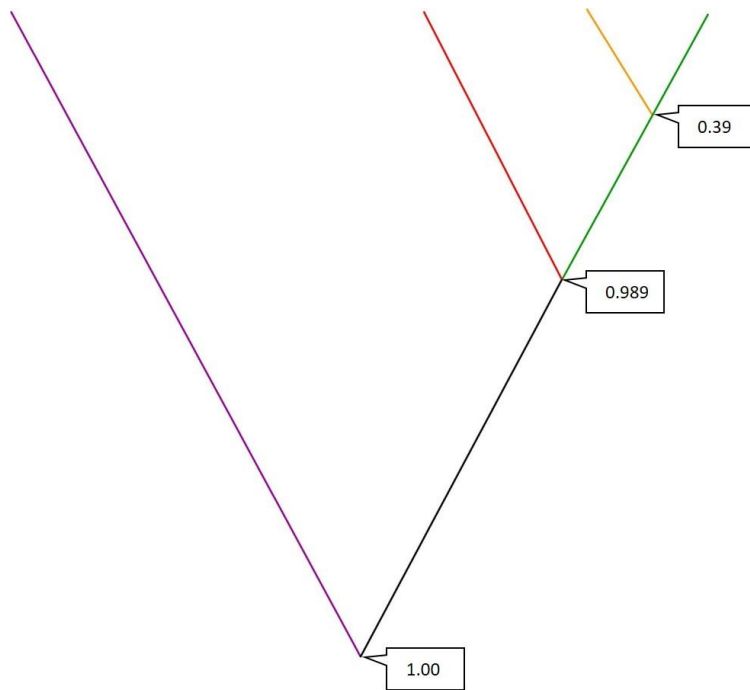


Figura 16. Resultados del análisis de delimitación de especies implementado en Filogenética y Filogeografía Bayesiana (BPP). Las probabilidades de especiación de BPP para cada nodo se muestran en cuadros: el cuadro de arriba muestra el valor de soporte bajo (0.39) entre la especie del OaxS-ChiaN, el segundo cuadro representa el valor de soporte (0.989) entre las especies OaxS-ChiaN y SMG y el cuadro de abajo representa el valor máximo (1.00) que representa la separación de las especies del Centro de las especies OaxS-ChiaN y SMG.

### 7.7.2. Bayesian Factor Delimitation (BFD)

Las hipótesis probadas, la probabilidad marginal promedio y los factores de Bayes con respecto a la taxonomía actual se resumen en el Cuadro 4. La hipótesis con la probabilidad marginal más alta fue la que considera cada grupo GMYC (single) / PTP de *G. liocephalus* como una especie diferente. La hipótesis con la segunda mayor probabilidad marginal fue la que considera cada grupo GMYC (múltiple) / PTP de *G. liocephalus* como una especie diferente. La hipótesis peor clasificada fue el modelo de taxonomía actual, que considera a *G. liocephalus* como una sola especie. El apoyo a la primera hipótesis fue decisivo con

respecto tanto a la taxonomía actual como a la segunda hipótesis mejor clasificada. La hipótesis concluyente con un valor de 10.35 es la que considera tres especies (Centro, SMG y OaxS-ChiaN) dentro del complejo.

Cuadro 4. Hipótesis de límites de especies probadas con BFD. Con base a los métodos de descubrimiento cuando dos o más clados se colapsaron en una sola especie, se muestran entre paréntesis. La probabilidad marginal es la probabilidad marginal promedio entre dos análisis de muestreo de ruta independientes. Los factores de Bayes (2lnBF) se calcularon con respecto a la taxonomía actual, que considera a *Gerrhonotus liocephalus* como una sola especie.

| Hipótesis                       | Especies | Probabilidad marginal | 2lnBF          |
|---------------------------------|----------|-----------------------|----------------|
| (Cen), ( OaxS-ChiaN ), (SMG)    | 3        | <b>-4131.35146</b>    | <b>-5.1787</b> |
| (Cen), ( OaxS ) (ChiaN ), (SMG) | 4        | -4199.94083           | N/A            |
| (Cen), ( OaxS-ChiaN, SMG)       | 2        | -4134.76477           | 1.6478         |
| (Cen, OaxS-ChiaN, SMG)          | 1        | -4140.37808           | 12.8745        |

## 8. Discusión

### 8.1. Sistemática en el grupo *Gerrhonotus liocephalus*

Las relaciones filogenéticas dentro de *G. liocephalus* recuperadas en el árbol de especies, fueron concordantes con resultados basados en la concatenación de los tres genes y con la topología mitocondrial (García-Vázquez y cols., 2018a). Los valores de soporte fueron altos en el árbol de especies.

Los análisis filogenéticos incluyeron muestras dentro del grupo de *G. liocephalus* que habían sido muestreados previamente (García-Vázquez y cols., 2018a), aunque se agregaron un mayor número de muestras de zonas de poblaciones que no habían sido analizadas, tales como como Silacayoapam, Oaxaca, región colindante con la localidad tipo de *G. liocephalus*; y de las que solo se había incluido un ejemplar como de Santa María Guienagati, Oaxaca, que se encuentra al oeste del Istmo de Tehuantepec.

