



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

REVISIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Ficimia hardyi*

(SQUAMATA: COLUBRIDAE)

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA PRESENTA :

VERÓNICA SANTILLÁN BADILLO

DIRECTOR: IRENE GOYENECHEA MAYER-GOYENECHEA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

2009

DEDICATORIA

Con todo mi amor a **mis hijos**,
que con una sonrisa o una patadita,
me recuerdan que son lo mejor que me ha pasado,
son mi Sol y mis ganas de salir adelante.

LOS AMO...

A mi esposo Yair,
no pude ver encontrado mejor compañero de vida,
y mejor padre para mis hijos,
TE AMO... y espero envejecer a tu lado.

Con profundo cariño a mis padres, Hugo Santillán y Yolanda Badillo
por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mi hermano Julio Cesar, por ser el mejor hermano del mundo,
gracias por todo.

A mi sobrina Isabella con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a mi Director de Tesis, la Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, por sugerir el tema y por la asesoría brindada durante el trabajo, gracias por su paciencia. Asimismo quiero agradecer a mis revisores M en C. Jesús M. Castillo Cerón, Dra. María del Consuelo Cuevas Cardona, Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, Dra. Katia Adriana González Rodríguez, Dr. Juan Márquez Luna y Dr. Aurelio Ramírez Bautista quienes revisaron el manuscrito, haciendo comentarios que lo enriquecieron.

Quiero agradecer especialmente al Dr. Juan Márquez Luna, quien contribuyó mucho a la mejora del escrito, al igual que el M en C. Jesús M. Castillo Cerón quien además me acompañó a campo a buscar más organismos y al Dr. Aurelio Ramírez Bautista quien facilitó los organismos de la localidad de San Luis Potosí, sin los cuales no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Al Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias UNAM, por facilitar la revisión de los organismos y al laboratorio de Sistemática Molecular del CIB de la UAEH, donde realicé todo el trabajo molecular.

Agradezco al Dr. David S. Germant , al Biol. Omar Zerón Flores y al Biol. Esmeralda Salgado Hernández, quienes me enseñaron todo lo que se del laboratorio de molecular y me ayudaron a obtener los resultados moleculares, sin ellos no hubiera podido concluir. Especialmente a Esme, por ayudarme a la edición del manuscrito y sobre todo quiero agradecerle su apoyo en los momentos de crisis en el laboratorio.

A Yair González Coronel, tengo muchísimas cosas que agradecerle y bien vale la pena que mencione cada una de ellas: gracias por acompañarme a revisar los bicho a la UNAM, por acompañarme a buscar bibliografía, por traerme a Pachuca cada que lo necesitaba y esperarme pacientemente, por ayudarme a comprar la compu donde escribí este trabajo, por repartir el manuscrito a los revisores, por ir a imprimir la tesis a México, y por darme siempre una crítica objetiva de mi trabajo. Pero sobre todo MIL GRACIAS, por aguantarme en mis momentos de estrés, angustia y desaliento durante las distintas etapas de este trabajo, **sin ti simplemente no lo hubiera logrado... este trabajo también es tuyo.**

A mi papá Hugo Santillán Cárdenas, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, y a mi mamá Yolanda Badillo Cabrera, por su apoyo e insistencia en que concluyera este trabajo. También agradezco a mi hermano Julio Cesar Santillán Badillo que de una u otra forma siempre

me ha hecho sentir que cuento con él. Sé que han realizado muchos sacrificios para que yo cumpliera este sueño MIL GRACIAS.

Quiero agradecer profundamente a Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, por su confianza (que espero no ver defraudado), por su enorme paciencia a lo largo de todo este trabajo (que sé, le pareció interminable) y sobre todo por tener siempre palabras de aliento para que concluyera este trabajo, y a Jesús Castillo Cerón que siempre estuvo al pendiente de mi trabajo, y que al igual que Irene siempre tuvo un comentario de apoyo, les agradezco a ambos su amistad, y todas las cosas que he aprendido de ustedes, no solo como alumna sino también como persona... MIL GRACIAS. Sin su paciencia y apoyo no lo hubiera concluido.

A mis amigos Yaremi Flores, Dianeis Téllez, Yair González, Esmeralda Salgado, Julio Villaseñor, Heli Coronel, Angélica Cruz y Armando Esaúl González, quienes en diferentes etapas de mi vida me han ayudado y han compartido conmigo grandes momentos, les agradezco su amistad y apoyo en los momentos difíciles... gracias por estar ahí.

Al Biol. Ulises Iturbe, por su apoyo y asesoría en la realización de los trámites de titulación. Y especialmente al M. en C. Jorge Eduardo González Espinoza por ayudarme en los gráficos y en la edición de este trabajo.

De manera especial quiero agradecer a mi esposos Yair González por cuidar lo más valiosos que tenemos, que es nuestro hijo, durante mis ausencias para realizar este trabajo, de la misma forma a mi mamá Yolanda Badillo y mi suegra Ocotlán Coronel, quienes con mucho amor, han cuidado a mi peque... ¡no pude dejarlo en mejores manos!. También quiero agradecer a la familia González Coronel quienes desinteresadamente me han apoyado para realizar y concluir este trabajo.

Y como no agradecer a mi hijo Zahir González Santillán por comprender que mamá tiene que trabajar, por portarse de maravilla en las tardes mientras yo realizaba este manuscrito, y por su enorme paciencia en nuestras visitas a Pachuca.

Finalmente, deseo agradecer profundamente a todas las personas que de alguna manera me ayudaron en la realización de este trabajo y que por falta de memoria olvido mencionar.

“Gracias a todos aquellos que nunca perdieron la fe en mi, incluso cuando yo ya la había perdido”

CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN.....1

INTRODUCCIÓN.....2

ANTECEDENTES

Género *Ficimia*.....5

Distribución del género *Ficimia* en el estado de Hidalgo.....8

Problemática de *Ficimia hardyi*.....9

Provincias geográficas a las que pertenecen las localidades donde se distribuye *Ficimia hardyi*.....12

Concepto de especie.....13

Caracteres morfológicos.....16

Caracteres moleculares.....19

Colecciones de tejidos.....22

Evidencia geológica de la Sierra Madre Oriental.....23

JUSTIFICACIÓN.....26

OBJETIVOS

Objetivo general.....27

Objetivos específicos.....27

ÁREA DE DISTRIBUCIÓN DE *Ficimia hardyi*

Localidades del estado de Hidalgo.....28

Características del área Zacualtipán.....28

Características del área Pacula.....29

Localidad del estado de San Luis Potosí.....29

Características del área de Guadalcázar.....	30
--	----

MATERIAL Y MÉTODO

Caracteres morfológicos.....	31
Pruebas estadísticas.....	34
Caracteres moleculares.....	34
Extracción de DNA.....	35
Electroforesis.....	36
Amplificación del gen <i>ND4</i>	36
Reacción de secuenciación.....	37
Elección del grupo externo.....	38
Análisis Filogenético.....	38

RESULTADOS

Caracteres morfológicos.....	40
Protocolos de extracción de DNA mt para tejidos fijados.....	46
Análisis filogenético de <i>Fimia hardyi</i>	51

DISCUSIÓN

Variación en los caracteres morfológicos de las localidades de <i>F. hardyi</i>	58
Importancia de los tejidos fijados en los análisis moleculares.....	61
Análisis filogenético de <i>Ficimia hardyi</i>	64

CONCLUSIONES	66
---------------------------	----

LITERATURA CITADA	68
--------------------------------	----

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Los nueve organismos revisados de las tres áreas donde se distribuye *Ficimia hardyi*..... 31
- Cuadro 2. Los 25 caracteres morfológicos usados, clasificados en cuantitativos y cualitativos. Los representados en negritas son los caracteres diagnósticos de *Ficimia hardyi*.33
- Cuadro 3. Caracteres cualitativos y cuantitativos en donde existieron variaciones en la comparación de los organismos de las tres áreas donde se distribuye *F. hardyi*.....40
- Cuadro 4. Valores de "t de student" obtenidos de los organismos de las tres áreas registradas para *Ficimia hardyi* con $\alpha = 0.05$. Con letra en negrita se indican los caracteres donde se encontraron diferencias significativas. Escamas geniales, número de escamas caudales y número de manchas dorsales.46
- Cuadro 5. Protocolos que se realizaron para obtener material genético de tejidos fijados en formol y preservados en alcohol al 70%. *Protocolo modificado obteniendo datos positivos.....50
- Cuadro 6. Frecuencia de bases nitrogenadas para los taxones de *Ficimia hardyi* y los dos grupo externos *Gyalopion cannum* y *Sympholis lippiens*..... 51
- Cuadro 7. Variación de caracteres. CC= Conjunto de caracteres, #C= Número de caracteres, SV= Sitios variables, SI= Sitios informativos, A= Porcentajes de A, C= Porcentajes de C, G= Porcentajes de G y T= Porcentajes de T.....55
- Cuadro 8. Diferencias entre pares de base. ti= transiciones, tv=transversiones. Los números en negritas muestra los caracteres donde existió más diferencia.....56
- Cuadro 9. Matriz de distancia "p". En negritas se resalta el valor de "p" para los pares de especies comparados, en donde el valor es el más pequeño.....57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Organismos XR 867 de la especie *Ficimia hardyi* de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí.....7
- Figura 2. Cabeza del organismo XR 867 de la especie *Ficimia hardyi* de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí en donde se observa la escama rostral ligeramente levantada con un borde puntiagudo.....7
- Figura 3. Distribución geográfica del género *Ficimia* en el estado de Hidalgo, donde se distribuyen cuatro de las seis especies registradas para esta especie. A) *F. hardyi*, B) *F. olivacea*, C) *F. publia* y D) *F. estreckeri*.....8
- Figura 4. Distribución de *Ficimia hardyi* en el estado de Hidalgo en las localidades de: A) Zacualtipán y B) Pacula.10
- Figura 5. Distribución de *Ficimia hardyi* en el estado de San Luis Potosí en las localidades de: A) Guadalcázar San Luis Potosí en las localidades de: B) El Realejo, C) San José de los Cervantes, y D) San José de las Flores.....11
- Figura 6. Las tres localidades de *Ficimia hardyi*: A) Zacualtipán y B) Pacula en el estado de Hidalgo y C) Guadalcázar en el estado de San Luis Potosí.....12
- Figura 7. Escamas geniales en tono gris, de los organismos de las localidades del estado de Hidalgo.....41
- Figura 8. Escamas geniales en tono gris, de los organismos de la localidad de San Luis Potosí, con una escama central o intermedia.....41
- Figura 9. Escamas geniales en tono gris, del organismos XR 775 hembra de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí, presenta dos escamas centrales o intermedias.....41

Figura 10. Número de Escamas Geniales de las tres localidades, muestra una diferencia significativa.....	42
Figura 11. Número de Escamas caudales en los organismos de <i>Ficimia hardyi</i> , en las tres áreas. El error estándar no es muy grande en las tres localidades lo que permite ver la amplia diferencia entre ella.	43
Figura 12. Número de Manchas Dorsales de los organismos de las tres localidades. Las tres localidades mantienen una separación de sus respectivos errores estándar, existiendo una diferencia significativa.....	44
Figura 13. Escama anal, a) escama anal dividida y b) escama anal fusionada.....	45
Figura 14. Cladograma obtenido a partir de los datos del gen <i>ND4</i> con número de paso=264 (I.C.=.9242, I.R.=.6667).....	52
Figura 15. Cladograma obtenido a partir de los datos del gen <i>ND4</i> con número de paso=264 (I.C.=.9242, I.R.=.6667). En la parte superior de las ramas se muestra los valores obtenidos por el “bootstrap” y en la inferior los obtenidos por el índice de decaimiento.	53
Figura 16. Filograma del gen <i>ND4</i> (650 pb, 60 caracteres in formativos L= 264 pasos, IC.=.9242, ICexc=.7500, IR.=.6667). El largo de las ramas es proporcional al número de cambios de los nucleótidos.	54
Figura 17. Organismo XR 867 <i>F. hardyi</i> de la localidad de Guadalcázar, San Luis Potosí.....	79
Figura 18. Organismo ORF 114 <i>F. hardyi</i> con muda de localidad de Guadalcázar, estado de San Luis Potosí.....	80

Figura 19. Organismo XR 767 cría de <i>F. hardyi</i> de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí.....	80
Figura 20. Los cinco organismos de la especie <i>Ficimia hardyi</i> de la localidad Guadalcázar del estado de San Luis Potosí.....	80
Figura 21. Descripción de las escamas de la cabeza presentes en las serpientes. A) Vista anterior y B) Vista lateral. Cada escama está indicada por un número: 1. rostral, 2. nasales, 3. loreal, 4. preoculares, 5. supraoculares, 6. posoculares, 7. temporales, 8. parietales, 9. internasales, 10. prefrontales, y 11. frontal (Tomado y modificado de de: Conant y Collins, 1991a).....	84
Figura 22. Descripción de las escamas de la cabeza presentes en las serpientes, vista posterior. Cada escama está indicada por un número: 12. mental, 13. escamas geniales y 14. ventrales (Tomado y modificado de de: Conant y Collins, 1991a).....	85
Figura 23. Conteo de Hileras de Escamas en el Cuerpo de la serpiente (Tomado y modificado de: Conant y Collins, 1991a).....	85
Figura 24. Escama anal (Tomado modificado de: Conant y Collins, 1991a).....	85

ANEXOS

Anexo I. Caracteres diagnósticos de <i>Ficimia hardyi</i>	79
Anexo II. Caracteres morfológicos analizados para las dos poblaciones de <i>Ficimia hardyi</i>	81
Anexo III. Diagramas donde se describe la posición de cada una de las escamas en las serpientes.....	84

Anexo IV. Protocolo de extracción para tejido congelado Medrano *et al.* (1990).....86

Anexo V. Protocolos de extracción de DNA para tejidos fijados en formol y alcohol.....88

Anexo VI. Protocolo estandarizado para muestras de tejidos fijados en formol y almacenados en alcohol al 70%. Modificación del protocolo de Eckerman y Walsh (1997).....93

Anexo VII. Protocolo para equilibrar fenol la extracción Fenol/Cloroformo (Hillis, *et al.*1996).....94

RESUMEN

Se investigó si existen diferencias morfológicas y moleculares entre los organismos de la especie *Ficimia hardyi*, registrados en tres localidades. La primera en la Sierra de Zacualtipán, la segunda en el municipio de Pacula, ambas en el estado de Hidalgo y la tercera en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, las tres se encuentran ubicadas en la Sierra Madre Oriental que se caracteriza por su topografía accidentada la cual favorece a la divergencia de especies. En el análisis morfológico se revisaron 25 caracteres a un total de nueve organismos, los cuales fueron evaluados por un estadístico para determinar si existían diferencias significativas entre los organismos de las tres localidades. El estudio molecular permitió realizar un análisis con secuencias del gen *ND4*, para obtener dichas secuencias se requirió la utilización de tejidos fijados en formol y almacenados en alcohol al 70%, debido a que existen pocos organismos colectados. Extraer DNA de tejido con éstas características es complicado, por lo cual se experimentó con cuatro protocolos logrando como resultado la estandarización de la técnica. Los datos obtenidos determinan que los organismos de las tres localidades pertenecen a la misma especie; sin embargo, estos resultados no son concluyentes debido a que son muy pocos los organismos colectados hasta la fecha, por lo cual es necesario realizar trabajo de campo para incorporar más organismos y determinar así la situación de las poblaciones de *Ficimia hardyi*.

INTRODUCCIÓN

Por el conocimiento de especies que se tiene, México está considerado dentro de los seis países biológicamente más ricos del mundo (Mittermeier, 1988). Sin embargo, se estima que todavía están por describirse más especies y se está lejos de tener un número cercano al real, de las especies que habitan el país. Los vertebrados de México están en términos generales bien conocidos, con la excepción de los peces marinos, los anfibios y los reptiles (Flores-Villela, 1993a; Ochoa y Flores-Villela, 2006).

Los anfibios y los reptiles presentan dos características que facilitan el aislamiento de sus poblaciones: 1) presentan poca vagilidad, con excepción de algunas especies como las tortugas y serpientes marinas, y 2) su tolerancia a factores climáticos y ecológicos extremos es, en general restringida, por lo cual son vulnerables a los cambios ambientales (Flores-Villela, 1993b). Aunado a lo anterior, la topografía accidentada y la gran diversidad de climas que presenta nuestro país, propician una gran cantidad de condiciones ecológicas, que a su vez han producido notables procesos de preservación, y diferenciación de especies, lo cual explica la gran riqueza que existe en México (Flores-Villela, 1993c), considerando que ocupa el segundo lugar mundial en diversidad de reptiles y el cuarto en anfibios (Ochoa y Flores-Villela, 2006).

El incremento en el número de especies de herpetozoos registrados para México ha sido lento desde la década de los cincuenta, pero sorpresivamente los últimos once años son considerados como los más productivos en la taxonomía de anfibios y reptiles, ya que se han descrito nuevas especies, se han registrado varias especies que han ampliado su área de distribución, las cuales no habían sido registradas para México

y se han presentado cambios taxonómicos de algunas subespecies que han sido elevadas a especies (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004). La riqueza herpetofaunística en México da como resultado 1200 especies, 16% más en relación con la lista registrada en 1993 (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004; Ramírez-Bautista y Moreno, 2006) y cuenta con una diversidad del 7% de anfibios y el 11% de reptiles a nivel mundial, de todas estas especies el 69% son endémicas para México (Ramírez-Bautista y Moreno, 2006). Dentro de todos los grupos distintivos de los reptiles, las serpientes son las que están mejor representadas en el país, con 16 familias, 88 géneros y 363 especies. Sin embargo, más del 70% de las especies pertenecen a una sola familia, la Colubridae (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004).

Durante mucho tiempo han existido dificultades para clasificar y agrupar a los diversos organismos. Este problema es muy común con los reptiles, las principales causas son: 1) La variación morfológica que es limitada (para las especies de algunos géneros), 2) Algunos géneros no poseen caracteres derivados únicos (autapomorfías), 3) La homología de los caracteres morfológicos no está clara y 4) La mayoría de los géneros y especies han sido agrupados arbitrariamente (Flores-Villela, 1993b). Todo lo anterior hace difícil obtener una clasificación natural, que abarque la gran variedad que presentan los reptiles por poseer abundantes géneros y especies, esto da como resultado una taxonomía confusa y problemática para algunos géneros de este grupo.

En el presente trabajo se analiza a *Ficimia hardyi* en cuanto a sus caracteres morfológicos y moleculares, las características de las tres áreas donde se localizan y la historia geológica de la Sierra Madre Oriental donde se encuentran distribuidas. Las

tres localidades de *Ficimia hardyi* se encuentran ubicadas dentro de la Zona de transición, por lo cual es importante reconocer las características biogeográficas de estas áreas ya que podrían permitir la divergencia de la especie, por lo cual es importante determinar la identidad taxonómica de los organismos de *Ficimia hardyi* y corroborar su actual distribución.

ANTECEDENTES

Género *Ficimia*

Dentro de la familia Colubridae se encuentra el género *Ficimia* descrito por Gray (1849; Hardy, 1975) y no está excluido de los problemas sistemáticos que presentan gran parte de los reptiles. El género *Ficimia* está incluido dentro del grupo de pequeñas culebras de Norteamérica, o serpientes "Sonorini" que forman un grupo supragenérico, tomando en cuenta las características de los huesos craneales y el tipo de dentición (Dowling, 1975; Goyenechea, 2000). Duellman (1961) sugería que *Ficimia* era congénico con *Gyalopion*, ahora está bien establecido que son dos géneros distintos (Hardy, 1975).

El trabajo taxonómico más importante realizado para el género es el de Hardy (1975) quien realiza un análisis morfológico exhaustivo para tratar de delimitar a las especies de *Ficimia*. Sin embargo, sus estudios son fenéticos, por lo cual no toma en cuenta las relaciones evolutivas de los organismos. En esta escuela se agrupan a los organismos estrictamente por el número de caracteres que tienen en común, por lo tanto las clasificaciones están basadas en todos los caracteres disponibles sin darles un peso diferencial de un carácter sobre otro (Scout-Ram, 1990). Por tal motivo es importante que se realicen trabajos donde se busque una clasificación natural para este grupo, es decir, basados en la escuela cladística, que tiene como fundamento la reconstrucción de la historia evolutiva de la especie en estudio, es decir su filogenia, a partir de un grupo monofilético (una especie ancestral con todas sus especies descendientes; Llorente, 1989).