Al incluir un mayor número de muestras se encuentra el mismo patrón de cada grupo de muestras identificadas previamente (García-Vázquez y cols., 2018a) como linajes independientes (*G. liocephalus* (Pacífico Oeste del Istmo de Tehuantepec), *G. liocephalus* (Pacífico Este del Istmo de Tehuantepec) y *G. liocephalus* (Sierra Madre del Sur + Faja Volcánica Transmexicana) (García-Vázquez y cols., 2018a), así como las mismas relaciones entre los grupos recuperados. De manera similar, la población del occidente de Jalisco se

recupera como un grupo independiente, hermano del clado compuesto por especímenes de *Gerrhonotus infernalis*, Lo que demuestra que no pertenece al complejo de *G. liocephalus* (Castiglia y cols. 2010; García-Vázquez y cols., 2018a). Por otra parte, las distancias génicas, son congruentes con estos resultados, ya que la distancia dentro de los clados fue menor que la distancia entre los diferentes clados. Situación esperada en poblaciones donde el flujo genético es limitado (García-Vázquez y cols., 2018a).

## **8.2. Límite de especies dentro de *Gerrhonotus liocephalus***

En el caso particular para *Gerrhonotus* el problema de delimitación de especies se debe a la homogeneidad morfológica o a la notable variación intraespecífica. Algunos estudios han señalado que la diferenciación genética en el género *Gerrhonotus* es alta y a menudo esta diferenciación no va acompañada de una divergencia morfológica significativa (Castiglia y cols., 2010; García-Vázquez y cols., 2018a). El presente estudio ejemplifica la tendencia de la taxonomía integradora en la sistemática de *Gerrhonotus*, en la cual los trabajos existentes, basados en un solo tipo de evidencia no permiten definir de manera confiable los límites de especie (e.g. Good, 1994; García-Vázquez y cols., 2018).

Es por esto por lo que, resulta necesario tener en cuenta múltiples evidencias (e.g. moleculares, morfológicas, geográficas, etc.) para evaluar los límites de especies en *G. liocephalus* en particular. Si bien, una serie de hipótesis de límites de especies con tres especies parecían posibles con base en los datos moleculares, la delimitación integradora de especies respalda la distinción de que los tres principales clados dentro de *G. liocephalus*, encontrados en este estudio representan especies distintas, dado que cada uno de ellos fue apoyado como una especie separada por más de un método. La validación de límites de especies se vio favorecida con el empleo de métodos que permite que varié la topología de los arboles (BPP) y la prueba de hipótesis de límites de especies utilizando topologías alternativas como arboles guía como BFD (Pavón-Vázquez y cols., 2018).

Los tres linajes fueron constantes en la mayoría de los análisis de delimitación de especies basados en secuencias de DNA y fueron consistentes con los resultados obtenidos por García-Vázquez y cols. (2018). Cada clado presenta una combinación de características morfológicas que permiten distinguirlos entre sí. El clado Centro incluye ejemplares que carecen de bandas dorsales que en ocasiones son sustituidas por pequeñas manchas que hacen

ver su apariencia moteada, además, las escamas postoculares varían de 2-4 y se pueden encontrar solo de 3-4 a diferencia de los ejemplares de los grupos SMG y OaxS-ChiaN que presentan bandas cruzadas en el dorso, aunque el número de bandas varía en cada grupo. Los organismos del grupo SMG presentan 10 bandas de color blanco sin ningún otro patrón mientras que las lagartijas del grupo OaxS-ChiaN presentan nueve bandas blancas con pequeñas manchas dispersas de color negro. Los grupos encontrados en este estudio Good (1994) no los observó de manera clara, aparentemente por la falta de muestras, ya que no contó con muestras del centro del país como de los estados de México, Morelos y Michoacán, adicional a esto no tomó en cuenta las barreras geográficas que suelen causar límites en el área de distribución (Maciel-Mata y cols., 2015) y su agrupación fue dada de manera inicial por límites geopolíticos, más que geográficos.

### **8.3. Biogeografía de *Gerrhonotus liocephalus***

Con base en la evidencia presentada en el párrafo anterior y en los análisis realizados en este trabajo se sugiere que los grupos Centro, SMG y OaxS-ChiaN representan especies distintas. Las muestras asignadas a SMG además de las diferencias morfológicas antes mencionadas, se encuentran distribuidas en Santa María Guienagati, Oaxaca que se encuentra en las zonas bajas de Oaxaca en el Istmo de Tehuantepec, a 107 km lineales de la localidad más cercana conocida de OaxS-ChiaN, además, el Istmo es una región estrecha de tierras bajas que se ha invocado típicamente como una barrera biogeográfica que ha promovido diversos procesos de especiación (Castoe y cols., 2009).

Los tiempos de divergencia obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos por García-Vázquez y cols. (2018a). *Gerrhonotus liocephalus* se dividió a finales del Mioceno-Plioceno temprano de los linajes SMG y OaxS-ChiaN al oeste y al este del Istmo de Tehuantepec, respectivamente. La evidencia geológica sugiere que desde el Mioceno tardío y hasta el Plioceno tardío, un hundimiento extenso del bloque oriental a lo largo de la falla de Tehuantepec resultó en una reducción masiva del territorio en las tierras altas y probablemente creó un gran embalse marino (Barrera y cols., 1998; Daza y cols., 2010). Aunque parece que la mayoría de los eventos de divergencia en el Istmo ocurrieron durante el Plioceno-Pleistoceno (Castoe y cols., 2009), Daza y cols. (2010) encontraron una divergencia más antigua en las serpientes de cascabel, lo que sugiere que un evento geológico

/ climático diferente al final del Mioceno (ej. Cambios en la vegetación) puede haber sido responsable de la divergencia en este grupo (García-Vázquez y cols., 2018a). Los resultados obtenidos sugieren que los eventos climáticos Pleistocénicos no influyeron en el origen de estos taxones, sin embargo, es posible que influyeran en la distribución actual de los mismos, tal como se ha observado en otros grupos de afinidad templada (Silva, 2011).

#### **8.4. Taxonomía integradora de especies**

Se sabe que algunos modelos de coalescencia son más susceptibles a la sobreestimación de la diversidad de especies que otros; GMYC de umbral múltiple dividió los clados geográficamente separando OaxS de ChiaN como especies independientes, esta hipótesis se descartó debido a que los valores obtenidos de los análisis de validación resultaron ser muy bajos. Algunos autores mencionan que GMYC de umbral múltiple tiende a sobreestimar especies (Fujisawa y Barraclough, 2013).

Se ha reconocido que la asignación de entidades naturales a los taxones, incluidas las especies constituye una hipótesis (Bonde, 1977; Pante y cols., 2015). Las hipótesis de especies tienen más probabilidades de ser verificadas cuando están respaldadas por varias líneas de evidencia. Es por esto por lo que se espera que el tiempo de divergencia entre dos linajes sea proporcional al número de criterios que sugieren la existencia de dos especies (De Queiroz, 2007). Por lo tanto, se espera que la delimitación de especies sea más robusta cuando considera diferentes atributos del taxón focal. Sin embargo, la integración de diferentes tipos de datos en un marco estadístico es menos frecuente en los estudios de delimitación de especies que en la comparación cualitativa de los resultados obtenidos del análisis individual de cada tipo de datos (Pavón-Vázquez y cols., 2018).

#### **8.5. Taxones catalogados como *Gerrhonotus liocephalus***

Hartwen y Tihen (1946) encontraron diferencias morfológicas entre ejemplares del sur del Istmo de Tehuantepec y un ejemplar del este de Chiapas que describen como *G. l. austrinus*. Esta descripción causó conflictos taxonómicos, por lo que Good (1994), menciona que debido a que la describieron solo con un espécimen joven, no es posible conocer si las diferencias señaladas forman parte de una mutación individual o variación geográfica, por lo que consideró esta subespecie como sinonimia de *G. liocephalus*. Good (1994) no encontró



diferencia entre los organismos y decidió agruparlos ya que contaban con algunas características similares como la ausencia de escamas preoculares, tres escamas canto/loreales y que la descripción de Hartwen y Tihen (1946) era incorrecta debido a que la escama frontonasal que ellos utilizaron como diagnóstico para describir la subespecie, aunque es poco común, se puede encontrar en otras poblaciones como las de la especie *G. infernalis*. Adicional a esto, la ausencia de supranasal que mencionan en la descripción de *G. l. austrinus* es una característica única que ocurre ocasionalmente entre individuos anómalos de otras especies de *Gerrhonotus* (Good, 1988). En el presente trabajo se encontraron diferencias morfológicas entre el grupo OaxS-ChiaN y el ejemplar de Cerro Malé. Hartwen y Tihen (1946) mencionan que el ejemplar que ellos describen proveniente de Cerro Malé no cuenta con ningún patrón dorsal, aunque no especifican el estado de conservación del ejemplar, y se sabe que los ejemplares preservados con el paso de tiempo pueden llegar a perder este patrón (Salvador, 1998).

Adicional a esto el ejemplar recolectado por Hartwen y Tihen (1946) representa una cría, lo que provoca un conflicto adicional ya que en algunas especies de reptiles la coloración cambia con base en el crecimiento del individuo. Con un solo ejemplar no es posible llegar a una conclusión definitiva, debido a que los niveles de variación dentro del grupo no son informativos.

Incluir a *G. l. austrinus* y OaxS-ChiaN en la misma especie difiere de una filosofía estricta dentro del concepto de especie unificado, porque *G. l. austrinus*, como se entiende ahora, es diagnosticable. Sin embargo, una adhesión tan extrema a este concepto no es realista; *G. l. austrinus* se conoce a partir de un solo espécimen y con el material disponible no es posible determinar si la característica distintiva de este espécimen se debe a la diferenciación de la población, a una mutación particular, o simplemente a la variación individual.

Para este trabajo no se contó con muestras de esta localidad, y a pesar de contar con evidencias ecológicas, como que el espécimen de Cerro Malé representa el registro más alto con una altitud de 3200 msnm y su vegetación es bosque de coníferas, mientras que el grupo OaxS-ChiaN tiene una altitud máxima de 1424 msnm y se encuentra en una vegetación de bosque de encino y selva baja. Debido a que se sabe que el carácter diagnóstico único de *G. l. austrinus* es variable en otras especies del género, con este trabajo se demostró que la

lagartija *G. liocephalus* se encuentra en el centro del país, por lo que *G. l. austrinus* tendría que elevarse de categoría a especie y ya que no se puede concluir si *G. l. austrinus* y el grupo OaxS-ChiaN representan la misma especie o dos especies distintas el grupo OaxS-ChiaN emerge provisionalmente como *G. cf. austrinus*.

Para el presente estudio tampoco se contó con muestras de Guatemala, pero se tiene evidencia fotográfica del ejemplar reportado para dicho país (Fig. 17). Al igual que con el ejemplar de *G. l. austrinus* no es posible llegar a una conclusión certera solo con una fotografía, al tener diferencias morfológicas de coloración, como el dorso liso de *G. l. austrinus* y la presencia de bandas dorsales en el ejemplar de Guatemala y este encontrarse a una altitud de 770 msnm, el cual se encuentra dentro del rango de altitud del grupo OaxS-ChiaN, lo que representa una diferencia de altitud entre los taxones *G. l. austrinus* y el de Guatemala de 2,430 msnm, este ejemplar emerge al igual que los del grupo OaxS-ChiaN como *G. cf. austrinus*.