Las culebras del género *Ficimia* son pequeñas y de hábitos enterradores (Figura 1). Se distribuyen del sur de los Estados Unidos, hasta el norte de Centro América. Las características morfológicas distintivas de este grupo son: presencia de una escama rostral levantada con un borde puntiagudo (Figura 2) y en contacto con la escama frontal, escama loreal ausente, 17 hileras de escamas en medio cuerpo, escamas dorsales planas, con un solo orificio apical; 12-34 escamas gulares, 5-8 escamas supralabiales, 5-8 escamas infralabiales; 4-10 escamas dorsales en contacto con las parietales, 1+2 temporales; 1 ó 2 escamas posoculares, 1 escama preocular; nasal dividida, bajo el nostrilo, nasal separada de preocular y fusionada con la primera supralabial, internasal presente o ausente; mental separada de las geniales por contacto mutuo de las primeras infralabiales; escamas ventrales de 126 a 152 (machos) ó 136 a 157 (hembras); caudales de 26 a 44 (machos) ó 28 a 41 (hembras); manchas dorsales de 17 a 52 (machos), 22 a 60 (hembras) o ausentes; manchas caudales de 6 a 18 (machos), 7 a 20 (hembras), o ausentes; longitud hocico cloaca de 100 a 415 mm (machos), 115 a 378 mm (hembras), longitud total 100 a 180.1 mm (machos), 120.5 a 170.0 mm (hembras); 13 a 17 dientes maxilares, 7 a 10 dientes palatinos, 12 a 17 dientes mandibulares (Hardy, 1990).

Este género está conformado por siete especies:

Ficimia olivacea Gray (1849), se distribuye en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Oaxaca, Hidalgo y Distrito Federal; *F. publia* Cope (1866), se distribuye en los estados de Guerrero, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Oaxaca, Chiapas, Campeche y Yucatán, así como en Honduras y Guatemala; *F. ruspator* Smith y Taylor (1941), solo

se encuentra distribuida en el estado de Guerrero; *F. variegata* Günther (1858), se distribuye en los estados de Veracruz y Oaxaca; *F. ramirezi*, Smith y Langebartel (1949), solo se distribuye en Oaxaca; *F. streckeri* Taylor (1931), se distribuye en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Hidalgo y San Luis Potosí. Y por último *Ficimia hardyi* Mendoza-Quijano y Smith (1993), se distribuye en los estados de Hidalgo y San Luis Potosí.



Figura 1. Organismos XR 867 de la especie *Ficimia hardyi* de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí.

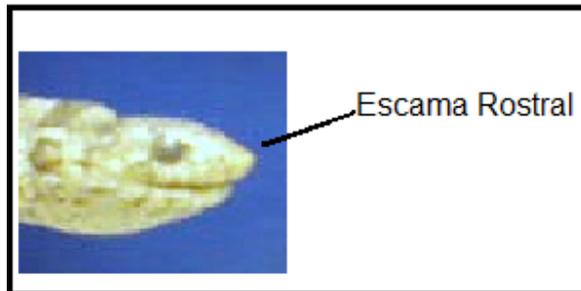


Figura 2. Cabeza del organismo XR 867 de la especie *Ficimia hardyi* de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí en donde se observa la escama rostral ligeramente levantada con un borde puntiagudo.

Distribución del género *Ficimia* en el estado de Hidalgo

En el Estado de Hidalgo se distribuyen cuatro de las siete especies del género *Ficimia*: *F. streckeri*, *F. olivacea*, *F. hardyi* y *F. publia* (Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista, 1999 Ramírez-Bautista *et al.* 1999, Hernández-Ibarra *et al.* 1999; Figura 3), es decir el 60% de la diversidad de este género está representada en el estado.

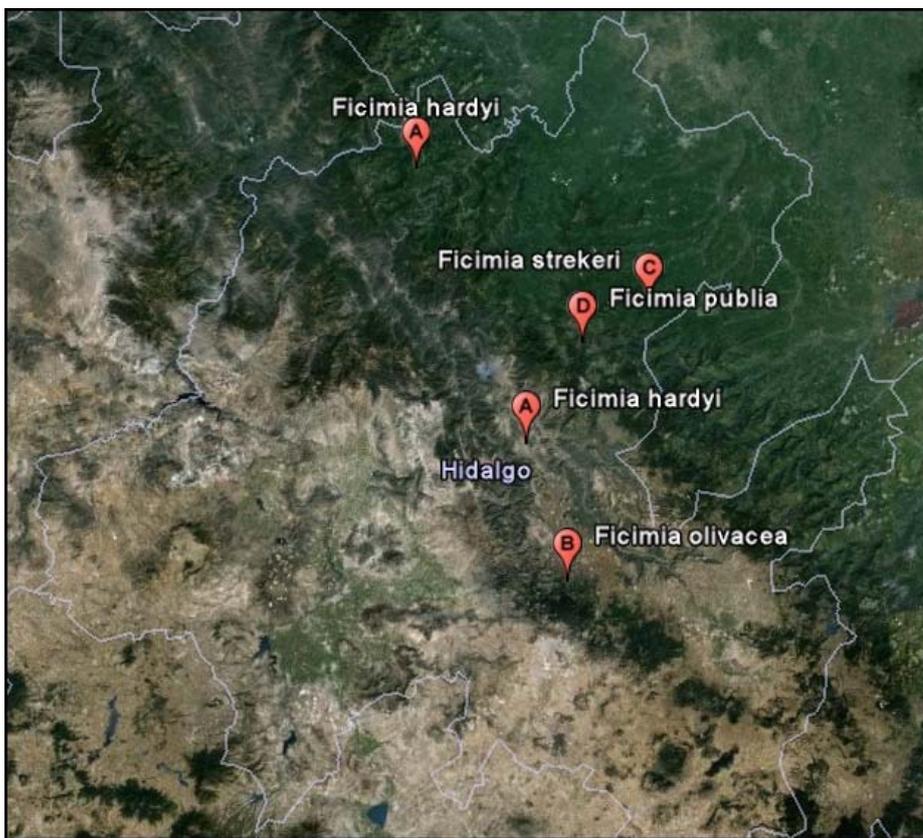


Figura 3. Distribución geográfica del género *Ficimia* en el estado de Hidalgo, donde se distribuyen cuatro de las seis especies registradas para esta especie. A) *F. hardyi*, B) *F. olivacea*, C) *F. publia* y D) *F. estreckeri*..

Ficimia streckeri se distingue de las demás especies de su género por la presencia de bandas dorsales angostas, que pueden ser de una escama o menos de

longitud, así como la presencia de una sola escama posocular (Taylor, 1931; Hardy, 1976; Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista, 1999).

Ficimia olivacea a diferencia de las demás especies de *Ficimia*, no presenta manchas dorsales, la escama nasal se encuentra dividida y tiene menor cantidad de escamas caudales en comparación con *F. hardyi* (Gray, 1849; Hardy 1978; Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista, 1999).

Ficimia publia presenta escamas internasales, una escama preocular y dos posoculares, la hilera de escamas en el cuerpo es de 19-19-17 y tiene menos manchas en el cuerpo y en la cola en relación a *F. hardyi* (Cope, 1866; Hardy, 1980; Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista *et al.* 1999).

Ficimia hardyi tiene como caracteres diagnósticos, la ausencia de internasales, dos posoculares, una combinación de 43 a 47 manchas para machos y 43 para hembras, en medio cuerpo con un tamaño de 2 a 4 escamas, 130 a 136 escamas ventrales para machos y 140 para hembras (Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista, 1999 Ramírez-Bautista *et al.* 1999).

Problemática de *Ficimia hardyi*.

En 1993 Mendoza-Quijano y Smith describen a *Ficimia hardyi*, el holotipo MZFC 4877 se encuentra en el Museo de Zoología, de la Facultad de Ciencias (MZFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se encontró a 3.8 Km. al Noroeste de Zoquizoquipán, en la Sierra Norte de Zacualtipán Hidalgo, se tiene además dos

paratipos: MZFC 4876 y MZFC 4878 de la misma localidad, así como otro ejemplar MZFC 5328 localizado en Puerto Hondo, Municipio de Pacula, Hidalgo (Mendoza-Quijano y Smith, 1990; Figura 4).



Figura 4. Distribución de *Ficimia hardyi* en el estado de Hidalgo en las localidades de: A) Zacualtipán y B) Pacula.

Ramírez-Bautista *et al.* (1999) ampliaron la distribución de *Ficimia hardyi* registrando una nueva localidad a partir de un ejemplar macho XR 767 y dos ejemplares hembras XR 775 y XR 559, estos organismos se encuentran depositados en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, dichos organismos fueron encontrados en las localidades: San José de Flores, El Realejo y San José de los Cervantes en Guadalcázar, Sierra de San Luis Potosí (Figura 5).



Figura 5. Distribución de *Ficimia hardyi* en el municipio de A) Guadalcázar San Luis Potosí en las localidades de: B) El Realejo, C) San José de los Cervantes, y D) San José de las Flores.

El presente trabajo toma como base los datos obtenidos por Hernández-Ibarra *et al.* (1999), en el cual se revisan los caracteres diagnósticos de *Ficimia hardyi*, más diez medidas de la cabeza de los organismos de las tres localidades (Figura 6), sin encontrar diferencias morfológicas significativas, ampliando así el área distribución de la especie. Sin embargo, considerando que las tres localidades se encuentran sobre la Sierra Madre Oriental que se ubica biogeográficamente dentro de la Zona de Transición, que se caracteriza por su topografía accidentada que proporciona una gran diversidad de microhábitats, que permite un alto índice de divergencia en muchos grupos biológicos, resulta interesante analizar que está pasando a nivel molecular con los organismos de las tres localidades realizando un análisis filogenético. Para complementar el estudio, se revisan nuevamente los caracteres morfológicos los cuales se evalúan con un análisis estadístico para determinar si las diferencias que existen entre los organismos son significativas y así confirmar la identidad taxonómica de los organismos.

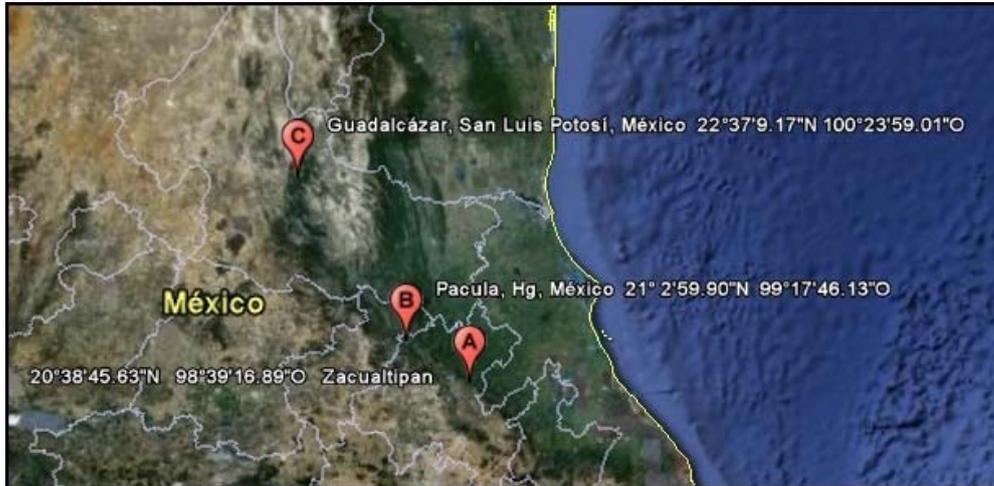


Figura 6. Las tres localidades de *Ficimia hardyi*. A) Zacualtipán y B) Pacula en el estado de Hidalgo y C) Guadalcázar en el estado de San Luis Potosí.

Provincias geográficas a las que pertenecen las localidades donde se distribuye

***Ficimia hardyi*.**

En México se reconocen tres componentes bióticos principalmente, cada uno con una combinación diferente de elementos y son: el componente Neártico o región Neártica que incluye las áreas áridas subtropicales del norte del país, el componente Transicional o Zona de Transición Mexicana que incluye las áreas básicamente montañosas del centro del país y el componente Neotropical (región Neotropical) que incluye áreas tropicales húmedas y subhúmedas del sur de México (Morrone, 2005).

De estos tres componentes bióticos, la región de especial interés para este trabajo es la Zona de Transición. Halffter (2003) la definió como un área compleja y variada donde se superponen elementos bióticos neotropicales y neárticos. No solo resulta interesante la “mezcla” biótica de esta zona de transición, sino también la

evolución *in situ* de numerosos taxones endémicos (Halffter, 2003; Morrone, 2005). Morrone (2004), consideró apropiado restringir la Zona de Transición Mexicana a las provincias de la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transmexicano, Cuenca del Balsas y Sierra Madre del Sur.

Las tres áreas donde actualmente se tienen registro de la presencia de *Ficimia hardyi*, se encuentran dentro de la Provincia de la Sierra Madre Oriental, que se ubica en el este de México, en los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Puebla y Querétaro, por encima de 1500 m de altitud. Corresponde al sistema montañoso de la Sierra Madre Oriental, y se une con el Eje Volcánico Transmexicano (Morrone, 2005). Predominan los bosques templados, principalmente de encino, aunque también hay bosques de pino y otras comunidades vegetales. Entre los géneros de plantas más frecuentes se destacan: *Carpinus*, *Pinus*, *Platanus*, *Quercus*, *Agave* y *Schizandra* (Morrone, 2004).

Existen varios análisis recientes que han reconocido unidades menores dentro de la Provincia de la Sierra Madre Oriental es decir subespecies, basados en taxones de hongos, anfibios y reptiles, aves y mamíferos. Lo que confirma el alto índice de divergencia entre las especies de esta zona, permitiendo procesos de evolución (Morrone, 2005).

Concepto de Especie

Definir a las especies es un problema antiguo y a menudo controvertido. Hay quienes las consideran como una unidad real, estética, disponible para el observador y objetivamente delimitable, y hay quienes la consideran como una unidad cambiante

imposible de delimitar y por lo tanto, inexistente en la naturaleza. Esta discusión se generalizó en los siglos XVIII y XIX (Llorente y Michán, 2000), resultando una gran variedad de definiciones de especie y donde cada una de éstas se adapta al campo de estudio en donde será utilizada, la finalidad teórica o práctica. Para resolver estas controversias se han planteado varias opciones. Sin embargo, la mayoría de los autores sugieren generar una definición para cada grupo o situación biológica. Sour y Montellano (1994) proponen que el concepto que se adopte dependa del organismo con el que se esté trabajando, así como considerar el espacio temporal en donde se ubique a las poblaciones.

El concepto biológico de especie ha sido dominante dentro de la taxonomía durante muchos años e incluso se considera como un concepto clásico, principalmente entre la zoología de vertebrados. En la herpetología no ha sido la excepción, pese a las desventajas que puede tener su utilización (Frost y Hillis, 1990).

Una especie biológica se define como: "grupos de poblaciones naturales entrecruzables que se encuentran reproductivamente aislados de otros grupos" (Mayr, 1969). Debido a que la compatibilidad reproductiva no es una medida sobre el grado de relación evolutiva, agrupar a las especies sobre la base de esta característica, debe abandonarse pues es inconsistente con el estudio del proceso evolutivo (Cracraft 1992; Frost y Hillis 1990). Además, según Cracraft (1983) existen dos desventajas principales por las cuales no es conveniente utilizar el concepto biológico de especies:

1. No permite reconstruir la historia evolutiva de manera adecuada e incluso es irrelevante investigar procesos de diferenciación evolutiva.

2. Solo puede aplicarse a especies que se reproducen sexualmente.

Si se considera que la taxonomía debe ser un conjunto de supuestos sobre las relaciones entre los seres vivos, entonces ésta debe ser lógicamente consistente con la historia evolutiva de los mismos (Frost y Hillis, 1990). En consecuencia, resulta necesario que las decisiones taxonómicas que se tomen se realicen bajo un concepto de especie que sea acorde a la historia evolutiva de los grupos. Al mismo tiempo, no se da un avance significativo en la filosofía y práctica del reconocimiento de especies hasta que se difunden dos ideas:

1. El reconocimiento de un taxón debe ser consistente con la historia evolutiva.
2. Las especies no deben ser vistas como clases.

En un sentido operacional, según Frost y Hillis (1990) una especie bajo el concepto de especie filogenética se define como las muestras de poblaciones menores detectables y con un conjunto único de caracteres. Una especie filogenética necesita solamente tener integridad de linaje, es decir caracteres que son propiedad de los organismos que solo son síntoma de la relación evolutiva y por lo tanto útiles en la inferencia de entidades evolutivas (Frost y Hillis, 1990).

Para Cracraft (1992) una especie filogenética se reconoce como un "arreglo irreducible de organismos entre los que existe un patrón de ancestría-descendencia y que es diagnosticablemente distinto a otro arreglo". Bajo este concepto solo se aplican nombres de especies a unidades evolutivas delimitadas y éstas son consideradas los grupos menores diagnosticables por lo que las subespecies no se reconocen.

El concepto filogenético de especie cumple con tres puntos que reflejan las relaciones evolutivas según Kluge (1990):

1. La búsqueda de especies con un análisis cladista de sinapomorfías encontradas entre los organismos individuales.
2. El empleo de la regla de la monofilia para asegurar una taxonomía genealógica consistente. La convención de la monofilia asegura que las taxonomías sean sistemas de relaciones de grupos hermanos completos, donde cada sistema contiene todos los descendientes del ancestro común más reciente del sistema, por lo tanto la monofilia asegura taxonomías e hipótesis filogenéticas consistentes.
3. La atribución de una categoría de especie a aquellos clados menos incluyentes en los que existe un patrón parental de ancestría descendencia.

Por todo lo anterior, el concepto filogenético de especie es compatible con el objetivo del presente trabajo, ya que permite conocer la identidad taxonómica de *Ficimia hardyi* por métodos cladísticos, por lo tanto es el concepto que se sigue en el mismo.

Caracteres morfológicos

En 1758 cuando el naturalista sueco Karl Linnaeus, publicó su libro *Systema naturae*, el primero de una serie de trabajos en los que presentó el sistema binominal como una nueva propuesta taxonómica, que ya había sido sugerida por Joseph Pitton de Tournefort y otros autores, se establecieron bases más firmes en la sistemática

(Martínez, 1997; Cuevas, 2007). Posteriormente la teoría de Darwin sobre “El Origen de las Especies”, en el que argumentaba que las especies estrechamente emparentadas mostraban una similitud fundamental porque comparten un ancestro común (Bowler, 1998; Iturbe y Lazcano, 2007), ha servido para explicar los patrones de similitud observados en los organismos. A partir de entonces se ha buscado clasificar a los seres vivos de una manera más natural, con base en su morfología y fisiología, tomando en cuenta todos esos caracteres que se puedan cuantificar o que desde el punto de vista del taxónomo son características que distinguen al organismo de otros. (Martínez, 1997; Cuevas, 2007). Todos los estudios morfológicos realizados a diferentes grupos biológicos han dado como resultado la creación de claves taxonómicas, las cuales de una manera relativamente fácil y económica, permiten identificar organismos en campo y laboratorio y son la referencia principal en los listados de especies. (Flores-Villela, 1993a).

La mayoría de los trabajos taxonómicos realizados para el grupo de las serpientes se han basado en el estudio de su morfología, osteología y ecología, lo que ha permitido realizar diversos estudios filogenéticos, y por ello las serpientes son uno de los grupos mejor estudiados dentro de los reptiles (Goyenechea, 2000). La familia Colubridae ha sido objeto de muchos estudios taxonómicos basados en su morfología, ya que es un taxón numeroso, aproximadamente de 1,500 especies clasificadas en subfamilias y tribus, esto se debe a que es una familia difícil de definir por estar integrada de taxones diferentes entre sí y carecen en su mayoría de apomorfías (Kraus y Brown, 1998). A pesar de los estudios filogenéticos realizados para el grupo, existen

diferencias en los resultados obtenidos, la causa principal es que los investigadores han utilizado diferentes tipos de caracteres o a que los resultados se obtuvieron realizando diferentes tipos de análisis que asumen filosofías distintas, las tres principales son: la Fenética, la Sistemática Evolutiva y la Cladística (Goyenechea, 2000; Contreras-Ramos y Goyenechea, 2007).

Los estudios morfológicos, tradicionalmente han servido como la única base para la mayoría de los estudios taxonómicos y continúan siendo muy útiles para estudios filogenéticos (Martínez, 1997), hasta la fecha la filogenia de la mayoría de los grupos biológicos está sustentada por estos caracteres y seguirán siendo la base de la sistemática moderna (Wiens y Servedio, 2000; Cuevas, 2007), aunque los avances tecnológicos han permitido la expansión de la sistemática molecular, no se podrán dejar de lado los caracteres morfológicos, cuando se realiza la descripción de una nueva especie, se describe las características externas, es decir su morfología y se designa un holotipo, por lo cual los caracteres morfológicos son el inicio del análisis taxonómico (Wiens y Servedio, 2000). Sin embargo, las principales desventajas de los caracteres morfológicos son: el tamaño del conjunto de datos es limitado y son de poca ayuda cuando existe poca delimitación morfológica entre los organismos, los estudios morfológicos requieren de muestras grandes para delimitar la variación intraespecífica de un carácter y para algunos grupos biológicos esto es complicado (Goyenechea y Contreras-Ramos, 2007). Pese a las desventajas que puedan tener los caracteres morfológicos, estos son el punto de referencia para sustentar los análisis moleculares (Goyenechea y Contreras-Ramos, 2007).