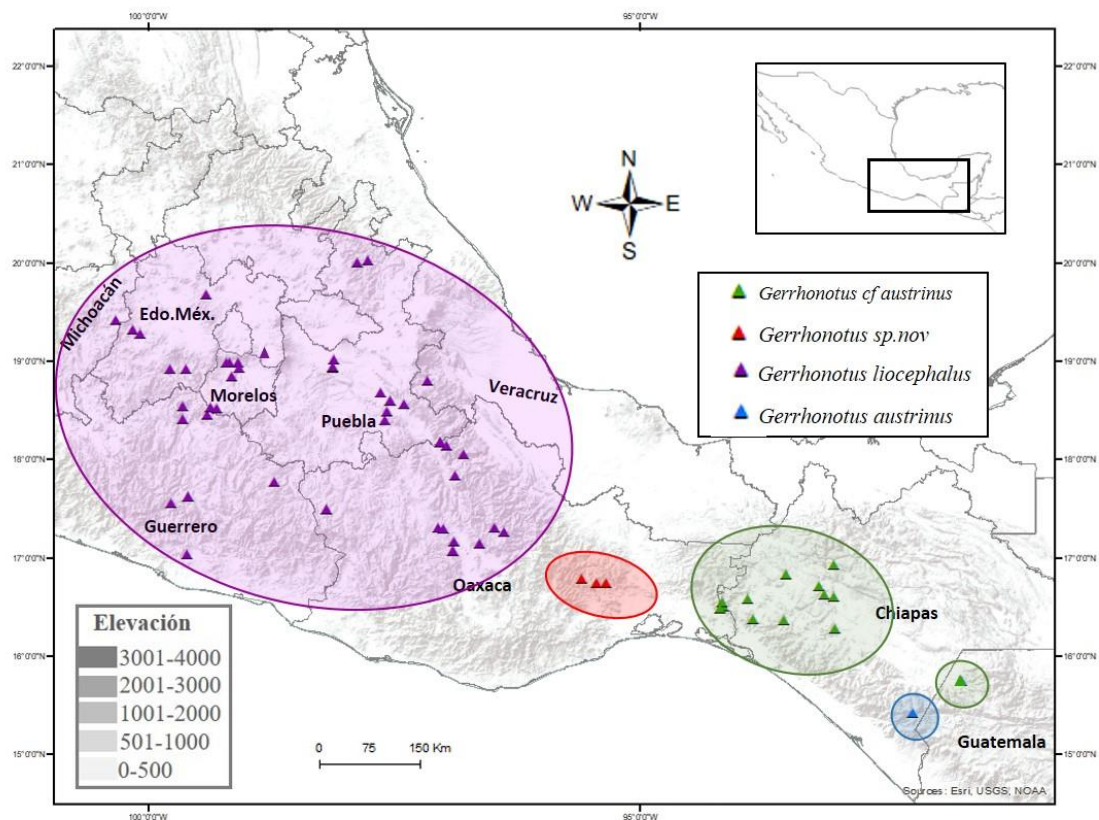
Figura 17. Voucher fotográfico del ejemplar de *Gerrhonotus liocephalus* (UTADC 8473) de Guatemala. Fotografía donada por Daniel Ariano Sánchez.

Adicionalmente existen registros de *G. liocephalus* para Tapala de Allende al occidente y Lagos de Moreno al noreste de Jalisco (Davalos-Martínez y cols., 2018), los autores mencionan que los registros más cercanos a los colectados por ellos son de la región de Chamela-Cuitzmala, Jalisco, que se encuentran a 64 y 413 km en línea recta

respectivamente. Con base en estudios moleculares y morfológicos Castiglia y cols., 2010 y García-Vázquez y cols., 2018 confirman que los ejemplares del occidente de Jalisco representaban una especie sin describir, por lo que, con base en su cercanía geográfica y características ecológicas como la presencia de los organismos en lugares de altitudes bajas, el ejemplar reportado para Tapala de Allende podría ser parte de esta especie no descrita. Mientras que, el ejemplar de Lagos de Moreno podría representar la especie *G. infernalis* (Baird, 1859), si bien, no se contó con ejemplares para revisión morfológica de los estados de Aguascalientes y Zacatecas, la evidencia fotográfica sugiere que los ejemplares que provienen de estos estados representan poblaciones de *Gerrhonotus infernalis*. En particular, una de las principales diferencias que presentan los ejemplares de *G. liocephalus* y *G. infernalis*, es la presencia de bandas cruzadas en el dorso de coloración marrón claro con pequeñas manchas de color marrón oscuro, mientras que, los ejemplares del grupo centro no presentan bandas cruzadas (Baird, 1959). En todas las fotografías revisadas de los ejemplares del norte de Jalisco, Aguascalientes y Zacatecas, se puede observar la presencia de estas bandas. Adicional a esto, los registros se ubican al noroeste de la Faja Volcánica Transmexicana y la del grupo centro es al sureste. La región de la Faja Volcánica Transmexicana es muy diversa en cuanto a morfotectónica y clima, lo que generan barreras a distancias cortas en esta región, repercutiendo en la distribución de las especies (Suarez-Mota y cols., 2013).

### **8.5. Sugerencias taxonómicas**

Debido a que la localidad tipo de *G. liocephalus* es Tlapancingo, Oaxaca y esta zona pertenece al centro de México, por principio de autoridad las poblaciones de esta zona conservan el nombre de *G. liocephalus*, la población de SMG representa una especie nueva que debe describirse, la subespecie *G. l. austrinus* se eleva a categoría de especie y las poblaciones de OaxS-ChiaN y Guatemala emergen provisionalmente como *G. cf. Austrinus* (Fig. 18).



**Figura 18.** Mapa de distribución de las especies propuestas en este trabajo. Los triángulos de color morado representan las localidades de presencia de *G. liocephalus*; los triángulos rojos representan los sitios de presencia de *G. sp. nov.*, los triángulos verdes muestran las localidades de presencia *G. cf. austrinus*, el triángulo azul representa la localidad tipo de *G. austrinus*.

## 9. Conclusiones

Al realizar la taxonomía integradora de *G. liocephalus* se demuestra que el complejo es un grupo monofilético, con respecto a las otras especies del género y comprueba la existencia de al menos tres especies, morfológica y filogenéticamente delimitados. Debido a esto se sugieren cambios taxonómicos a la especie, concluyendo con tres especies, *G. liocephalus*, *G. sp. nov.* (SMG), *G. austrinus* y tentativamente una adicional catalogada como *G. cf. austrinus*. Por lo que el número de especies dentro del género *Gerrhonotus* aumentaría de 10 a 12 especies.

## 10. Perspectivas

A pesar del trabajo realizado, dentro del género *Gerrhonotus* aún se mantienen problemas taxonómicos que sugieren la necesidad de que se siga trabajando para esclarecer estos conflictos. Aunque particularmente en *G. liocephalus*, se esclarecieron algunos de los

problemas, aún es necesario realizar estudios que evalúen el estado taxonómico de las poblaciones de Cerro Malé en Chiapas y la población de Guatemala.

## 11. Literatura citada

- Arévalo, E., Davis, SK. y Sites, JW. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporous grammicus* (Phrynosomatidae) in Central Mexico. *Systematic Biology*, 43: 387–418.
- Avice, JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, New York, 447 pp.
- Baird, SF. 1859. Description of new genera and species of North American lizards in the museum of the Smithsonian Institution. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia*, 10: 253–256.
- Bandelt, HJ., Foster, P. y Röhl, A. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 16: 37–48.
- Barber, BR. y Klicka, J. 2010. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican Birdfauna. *Proceeding of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 277: 2675–2681.
- Bonde, N. 1977. Cladistic classification as applied to vertebrates. En: Hecht, MK., Goody, PC., Hecht, B.M. (Eds.), *Major Patterns in Vertebrate Evolution*. Plenum Press, New York, pp. 741–804.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, CH., Xie, D., Suchard, MA., Rambaut, A. y Drummond, AJ. 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10, e1003537.
- Bouckaert, RR. y Drummond, AJ. 2017. bModelTest: Bayesian phylogenetics site model averaging and model comparison. *BMC evolutionary biology*, 17: 42.
- Braum, DA. y Swaw, KL. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. En: Hoch, P. C. y Stephenson, A. G. Eds. *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematic*. Missouri Botanical garden, 289–303 pp.
- Castiglia, R., Annesi, F., Bezerra, A., García, A. y Flores-Villela, O. 2010. Cytotaxonomy and DNA taxonomy of lizards (Squamata, Sauria) from a tropical dry forest in the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve on the coast of Jalisco, Mexico. *Zootaxa*, 2508: 1–29.
- Caviedes-Solis, IW., Bouzid, NM., Banbury, BL. y Leaché, AD. 2015. Uprooting phylogenetic uncertainty in coalescent species delimitation: a meta-analysis of empirical studies. *Current Zoology*, 61: 866–873.

- Colston, T.J., Grazziotin, F.G., Shepard, D.B., Vitt, L.J., Colli, G.R., Henderson, R.W. y Burbrink, F.T. 2013. Molecular systematics and historical biogeography of tree boas (*Corallus* spp.). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 953–959.
- Cuadros Arasa, M. 2013. Efecto de las mutaciones en el ADN mitocondrial sobre la expresión de genes implicados en la función mitocondrial. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Cuevas-Cardona C. 2007. En busca de los caracteres apropiados para hacer clasificaciones. En: *La Sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad*, eds. Contreras-Ramos A., Cuevas Cradona C., Goyenechea I. y Iturbe U. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*, 9: 772.
- De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56: 879–886.
- Doyle, J.J. 1995. The irrelevance of allele tree topologies for species delimitation, and a non-topological alternative. *Systematic Botany*, 20: 574–588.
- Drummond, A.J. y Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7: 214.
- Edwards, D.L. y Knowles, L.L., 2014. Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281: 1–7.
- Ence, D.D. y Carstens, B.C. 2011. SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources*, 11: 473–480.
- Esquivel Ramírez, A. 2014. *Genética de poblaciones: Una revisión de la teoría de la coalescencia*. Instituto de ciencia básica e ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Boletín científico 1(2).
- Ezard, T., Fujisawa, T., y Barraclough, T.G. 2009. Splits: species' limits by threshold statistics. R package version, 1(11), r29. Disponible en: URL [http://R Forge.Rproject.org/projects/splits](http://RForge.Rproject.org/projects/splits)
- Fetzner Jr, J.W. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptile skins: a simplified method. *Biotechniques*, 26: 1052–1054.
- Fujisawa, T., Barraclough, T.G., 2013. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62: 707–724.