Caracteres moleculares

Las fuentes de información taxonómica hasta principio de los años cincuenta fueron tomadas directamente de características morfológicas, anatómicas, embriológicas y citológicas, pero no siempre han sido suficientes para clasificar a los organismos y resolver problemas taxonómicos (González, 1997). A mediados de los años cincuenta se inició una nueva etapa experimental de la sistemática, principalmente en el área de la botánica al incluirse el uso de compuestos secundarios encontrados en algunas plantas (Martínez, 1997). Estas técnicas se perfeccionaron para ser utilizada en otros grupos biológicos y su aplicación se extendió hasta los años setenta (Crawford y Baver, 1981).

Los marcadores moleculares y la electroforesis de enzimas, son las primeras técnicas moleculares utilizadas, hacia los ochenta las técnicas de manipulación y análisis habían avanzado lo suficiente para poder estudiar la variación del DNA y RNA (Hillis *et al.*, 1996). La popularidad de estos métodos está basada en que cualquier carácter utilizado para realizar un análisis sistemático debe reflejar cambios genéticos, con la ventaja adicional de que el número de datos que se pueda obtener está limitado sólo por el tamaño del genoma. Las tres grandes áreas de aplicación de la sistemática molecular son: la estructura genética de poblaciones (como la variación geográfica, heterocigocidad), delimitación de especies (incluyendo híbridos) e inferencia filogenética (Martínez, 1997). Debido en parte al gran número de caracteres involucrados, estos datos se analizan por métodos de distancia, parsimonia o máxima similitud con lo que se obtiene una filogenia.

El uso de secuencias génicas es actualmente uno de los métodos más comúnmente utilizados y recomendados por tres razones principales (Giannasi *et al.*, 1992): 1. representan una fuente abundante de caracteres (potencialmente cada nucleótido de la secuencia es un carácter), 2. presentan propiedades estructurales y funcionales y 3. representan diferentes tasas evolutivas.

Las secuencias génicas del DNA mitocondrial fueron introducidas por Avise *et al.* (1979 y Llorente, (1989), teniendo un gran impacto en el estudio de la filogenia y la genética de poblaciones de animales. A finales de los años 70's y principio de los 80's el DNA mitocondrial (DNAmt) era la mejor parte conocida del genoma eucarionte y se descubrió que tenía una serie de características prácticas que se han aprovechado para estudios filogenéticos y son: 1. El DNAmt es más fácil de purificar que cualquier otro segmento específico del DNA nuclear, gracias a que presenta un alto número de copias y carece de envoltura nuclear lo cual facilita su extracción. 2. El DNAmt se encuentra distribuido universalmente en todo el reino animal y se caracteriza por estar notablemente uniforme en contenido genético. 3. Los tipos de cambio evolutivo que sufre el DNAmt son relativamente simples, son principalmente sustituciones de bases y adiciones mutacionales de longitud, que se acumulan periódicamente en las pequeñas regiones no codificadoras. 4. El DNAmt tiene una tasa de cambios mucho más rápida que el DNA nuclear, lo que hace que las comparaciones usando DNAmt sean mucho más precisas que utilizando DNA nuclear y 5. El DNAmt se hereda solo maternalmente, por lo que la recombinación no ocurre en el DNAmt (Llorente, 1989). El DNAmt de todos los organismos multicelulares contiene un conjunto de 37 genes

específicos, 2 genes de RNA ribosomal, 22 genes de RNA de transferencia y 13 genes que codifican para proteínas que forman parte de la cadena respiratoria, entre estos últimos está incluido el gen *ND4* (Videira, 1998). Estos genes están dispuestos en alrededor de 15 kilobases de DNA de doble cadena, en donde el arreglo es muy estable y solo se han encontrado cambios en el orden de los genes (Llorente, 1989).

Aunque potencialmente se puede extraer DNA de músculo, médula ósea y epitelio intestinal, entre otros tejidos; en los mamíferos y reptiles el hígado por sus funciones específicas tiene mayor presencia de mitocondria. Una célula hepática presenta hasta mil mitocondrias (Klug y Cummings, 1998), por lo que, el trabajar con el hígado como tejido de extracción permite tener una mayor posibilidad de obtener DNA mitocondrial.

En los últimos años, la utilización de tejidos fijados en formol y alcohol es cada vez más frecuente. Sin embargo, la obtención del DNA es más complicada y las cantidades de material genético son menores. Esto se debe a que el formol causa endurecimiento y contracción en el tejido, además de una distorsión molecular formando cadenas entre las proteínas. La interacción del formaldehído con la estructura del DNA no se ha entendido completamente, pero hay evidencias de que se forman cadenas entre las proteínas y los filamentos del DNA (Chaw *et al.*, 1980). Por lo anterior actualmente no existe un método de extracción estandarizado para tejidos con las características antes mencionadas. Existen algunos trabajos entre los que destaca el de Singer-Sam (1989, en Hillis *et al.* 1996) en el cual se realiza una técnica para extraer DNA de tejidos fijados de mamíferos, y el de Shiozawa *et al.* (1992) quienes extraen

DNA de tejidos fijados de salmón. Con lo que respecta al grupo de los reptiles, Eckerman y Walsh (1997, en Hillis *et al.* 1996) hicieron una serie de cambios al método de Singer-Sam para obtener material genético de lagartijas. Sin embargo, ellos mismos mencionan que en todas las pruebas que realizaron no siempre obtuvieron DNA, por lo cual dicho método no está estandarizado.

Colecciones de tejidos

“Una colección biológica es un archivo de utilidad múltiple: es la referencia más directa para la identificación correcta de ejemplares, es el cimiento de la taxonomía y la nomenclatura, es la fuente de información para diferentes tipos de proyectos y por si fuera poco el desarrollo de la biología comparada, la taxonomía y biogeografía está íntimamente ligado con las colecciones biológicas” (Navarro y Llorente, 1991).

Existen dos tipos de colecciones: 1) Las principales, que en el caso de los vertebrados están constituidas por pieles, esqueletos o individuos preservados en alcohol o formol, y 2) las accesorias que están constituidas por partes de los ejemplares como lo son: contenidos estomacales, muestras de sangre, tejidos congelados, por estados juveniles, nidos, huevos, excreta, endo y exoparásitos (Navarro y Llorente, 1991). Su función principal es la de proporcionar información adicional sobre la biología del grupo en estudio.

A partir de la necesidad de incorporar la mayor cantidad posible de caracteres, para así resolver problemas en la sistemática de muchos organismos, la importancia de las colecciones accesorias se incrementó; principalmente por que permitieron realizar trabajos en sistemática molecular, ya que las secuencias génicas obtenidas de la

sangre y tejidos congelados o fijados de estas colecciones, permiten completar la información morfológica y resolver así los problemas taxonómicos (Navarro y Llorente, 1991;1994).

Como resultado de las actividades humanas, muchas especies se están extinguiendo y numerosos ecosistemas y comunidades biológicas se están degradando. Además, las especies sobrevivientes están siendo dramáticamente dañadas debido a la reducción de su variabilidad genética y del número de sus poblaciones siendo la extinción de las especies irreparable. Una vez que una especie es eliminada, la información genética contenida en su DNA y su combinación especial de caracteres se pierde para siempre (Navarro y Llorente, 1991; 1994). A pesar de la pérdida de especies, la creación de colecciones donde se preserve material genético, es una alternativa para evitar la colecta de especies raras o restringidas. Este material genético sería guardado para la posteridad y así facilitar la labor científica pese a las condiciones desfavorables que pueda presentar el organismo en su hábitat natural.

Además, es posible analizar el DNA de poblaciones y taxones extintos utilizando lo que se conoce como "DNA añejo" (Goyenechea, 2000).

Evidencia geológica de la Sierra Madre Oriental

Las tres localidades registradas hasta ahora para *Ficimia hardyi*, se encuentran distribuidas en parte de la Sierra Madre Oriental, dicha formación geológica presenta características topográficas que permiten que algunas poblaciones biológicas se encuentren aisladas y estén expuestas a distintos factores climáticos y ecológicos, lo que permite la diversificación de especies, por lo cual es importante conocer la historia

geológica de ésta, para que posteriormente tomando en cuenta los resultados morfológicos y moleculares sirva como apoyo para determinar la identidad taxonómica de *F. hardyi* y así corroborar su actual distribución. Por lo anterior se presenta una síntesis del origen y cambios de la Sierra Madre Oriental y la evidencia fósil del género *Ficimia*.

La Sierra Madre Oriental se ubica en el este de México, nace al sur del Río Bravo y corre paralela al Golfo de México. Abarca los estados de San Luis Potosí, Coahuila, Hidalgo, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz, Puebla y Querétaro (Morrone, 2004). Se une con el Eje Volcánico Transmexicano y se encuentra por encima de los 1500 m de altitud y posee una extensión aproximada de 1.350 Km. de longitud (Morrone, 2005). La ladera Occidental es más seca que la oriental, pues recibe vientos aislados del Golfo de México, aunado a la existencia de valles alargados, facilitando la existencia de elementos montañosos a altitudes menores (Morrone, 2005). Predominan los bosques templados de *Quercus* y *Pinus* entre otros. Morrone (2004) propone una regionalización biogeográfica en donde se reconoce a la Sierra Madre Oriental como parte de una “Zona de Transición”, ésta se localiza en los límites entre regiones biogeográficas y representan eventos de “hibridación” biótica, promovidos por cambios históricos y ecológicos.

Durante la Era Mesozoica, a principio del Terciario se inició un proceso orogénico que duró hasta finales del Cretácico dando como resultado la formación de la Sierra Madre Oriental, constituida por pliegues anticlinales y sinclinales. Además de fallas inversas. Por lo que involucra al estado de San Luis Potosí está constituida

principalmente por rocas sedimentarias Mesozoicas, elásticas y químicas, las rocas sedimentarias se depositaron y evolucionaron sobre un basalto Paleozoico y Precámbrico. Por lo que respecta al estado de Hidalgo el carácter estructural de esta cordillera está acentuado por pliegues complejos recostados hacia el noreste y grandes fallas, que han sacado a la luz fragmentos del basamento precámbrico y paleozoico (Ortega-Gutiérrez *et al.* 1990).

La Sierra se originó por el plegamiento de rocas sedimentarias de origen marino, las características litológicas y estructurales, indican que hubo diferentes eventos geológicos de tipo orogénico asociados a la actividad ígnea volcánica, que actuando en varias épocas para dar origen a un relieve estructural que después ha sido modificado en forma subsecuente por los diferentes factores, como el fracturamiento, el movimiento de masa y agua (Ortega-Gutiérrez *et al.* 1990).

JUSTIFICACIÓN

Ficimia hardyi se distribuye en tres áreas en la Sierra Madre Oriental, la cual se ubica dentro de la Zona de Transición, que presenta características topográficas y ecológicas que aíslan a los organismos favoreciendo la divergencia de muchos grupos biológicos y resulta importante determinar su identidad taxonómica con base en sus caracteres morfológicos y moleculares para corroborar su actual distribución. Además, dada la escases de ejemplares en campo es necesario experimentar con cuatro protocolos para extraer material genético de tejido fijados en formol y almacenados en alcohol al 70% para estandarizar la técnica, para la obtención de DNA mitocondrial de tejidos fijados de serpiente.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer la identidad taxonómica de los organismos de las tres localidades registradas para *Ficimia hardyi*, la primera en la Sierra de Zacualtipán la segunda en el municipio de Pacula, ambas en el estado de Hidalgo y la tercera en Guadalcázar, San Luis Potosí, analizando caracteres morfológicos y moleculares.

Objetivos específicos

Determinar si existen diferencias morfológicas entre los organismos de las tres localidades de *Ficimia hardyi* analizando 25 caracteres con pruebas estadísticas.

Estandarizar la técnica de extracción de DNA para tejidos previamente fijados en formol.

Determinar si existen diferencias moleculares entre las localidades de *Ficimia hardyi*, con base en un análisis cladístico utilizando las secuencias del gen *ND4*.

Corroborar la situación taxonómica de los organismos de las tres localidades de *Ficimia hardyi*.

ÁREA DE DISTRIBUCIÓN DE *Ficimia hardyi*

Localidades del estado de Hidalgo

El holotipo MZFC4877 (macho) fue encontrado a 3.8 km. al Noroeste de Zoquizoquipán, Sierra Norte de Zacualtipán, Hidalgo, a 1480 m de elevación. Los paratipos MZFC 4876 (macho) y MZFC 4878 (hembra) se localizaron en el mismo poblado del holotipo solo que a 2100 m y 1800 m de elevación, respectivamente, y el paratipo MZFC 5328 (macho) se localizó en Puerto Hondo, poblado del municipio de Pacula, Hidalgo a 1885 m de elevación (Mendoza-Quijano y Smith, 1993).

Características del área de Zacualtipán

El municipio de Zacualtipán se localiza en la Sierra Alta, que se caracteriza por tener un suelo muy accidentado, lleno de montañas altas, cerros y barrancas, esto proporciona ambientes muy diversos y diferentes entre sí, que van desde bosque de encino presente en zonas semifrías, hasta ambientes de matorral xerófilo que es donde se encontraron a los ejemplares de *Ficimia hardyi*, por ser zonas secas presentan precipitaciones anuales de 427 mm y una temperatura media de 19 C° (INEGI, 1998). La vegetación presenta especies como: *Dasyllirion sp*, *Yucca sp*, *Opuntia sp* y *Agave sp* las cuales son cultivadas por la gente del lugar (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Tres especímenes (MZFC 4876, MZFC 4877 y MZFC 4878) fueron localizados específicamente en plantaciones de maguey (*Agave sp*) (Mendoza-Quijano y Smith, 1993; INEGI, 1998).

Características del área de Pacula

El último organismo (MZFC 5328) se encontró en el municipio de Pacula que se localiza al sureste de la Sierra Gorda, fue encontrado en submonte dominado por zonas semiáridas que se distingue por una vegetación dominada de enebro (*Juniperus fláccida*; Mendoza-Quijano y Smith, 1993).

El municipio de Pacula se encuentra ubicado a una altitud sobre el nivel del mar de 1320 m. Presenta mesetas elevadas y profundas cañadas, se ubica en la provincia de la Sierra Madre Oriental (INEGI, 1998). El clima es seco con una precipitación pluvial media de 670 mm por año siendo su período de lluvias los meses de mayo y septiembre, teniendo como consecuencia una vegetación del tipo de matorrales. La localidad se encuentra muy perturbada, pues existe una gran tala de árboles y cultivo de terrenos, además de pastoreo excesivo de ganado caprino, ovino y vacuno. En la localidad de árboles, como el *Pinus sp*, *Juniperus sp* y *Cedrela sp* (INEGI, 1998; Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Localidad del Guadalcazar en el estado de San Luis Potosí

El organismo XR 559 (hembra) fue recolectado en San José de las Flores (22° 44'17''N, 100°23'24''W), a 1850 m de elevación; el XR 767 (macho) en San José de los Cervantes (22°32'55''N, 100°27'46''W) 1588 m de elevación; el XR 775 (hembra) se colectó en la población de El Realejo (22°40'46'' N, 100°24'52''W) a una elevación de 2160 m, y por último los organismos ORF 114 (macho) y XR 867 (macho), localizados también en el municipio El Realejo (22°40'46'' N, 100°22'53''W). Todas las

áreas antes mencionadas se encuentran en el municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí (Hernández-Ibarra *et al.* 1999).

Características del área de Guadalcázar

El municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, es una zona árida que está comprendida dentro de la Región del Desierto Chihuahuense (Hernández y Bárcenas, 1995). Sin embargo, cuenta con parches de vegetación de chaparral que se distinguen por presentar arbustos perenes, pinos, encinos y robles resistentes a las sequías (Hernández y Bárcenas, 1995). La temperatura media anual es de 18.1 C° la máxima se presenta en el mes de mayo, la mínima absoluta es de 7 C° para el mes de diciembre. La precipitación media anual es de 355 mm, que se distribuye de forma desigual en el municipio de Guadalcázar, durante la temporada de lluvias el hábitat puede ser exuberante y verde, aunque la mayor parte del territorio hay sequías recurrentes, las plantas permanecen latentes. Los organismos de la población de *Ficimia hardyi* fueron encontrados bajo roca en chaparral con una vegetación predominante de encino (*Quercus sp*; INEGI, 1992).

Al igual que la localidad de Hidalgo la zona se encuentra muy perturbada, por la tala inmoderada y cultivo de terrenos, además de pastoreo excesivo.

MATERIAL Y MÉTODO:

Caracteres morfológicos

Se revisaron un total de nueve ejemplares para las tres localidades donde se distribuye *Ficimia hardyi*. Para el estado de Hidalgo se revisó el holotipo y tres paratipos de las localidades de Zacualtipán y Pacula, los cuales se encuentran depositados en el Museo de Zoología de la Universidad Nacional Autónoma de México y para el estado de San Luis Potosí se revisaron cinco organismos que se encuentran depositados en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, los cuales solo están registrados con la clave de quien los colectó (Cuadro 1).

Cuadro 1. Los nueve organismos revisados de las tres áreas donde se distribuye *Ficimia hardyi*

Localidad	Clave de registro	Depositado en:	Sexo	Estadío
Zacualtipán, Hidalgo	holotipo MZFC 4877	Museo de Zoología Facultad de Ciencias UNAM	Macho	Adulto
Zacualtipán, Hidalgo	paratipo MZFC 4876	Museo de Zoología Facultad de Ciencias UNAM	Macho	Adulto
Zacualtipán, Hidalgo	paratipo MZFC 4878	Museo de Zoología Facultad de Ciencias UNAM	Hembra	Adulto
Pacula, Hidalgo	paratipo MZFC 5328	Museo de Zoología Facultad de Ciencias UNAM	Macho	Adulto
Guadalcázar, San Luis Potosí	XR 775	Instituto de Biología UNAM	Hembra	Adulto
Guadalcázar, San Luis Potosí	XR 559	Instituto de Biología UNAM	Hembra	Adulto
Guadalcázar, San Luis Potosí	XR 767	Instituto de Biología UNAM	Macho	Cría
Guadalcázar, San Luis Potosí	ORF 114	Instituto de Biología UNAM	Macho	Adulto
Guadalcázar, San Luis Potosí	XR 867	Instituto de Biología UNAM	Macho	Adulto

Se revisó previamente el trabajo de Ramírez-Bautista *et al.* (1999), en el cual, se realiza un análisis de los caracteres diagnósticos de *Ficimia hardyi*, así como una descripción detallada de diez medidas de la cabeza de los organismos, en dicho trabajo no están agregados los organismos ORF 114 y XR 867, probablemente porque fueron colectados después de la publicación, por lo cual el presente trabajo realiza una nueva revisión a los organismos de las tres localidades agregando para la localidad de San Luis Potosí los dos antes mencionado, además de que no se agregan las medidas de la cabeza, por no considerarlos diagnósticos para la especie, en su lugar se considera otros caracteres para enriquecer la descripción de los organismos de las tres localidades los cuales se mencionan Cuadro 2 . Esta nueva revisión morfológica a los nueve organismos de la especie de *Ficimia hardyi*, se realiza con el fin de complementar los resultados moleculares y hacer más completo el estudio.

Debido a la poca cantidad de organismos colectados hasta la fecha para *Ficimia hardyi*, y con el fin de hacer más detallado y completo el estudio, se visito en repetidas ocasiones las tres localidades donde se tiene registrada la presencia de la especie, para capturar más organismos, sin embargo, no se colecto ningún otro, por lo cual, solo se sometieron al análisis los nueve organismos antes mencionados.

El análisis morfológico se realizó usando los ocho caracteres diagnósticos de *Ficimia hardyi* (ANEXO 1), aunado a 17 que se consideraron para complementar el análisis, para tener un total de 25 caracteres morfológicos, de los cuales ocho son cualitativos y 17 cuantitativos (Cuadro 2; Anexo 2).

Cuadro 2. Los 25 caracteres morfológicos usados, clasificados en cuantitativos y cualitativos. Los representados en negritas son los caracteres diagnósticos de *Ficimia hardyi*.

Caracteres cuantitativos	Caracteres cualitativos
1. Número de supralabiales	18. Frontal en contacto con:
2. Número de infralabiales	19. Presencia o ausencia de Internasales
3. Número de preoculares	20. Presencia o ausencia de escama Loreal
4. Número de supraoculares	21. Escama anal dividida
5. Número de posoculares	22. Coloración dorsal
6. Formula temporal	23. Coloración ventral
7. Número de escamas geniales	24. Coloración de manchas dorsales
8. Número de escamas ventrales	25. Presencia de manchas dorsales
9. Número de escamas caudales	
10. Hileras de escamas en el cuerpo	
11. Número de manchas dorsales	
12. Número de manchas caudales	
13. Tamaño de manchas	
14. Longitud total	
15. Longitud hocico-cola	
16. Longitud cola	
17. Diámetro	

En este análisis morfológico se utilizó un microscopio estereoscópico, un calibrador para realizar las mediciones y como referencia para determinar la coloración de las manchas y de todo el organismo se utilizó la guía de colores de tejidos vegetales Munsell (Wilde y Voigt, 1977). En el Anexo 3 se muestra la posición de cada una de las escamas.

Pruebas estadísticas

Se realizó una prueba de "t" student no pareada (ya que los datos son independientes) con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, para conocer si existen diferencias significativas entre las tres localidades. Se utilizó el programa Stat Viewy 5.0 y se aplicó a los caracteres cuantitativos que presentaron variación entre las tres áreas (Lewis, 1992).

La hipótesis nula indica que no existen diferencias significativas entre los caracteres mencionados de las dos poblaciones y la hipótesis alternativa indica que si existen diferencias significativas.

Caracteres moleculares

Para realizar el trabajo molecular, se extrajo tejido de los siguientes organismos: para la localidad de Zacualtipán, Hidalgo se utilizó el organismo MZFC 5328. Para la localidad de Pacula, Hidalgo no existió tejido preservado, por lo cual no se pudo someter a un análisis molecular, y para Guadalcázar San Luis Potosí se utilizó el tejido del organismo ORF 114. Debido a la falta de tejido para la localidad de Pacula, el análisis molecular solo se realiza comparando el gen *ND4* de un organismo por estado y no por localidad. Por esta razón a lo largo de este trabajo se insiste en la importancia de preservar los tejidos de los organismos colectados para realizar análisis más detallados, evitando coleccionar de nuevo.

Extracción de DNA

Se extrajo previamente DNA del organismo MZFC 5328 para las localidades del Estado de Hidalgo el cual se encontraba congelado y en buen estado por lo cual fue utilizado el protocolo de Medrano *et al.* (1990), diseñado para extraer DNA de cantidades pequeñas de tejido congelado, este método no utiliza fenol/cloroformo, sino que utiliza cloruro de sodio para extraerlo (Goyenechea, 2000; ANEXO IV).

El tejido de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí se extrajo del organismo ORF 114 el cual se encontraba fijado en formol y almacenado en alcohol al 70%. Actualmente es muy difícil extraer DNA de un reptil en la cantidad y calidad necesaria para ser secuenciado, por lo cual fue necesario llevar a cabo cuatro protocolos de extracción y realizar modificaciones para así estandarizar la técnica.

El Protocolo de Singer-Sam (1989, en Hillis *et al.* 1996) tiene como reactivo principal la resina quelante de intercambio iónico tipo Chelex 100. Originalmente se utilizaba para extraer material genético de tejidos preservados en museos donde la mayoría de los organismos eran mamíferos (ANEXO V).

La técnica de Eckerman y Walsh (1997) es utilizada en tejidos de reptiles fijados en 10 % de formol y agua, o 70% de etanol. Es una modificación del protocolo utilizado por Singer-Sam (1989, en Hillis *et al.* 1996). Las modificaciones a este protocolo son a nivel de tiempo de incubación del tejido, temperatura, así como la incorporación de proteinasa K para realizar la lisis del tejido (ANEXO V).

El método propuesto por Shiozawa *et al.* (1992), está desarrollado para extraer DNA de tejidos fijados de salmón (*Oncorhynchus clarki*), utiliza tejidos que fueron

fijados de 1926 a 1981 obteniendo cantidades de DNA suficientes para amplificar, los tejidos que fueron utilizados para la extracción son: músculo, hígado e intestino (ANEXO V). Entre los reactivos principales para llevar a cabo este protocolo esta RNasa y extracción de Fenol/Cloroformo, para este protocolo se tuvo que equilibrar previamente el fenol (ANEXO VII).

Se utilizó el Kit QIAamp Tissue Extraction (Quiagen, Chatsworth, CA. USA.) propuesto por Chase *et al.* (1998). Éste protocolo se aplicó para moluscos previamente fijados y se pudo extraer DNA para amplificar 557 pb del gen 16S (Chase *et al.* 1998; ANEXO V).

Electroforesis

Para visualizar si se logró obtener DNA en cada uno de los protocolos mencionados, se realizó una electroforesis. Considerando que el gel es una red compleja de moléculas poliméricas y la distancia que el DNA migra a través de él, refleja el tamaño de la muestra (Scragg, 2000), es importante variar las concentraciones de agarosa, de 1.2 % hasta 9% con Buffer TB, debido a que en los tejidos fijados el DNA se encuentra degradado por lo cual las muestras no son muy grandes (Chaw *et al.*, 1980). En cada muestra se colocó 4 µl de bromuro de etilo.

Amplificación del gen *ND4*

La amplificación del gen *ND4* se realizó utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando los "primer" *ND4* de izquierda a derecha es: CCTATGACTACCAAAGCTCATGTAGAAGC y de su complemento de Leucina es: CATTACTTTTACTTGGATTTGCACCA (Arévalo *et al.*, 1994).

Las reacciones de PCR consistieron en 25 ciclos iniciales a una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 5 minutos, de acoplamiento a 94 °C por 30 segundos, y de extensión a 50 °C por 45 segundos, seguido de otros 25 ciclos con las siguientes temperaturas 72 °C por un minuto y 72 °C por 10 minutos. Dichas reacciones se realizaron en un termociclador modelo GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California). Las reacciones fueron realizadas en un volumen total de 33 µl usando: 1.42 µl de Primer ND4 (5'-3') a una concentración de 50 pmol, 1.42 µl de primer Leucina (3'-5') a una concentración de 50 pmol, 4.2 µl MgCl 25mg, .57 µl de dNTP 25mg (GeneAmp dNTP's, Applied Biosystems-Roche Molecular Systems Inc. New Jersey USA.), 2.5 µl de Taq polimerasa (Ampli Taq DNA polymerase Concentración 5 unidades/ µl Applied Biosystems), 7 µl de Buffer 10X y 52,1 µl de agua destilada.

Se corrió 2 µl de los productos en un gel de agarosa al 9% para verificar la calidad y cantidad del fragmento amplificado. Se visualizó agregando 5 µl de bromuro de etidio al gel y mediante un transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño del fragmento amplificado fue alrededor de 650 pb. La purificación de los productos amplificados de doble cadena se realizó con el Kit: QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN).

Reacción de Secuenciación

Las reacciones de secuenciación se realizaron con los productos de PCR. Los "primer" utilizados fueron *ND4* y Leucina (Arévalo *et a.* 1994). Se realizaron 25 ciclos con las siguientes temperaturas: 96°C por diez segundos, 50°C por cinco segundos y

60°C por cuatro minutos. Los productos de la reacción de secuenciación se precipitaron con acetato de sodio.

Se utilizó un secuenciador automático de capilar modelo ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems). La corrida se realizó con un capilar de 47 cm aplicado a las siguientes condiciones: tiempo de inyección: 60 segundos, voltaje de inyección: 2kV, voltaje de corrida: 15 kV, temperatura: 50°C y tiempo de corrida: de 45 minutos

Elección de grupos externos

Para la elección de los grupos externos se revisó el trabajo elaborado por Goyenechea (2000), donde realizó un análisis cladista del grupo de pequeñas culebras de Norteamérica, donde está incluido el género *Ficimia*. El primer grupo externo que se eligió fue la especie *Sympholis lippiens*, ya que utilizando las secuencias de DNA de los genes *ND4* y *16S* obtuvo un clado bien definido de la monofilia de *Ficimia* y *Sympholis* (Goyenechea, 2000). Y la segunda especie fue *Gyalopion canumm* que en el mismo análisis es el grupo externo de la monofilia de *Ficimia* y *Sympholis* (Goyenechea, 2000).

Análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron alineadas manualmente con el programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (Hall, 1999).

El análisis filogenético se realizó con el programa PAUP* 4.0B8 de Windows (Swofford, 2003) en donde se analizaron las secuencias obtenidas de las dos poblaciones de *Fimia hardyi* junto con los dos grupos externos.

Se realizó un análisis de máxima parsimonia incluyendo todos los caracteres informativos, y los polimorfismos. Se elaboró un análisis heurístico, con 1000 replicas y se evaluó la robustez del árbol de los resultados con el Índice de decaimiento “decay” de Bremer (1994; Morrone, 2000) que se basa en revisar el número de pasos requeridos para que una rama del cladograma se colapse. Una rama fuertemente soportada perdurará en un mayor número de series en contraste a una rama pobremente sustentada la cual deberá colapsarse antes. Al árbol resultante del consenso estricto se le aplicó un análisis “bootstrap” (Felsenstein, 1985) con 100 replicas. Este análisis se basa en la eliminación al azar de la mitad de los caracteres de la matriz de datos y la duplicación de los restantes, de esta manera se obtiene una nueva matriz del mismo tamaño la cual se utiliza para obtener el o los clados más parsimoniosos. Este procedimiento se repite un número determinado de veces y las veces de aparición de un componente se considera un índice de soporte. Ambos análisis son pruebas estadísticas que determinan la confianza de los resultados.

RESULTADOS

Caracteres morfológicos

Se encontraron variaciones en 13 caracteres de los 25 revisados, de los cuales 10 son cuantitativos y 3 cualitativos (Cuadro 3; ANEXO 2).

Cuadro 3. Caracteres cualitativos y cuantitativos en donde existieron variaciones en la comparación de los organismos de las tres áreas donde se distribuye *F. hardyi*.

Caracteres cuantitativos	Caracteres cualitativos
Escamas geniales	Escama anal dividida
Hileras de escamas en el cuerpo	Coloración dorsal
Número de escamas ventrales	Coloración de manchas dorsales
Número de escamas caudales	
Número de manchas dorsales	
Número de manchas caudales	
Tamaño de manchas caudales	
Longitud total	
Longitud cola	
Diámetro	

Escamas geniales: En los organismos de las dos áreas de Hidalgo, Zacualtipán y Pacula, las escamas geniales están presentes en dos pares, fusionadas (Figura. 7).

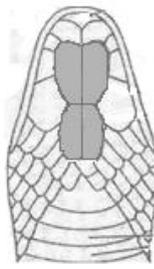


Figura 7. Escamas geniales en tono gris, de los organismos de las localidades del estado de Hidalgo.

En la localidad de San Luis Potosí las escamas geniales se encuentran el primer par fusionado y el segundo dividido por una escama (Figura 8), excepto en el organismo XR 775 hembra que presenta el primer par fusionado y el segundo dividido por dos escamas(Figura 9). Las variaciones encontradas en este caracter son consideradas significativas ya que en el análisis estadístico se obtuvo un valor de $P=0.024$ (ANEXO 2; Fig. 10).

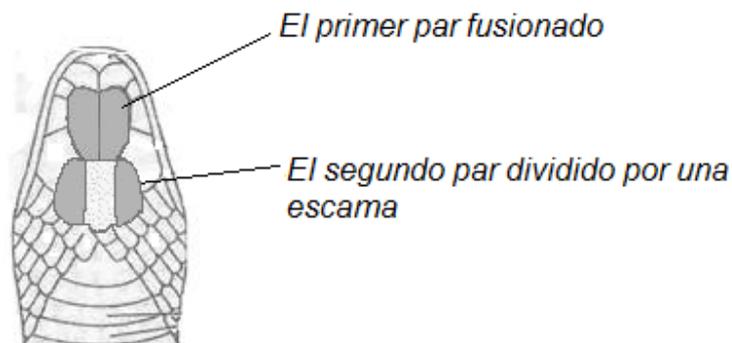


Figura 8. Escamas geniales en tono gris, de los organismos de la localidad de San Luis Potosí, el primer par fusionado y el segundo dividido por una escama

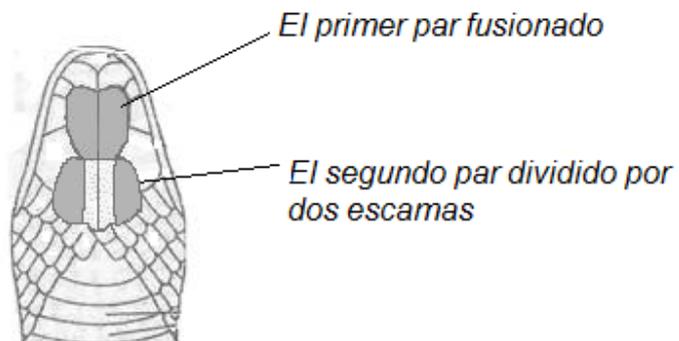


Figura 9. Escamas geniales en tono gris, del organismos XR 775 hembra de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí, el primer par fusionado y el segundo dividido por dos escamas.

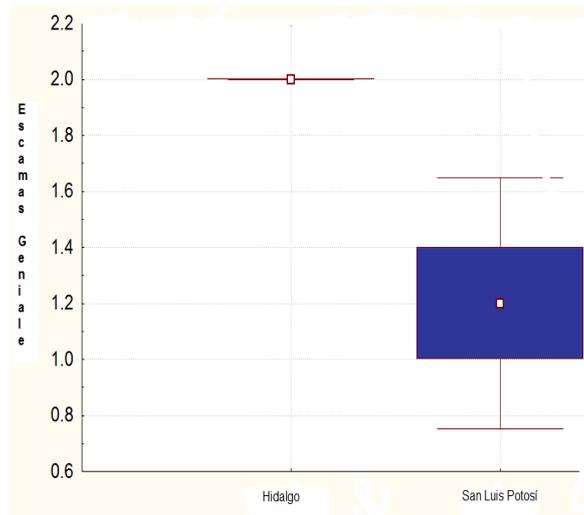


Figura 10. Número de Escamas Geniales de las tres localidades, muestra una diferencia significativa.

Hileras de escamas en el cuerpo: en las tres localidades los organismos presentaron 17 escamas en la hilera de la parte anterior de los organismos, 17 para la parte media y 17 para la parte posterior, pero en ambas existió un organismo que no cumplió con este patrón. Para Hidalgo el organismo MZCF 5328 (macho) con 17-17-15 escamas y para San Luis Potosí el organismo XR 559 (hembra) con 17-17-16 escamas, en ambas áreas la variación se presentó en las escamas de la parte posterior y en sexos distintos. Las variaciones presentes en este carácter resultaron no significativas por el análisis estadístico (ANEXO 2).

Número de escamas ventrales: los intervalos de los organismos de las localidades de Hidalgo fueron de 140 escamas para hembras y de 130 a 136 para machos. Para San Luis Potosí, las hembras presentan menor número de escamas ventrales de 135 a 139 y en los machos el intervalo se amplía de 126 a 136, aunque es evidente la variación entre los organismos de las tres localidades, en el análisis estadístico se obtuvo un valor de $P= 0.507$ (ANEXO 2), por lo cual no se considera una diferencia significativa.

Número de escamas caudales: en las localidades de Hidalgo los machos presentaron un intervalo de 44 a 46 escamas y para las hembras fue de 40, con lo que respecta a San Luis Potosí los machos presentaron intervalos de 36 a 38 y las hembras de 33 escamas, es evidente que los organismos de las localidades de Hidalgo tienen más escamas caudales en ambos sexos (ANEXO 2), los resultados del estadístico confirman que esta variación es significativa obteniendo un valor de $P= 0.001$ (Figura 11).

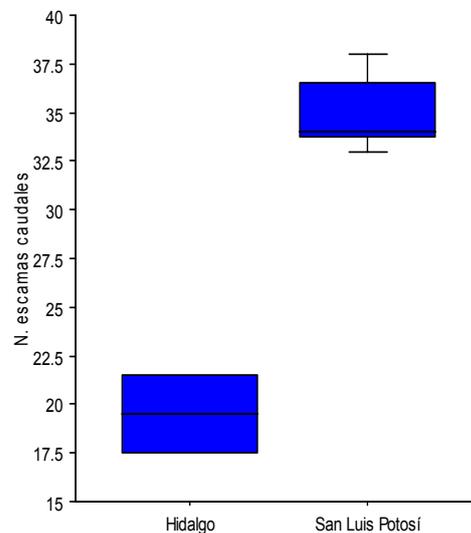


Figura 11. Número de Escamas caudales en los organismos de *Ficimia hardyi*, en las tres áreas. El error estándar no es muy grande en las tres localidades lo que permite ver la amplia diferencia entre ella.

Número de manchas dorsales: los organismos de las localidades de Hidalgo presentaron un intervalo en hembras de 43 manchas y de 43 a 47 en machos, para San Luis Potosí las hembras tienen de 49 a 51 manchas y los machos de 45 a 50 (ANEXO 2). En la localidad de San Luis Potosí los organismos presentaron más manchas caudales en ambos sexos y en el estadístico obtuvo un valor de $P=0.014$, por lo cual esta variación es significativa (Figura. 12).

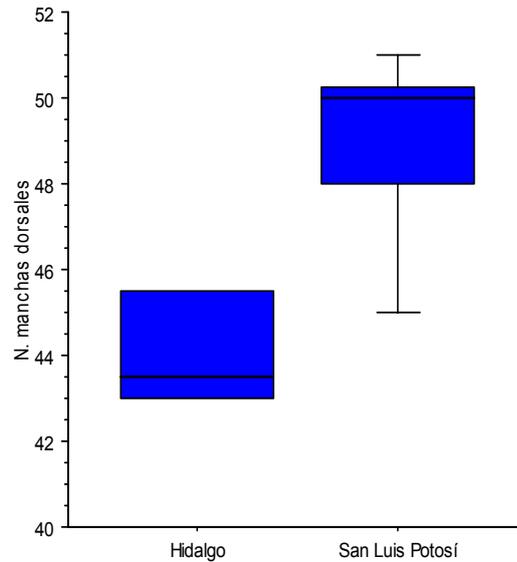


Figura 12. Número de Manchas Dorsales de los organismos de las tres localidades. Las tres localidades mantienen una separación de sus respectivos errores estándar, existiendo una diferencia significativa.

Número de manchas caudales: los organismos de Hidalgo presentaron un intervalo en hembras de 18 manchas y para machos de 17 a 22. Para San Luis Potosí las hembras tienen de 15 a 16 manchas y los machos de 16 a 18 (ANEXO 2). En Hidalgo los organismos presentan más manchas caudales para ambos sexos, pero dicha variación no es significativa ya que en análisis estadístico obtuvo un valor de $P=0.053$.

Tamaño de manchas: Las manchas de todos los organismos de las áreas del estado de Hidalgo tienen un largo de dos escamas, al igual que los organismos de San Luis Potosí con excepción de XR 775 (hembra) y ORF 0114 (macho), en donde las manchas son más grandes, de 3 escamas de largo (ANEXO 2). En el estadístico se obtuvo un valor de $P=0.070$, lo que indica que las diferencias no son significativas.

Mediciones: En las cuatro medidas obtenidas longitud total, longitud hocico- cloaca, longitud de cola, y diámetro, existió variación, pero tomando en cuenta que no se analizaron los mismos estadios de las tres localidades, ya que se analizaron

organismos adultos, juveniles y una cría, no se pudo observar si existía variación clinal y los resultados del estadístico confirman lo anterior ya que ninguna de las mediciones presentó diferencia significativa (ANEXO 2).

En cuanto a los caracteres cualitativos, las manchas dorsales de las áreas del estado de Hidalgo presentó tonalidades más oscuras que iban de tonos pardos oscuros al negro, mientras que en los organismos de San Luis Potosí eran tonalidades pardas claras y grisáceas. En la coloración dorsal no existió mucha variación, en las tres localidades, presentaron colores que iban del pardo claro al oscuro y el organismo MZCF 4876 de Hidalgo presentó un color grisáceo al igual que el organismo XR 867 de San Luis Potosí (ANEXO 2). La variación en la coloración del cuerpo y de las manchas entre las dos poblaciones probablemente se deba a la coloración del sustrato donde fue encontrada. Es importante recordar que los ambientes donde se distribuye esta especie tienen características distintas. Para las áreas de Hidalgo los organismos fueron encontrados en matorral xerófilo en plantación de *Agave* en donde las condiciones son áridas. Para San Luis Potosí las condiciones ambientales son más húmedas ya que fueron encontrados en bosque de encino (*Quercus*; Mendoza-Quijano y Smith, 1993).