- Fujita, MK., Leaché, AD., Burbrink, FT., McGuire, JA. y Moritz, C., 2012. Coalescent based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends Ecology and Evolution*, 27: 480–488.
- García-Padilla E. y Villegas-Ruiz, F. 2010. Geographic Distribution: *Gerrhonotus ophiurus* (Snake Lizard). *Herpetological Review*, 41: 512.
- García-Vázquez, UO., Nieto-Montes de Oca, A., Bryson Jr., RW., Schmidt-Ballardo, W. y Pavón-Vázquez. CJ. 2018a. Molecular systematics and historical biogeography of the genus *Gerrhonotus* (Squamata: Anguinae). *J Biogeogr.* 1–13.
- García-Vázquez, UO., Contreras-Arquieta, A., Trujano-Ortega, M. y Nieto-Montes De Oca A. 2018b. A New Species of *Gerrhonotus* (Squamata: Anguinae) from the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, México. *Herpetologica*, 74(3).
- García-Vázquez, UO., García-Padilla, E. y Herrera-Enríquez, GJ. 2016. First record of the alligator lizard *Gerrhonotus lugoi* (Squamata: Anguinae) for the state of Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 1399–1401.
- Good, DA. 1994. Species limits in the Genus *Gerrhonotus* (Squamata: Anguinae). *Herpetological Monographs*, 8: 180–202.
- Good, DA. y Wake, DB. 1992. Geographic variation and speciation in the torrent salamanders of the genus *Rhyacotriton* (Caudata: Rhyacotritonidae). *University of California Publication Zoology*, 126: 1–91.
- Good, DA. 1998. Phylogenetic relationships among Gerrhonotine lizards: An analysis of external morphology. *University of California Publications in Zoology*, 121: 1–139.
- Goyache F., Carus, J., Álvarez, I., Gutiérrez, J., Fernández, I. y Royo, L. 2006. Diversidad filogenética como método de utilidad en programas de conservación de recursos genéticos ganaderos. *ITEA* 120: 133–38.
- Goyenechea, I. 2007. Sistemática: su historia, sus métodos y sus aplicaciones en las serpientes del género *Conopsis*. *Ciencia ergo-sum, Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva*.
- Grechko, VV. 2013. The problems of molecular phylogenetics with the example of squamate reptiles: Mitochondrial DNA markers. *Molecular Biology*, 47: 55-74.
- Grummer, JA., Bryson, RW. y Reeder, TR. 2014 Species delimitation using Bayes factors: simulations and application to the *Sceloporus scalaris* species group (Squamata: Phrynosomatidae). *Systematic Biology*, 63: 119–133.



- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52: 696–704.
- Highton, R. 1990. Taxonomic treatment of genetically differentiated population. *Herpetologica*, 46: 114–121.
- Hills, DM., Moritz, C., Mable, BK. y Meyer, A. 1996. *Molecular Systematics* (2nd edn.). *Trends in Genetics*, 12: 534.
- Hills, DM., y Bull, JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, 42: 182–192.
- Hoyos, MA., Otero, R., Saldarriaga, M. y Jaramillo, N. 2003. Divergencia morfométrica entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* (Serpentes: Viperidae). *Actualidades Biológicas*, 25: 157–165.
- Lamar, WW., Barrio-Amorós, CL, Dwyer, Q., Abarca, JG. y Plecker, DR. 2015. The Gerrhonotine genus *Coloptychon* (Sauria: Anguillidae). *Mesoamerican Herpetology*, 2: 88–104.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, SY., y Guindon, S. 2012. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, 29: 1695–1701.
- Leaché, AD., y Reeder, TW. 2002. Molecular systematics of the eastern fence lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood, and Bayesian approaches. *Systematic Biology*, 51: 44–68.
- Lee, MS., Hugall, AF., Lawson, R., y Scanlon, JD. 2007. Phylogeny of snakes (Serpentes): combining morphological and molecular data in likelihood, Bayesian and parsimony analyses. *Systematics and Biodiversity*, 5: 371–389.
- Leigh, JW. y Bryant, D. 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecology and Evolution*, 6:1110–1116.
- Luna-Vega, I. y Llorente, J. 1994. Los conceptos de especie evolutiva y filogenética, 83–94 p.
- Llamas, L. y Sigala RJ. 2020. Diversidad de anfibios y reptiles de la sierra de Valparaíso La biodiversidad en Zacatecas Estudio de estado.
- Maciel-Mata, CA., Manríquez-Morán, N., Octavio-Aguilar, P., y Sánchez-Rojas, G. 2015 El área de distribución de las especies: revisión del concepto. *Acta universitaria*, 25: 03–19.

- Mata-Silva, V., DeSantis, DL., García-Padilla, E., Johnson, JD., Wilson, LD. 2019. The endemic herpetofauna of Central America: a casualty of anthropocentrism. *Amphibian and Reptile Conservation*, 13: 1–64 (e168).
- Morales, A., Ariano-Sánchez, D. y Morán, D. 2015. Geographic distribution: *Gerrhonotus liocephalus* (Wiegmann's Alligator Lizard). Guatemala: Huehuetenango. *Herpetological Review*, 46:217.
- Pante, E., Puillandre, N., Viricel, A., Arnaud-Haond, S., Aurelle, D., Castelin, M., Chenuil, A., Destombe, C., Forcioli, D., Valero, M., 2015. Species are hypotheses: avoid connectivity assessments based on pillars of sand. *Molecular Ecology*, 24: 525–544.
- Pons, J., Barraclough, TG., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, DP., Hazell, S. y Vogler, AP. 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55: 595–609.
- Pavón-Vázquez, CJ, García-Vázquez, UO., Bryson Jr, RW, Feria-Ortiz, M., Manríquez-Morán, NL. Y Nieto-Montes De Oca, A. Integrative species delimitation in practice: Revealing cryptic lineages within the short-nosed skink *Plestiodon brevirostris* (Squamata: Scincidae). *Molecular Phylogenetic Evolution*, 129: 242–257.
- Porter, A.H. 1990. Testing nominal species boundaries using genes flow statistics: the taxonomy of two hybridizing admiral butterflies (*Limenitis*: Nymphalidae). *Systematics Zoology*, 39: 131–147.
- Pritchard, JK., Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Puerto, G., da Graça Salomão, M., Theakston, RDG., Thorpe, RS., Warrell, DA. y Wüster, W. 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 527–538.
- Rambaut, A. y Drummond, AJ. 2007. Tracer, version 1.5. Program distributed by the author. Edinburgh, UK: University of Edinburgh. Auckland, New Zealand: University of Auckland
- Ramírez-Bautista, A., Hernández-Salinas, U., Mendoza-Quijano, F., Cruz-Elizalde, R., Stephenson, BP., Vite-Silva, VD. y Leyte-Manrique, A. 2010. Lista Anotada de los Anfibios y Reptiles