Por último la escama anal de la especie *Ficimia hardyi* se encuentra dividida (Figura 13 a). Sin embargo en la población de San Luis Potosí, el organismo XR 775 (hembra) presenta la escama anal totalmente fusionada (Figura 13b).



Figura 13. Escama anal, a) escama anal dividida y b) escama anal fusionada

Los 10 caracteres cuantitativos donde existió variación se analizaron con una prueba de "t" student no pareada (Cuadro 4). Como ya se mencionó los tres caracteres que presentaron diferencias significativas entre las dos poblaciones son: escamas geniales (t=3.02; gl=6; P= 0.024), número de escamas caudales (t=10.642; gl=7; P= 0.001), número de manchas dorsales, (t=-3.274; gl=7; P=0.014).

Cuadro 4. Valores de "t de student" obtenidos de los organismos de las tres áreas registradas para *Ficimia hardyi* con $\alpha = 0.05$. Con letra en negrita se indican los caracteres donde se encontraron diferencias significativas. Escamas geniales, número de escamas caudales y número de manchas dorsales.

Caracteres donde existió variación	<i>F. hardyi</i> Hidalgo vs <i>F. hardyi</i> San Luis Potosí
Número de escamas ventrales	0.507
Número de escamas caudales	0.001
Número de manchas dorsales	0.014
Número de manchas caudales	0.053
Escamas geniales	0.024
Tamaño de las manchas	0.070
Hileras de escamas en el cuerpo	0.055
Diámetro	0.905
Longitud hocico-cloaca	0.080
Longitud de cola	0.051
Longitud total	0.107

Protocolos de extracción de DNAm para tejidos fijados

Se obtuvo la secuencia del gen *ND4* (Anexo VIII), del organismo MZCF 5328 para el estado de Hidalgo utilizando el protocolo de Medrano *et al.*, 1990, (Anexo IV). Por lo que respectar estado de San Luis Potosí el organismo ORF 114 se llevaron a cabo 4 protocolos de extracción para tejidos fijados en formol y preservados en alcohol al 70%, por lo cual se presentan las modificaciones y resultados de la experimentación con cada uno de ellos (Cuadro 5).

En el protocolo de Singer-Sam (1989 en Hillis *et al.* 1996), se observó que el tiempo de 45 minutos que se propone para que se degrade el tejido, no es suficiente. Modificación: Se crearon intervalos de tiempo más largos, se dejó el tejido hasta 6 horas en lisi, manteniendo siempre constante los 56° C de temperatura. No se alteró la temperatura, ya que entonces existirían dos modificaciones importantes a este protocolo, provocando muchas variables. Posterior a este paso el protocolo indica volver a incubar el tejido a una temperatura de 95° C por 15 minutos para terminar de degradar el tejido restante, sin embargo, el tiempo fue de nuevo insuficiente, así que se prolongó hasta 2 horas.

Resultado: No se logró degradar en su totalidad el tejido, por lo cual, al correr la electroforesis, no se obtuvieron bandas. Es importante mencionar que por ser el primer protocolo realizado, se incubó el tejido en baño María, observando que no es recomendable ya que el cambio de temperatura solía destapar el tubo eppendorf, alterando la muestra, por lo cual se optó por la utilización del bloque térmico para los posteriores protocolos.

El Protocolo de Shiozawa. *et al* (1992) fue utilizado originalmente en tejidos que estuvieron fijados por largos periodos de tiempo, y obtuvieron cantidades de DNA suficientes para amplificar. Sin embargo, la cantidad total al incorporar todas las soluciones era de 15 ml y el protocolo pedía que se centrifugara a una velocidad de 10,000 rpm, pero en el laboratorio no se cuenta con una centrifuga que alcanzara esa velocidad con esa cantidad de solución.

Modificación: Como alternativa se bajo a 10 veces la cantidad y concentración de cada reactivo para así utilizar la microcentrífuga.

Resultado: Se realizaron muchos cambios a este protocolo dando como resultado que no se obtuviera material genético.

Se siguió al pie de la letra la metodología del Kit QIAamp DNA Mini QIAGEN, se obtuvieron unas ligeras bandas al realizar la electroforesis, pero después de la purificación los resultados fueron negativos, se intento por varias ocasiones sin éxito, por lo cual se considera que este Kit no funciona para tejidos fijados, probablemente debido a lo degradado que se encuentra el material genético. El diseño de este Kit es muy específico, funciona de manera efectiva con tejidos de reptiles que se encuentran frescos o congelados, por este motivo se decidió no modificarlo, ya que existen muchas variantes.

Como ya se ha mencionado el protocolo de Eckerman y Walsh (1997), es una modificación al propuesto por Singer-Sam (1989 en Hillis *et al.* 1996). Este protocolo ya se había utilizado para tejidos de reptiles pero el mismo autor menciona que los resultados son inconstantes y no siempre se obtiene material genético.

Modificación: Se enjuagó el tejido con agua destilada hasta en 10 ocasiones, previas al protocolo, esto permite eliminar gran parte del alcohol y formol. Posteriormente se aumento las concentraciones de Chelex 100^a a 600 µl y proteinasa k 6.5 µl de, y se incubo durante toda la noche, no se puso límite de tiempo ya que se espero hasta que se degradara el tejido. Sin embargo al correr las primeras muestras no se observó ninguna banda en la electroforesis. Por el tiempo que tenían de fijados los tejidos, la

cantidad DNA sería mucho menor que la obtenida en tejidos frescos, por lo cual se modificó la concentración de agarosa en el gel y se aumentó la cantidad de muestra colocada en los pozos de 2 μ l a 2.5 μ l o hasta 3 μ l. Esta modificación se realizó pensando en que si realmente el protocolo era exitoso las concentraciones de material genético serían bajas y degradadas.

Resultado: con las modificaciones realizadas, fue el único protocolo que permitió obtener la secuencia del gen *ND4* del organismo ORF 114 para la población de San Luis Potosí (Anexo VIII). Las modificaciones permitieron ver bandas en los pozos después de correr la electroforesis, incluso después de la purificación lo que nos indica que efectivamente se puede obtener DNA. En el Anexo V se presenta el protocolo original y en el Anexo VI el protocolo ya estandarizado para los tejidos fijados resultado de este trabajo.

Cuadro 5. Protocolos que se realizaron para obtener material genético de tejidos fijados en formol y preservados en alcohol al 70%. *Protocolo modificado obteniendo datos positivos.

Características del Protocolo	Singer-Sam (1989 en Hillis <i>et al.</i>, 1996)	*Eckerman y Walsh (1997)	Shiozawa <i>et al.</i>, (1992)	Kit QIAamp Chase <i>et al.</i>, (1998)
Grupo biológico en el que fue utilizado	Tejido de mamíferos	Tejido de reptiles	Tejido de ave y peces	Tejidos de plantas y animales, frescos o congelados
Tejido en el que fue utilizado originalmente	Músculo	Hígado y Músculo	Hígado y Músculo	En animales, Hígado y Músculo
Reactivo Principal	Chelex 100°	Chelex 100° y Proteinasa K	Extracción de formol-cloroformo y RNasa	Proteinasa K
Tiempo de degradación del tejido	No se degrada el tejido en los 45 minutos que indica el protocolo	Se dejó el tejido cerca de 24 horas en proceso de degradación	Las doce horas que indica el protocolo son insuficientes para la degradar el tejido	El protocolo no indica un tiempo determinado
Modificación principal que se realizó	Se aumentó hasta 6 horas el tiempo de digestión del tejido	Se enjuago con agua destilada el tejido. No se puso límite de tiempo para la digestión del tejido, se duplicaron las concentraciones de Chelex y proteinasa K	Se bajo hasta 10 veces la concentración de cada reactivo	No hubo modificaciones se consideró que es un protocolo estandarizado y específico
Se obtuvo material genético	No, no aparecieron bandas en la electroforesis	Si el suficiente para secuenciar 650pb	No, realmente no se se pudo cumplir con la totalidad del protocolo	Sí, pero no se obtuvo suficiente material genético para realizar PCR

Análisis filogenético de *Ficimia hardyi*

Se obtuvo una matriz con las dos secuencias del gen *ND4* la cual tuvo una longitud de 650pb. En el análisis filogenético de los 650 caracteres totales, 525 fueron constantes, 165 fueron variables, de estos 60 fueron informativos y 105 fueron no informativos (autapomorfías). En los porcentajes obtenidos de las bases nitrogenadas (Cuadro 6), se observa que al comparar las localidades de *Ficimia hardyi* los porcentajes son muy similares en ambas secuencias: en Adenina el estado de Hidalgo presenta unas milésimas de más, en Citosina San Luis Potosí presenta unas centésimas de más, en Guanina San Luis Potosí presenta unas milésimas de más y por último Timina en donde Hidalgo presenta unas centésimas de más. Los dos grupos externos *Gyalopion canum* y *Sympholis lippiens* presentaron diferencias en todas las bases en relación a los dos estados donde está representada *F. hardyi*, pero al compararlos entre sí presentaron más diferencias en Citosina y Timina en donde *Gyalopion canum* y *Sympholis lippiens* presentaron tres centésimas de más respectivamente.

Cuadro 6. Frecuencia de bases nitrogenadas para los taxones de *Ficimia hardyi* y los dos grupo externos *Gyalopion canum* y *Sympholis lippiens*.

TAXON	A	C	G	T
<i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo	.339	.263	.121	.277
<i>F. hardyi</i> de San Luis Potosí	.333	.280	.125	.261
<i>Gyalopion canum</i>	.350	.270	.116	.257
<i>Sympholis lippiens</i>	.355	.247	.115	.283

La búsqueda heurística con 1000 replicas, encontró 1 árbol más parsimonioso, con una longitud de: 264 pasos, un índice de consistencia= 0.9242, un índice de consistencia excluyendo los caracteres no informativos de= 0.7500 y un índice de retención de= 0.6667. El cladograma obtenido (Figura 14), sustenta la monofilia entre los estados donde se distribuye *Ficimia hardyi*, pero no queda resuelta la relación de los dos grupos externos *Gyalopion canum* y *Sympholis lippiens*.

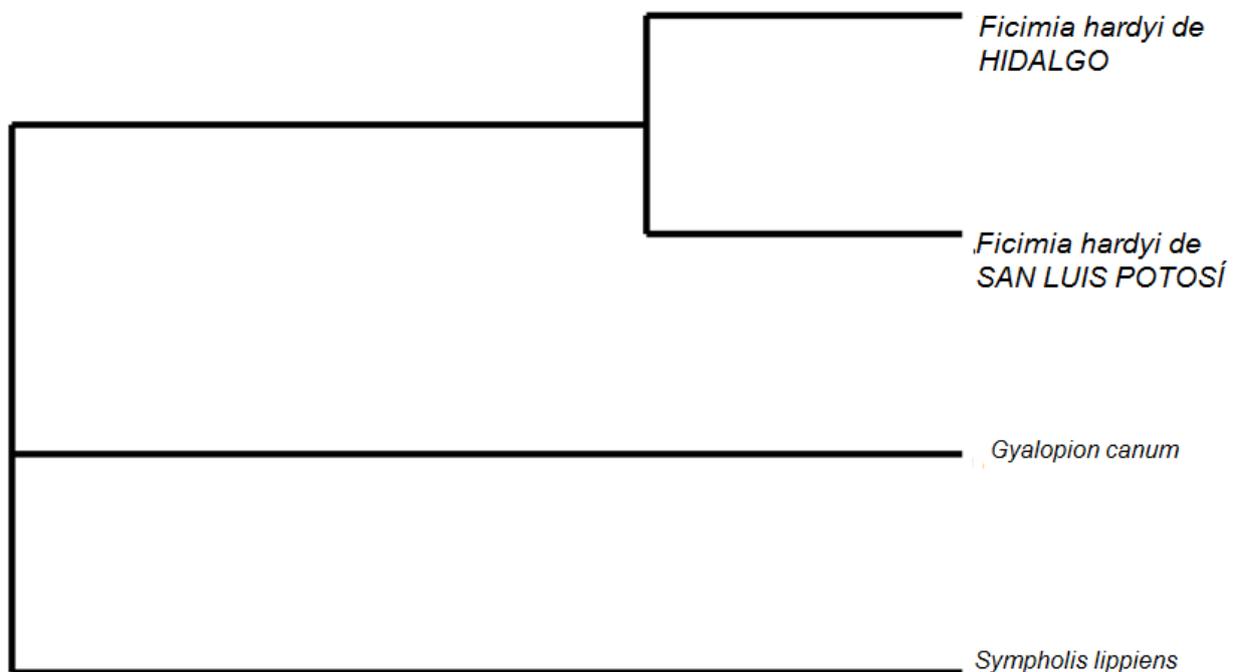


Figura 14. Cladograma obtenido a partir de los datos del gen *ND4* con número de paso=264 (I.C.=.9242, I.R.=.6667).

Al realizarse el análisis de bootstrap con 1000 réplicas, se obtuvo un valor del 100% para el nodo de las localidades de *Ficimia hardyi*, y se realizó un índice de decaimiento el cual obtuvo un valor de 14 (Figura 15), esto indica que relación entre las localidades de *Ficimia hardyi* es robusta. En cuanto a los grupos externos la utilización del gen *ND4* no es suficiente para determinar la relación entre estos dos taxones ya que el cladograma no está resuelto.

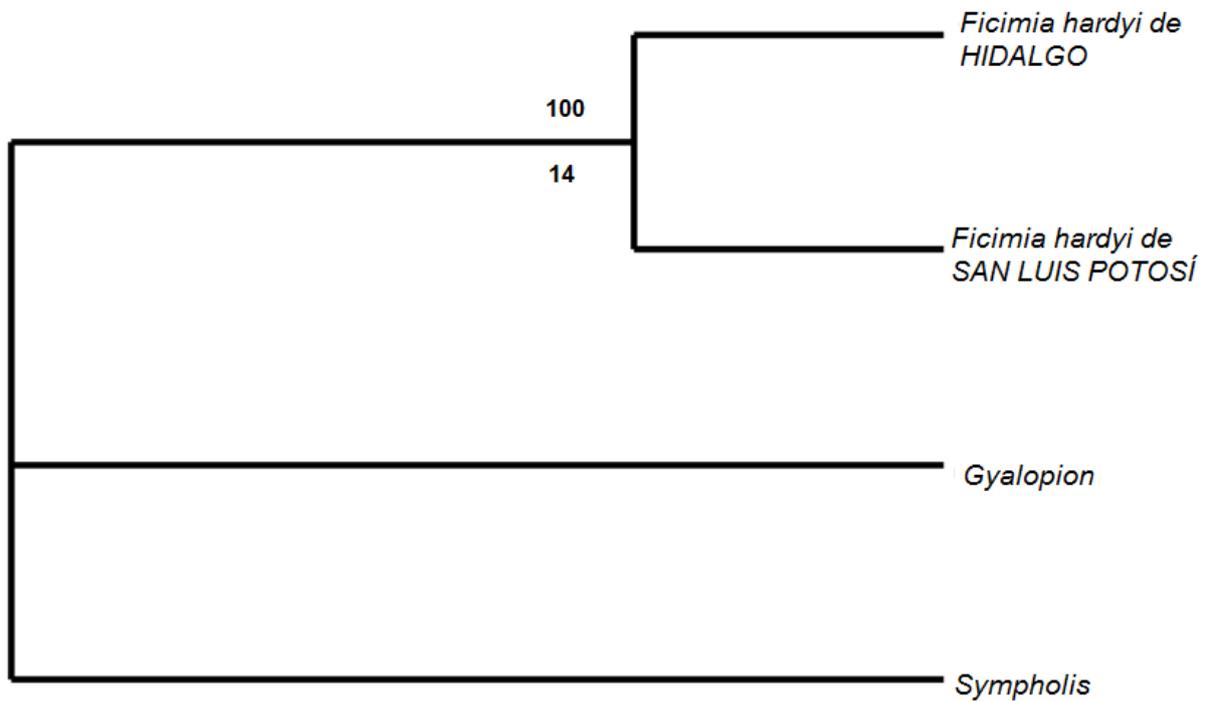


Figura 15. Cladograma obtenido a partir de los datos del gen *ND4* con número de paso=264 (I.C.=.9242, I.R.=.6667). En la parte superior de las ramas se muestra los valores obtenidos por el “bootstrap” y en la inferior los obtenidos por el índice de decaimiento.

Se obtuvo un filograma, este tipo de diagrama muestra las relaciones filogenéticas entre los organismos y permite ver los cambios evolutivos entre éstos, porque las ramas son proporcionales al número de cambios. La longitud de las ramas en el filograma (Figura 16) indica que el gen *ND4* es variable entre las localidades de *Ficimia hardyi*, encontrando que los organismos del estado de Hidalgo tienen más sitios de cambio en comparación con los de San Luis Potosí. Con lo que respecta a los grupos externos, *Gyalopion canum* presenta la rama más corta lo que indica que tiene menos sitios de cambio en comparación con *Sympholis lippiens* y *Ficimia hardyi*.

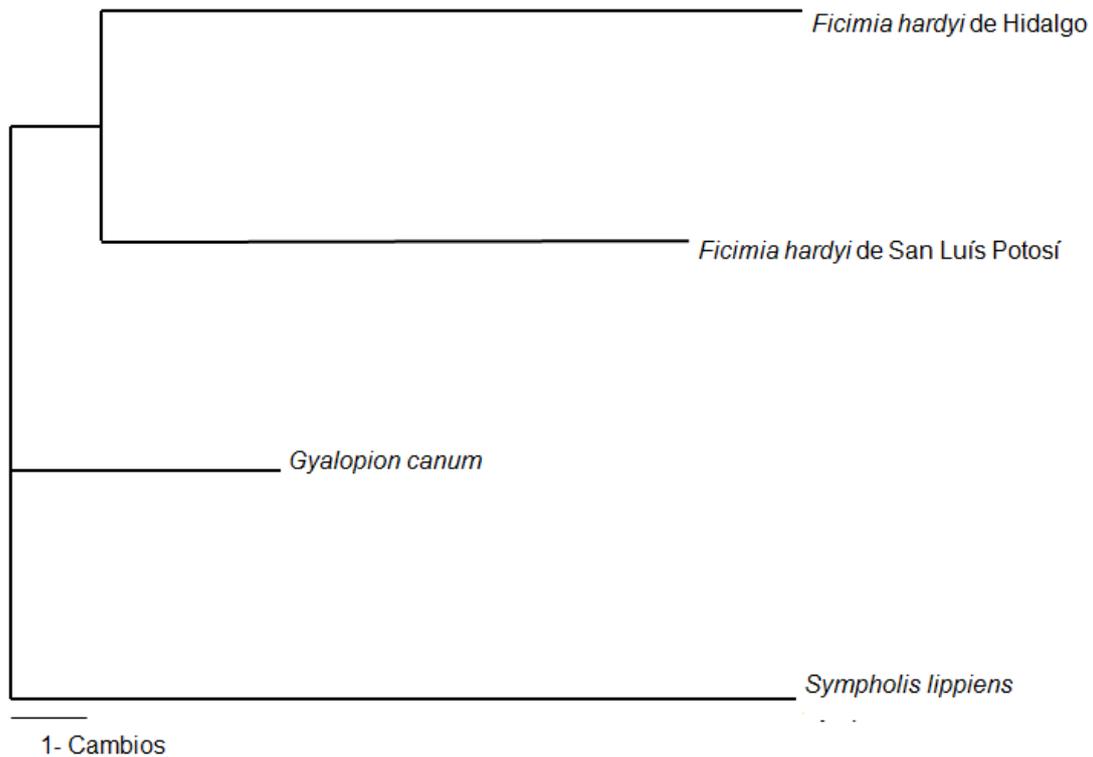


Figura 16. Filograma del gen *ND4* (650 pb, 60 caracteres informativos L= 264 pasos, IC.=.9242, ICexc=.7500, IR.=.6667). El largo de las ramas es proporcional al número de cambios de los nucleótidos.

En el cuadro 7 se resumen los patrones de variación para los conjuntos de datos analizados, tanto morfológicos como moleculares. La morfología consiste en los datos con un número limitado de caracteres, en el presente trabajo solo se analizaron 25, de los cuales solo en 13 se encontraron diferencias, que al ser evaluados con el estadístico t de student para conocer su nivel de significancia, solo en 3 caracteres (número de escamas caudales, número de escamas dorsales y escamas geniales) se encontraron diferencias significativas, por lo cual son considerados caracteres informativos debido a que permiten ver claras diferencias entre los organismos de las tres localidades. Debido a que son pocos los caracteres morfológicos informativos y con base en la variación que se observa en muchos caracteres, se considera que existe un alto número de polimorfismos, es decir, la presencia de más de un estado para un carácter.

Por esta misma razón el análisis filogenético no incluye a los caracteres morfológicos, debido a que resulta problemático codificar los caracteres polimórficos debido a la falta de algoritmos computacionales, y por la poca cantidad de organismos analizado, no es viable realizar este tipo de análisis.

Cuadro 7. Variación de caracteres. CC= Conjunto de caracteres, #C= Número de caracteres, SV= Sitios variables, SI= Sitios informativos, A= Porcentajes de A, C= Porcentajes de C, G= Porcentajes de G y T= Porcentajes de T.

CC	#C	SV	SI	A	C	G	T
Morfología	25	13	3				
ND4	650	165	60	34	.26.5	11.5	26.5

Los datos moleculares tuvieron mayor cantidad de sitios informativos un total de 60 que son cerca del 10% del total de caracteres moleculares analizados.

Al analizar las diferencias entre pares de bases se observa que la mayor variación entre *F. hardyi* de Hidalgo y *F. hardyi* San Luis Potosí se localiza en las bases nitrogenadas idénticas AA, CC, GG y TT incluso las diferencias son mayores a las encontradas en la comparación de *F. hardyi* con *Gyalopion canum* o *Sympholis lippiens* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Diferencias entre pares de base. ti= transiciones, tv=transversiones. Los números en negritas muestra los caracteres donde existió más diferencia.

TAXONES	ti			tv			idénticas			
	AG	CT	CA	AT	CG	GT	AA	CC	GG	TT
<i>F. hardyi</i> Hidalgo vs <i>F. hardyi</i> San Luis Potosí	5	16	3	3	1	1	237	177	85	176
<i>F. hardyi</i> Hidalgo vs <i>Gyalopion canum</i>	5	13	10	7	3	6	236	171	73	167
<i>F. hardyi</i> Hidalgo vs <i>Sympholis lippiens</i>	9	32	22	10	8	8	216	135	65	162
<i>F. hardyi</i> San Luis Potosí vs <i>Gyalopion canum</i>	6	18	14	9	4	5	229	174	74	161
<i>F. hardyi</i> San Luis Potosí vs <i>Sympholis lippiens</i>	9	36	24	13	7	8	213	143	65	155

La matriz de distancias “p”, indica la proporción de sitios de nucleótidos donde las cuatro secuencias comparadas son diferentes. El valor obtenido entre las secuencias de las localidades de *Ficimia hardyi* es de 0.10000 (Cuadro 9), siendo éste el valor más bajo de las cuatro secuencias analizadas, lo que significa que en comparación los grupos externos existen pocos nucleótidos que cambian entre las localidades de *F. hardyi*, y la mayor diferencia se presentó entre *Ficimia hardyi* de San Luis Potosí y *Sympholis lippiens* con un valor de 0.23086.

Cuadro 9. Matriz de distancia “p”. En negritas se resalta el valor de “p” para los pares de especies comparados, en donde el valor es el más pequeño.

	1	2	3	4
<i>F. hardyi</i> Hidalgo	_____			
<i>F. hardyi</i> San Luis Potosí	.10000	_____		
<i>Gyalopion canum</i>	.13733	.14933	_____	
<i>Sympholis lippiens</i>	.22819	.23086	.18418	_____

DISCUSIÓN

Variación de los caracteres morfológicos en las localidades de *Ficimia hardyi*.

Actualmente existen pruebas estadísticas que buscan resolver el problema de delimitar dos o más poblaciones que aparentemente pertenecen a la misma especie, ya sea utilizando caracteres morfológicos o caracteres moleculares (Wiens y Servedio, 2000; Sites y Marshall, 2003), para llevar a cabo dichos análisis el tamaño de la muestra juega un papel muy importante, ya que es claro que entre más individuos de una población se analicen más información se tendrá sobre el fenotipo y genotipo de las poblaciones (Sites y Marshall, 2003). Aunque por las características de algunos grupos biológicos es complicado tener una muestra suficientemente grande, debido a lo difícil que es su captura o al estado vulnerable que guardan sus poblaciones (Navarro y Llorente, 1991).

Ficimia hardyi es una especie constituida por individuos de tallas pequeñas de no más de 30 cm, de hábitos excavadores, por lo cual pasan la mayor parte del tiempo bajo rocas o enterrados, y ya que se alimentan de arañas o ciempiés no requieren salir a la superficie con mucha frecuencia (Conant y Collins, 1991b; Behler, 1991; Ramírez-Bautista, 1999), aunado a lo anterior, es considerada una especie escasa en las áreas donde se distribuye (Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista, 1999), y hasta la fecha no se ha realizado ningún trabajo que intente recolectar la mayor cantidad posible de organismos para conocer la situación en la que se encuentran sus poblaciones. Por ello cada uno de los organismos se considero como un representante de una localidad y no como una población. Esto no permite realizar las pruebas estadísticas sugeridas por algunos autores, ya que los resultados obtenidos serían muy

sesgados y poco reales. Por lo cual el análisis de los caracteres morfológicos realizado en las áreas de *Ficimia hardyi* en este trabajo, se robusteció con la utilización de un análisis estadístico más sencillo como la t de student, el cual permite determinar si las diferencias entre dos grupos comparados son significativas (Lewis, 1992).

Al realizar la revisión morfológica de los ejemplares se encontró que el holotipo MZCF 4877 y el paratipo MZCF 4876 de las localidades del estado de Hidalgo, que se encuentran en el Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera”, se encuentran muy dañados de la parte de la cabeza, debido a que murieron atropellados, por lo cual se puede prestar a confusiones a la hora de tomar mediciones o las características de las escamas de la cabeza. En este trabajo se consideró esta variación y, como se puede observar en el Anexo II, se marcan con un asterisco los caracteres que no se aprecian con claridad.

Se encontró una variación de más del 50% en los 25 caracteres morfológicos analizados, si bien estos resultados no son concluyentes por el tamaño de la muestra, si permiten ver la gran variación que existe entre los organismos de las tres localidades, esto también se refleja en el alto número de polimorfismos presentes (la presencia de más de un estado para un carácter), ya que solo tres caracteres fueron informativos: número de escamas ventrales, número de manchas caudales y número de escamas geniales, en los cuales las variaciones resultaron ser significativas con base en el estadístico utilizado. El tamaño de la muestra de las tres localidades no permite dar una explicación clara a estas variaciones. Se ha sugerido que *Ficimia hardyi* es una especie con mucha plasticidad genética (Ramírez-Bautista, 1999), o se puede sugerir también que las localidades estén en un proceso de especiación, debido a que las

características geográficas donde se encuentran distribuidas podrían favorecer a la separación de la especie debido a que las localidades se encuentran dentro de la Zona de Transición que es una área con una mezcla de elementos bióticos que permite la especiación de muchos grupos biológico.

Este trabajo se basa en el concepto de especie “filogenético” (Cracraft, 1992; Nixon y Wheeler, 1990;) y aunado a la propuesta de Davis y Nixon (1992) quienes sugieren que para cualquier conjunto de datos, dos poblaciones que no se distinguen entre sí se asignarán a la misma especie, aún si dos poblaciones son diferentes pero si estas diferencias se observan debido a polimorfismos serán consideradas de la misma especie, bajo estos argumentos y el número de polimorfismos presentes en este análisis, se determina que pese a la variación encontrada entre en los organismos de las tres localidades, las tres pertenecen a misma especie *Ficimia hardyi*, con lo cual este trabajo apoya los resultados obtenidos por Ramírez-Bautista *et al.*,(1999). Sin embargo, este trabajo considera más caracteres morfológicos de los ya analizados en trabajos previos y estos son respaldados con un análisis estadístico, además de que no sólo se tomó como base la descripción de Mendoza-Quijano y Smith (1993), sino que se revisaron los ejemplares de las tres localidades.

Al cotejar la evidencia geológica de la Sierra Madre Oriental y el registro fósil del género *Ficimia*, se sugiere que la Sierra Madre Oriental no es considerada una barrera física para las especies del género, sino que muy probablemente la Sierra y el género evolucionaron a la par (Holman, 1981; Ortega-Gutiérrez *et al.*, 1990). Durante la mayor divergencia de la familia Colubridae ocurrida en el Pleistoceno (Holman, 1981; Goyenechea y Castillo, 2002) la Sierra ya estaba casi formada lo cual pudo haber

favorecido la divergencia de las especies del género *Ficimia* que se distribuyen en los alrededores y sobre la Sierra Madre Oriental las cuales son: *F. publia*, *F. streckeri*, *F. olivacea* y *F. hardyi* lo que sugiere que esta zona es muy importante para el estudio no solo de *F. hardyi*, sino para todo el género ya que cuatro de sus siete especies están representadas en esta zona (Hardy, 1990; Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista *et al.*, 1999). Al realizar una comparación de caracteres morfológicos entre estas cuatro especies se ha encontrado una estrecha relación entre *F. hardyi* y *F. publia* (Mendoza-Quijano y Smith, 1993; Ramírez-Bautista *et al.*, 1999).

El resolver si las variaciones morfológicas de los organismos de *Ficimia hardyi* se deben a plasticidad genética, es decir que una especie esté adaptada a distintas condiciones sin dejar de ser la misma especie, o a un proceso de especiación, requieren de un análisis más profundo, que se tenga la mayor cantidad de individuos posible y se conozca la real distribución de la especie, ya que no sería raro encontrar que su distribución es más amplia de lo que se piensa ya que el género *Ficimia* tiene una amplia distribución en el centro y sur de la República Mexicana (Hardy, 1969; 1990). Por tal motivo este trabajo deja clara la necesidad de realizar más trabajos de campo para confirmar y completar la situación geográfica y filogenética de *Ficimia hardyi*.

Importancia de los tejidos fijados en los análisis moleculares

La mayoría de los autores que incorporan caracteres moleculares a un estudio filogenético, prefirieron la utilización de tejidos frescos o congelados, ya que con esto se evitan dos problemas principalmente: 1. encontrar el material genético parcialmente

degradado y 2. encontrar la muestra contaminada con DNA bacterial (Navarro y Llorente, 1991). Además de que los protocolos para extraer DNA de muestras fijadas suelen ser muy laboriosos, ya que se necesita de la preparación de reactivos previos a la extracción, por mencionar un ejemplo, algunos protocolos requieren fenol equilibrado (Hillis *et al.*,1996) y para esto se necesita un procedimiento más, como se puede observar en el Anexo VII, esto conlleva a que se requiera de muchos reactivos o que se necesite de instrumentos de laboratorio muy específicos, tal es el caso del protocolo de Shiozawa *et al.*, (1992) en el cual las muestras se colocan en un tubo de centrífuga de 15 ml y son centrifugados a 10 000 rpm por 10 minutos, para este trabajo se modificó el protocolo ya que en el laboratorio no se cuenta con una centrífuga de este tamaño y dicha modificación afectó de manera considerable el resultado de este protocolo.

El protocolo de Eckerman y Walsh (1997) es considerado como la base de este análisis ya que permitió obtener mejores resultados, este protocolo ya se había probado en tejidos de reptiles, sin embargo, los autores menciona que su protocolo no siempre permitía obtener secuencias. Las modificaciones principales que se realizaron a este protocolo y que permitieron obtener material genético del tejido de *Ficimia hardyi* de San Luis Potosí, son básicamente enjuagar en repetidas ocasiones el tejido antes de iniciar el protocolo, esto permite que se elimine una gran cantidad de alcohol y formol e incrementar la cantidad de proteinasa K y Chelex 100° ya que el problema con la mayoría de los protocolos es que el tejido no se degradaba completamente impidiendo la obtención DNA.

El éxito que se tenga al utilizar tejidos en trabajos moleculares depende mucho de la manera en que son preservados, la mayoría de los herpetólogos que realizan

colectas en campo, fijan y preservan a los organismos siguiendo los protocolos de Pisani y Villa (1974) y de Casas-Andreu *et al.*, (1991) o modificaciones de estos (Navarro y Llorente, 1994) pero poco se habla de la preservación de tejidos de los cuales se pueda obtener DNA (sangre, músculo, medula ósea o hígado) a menos que la colecta del organismos tenga como objetivo realizar una análisis molecular, entonces los tejidos son congelados con nitrógeno líquido o en su caso si no se cuenta con éste el tejido se fija en alcohol absoluto, el cual no altera la muestra pero se requiere que en el menor tiempo posible sea utilizada (Chaw *et al.*, 1980; Hillis *et al.*,1996 ; Mendoza-Quijano, 1997) .

Mientras no se dé una solución a la extinción y fragmentación de muchas de las especies que se encuentran en su hábitat natural, es necesario planear alternativas, que permitan en un futuro resolver problemas taxonómicos de muchas de las especies, utilizando métodos moleculares, sin necesidad de capturar nuevos ejemplares y contribuir así a la fragmentación de las poblaciones (Llorente y Michán, 2000). La creación de colecciones accesorias en donde se preservan tejidos frescos o fijados es una alternativa viable, ya que se contaría con tejido para trabajos posteriores sin la necesidad de volver a capturar nuevos ejemplares, además de que si el material se congela a una temperatura -80°C los tejidos pueden perdurar por años sin alterar su estructura molecular y sin la necesidad de ser fijados, lo cual evitaría complicaciones (Chaw *et al.*, 1980; Navarro y Llorente, 1994; Hillis *et al.*,1996). Sin embargo, Goyenechea y Castillo (2004), plantean la problemática que existe en la infraestructura de las colecciones biológicas o al menos de las que forman parte de la REDMESO integrada por 9 universidades del Centro-Sur de la República Mexicana y siete países

centroamericanos. Tales colecciones están integradas solo por herbarios y colecciones zoológicas y en la mayoría de éstas existen deficiencias en su infraestructura y en las cuestiones académicas, lo cual plantea un panorama difícil para la creación de colecciones de tejidos ya que éstas requieren de una mayor inversión y mantenimiento.

Se tendrá que realizar un balance para determinar que es más costoso, seguir realizando recolectas sin poner cuidado en la preservación de tejidos y a la larga contribuir a la fragmentación de las poblaciones biológicas o plantear proyectos que permitan la creación de colecciones accesorias las cuales permitirían realizar trabajos moleculares sin depender de la captura de nuevos organismos o de la realización de técnicas costosas.

El presente trabajo ofrece una técnica la cual permite extraer alrededor de 650pb de DNAm obtenido de hígado de serpiente, fijado en formol y almacenados en alcohol al 70%. El tiempo que permanezcan los tejidos fijados, es un punto importante, ya que entre más tiempo, más degradado se encontrará el tejido (Chaw *et al.*, 1980). El tejido utilizado como representante del estado de San Luis Potosí tenía de 6 años de estar fijado, por lo cual se puede decir que ésta técnica funciona por lo menos para tejidos que tengan hasta 6 años fijados.

Análisis filogenético *Ficimia hardyi*

Este es el primer trabajo en el cual se consideran caracteres moleculares en un análisis de una especie del género *Ficimia*, por lo cual no se tiene ninguna secuencia que se pueda agregar para complementar este análisis, el cual se realizó con solo dos secuencias, la primera de la localidad de Zacualtipán Hidalgo y la segunda de la

localidad de Guadalcázar de San Luis Potosí. Por lo que respecta a la localidad de Pacula Hidalgo, la mala preservación del tejido evitó que los organismos de esta localidad fueran secuenciados, por lo cual se tomó la decisión de que en el estudio filogenético se analizara una secuencia por estado y no por localidad apoyados en el hecho de que los organismos de Zacualtipán y Pacula presentan una variación casi mínima en sus caracteres morfológicos. Se agregaron como grupos externos a las especies *Gyalopion canum* y *Sympholis lippiens*, que están estrechamente relacionados con *Ficimia* (Goyenechea, 2000).

Como puede verse en el cladograma mostrado en la figura 9, las dos áreas de *Ficimia hardyi* forman un grupo monofilético. Estas relaciones muestran un valor alto tanto en el análisis de Bootstrap (100%) como en el índice Bremer (14; figura 10) lo que indica que es un cladograma robusto, y ambos taxones están estrechamente relacionados. Sin embargo al obtener un filograma mostrado en la figura 10, las ramas de ambas localidades son de diferente tamaño, lo que permite ver que el área de Hidalgo tiene más cambios evolutivos, lo cual sugiere que los organismos encontrados en el estado de Hidalgo son probablemente más antiguos. Esto puede traer como consecuencia que los organismos de ambos estados están divergiendo a tasas de evolución diferentes y podrán en un futuro considerarse especies diferentes. En cuanto a la relación que guardan los grupos externos, en ambos árboles, su relación no queda resuelta con el gen *ND4* y en el filograma es notoria la diferencia de las ramas entre *Sympholis lippiens*, y *Gyalopion canum*, en el cual *Gyalopion canum* presenta menor número de cambios.

CONCLUSIONES

La especie *Ficimia hardyi* tiene relativamente poco tiempo de haberse descrito y son pocos los organismos recolectados hasta la fecha. Para este trabajo, el tamaño de la muestra fue determinante para confirmar que los organismos de las tres localidades, la primera en Zacualtipán, la segunda en Pacula ambas en el estado de Hidalgo (Mendoza-Quijano y Smith, 1993) y la tercera en Guadalcázar San Luis Potosí (Hernández-Ibarra *et al.*, 1999) pertenecen a la misma especie, por lo cual este estudio coincide con el trabajo de Ramírez-Bautista *et al.*, (1999), aunque se deja clara la existencia de una variación considerable en los caracteres morfológicos y moleculares.

Los resultados obtenidos en el análisis de caracteres morfológicos, indican un porcentaje considerable de variaciones, las cuales son consideradas polimorfismos, que debido a la poca cantidad de organismos no permiten determinar si las variaciones son suficientes para considerarlas especies distintas.

Las secuencias del gen *ND4* confirman la estrecha relación de ambas poblaciones, pese a la distancia y características geográficas que las separan. El filograma obtenido nos permite concluir que los organismos de Hidalgo tiene un mayor número de cambios evolutivos lo que indica que amabas localidades tienen distintas tasas de evolución y que probablemente se refleja en la variación que existe en los caracteres morfológicos.

Este es el primer estudio realizado a los organismos de *Ficimia hardyi* en el que se incorporan datos moleculares, sin embargo, no se hubiera podido realizar sin la estandarización de una técnica para extraer DNA de tejidos fijados. Por lo cual tomando

como base el protocolo de Eckerman y Walsh (1997), este trabajo presenta un protocolo para extraer DNAm obtenido de hígado de serpiente, fijado en formol y almacenados en alcohol al 70%, con una antigüedad de no más de 6 años.

Para determinar la razón de las variaciones presentes en los caracteres tanto moleculares como morfológicos de las localidades de *Ficimia hardyi*, es necesario incorporar más individuos y explorar los alrededores de las tres localidades. Los resultados obtenidos en este estudio concluyen que *Ficimia hardyi* se distribuye en los estados de Hidalgo y San Luis Potosí, por lo que es una especie de distribución restringida.

LITERATURA CITADA

- Arévalo, E., Scott, K. y Sites, J. W. 1994. *Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the Sceloporus grammicus complex (Phrynosomatidae) in central Mexico*. Systematic Biology, 43: 387-415.
- Avise, J. C., Lansman, R. A., y Shade, R. O. 1979. *The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations*. Genetics. 92:279-295.
- Behler, J. L., 1991. *The Audubon Society Field Guide to North American Reptiles & Amphibians*. Alfred A. Knopf, New York, 743 pp.
- Bowler, P. 1998. *Historia Fontana de las ciencias ambientales*. Fondo de la Cultura Económica. México, 463pp.
- Bremer, K. 1994. *The limits of amino acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction*. Evolution. 42:795-803.
- Campbell, R. C. 1998. *Statistics for Biologists*. 3era edición. Cambridge University Press.
- Casas-Andreu, G., Valenzuela López, G. y Ramírez-Bautista, A. 1991. *Cómo hacer una colección de anfibios y reptiles*. Cuadernos del Instituto de Biología No. 10, Universidad Nacional Autónoma de México. 68 p.

- Chase, M. R. Etter, R. J., Rex , M. A. y Quattro, J. M. 1998. *Extraction and amplification of mitochondrial DNA from formalin-fixed deep-sea mollusks*. Bio Techniques, 24: 243-247.
- Chaw, Y. F., Crane, E. L., Lange, P., y Shapiro, R. 1980. *Isolation and Identification of Cross-Links from Formaldehyde-Treated Nucleic Acid*. Bio Techniques, 19:5525-5531.
- Conant, R. y Collins, J.T. 1991a. *Reptiles and Amphibians*. Houghton Mifflin. Central North American, 447pp.
- Conant, R. y Collins, J. T. 1991 b. *A field guide to reptiles and amphibians of eastern and central North America*. Houghton Mifflin Co., Boston, MA. 229 pp.
- Contreras-Ramos, A. y Goyenechea, I. 2007. La Sistemática, base del conocimiento de la Biodiversidad. En: La Sistemática base del conocimiento de la Biodiversidad. Contreras-Ramos, A., Cuevas, C. C., Goyenechea, I. e Iturbe, U. Editores. UAEH.11-22.
- Cracraft, J. C. 1983. *Species concepts and speciation analysis*. Current Ornithology, 1: 159-187.
- Cracraft, J. C. 1992. *Species concepts and speciation analysis*. In Johnston, R.F. Eds. Current Ornithology. Vol 1. Plenum Press. New York, 159-187pp.
- Crawford, D. J. y Baver, R. J. 1981. *Allozyme divergence in Coreopsis cycloca rpa*. *Systematic Botany*. 6: 373-386.