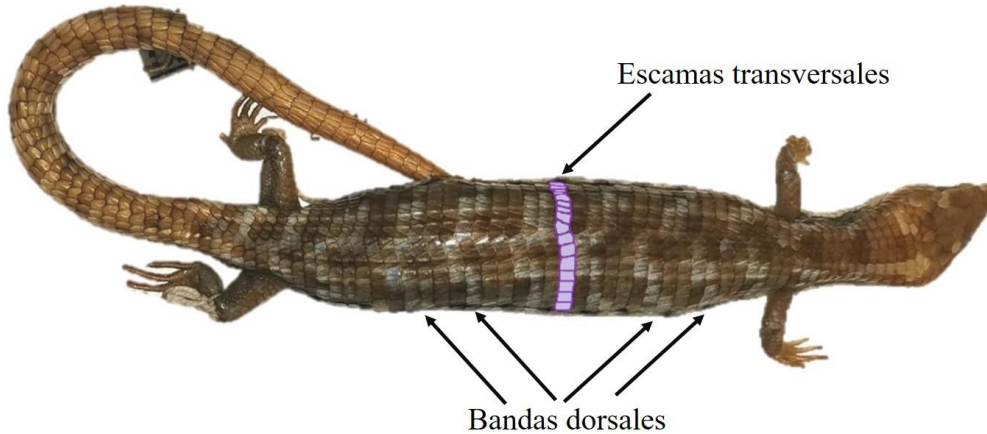
- del Estado de Hidalgo, México. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, PVD., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, MA. y Huelsenbeck, JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61:539–542.
- Ruane, S., Bryson Jr, RW., Pyron, RA. y Burbrink, FT. 2014. Coalescent species delimitation in milksnakes (genus *Lampropeltis*) and impacts on phylogenetic comparative analyses. *Systematic Biology*, 63: 231–250.
- Sáez, AG. 2009. Genes y especies. *Revista Ecosistemas*, 18.
- Salvador, J. 1998. Reptiles. *Fauna Ibérica Vol. 10*. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 705 p.
- Sambrook, J. y Russell, D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual 3a. ed.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez García, JC. 2018. Límite de especies entre *Rhadinaea marcellae* y *Rhadinaea forbesi* (Squamata: Colubridae). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Silva Segundo, CA. 2011. Estatus taxonómico y estructura genética poblacional del género *Merluccius* en el Pacífico Nororiental y Central, mediante la aplicación de marcadores mitocondriales y nucleares. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C.
- Silvestro, D. y Michalak, I. 2012. raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12:335–337.
- Sites Jr, JW. y Marshall, JC. 2003. Delimiting species: A renaissance issue in systematic biology. *Trends Ecology Evolution*, 18:462–470.
- Sites Jr, JW. y Marshall, JC. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review Ecology Evolution Systematics*, 35:199–227.
- Smart, U., Sarker, GC., Arifin, U., Harvey, MB., Sadik, I., Hamidy, A., Kurniawan, N. y Smith, EN. 2017. A New Genus and Two New Species of Arboreal Toads from the Highlands of Sumatra with a Phylogeny of Sundland Toad Genera. *Herpetologica*, 73: 63–75.
- Smith, H. y Frost, D. 2018. *Handbook of Lizards: Lizards of the United State and of Canada*. Ithaca: Cornell University Press.
- Solís-Lemus, C., Knowles, LL. y Ané, C. 2015. Bayesian species delimitation combining multiple genes and traits in a unified framework. *Evolution*, 69: 492–507.

- Suárez-Mota, ME., Téllez-Valdés, O., Lira-Saade, R. y Villaseñor, J. 2013. Una regionalización de la Faja Volcánica Transmexicana con base en su riqueza florística. *Botanical Sciences*, 91: 93–105.
- Sukumaran, J. y Knowles, LL., 2017. Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114: 1607–1612.
- Stamatakis, A. 2016. The RAxML v8. 2. X Manual. Heidelberg Institute for Theoretical Studies. Available from: <http://sco.h-its.org/exelixis/web/software/raxml/#documentation>
- Townsend, TM., Alegre, RE., Kelley, ST., Wiens, JJ. y Reeder, TW. 2008. Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: An example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47:129–142
- Uetz, P. y Hošek, J. 2017, The Reptile Database. <http://www.reptile-database.org>
- Vázquez Díaz, J. y Quintero Díaz, GE. 2005. Anfibios y Reptiles de Aguascalientes. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México. 318 pp.
- Vicente-Villadón, JL. 2006. Análisis discriminante: introducción. Universidad de Salamanca: Departamento de estadística.
- Wiens, JJ., 2007. Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*. 56: 875–878.
- Wiens, JJ. y Penkrot, TA., 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology*. 51: 69–91.
- Wiens, JJ. y Servedio, M. 2000. Species delimitation in systematics: Inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 267: 631–636.
- Zavala-Páramo, MG., Cano-Camacho, H., Valdez-Alarcón, JJ. y López-Meza, J. 2002. Marcadores moleculares: revisión y aplicaciones prácticas en animales. *Ciencia Nicolaita*, 32: 99–109.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. y Stamatakis, A. 2013. A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29:2869–2876.
- Zúñiga, G., Polaco, OJ. y Vargas, CF. 2009. La teoría de la evolución y la genética de poblaciones. Setenta y cinco años de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, 395–405.