- Cope, E. D. 1866. *Fourth contribution to the herpetology of tropical America*. Proc. Acad. Nat. Philadelphia. 18: 123-132.
- Cuevas, C. C. 2007. *En la búsqueda de los caracteres apropiados para hacer clasificaciones*. 41-45pp. En: La Sistemática base del conocimiento de la Biodiversidad. Contreras-Ramos, A., Cuevas, C. C., Goyenechea, I. e Iturbe, U. Editores. UAEH.
- Davis, J. I. y Nixon, K. C. 1992. *Populations, genetic variation and the delimitation of phylogenetic species*. Systematic. Biology.41: 421-435.
- Dowling H. G. 1975. *Systematic herpetology: A synopsis of families and higher categories*. HISS. Publication Herpetology (7): 1-118.
- Duellman, W. E. 1961. *A biogeographic account of the herpetofauna of Mexico*. Univ. Kansas Publ. Museo Natural de Historia. 15 (14):627-709.
- Eckerman, C. M. y Walsh, E. J. 1997. *Breaking the formalin barrier: Development of molecular techniques for genetic analysis of museum specimens*. Systematic. Biology. 32:324-326.
- Felsenstein, J. 1985. *Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap*. Evolution. 39: 783-791.
- Flores-Villela, O. 1993a. *Herpetofauna Mexicana*. Carnegie Museum of Natural History. Special Publication No. 17. 72pp.

- Flores-Villela, O. 1993b. *Herpetofauna of Mexico distribution and endemism. Biological diversity of Mexico; origins and distribution*. R. Bye, A. Lot and J. F. New York, Oxford University press: 253-280.
- Flores-Villela, O. 1993c. *Riqueza de los anfibios y los reptiles*. Ciencias. No Especial, 33-43pp.
- Flores-Villela, O. y Canseco-Márquez, L. 2004. *Nuevas especies y cambios taxonómicos para la Herpetofauna de México*. Acta Zoológica Mexicana, 20 (2): 115-144.
- Frost, D.R. y Hillis, D.M. 1990. *Species in concept and practice Herpetological Applications*. Herpetological, 46 (1): 87-104.
- Giannasi, D. E., Zurawski, G., Learn, G. y Clegg, M. 1992. *Evolutionary relationships of the Caryophyllidae base don comparative rbcL sequences*. Systematic Botany. 17: 1-15.
- González, D. 1997. *El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos*. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 60: 137-157.
- Goyenechea, I. 2000. *Filogenia del género Conopsis Günther 1858 (Serpentes: Colubridae) con un análisis Cladista del grupo de pequeñas culebras Norteamericanas*. Tesis de Doctorado, UNAM. 179pp.
- Goyenechea, I y Castillo, J. 2002. *Historia Geológica de las Serpientes*. Boletín de la Sociedad Herpetológica de México. 10 (2): 35-42.

- Goyenechea, I. y Castillo, J. 2004. *Diagnóstico de las Colecciones Biológicas de la Red Mesoamericana de Recursos Bióticos*. UAEH. 78pp.
- Goyenechea, I. y Contreras-Ramos, A. 2007. Controversias en *Sistemática Filogenética*. 47-54pp: En: La Sistemática base del conocimiento de la Biodiversidad. Contreras-Ramos, A., Cuevas, C. C., Goyenechea, I. e Iturbe, U. Editores. UAEH.
- Gray, J. E. 1849. *Catalogue of the specimens of snake in the collection of the British Museum*. Londo. 125pp.
- Günther, G. 1858. *Catalogue of colubrine snake in the collection of the British Museum*. Londo. 281pp.
- Hall, T. 1999. *BioEdit: a user-friendly biological sequence editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Halffter, G. 2003. *Biogeografía de la entomofauna de montaña de México y América Central*. In Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía, J. J. Morrone y J. Llorente-Bousquets (eds.). Las Prensas de Ciencias, UNAM, México, p. 87-97.
- Hardy, L. M. 1969. *Systematic revision of the genera Pseudoficimia, Gyalopion and Ficimia (Serpentes: Colubridae)*. The University of New Mexico Albuquerque, New México.
- Hardy, L. M. 1975. *A Systematic Revision of the Colubrid Snake Genus Ficimia*. Journal of Herpetology. 9: 133-168

- Hardy, L. M. 1976. *Ficimia streckeri* Taylor Mexican Hook-nosed snake. Catalogue of amphibians and reptiles.
- Hardy, L. M. 1978. *Ficimia olivacea* Gray Brow hook-nosed snake. Catalogue of amphibians and reptiles.
- Hardy, L. M. 1980. *Ficimia publia* Cope Blotched hooknose snake. Catalogue of amphibians and reptiles.
- Hardy L. M. 1990. *Ficimia Gray. Southern Hook-nook-nosed Snake*. Catalogue of American Amphibians and Reptiles. 471.1-471.5 pp.
- Hernández, H. M., y Bárcenas, R. T. 1995. *Endangered cactaci in the Chihuahuan Desert*. Distribution Patterns. Conservation Biology, 5:1176-1188.
- Hernández-Ibarra, X., Ramírez-Bautista, A., Torres-Cervantes, R., y Hernández-Macías, H. 1999. *Geographical distribution: Ficimia hardyi*. Herp. Rev. 235pp.
- Hillis, D. M., Moritz, C. y Mable, B. K. 1996. *Molecular Systematics*, Sinauer. 655 pp.
- Holman, J. A. 1981. *A review of North American Pleistocene Snake*. Publications of the Museum of Michigan State University Paleontological Series. 1:261-306.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1992. *Síntesis Geográfica del estado de San Luis Potosí*. Aguascalientes, México.

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1998. *Cuaderno estadístico municipal Zacualtipán, estado de Hidalgo* (edición 1997). Aguascalientes, México. 145
- Iturbe, U. y Lazcano, A. 2007. El método de clasificación y los caracteres de comparación universal. En: *La Sistemática base del conocimiento de la Biodiversidad*. Contreras-Ramos, A., Cuevas, C. C., Goyenechea, I. e Iturbe, U. Editores. UAEH. 23-40.
- Klug, W. S. y Cummings, M. R. 1998. *Conceptos de Genética*. 5° Ed. Prentice Hall. Madrid, 614 pp.
- Kluge, G. A. 1990. *Species as Historical Individuals*. *Biology and Philosophy*, 5:417-43.
- Kraus, F. y Brown, W. M. 1998. *Phylogenetic relationships of colubroid snake based on mitochondrial DNA sequences*. *Zoolgy. J. Linne. Soc.* 122:455-487.
- Lewis, A. E. 1992. *Bioestadística*. Continental. México, 270pp
- Llorente, B.J. 1989. *Algunas ideas de la Teoría Sistemática contemporánea: conceptos en el Cladismo*. *Ciencias. No Especial*, 26-39 pp.
- Llorente, B. J. y Michán, A, L. 2000. *El Concepto de especie y sus Implicaciones para el desarrollo de inventarios y estimaciones en Biodiversidad*. Hacia un Proyecto CYTED para el Inventario y Estimación de la Diversidad Entomológica en Iberoamérica. PriBES-2000. 87-90pp.

- Martínez, M. 1997. *Sistemática Molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones*. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 60: 123-136.
- Mayr, E. 1969. *Principles of Systematic Zoology*. McGraw-Hill, USA. 390pp.
- Medrano, J. F., Aasen, E. y Sharrow, L. 1990. *DNA Extraction from nucleated red blood cells*. Biotechniques. 8:43.
- Mendoza-Quijano, F. y Smith, H. M. 1993. *A new species of Hooknose Snake, Ficimia. (Reptilia, Serpentes)*. Journal of Herpetology. 27 (4): 406-410.
- Mendoza-Quijano, F. 1997. *Límites de especies dentro del género Gerrhonotus (Sauria: Anguidae)*. Proyectos CONABIO. UNAM. 1-18pp.
- Mittermeier, R. A. 1988. *Primate diversity and the tropical forest: Case studies from Brazil and Madagascar and importance of the megadiversity countries. Biodiversity*, National Academy Press, Washington D.C. Pp. 145-154.
- Morrone, J. J. 2000. *El lenguaje de la cladística*. Dirección general de publicaciones y fomento Editorial UNAM. 109pp.
- Morrone, J. J. 2004. *Panbiogeografía componentes bióticos y zonas de transición*. Coleopterists Bulletin, 48: 149-162.
- Morrone, J. J. 2005. *Hacia una síntesis biogeográfica de México*. Revista Mexicana de Biodiversidad. 76 (2):207-252.

- Navarro, A. G. y Llorente, J. 1991. *Museos, colecciones biológicas y la conservación de la biodiversidad: una perspectiva para México*. Memorias del Seminario sobre Conservación de la Diversidad Biológica de México, 3. 1-31pp.
- Navarro, A. & J. Llorente. 1994. *Museos y la conservación de la biodiversidad*. En:Taxonomía Biológica. Llorente, J. e I. Luna. UNAM-Fondo de Cultura Económica, 229-258 pp.
- Nixon, K. C. y Wheeler, 1990. *An amplification of the phylogenetic species concept*. Cladistics. 6:211-223.
- Ochoa, O.L.M. y Flores-Villela, O. 2006. *Áreas de diversidad y Endemismo de la Herpetofauna Mexicana*. CONABIO. UNAM. 212pp.
- Ortega-Gutiérrez, T. L., Sedlock, A. y Speed R.C. 2000. *Evolución de la Tectónica de México durante el Fanerozoico* 3-59pp: En Llorente J., González E. y Papayero N., (eds). Biodiversidad, taxonómica y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento. Vol. II. Las prensas de la Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Pisani, G. R. y Villa, J. 1974. *Guía de Técnicas de preservación de anfibios y reptiles*. SSAR. Misc. Publs. 2:24 p.
- Ramírez-Bautista, A. 1999. *Herpetofauna de la región "el Huizache", San Luís Potosí*. Proyecto CONABIO. UNAM.150PP.
- Ramírez-Bautista, A., Hernández-Ibarra, X., Torres-Cervantes, R. y Smith, H. M. 1999. *External Morphological Variation in Hardy's Hooknose Snake *Ficimia hardyi**

(*Squamata: Colubridae*). Bulletin of the Maryland Herpetological Society. 35 (3): 81-84.

Ramírez-Bautista, A. y Moreno, E. 2006. *Análisis comparativo de la Herpetofauna de cuatro regiones geográficas de México*. 74-86pp: En Ramírez-Bautista A., Canseco-Márquez M. y Mendoza-Quijano F. (eds). Inventario herpetofaunístico de México: Avances en el conocimiento de su Biodiversidad. Publicaciones de la Sociedad Herpetologica Mexicana. N.3.

Rzedowski, G.C y Rzedowski, J. 2001. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2a. ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el uso y Conocimiento de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. México. 1406 pp.

SAS Institute Inc. 1992-1998. StatView for windows. Versión 5.0.1

Scragg, A. 2000. *Biotecnología para ingenieros, Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. Limusa. México. Pp 410.

Scout-Ram, N. R. 1990. *Transformed Cladistics, Taxonomy and evolution*. New York. Cambridge University Press. 238pp.

Shiozawa, D. K., Kudo, J., Evans, R. P., Woodward, S. R. y Williams, R. N. 1992. *DNA Extraction from preserved trout tissues*. Great Basin Naturalist 52(1): 29-34.

Sites, J. W., y Marshall, J.C. 2003. *Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology*. Review Trends in Ecology and Evolution 18 (9): 462-470.

- Sour, A., y Montellano, J. 1994. *La especie: realidad y concepto*, pp. 27-225 En: Llorente B. J. y V. I. Luna (compiladores). *Taxonomía biológica*. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM-Fondo de Cultura Económica. México. 626 pp.
- Smith, H. M., y Langebartel, D. A. 1949. *Notes on a collection of reptiles and amphibians from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca*. Journal of the Washington Academy of Sciences. 39 (12) 409-416.
- Smith, H. M., y Taylor E. H. 1941. *A review of the snakes of the genus Ficimia*. J. Washington Acad. Society. 31 (8):356-368.
- Swofford, D. 2003. PAUP*. *Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland
- Taylor, E. H. 1931. *Notes on two specimens of the rare snake Ficimia cana and the description of new species from Texas*. Copeia (1): 4-7.
- Videira, A. 1998. *Complex I from the fungus Neurospora crassa*. Biochimica et Biophysica. Acta 1364: 89-100.
- Wiens, J. J., y Servedio M. R. 2000. *Species delimitation in systematic inferring diagnostic differences between species*. The Royal Society Lond. 267, 631-636.
- Wilde, S. A., y Voigt, G. K. 1977. *Munsell color charts for plant tissues*. Britain Road New Windsor, New York, 72pp.

ANEXO I. Caracteres diagnósticos de *Ficimia hardyi*

Holotipo: MZFC 4877

Localidad: Sierra Norte de Zacualtipán

Ausencia de escamas Internasales

Número de posoculares: 2

Escamas geniales: 2 pares de escamas

Número de escamas ventrales: de 130 a 136 machos y hembras 140

Número de escamas caudales: de 44 a 46 machos y hembras 40

Número de manchas dorsales: de 43 a 47 en machos y hembras 43

Número de manchas caudales: de 17 a 22 machos y hembra 18

Tamaño de las manchas: dos escamas.



Figura 17. Organismo XR 867 *F. hardyi* de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí



Figura 18. Organismo ORF 114 *Ficimia hardyi* con muda del estado de San Luis Potosí.



Figura 19. Organismo XR 767 cría de *F. hardyi* de la localidad de Guadalcázar San Luis Potosí



Figura 20. Los cinco organismos de la especie *Ficimia hardyi* de la localidad Guadalcázar del estado de San Luis Potosí.

Anexo II. Caracteres morfológicos analizados para las dos poblaciones de *Ficimia hardyi*.

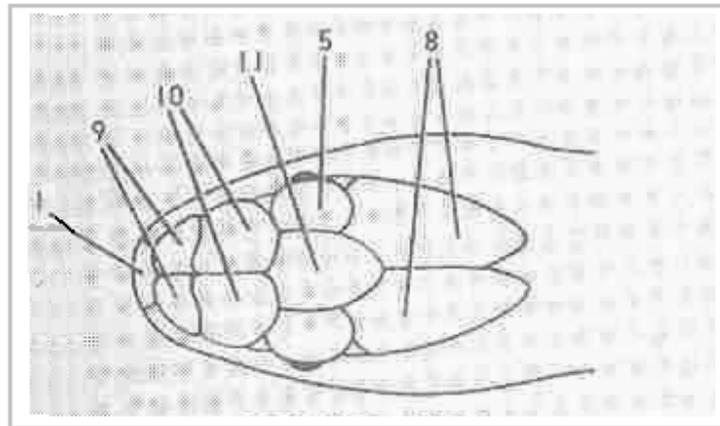
Nota: Los organismos MZCF4877 y MZCF4876 de la población del Estado de Hidalgo, se encuentra en malas condiciones, por lo cual fue difícil tomar algunos caracteres y se les colocó un *. En los caracteres coloración dorsal y coloración de manchas se anotó la clave del color basado en la guía de colores vegetales Munsell (Wilde y Voigt, 1977).

<i>Ficimia hardyi</i> del Estado de Hidalgo				<i>Ficimia hardyi</i> del Estado de San Luis Potosí					
Caracteres morfológicos	Zacualtipán		Pacula		Guadalcázar				
	MZCF4877 Holotipo Macho	MZCF4876 Paratipo Macho	MZCF4878 Paratipo Hembra	MZCF5328 Paratipo Macho	XR 775 Hembra	XR 767 Macho	XR 559 Hembra	ORF 114 Macho "cría"	XR 867 Macho "juvenil"
Frontal en contacto con:	Escama Rostral	Escama Rostral	Escama Rostral	Escama Rostral	Escama Rostral	Escama Rostral	Escama Rostral	Escama Rostral	Escama Rostral
Número de Supralabiales	7-7*	7-7*	7-7	7-7	7-7	7-7	7-7	7-7	7-7
Número de infralabiales	7-7*	7-7*	7-7	7-7	7-7	7-7	7-7	7-7	7-7
Número de preoculares	1*	1*	1	1	1	1	1	1	1
Número de posoculares	2*	2*	2	2	2	2	2	2	2
Número de supraoculares	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Formula temporal	1+2	1+2	1+2	1+2	1+2	1+2	1+2	1+2	1+2
Escamas geniales	2 Pares	*	2 Pares	2 Pares	2 Pares c/ 2 escamas intermedias	2 Pares c/ 1 escama intermedia	2 Pares c/ 1 escama intermedia	2 Pares c/ 1 escama intermedia	2 Pares c/ 1 escama intermedia
Internasales	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes

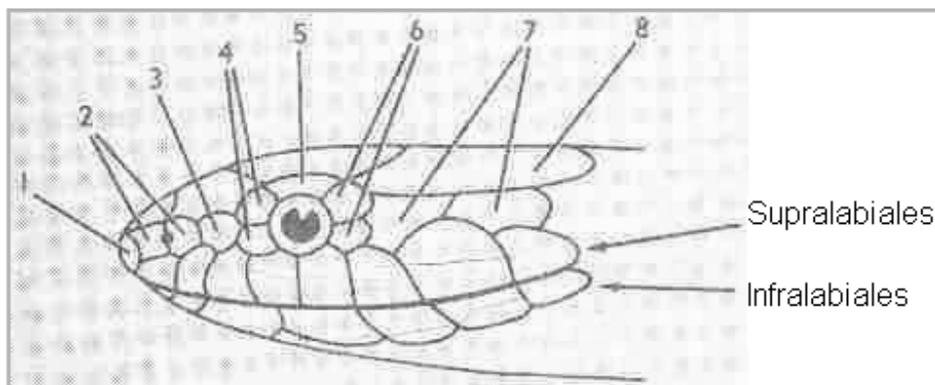
Loreal	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Número de escamas ventrales	133	130	140	136	135	126	139	129	136
Número de escamas caudales	44	45	40	46	33	37	33	38	36
Escamas por hileras en el cuerpo	17-17-17	17-17-17	17-17-17	17-17-15	17-17-17	17-17-17	17-17-16	17-17-17	17-17-17
Escama anal dividida	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Coloración dorsal	Pardo claro (clave: 7.5 YR 5/2)	Grisáceo (clave: 5 YV5/ 2)	Pardo claro (clave:7. 5 YV 5/2)	Pardo oscuro (clave: 5 YV4/ 2)	Pardo oscuro (clave: 5 YV 4/ 2)	Pardo oscuro (clave: 5 YV 4/ 2)	Pardo claro (clave:7. 5 YV 5/2)	Pardo claro (clave:7. 5 YV5/2)	Grisáceo (clave: 5 YV 5/2)
Coloración ventral	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Tamaño de manchas dorsales	De 2 escamas	De 2 escamas	De 2 escamas	De 2 escamas	De 2 a 3 escamas	De 2 escamas	De 2 escamas	De 2 a 3 escamas	De 2 escamas
Coloración manchas dorsales	Pardo (Clave: 5 YR4)	Negro	Pardo (Clave: 5 YR4)	Negro	Pardo (Clave: 5 YR4)	Pardo (Clave: 5 YR4)	Pardo claro (Clave: 5 YV2)	Pardo (Clave: 5 YR4)	Pardo (Clave: 5 YR4)
Presencia de manchas ventrales	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
Numero de manchas dorsales	44	43	43	47	49	45	51	50	50

Numero de manchas caudales	17	22	18	21	15	18	16	18	16
Longitud total	358mm	*	230mm	300mm	246.2mm	273mm	319.4mm	121.2mm	164.4mm
Longitud hocico-cloaca	282mm	*	190mm	238mm	207.7mm	234.0mm	276mm	100.8mm	137mm
Longitud cola	76mm	*	40mm	62mm	38.5mm	39mm	43.4mm	20.4mm	27.4mm
Diámetro	40mm	*	25mm	35mm	25mm	30mm	35mm	20mm	20mm

Anexo III. Diagramas donde se describe la posición de cada una de las escamas en las serpientes.



A)



B)

Figura 21. Descripción de las escamas de la cabeza presentes en las serpientes. A) Vista anterior y B) Vista lateral. Cada escama está indicada por un número: 1. rostral, 2. nasales, 3. loreal, 4. preoculares, 5. supraoculares, 6. posoculares, 7. temporales, 8. parietales, 9. internasales, 10. prefrontales, y 11. frontal (Tomado y modificado de de: Conant y Collins, 1991a).

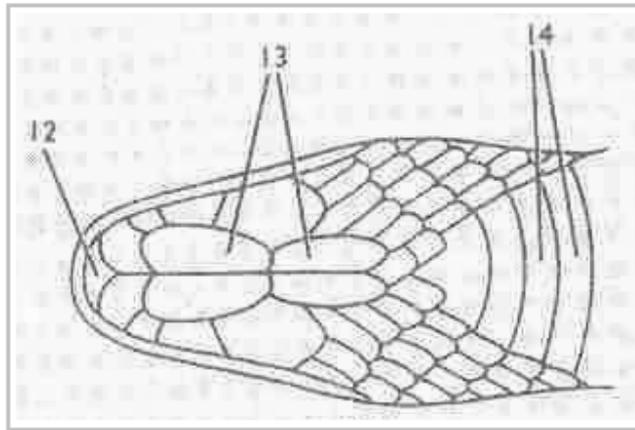


Figura 22. Descripción de las escamas de la cabeza presentes en las serpientes, vista posterior. Cada escama está indicada por un número: 12. mental, 13. escamas geniales y 14. ventrales (Tomado y modificado de de: Conant y Collins, 1991a).

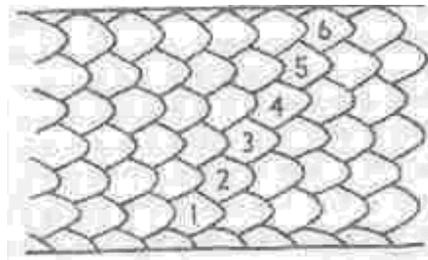


Figura 23. Conteo de Hileras de Escamas en el Cuerpo de la serpiente (Tomado y modificado de: Conant y Collins, 1991a).

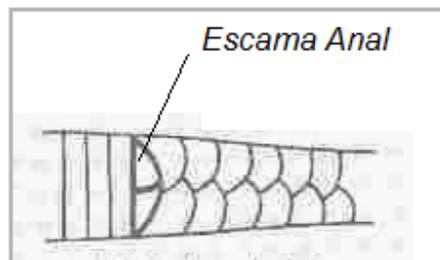


Figura 24. Escama anal (Tomado modificado de: Conant y Collins, 1991a).

Anexo IV. Protocolo de extracción para tejido congelado Medrano *et al.* (1990).

REACTIVOS:

1. Buffer lisis (50mM Tris HCl, 20 mM EDTA pH 8, 1% SDS sulfato de dodecil sodio, 200mM NaCl, 1 % b mercapto etanol.)
2. Proteinasa K (10 mg/μl en agua)
3. RNAasa A (10mg/μl)
4. Cloruro de sodio 5 M
5. Etanol absoluto frío
6. Etanol al 70 %
7. Buffer 1 X TE pH 8

PROCEDIMIENTO

Se colocan aproximadamente 20 mg de tejido en un tubo Eppendorf y se lava varias veces con un 1ml de agua fría, tirando el líquido cada vez. Se agregan 550 μl de buffer lisis, hasta que la mezcla se vea clara, inmediatamente se agrega 11 μl de proteinasa K, el tejido se macera con ayuda de la punta de una micropipeta. Se mezcla en el vortex y se incuba a una temperatura de 55 °C hasta que el tejido se degrada.

Una hora antes de que se termine de incubar, se agrega 5.5 μl de RNAasa. Si existe tejido sin degradar se puede centrifugar durante 10 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante (aprox. 550 μl) se trasfiere a un nuevo tubo.

Después de centrifugar, se agrega 350 μ l de cloruro de sodio 5 M y se centrifuga 30 minutos. Luego se transfieren 450 μ l del sobrenadante a un nuevo tubo y se le agrega 900 μ l de etanol absoluto frío. Se invierte la muestra varias veces hasta que se observan "hilos" del DNA en la solución. Para que la precipitación sea completa las muestras se incuban a -20° C durante dos horas o toda la noche. Si se dejan toda la noche la temperatura adecuada es de 4° C.

Se centrifugan las muestras durante 30 minutos para hacer una pastilla de DNA, por lo tanto se tira el sobrenadante lo más posible. Se lava la pastilla con 1 μ l de etanol al 70 % y se centrifuga a 6000 rpm durante 5 minutos. Cada vez se tira el sobrenadante hasta secar la pastilla, las muestras se cubrieron con " Kimwipes " y se incubaron a 37° C por 30 minutos o hasta que se seque. Se agrega 100 μ l de buffer 1XTE y se incuba a 50° C por 2 horas hasta que se suspenda la pastilla por medio del vortex.

Anexo V. Protocolos de extracción de DNA para tejidos fijados en formol y alcohol.

A. Protocolo de Singer-Sam (1989 en Hillis *et al.*, 1996)

REACTIVOS

A) 500 µl de Chelex 100 al 5% (5g / 100 µl de agua desionizada)

PROCEDIMIENTO

1. Cortar menos de 1 mg de tejido con bisturí previamente esterilizado,
2. Trasferir a un tubo eppendorf de 1.5 µl y adicionar 500 µl de Chelex 100 al 5%
Incubar a 56° C por 45 minutos (desintegra el tejido)
3. Vortexiar de 10 a 15 minutos
4. Incubar de nuevo el tejido a 95 - 100° C por 15 minutos
5. Almacenar a 4° C
6. Agitar antes de realizar la PCR para resuspender la pastilla.

B. Protocolo de Eckerman y Walsh (1997)

REACTIVOS

A) De 300 µl de Chelex 100 al 5% (5 g/100µl de agua desionizada)

B) 3 µl de Proteinasa K

PROCEDIMIENTO

1. Cortar menos de 1mg. de tejido con bisturí previamente esterilizado

2. Transferir el tejido aun tubo eppendorf de 1.5 μ l
3. Posteriormente se le adiciona de 300 μ l de Chelex 100 al 5%
4. Se le adiciona 3 μ l de proteinasa K para realizar una mejo lisis del tejido
5. Encubar durante toda la noche de 56 a 95° C
6. Mantener a una temperatura de -20° C
7. Centrifugar por 30 seg. y utilizar el sobrenadante en la PCR

C. Protocolo de Shiozawa *et al.*, (1992).

REACTIVOS

- A) Buffer TE9 (500mM Tris, 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 9)
- B) SDS Dodecil Sulfato de Sodio
- C) Proteinasa K (5 mg/ μ l)
- D) Fenol equilibrado
- E) Cloroformo
- F) Acetato de Sodio 3 M
- G) Etanol al 95% y al 70%
- H) 3mM Tris, 0.2mM EDTA pH 7.2
- I) RNasa 20 mg/ μ l

PROCEDIMIENTO:

1. Se remueve 2 mm de tejido del organismo con bisturí previamente esterilizado.
2. Se coloca en 20 volúmenes de TE9 durante 24 horas con dos cambios de solución
3. El tejido se coloca en un tubo de centrifuga de 15 ml con 10ml de TE9, 0.1g de SDS Y 5 mg de proteinasa K y se puso a incubar durante 24 horas a una temperatura de 55° C. (Es importante mencionar que la incubación se debe realizar en un baño María con movimiento para evitar que las muestras se suspendan).
4. De nuevo se adiciona 5 mg de proteinasa K y 0.1 mg de SDS y ahora se dejara incubar a 55° C por 50 horas para remover el tejido que aun no asido digerido.
5. Las muestras fueron trasferidas a tubos de 30 µl con un volumen igual de fenol/cloroformo (El fenol debe estar previamente equilibrado), los tubos se invierten varias veces para mezclar bien la solución, posteriormente se centrifuga a 10000rpm por 10 minutos.
6. La fase acuosa de las muestra se remueve y se coloca en un tubo limpio y el proceso se repite.
7. Al final de la extracción a la fase acuosa se le adiciona un volumen de cloroformo y se centrifuga de nuevo.
8. La fase acuosa de la muestra se trasfiere a un tubo limpio y se incorpora .1 volumen de Acetato de Sodio 3M.

9. La mezcla se precipita con alcohol al 95% que previamente ha sido congelado con por lo menos 12 horas de anticipación.
10. Cada muestra es centrifugada a 10 000 rpm por 10 minutos y el sobrenadante es eliminado.
11. En la parte inferior se ha formado una pastilla de DNA que es enjuagado con alcohol al 70% y centrifugado.
12. Se deja la muestra toda la noche para que el alcohol restante se evapore. La pastilla es resuspendida con RNasa con una concentración final de 20 mg/ml.

D. Protocolo de extracción con el Kit QIAamp DNA Mini QIAGEN

Antes de iniciar el procedimiento es necesario equilibrar la muestra a temperatura ambiente y posteriormente homogeneizar de manera mecánica la muestra

1. Se cortan 25 mg de tejido y se colocan en un tubo de 1.5 µl el cual debe contener 80 µl de PBS como máximo. Homogeneizar la muestra adicionando 100 µl de Buffer ATL
2. Adicionar 20 µl de proteinasa K, vortexear e incubar a 56 ° C hasta que el tejido este completamente lisado. Vortexear ocasionalmente durante la incubación para dispersar la muestra o colocar la muestra en un baño de agua con agitación o en una plataforma de movimiento.
3. Centrifugar brevemente el tubo de 1.5 µl con el fin de remover las gotas que se formaron en la parte superior del tubo.

4. Adicionar 200 μ l de Buffer AL a la muestra, vortexé por 15 segundos e incubar a 70° C por 10 minutos. Centrifugue brevemente. Es esencial que la muestra y el buffer AL sean mezclados perfectamente para que se produzca una solución homogénea. Un precipitado blanco se puede formar al adicionar el Buffer AL, el cual en la mayoría de los casos se disolverá al incubar a 70° C.
5. Adicionar 200 μ l de etanol 96-100% a la muestra y vortexear 15 segundos. Centrifugar brevemente. Si la muestra son mayores a 25 mg de tejido, incrementar proporcionalmente la cantidad de etanol. Es esencial que la muestra, el Buffer AL, y el etanol sean mezclados perfectamente.
6. Cuidadosamente aplique la muestra del paso 5 (incluyendo el precipitado) a la columna QIAamp y colocar esta en un tubo colector. Cierre la tapa y centrifugue a 6000x g (8000 rpm) por 1 minuto. Colocar la columna en un nuevo tubo colector nuevo y desechar el tubo que contiene el filtrador
7. Abrir la columna QIAamp cuidadosamente y adicional 500 μ l de Buffer AW1 sin mojar la orilla. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por un minuto. Colocar la columna en un tubo colector nuevo.
8. Adicionar 500 μ l de Buffer AW2 sin mojar la orilla. Centrifugar a velocidad alta (20000 x g; 14 000 rpm) por 3 minutos.
9. Colocar la columna en un tubo de 1.5 μ l Adicionar 200 ml de Buffer AE o agua destilada. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 6000 x g (8000 rpm) por un minuto.

Anexo VI. Protocolo estandarizado para muestras de tejidos fijados en formol y almacenados en alcohol al 70%. Modificación del protocolo de Eckerman y Walsh (1997).

REACTIVOS

- A) De 600 µl de Chelex 100 al 5% (5 g/100µl de agua desionizada)
- B) 6.5 µl de Proteinasa K

PROCEDIMIENTO

1. Cortar menos de 2mg. de tejido con bisturí previamente esterilizado
2. Colocar el tejido a un tubo eppendorf de 1.5 µl
3. Enjuagarlo en 10 ocasiones con agua destilada, vortexear la muestra de manera intercalada y cambiar el agua.
4. Transferir el tejido aun tubo eppendorf de 1.5 µl
5. Posteriormente se le adiciona de 600µl de Chelex 100 al 5%
6. Se le adiciona 6.5 µl de proteinasa K para realizar una mejor lisis del tejido
7. Encubar durante toda la noche a 95° C
8. Posteriormente mantener la muestra a una temperatura de -20° C
9. Centrifugar por 30 seg. y utilizar el sobrenadante en la PCR

Anexo VII. Protocolo para equilibrar fenol la extracción Fenol/Cloroformo (Hillis, *et al.*1996).

REACTIVOS

1. Buffer Tris-HCl a pH 8
2. Dilución de Buffer Tris-HCl a 0.1 M
3. Fenol liquido
4. Granos de Hidroxiquinoleína

PROCEDIMIENTO

1. Se coloca en un vaso de precipitados 100 μ l de Fenol y 100 μ l de Buffer 1M. (No importa la cantidad de fenol a preparar pero siempre debe ser la misma cantidad de Buffer). Se van a formar dos fases en esta mezcla.
2. Se agita por 2 horas con un agitador magnético y una mosca y se deja por varias horas.
3. Se agregan granos de Hidroxiquinoleína hasta que la fase que contiene el fenol toma un color amarillo paja.
4. Al formarse las dos capas con una pipeta se desecha la capa de arriba que es el buffer (incolora) y se utiliza la de abajo que contiene al fenol (amarilla).
5. Se toma el pH debe ser cercano a 8
6. Se añade un volumen igual de buffer pero ahora 0.1 M. Se agita de media hora o 1 hora. Se formaran dos fases se elimina la fase de arriba.

7. Se toma el pH y ahora debe ser de 8 pero si no, se repite el punto 6 hasta que se logre este pH. (No es muy recomendable repetir más de 3 veces este paso)
8. Una vez que el fenol tenga un pH mayor a 7.8 se agrega de nuevo buffer 0.1 M. nuevo pero solo 1/10 volumen original del fenol esto ayuda a que el fenol se mantenga equilibrado por más tiempo.
9. Se refrigera a 4 °C en una botella ámbar.

ANEXO VIII. Secuencias de *Ficimia hardyi* y los dos grupos externos. La base nitrogenada en minúscula identifican caracter fallante.

<p>N. DE BASES NITROGENADAS</p>	<p>1</p>	<p>80</p>
<p><i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo <i>Ficimia hardyi</i> de San Luis Potosí <i>Gyalopion</i> <i>Sympholis</i></p>	<p>TATCATCCGGGGAATAACCCAAATTTTACCCCAATAAAAAACAGGACCTTTTTTCCCATTTCATTGTA CTGCTCTCTTG TATCATCCGGGGAATAACCCAAATTTTACCCTCAATAAAAAACAGGACCTGTTTCTCCATTTATCGTACTTGCCCTCTTG TGGCATCATCCGAATAACCTAAATTCTACCAACAATAAAAAACAGAACCTTCTCTCCATTTATTGTTCTTGCCCTCTTG GCATGTAATCCGAAtAACCAAAGTTTTAcCAACAATACAAGCAGATTTgATTCTACCATTTCATTGTA CTGCTCTCTTG</p>	<p>81</p> <p>160</p>
<p><i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo <i>Ficimia hardyi</i> de San Luis Potosí <i>Gyalopion</i> <i>Sympholis</i></p>	<p>AGGAGCAACACTAGCTAACCTGACATGTCTTCAACAAACAGACCTAAAATCGCTAATTGCATACTCCTCAATTAGCCACA AGGGGCTACACTAGCTAATTTAACATGTCTTCAACAAACGGATCTAAAATCACTCATCGCATATTCTCAATTAGCCACA AGGGGCAACACTAGCTAACCTAACATGCCTTCAACAAACAGACCTAAAATCGCTAATCGCATACTCCTCAATTAGCCACA AGGGGCAGTACTAGCTAATCTAACATGCCTTCAa CAAGCAGACTTAAAATCTCTCATCGCATATTCTCAATTAGCCATA</p>	<p>161</p> <p>240</p>
<p><i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo <i>Ficimia hardyi</i> de San Luis Potosí <i>Gyalopion</i> <i>Sympholis</i></p>	<p>TAGGCCTAGTTATCGCTGCAATCATAATTCAAACACAATGAAGTCTTTCTGGGCAATAAAGCTCTGATAATCGCTCATGG TAGGCCTAGTTATCGCCGCAATTATGATTCAAACACAATGAAGCCTTTCTGGGCAATAAAGCCCTAATAATCGCCCACGG TAGGCCTAGTCATCGCTGCAATTATAATTCAAACACAATGAAGCCTCTCAGGGCAATAATGCCCTAATAATCGCTCACGG TAGGCC t aGTTATTGCTGCAATCATAATTCAAACACAATGAAGTTTTTCAGGAGC-TATAGCCCTAATAATTGCCCATGG</p>	<p>240</p>

N. DE BASES NITROGENADAS	241	320
<i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo	CTTCACCTCGTCAGCACTATTCTGCCTAGCTAATACAACCTATGAACGAACTAAAACCTCGCCTTATGATCCTAACACGAG	
<i>Ficimia hardyi</i> de San Luis Potosí	CTTCACCTCATCAGTACTATTCTGTCTAGCCAACACCACCTATGAACGAACTAAAACCCGAATTATGATCCTAACACGAG	
<i>Gyalopion</i>	CTTCACCTCATCAGCACTATACTGCCTAGCTAACACCACCTACGAACGAAACAAAACCCGAATTATAATCCTAACACGAG	
<i>Sympholis</i>	CTTTACCTCATCAGCATTATTCTGTTTAGCTAATACCACCTACGAACGAACTAAAACCCGTATTTTAGTATTAACACGAG	
	321	400
<i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo	GTTTCCACAACATTCTACCAATATTTACTGCCTGGTGACTTATAGGCAAATCTAATATATATTGCAACCCCACTACTAT	
<i>Ficimia hardyi</i> de San Luis Potosí	GATTCCACAATATTCTACCAATATTCACCGCTGATGATTGCTGGGCTAATCTAATAACTATTGCACCCCCAACTAT	
<i>Gyalopion</i>	GGTTCATAACATTCTACCAATATTTACCACCTGGTGACTGGTAACCAAATCTAATAAATATTGCAACCCCACTACTAT	
<i>Sympholis</i>	GATTCCATAACATTCTACCAATATTCACTACTTGGTGGCTTACCAAATCTAATAAATATTGCAACTCCTCCAACCAT	
	401	480
<i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo	AAACTTTACAGGCGAATTAACAATTCTAGCATCATTATTCAACTGGTGTCACAACAACAATCATTTTAACCGGACTCTCT	
<i>Ficimia hardyi</i> de San Luis Potosí	AAACTTTACGGGCGAATAATAATTCTATCATCATTATTTAACTGGAGTCACAACAACAATTTTAAACGGGACTCCCT	
<i>Gyalopion</i>	AAACTTTACAGGTGAATTAATAATTCTATCATCACTATTCAACTGGTGTCACAACAACAATCATTTTAGTCGGACTCTCT	
<i>Sympholis</i>	TAACTTTACAGGAGAATAAATTaCAGCATCACTAtTTAACTGATGTCCAACAACAATCATATAAGTGGGACTCAAT	
	481	560
<i>Ficimia hardyi</i> de Hidalgo	ATACTTATTACAGCATCATATTCTCTACACTATCAACACAAATAGGCACACCTCACTTAAATCAcCaAACACCACCGACA	
<i>Ficimia hardyi</i> de San Luis Potosí	AAACTTTACGGGCGAATAATAATTCTATCATCATTATTTAACTGGAGTCACAACAACAATTTTAAACGGGACTCCCT	
<i>Gyalopio</i>	ATACTTATTACCGCATCATACTCTTTACACTATGAACACAAATAGG c ACATCTC aaTTAAATCACACAACACCACATTCA	
<i>Sympholis</i>	ACACt Ta tTACAGCATCATa CTCACTaCATTAt GAACACAAATAgGCACCACTCAATCAACACA ca CCCAACAcATTTCa	

N. DE BASES NITROGENADAS

561

640

Ficimia hardyi de Hidalgo

CACTCACGAGAACATCTTCTTATAGTACTACATAATATCCCCTAATACTAATTTCCCTAACAGAACTAGTAATCCTAAT

Ficimia hardyi de San Luis Potosí

CACTCACGAGAACACCTCCTTATAGTACTCCACAAGATCCCCTAATACTAATCTCCCTAACAGAACTAGTAATCCTAAT

Gyalopion

CACTCACGCGTACACCTTCAAATAGAACTACACAAGATCCCCTGATACTAATCTCCCTAAAACAATAATTAAt CCTTTT

Sympholis

CACTAACACC tACACC tTCAAAt AGTACTCCACAT a ATTCCCTAATCCTt ATC tCAATAAAAACCAGaACTAATTatCAT

641

650

Ficimia hardyi de Hidalgo

AGTGCGTCGT

Ficimia hardyi de San Luis Potosí

AGTGCGTCGT

Gyalopion

AGTGCGTCGT

Sympholis

AGGGCGTCGt