## 12. Apéndices

### 12.1. Apéndice 1. Clave taxonómica para el complejo *Gerrhonotus liocephalus*

- 1a. Presencia de bandas dorsales cruzadas .....2  
1b. Ausencia bandas dorsales cruzadas..... *Gerrhonotus liocephalus*  
2a. 14 hileras transversales dorsales a mitad del cuerpo ..... *Gerrhonotus austrinus*  
2b. 16 hileras transversales dorsales a mitad del cuerpo ..... *Gerrhonotus sp.*  
**nov.**



## 12.2. Apéndice 2. Muestras de DNA

Recopilación y datos de voucher para muestras genéticas de *Gerrhonotus* utilizadas en este estudio.

| ID de la muestra     | Numero de Voucher | Localidad                      | ND4 | PRLR | BDNF |
|----------------------|-------------------|--------------------------------|-----|------|------|
| G1                   | AEVB-123          | Veracruz, Zongolica            | X   | X    | X    |
| G2                   | African           | Puebla, African Safari         | X   | -    | -    |
| G3                   | ANMO-2174         | Oaxaca, Guelatao               | X   | X    | X    |
| G4                   | ANMO-3615         | Guerrero, Olinalá              | -   | X    | X    |
| G5                   | ANMO-4013         | Puebla, Vigastepec             | X   | X    | X    |
| G6                   | ANMO-4015         | Puebla, Vigastepec             | X   | -    | -    |
| G7                   | FMQ-1920          | Edo. Méx., Villa Guerrero      | X   | X    | X    |
| G8                   | FMQ-3071          | Puebla, Tepanco de Rodríguez   | X   | X    | -    |
| G9                   | FMQ-3074          | Puebla, Tepanco de Rodríguez   | X   | X    | X    |
| G10                  | FMQ-3333          | Puebla                         | X   | X    | X    |
| G11                  | JAC-25255         | Guerrero, Vallecitos           | X   | X    | X    |
| G12                  | JAC-27292         | Edo. Méx                       | X   | -    | -    |
| G13                  | JAC-27293         | Edo. Méx                       | X   | -    | -    |
| G14                  | LCM-683           | Puebla, Valle de Tehuacan      | X   | X    | X    |
| G15                  | LCM s/n           | Oaxaca, Concepción             | X   | X    | X    |
| G16                  | RICB-367          | Puebla, Valle de Tehuacán      | X   | X    | X    |
| G17                  | RICB-371          | Morelos, Tepoztlán             | X   | X    | -    |
| G18                  | RICB-524          | Oaxaca, Silacayoapam           | X   | X    | X    |
| G19                  | RICB-552          | Guerrero, Jalapa               | X   | X    | X    |
| G20                  | RICB-553          | Guerrero, Jalapa               | X   | X    | X    |
| G21                  | RWB-Ixtlán        | Oaxaca, Ixtlán                 | X   | X    | X    |
| G22                  | RW-Omiltemi       | Guerrero, Omiltemi             | X   | X    | X    |
| G23                  | WSB s/n           | Michoacan, Zitacuaro           | X   | -    | X    |
| G24                  | ANMO-3218         | Oaxaca, Cerro Baúl             | X   | X    | -    |
| G25                  | ANMO-3219         | Oaxaca, Cerro Baúl             | X   | X    | X    |
| G26                  | FMQ-2925          | Oaxaca, El Jicaro              | X   | X    | -    |
| G27                  | RLR-2             | Chiapas                        | X   | -    | X    |
| G28                  | RLR-3             | Chiapas                        | X   | -    | -    |
| G29                  | RLR-4             | Chiapas                        | X   | -    | -    |
| G30                  | JAC-23140         | Oaxaca, Santa Maria Guienagati | X   | X    | X    |
| G31                  | RICB-533          | Oaxaca, Santa Maria Guienagati | X   | X    | X    |
| G32                  | ANMO-4014         | Puebla, Vigastepec             | -   | -    | X    |
| G33                  | RLR-5             | Chiapas                        | -   | -    | X    |
| <i>G. infernalis</i> | ANMO-2189         | Coahuila, Sierra de Jimulco    | X   | X    | X    |

|                    |         |                          |   |   |   |
|--------------------|---------|--------------------------|---|---|---|
| <i>G. ophiurus</i> | UANL-45 | Tamaulipas, Gómez Farías | X | X | X |
| <i>G. sp. nov.</i> | Romx-14 | Jalisco, Chamela         | X | X | X |

### 13. Publicaciones

- De La Torre-Loranca M., Grünwald C.I., Valdenegro-Brito A.E., **Cervantes-Burgos R.I.** and García-Vázquez U.O. 2019. New distributional records for the rare mexican pitviper *Cerrophidion petlalcalensis* (squamata: viperidae) from Veracruz and Oaxaca, México, with comments on distribution and the natural history. *Revista Latinoamericana de Herpetología* 2 (2).
- **Cervantes-Burgos R.I.** and García-Vázquez U.O. 2020. *Gerrhonotus liocephalus*. *Distribución. Review* 51(4): 775-776. ISSN: 0018-084X.