



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Biología

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

EL CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO COMO HERRAMIENTA PARA LA
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN EL COMPLEJO *ASPIDOSCELIS GULARIS*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

GONZÁLEZ SOLÍS OSCAR IVÁN

Directora: Dra. Norma Leticia Manríquez Morán



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

Dirección

M. EN A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO
DIR. ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
P R E S E N T E

Por este conducto le comunico que, después de revisar el trabajo titulado "El código de barras genético como herramienta para la identificación de especies en el complejo *Aspidoscelis gularis*", que presenta el alumno de la Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, **Biól. Oscar Iván González Solís**, el Comité Revisor de tesis ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE:	Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea
SECRETARIO:	Dra. Virginia León Régagnon
VOCAL:	Dra. Norma L. Morán Manríquez
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Claudia T. Homung Leoni

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"
Mineral de la Reforma, Hgo., a 30 de mayo del 2014.

DR. ORLANDO ÁVILA POZOS
DIRECTOR I.C.B.I.

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería,
Carretera Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Ciudad del Conocimiento,
Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts. 2230 y 2231, Fax 2109
avilap@uah.edu.mx



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	4
1.	EL GÉNERO <i>ASPIDOSCELIS</i>	4
1.1	EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	5
2.	EL CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO.....	8
3.	EL CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES.....	12
III.	JUSTIFICACIÓN.....	16
IV.	OBJETIVOS.....	16
V.	MÉTODOS.....	17
1.	OBTENCIÓN DE EJEMPLARES Y MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO	17
2.	ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	19
3.	DISTANCIAS GENÉTICAS ENTRE LAS SECUENCIAS.....	19
4.	ANÁLISIS Y LÍMITES ENTRE LAS ESPECIES DEL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	20
VI.	RESULTADOS.....	22
1.	EJEMPLARES Y SECUENCIAS OBTENIDAS	22
2.	DISTANCIAS GENÉTICAS	22
3.	ÁRBOL DE DISTANCIAS GENÉTICAS DENTRO DEL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	23
4.	DISTANCIAS ENTRE LAS MOTU'S DEL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	28
5.	ANÁLISIS DEL MODELO GMYC.....	30
6.	APLICACIÓN DEL MÉTODO DE DISTANCIA PARA EL RECONOCIMIENTO DE LAS 7 ESPECIES RECUPERADAS CON EL MODELO GMYC EN EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	35
VII.	DISCUSIÓN.....	38
1.	DISTANCIAS GENÉTICAS	38
2.	IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE EL MODELO GMYC.....	41
3.	IDENTIFICACIÓN DE LAS 7 ESPECIES RECUPERADAS POR EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO EMPLEANDO LAS DISTANCIAS GENÉTICAS.....	45
VIII.	CONCLUSIONES.....	47
IX.	LITERATURA CITADA.....	48
ANEXO 1.....	57	
ANEXO 2.....	61	
ANEXO 3.....	64	
ANEXO 4.....	65	

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. ESPECIES Y DISTRIBUCIÓN, RECONOCIDAS POR GARCÍA (2012).....	7
CUADRO 2. ESTADÍSTICAS DE LOS REPTILES, TOMADO DE: <i>BOLD</i> , WWW.BOLDSYSTEMS.ORG	11
CUADRO 3. VALORES DE DISTANCIAS GENÉTICAS UTILIZADOS PARA LA DELIMITACIÓN DE ESPECIES EN DIVERSOS GRUPOS DE ANIMALES	13
CUADRO 4. SECUENCIAS DE LOS PRIMERS DE NAGY <i>ET AL.</i> (2012) UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR EL GEN QUE CODIFICA PARA LA SUBUNIDAD I DE LA CITOCROMO C OXIDASA (COI).....	18
CUADRO 5. PROMEDIOS DE DIVERGENCIA INTRAESPECÍFICA E INTERESPECÍFICA Y VALORES MÍNIMOS Y MÁXIMOS ENCONTRADOS PARA CADA MOTU EN EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	28
CUADRO 6. DISTANCIAS INTRAESPECÍFICA E INTERESPECÍFICA ENTRE MOTU'S EN EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	29
CUADRO 7. PROMEDIOS DE DIVERGENCIA INTRAESPECÍFICA E INTERESPECÍFICA Y VALORES MÍNIMOS Y MÁXIMOS ENCONTRADOS PARA CADA ESPECIE RECUPERADA CON EL MODELO GMYC EN EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	36
CUADRO 8. DISTANCIAS INTRAESPECÍFICA E INTERESPECÍFICA ENTRE LAS ESPECIES RECUPERADAS CON EL MODELO GMYC EN EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUCIÓN DE LOS TAXONES PROPUESTOS POR GARCÍA (2012) PARA EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	7
FIGURA 2. FRECUENCIAS DE DISTANCIAS PAREADAS DE LA SECUENCIA COI PARA 1525 COMBINACIONES, DE LAS 52 MUESTRAS DE TAXONES DEL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	23
FIGURA 3. DENDOGRAMA DE DISTANCIAS CORREGIDAS, CONSTRUIDO CON EL MÉTODO DE NEIGHBOR JOINING	24
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN DE LOS 12 AGRUPAMIENTOS DE SECUENCIAS RECUPERADOS CON EL MÉTODO DE DISTANCIA.	27
FIGURA 5. VALORES MÍNIMOS Y MÁXIMOS ENCONTRADOS PARA CADA GRUPO DEL FENOGRAMA CONSTRUIDO CON EJEMPLARES DEL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i> , EMPLEANDO LAS DISTANCIAS CORREGIDAS CON EL MODELO K2P.....	29
FIGURA 6. ÁRBOL FILOGENÉTICO CONSTRUIDO MEDIANTE ANÁLISIS BAYESIANOS.....	32
FIGURA 7. DISTRIBUCIÓN DE LAS SIETE ESPECIES RECUPERADAS MEDIANTE EL ANÁLISIS GMYC.....	33
FIGURA 8. MAPA DE DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS ESPECIES RESULTANTES DEL MODELO GMYC PARA EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	35
FIGURA 9. VALORES MÍNIMOS Y MÁXIMOS ENCONTRADOS PARA CADA ESPECIE RECUPERADA CON EL MODELO GMYC EN EL COMPLEJO <i>ASPIDOSCELIS GULARIS</i>	37

DEDICATORIA

A mi madre: Por el apoyo incondicional que siempre has tenido para mí, por todo el sacrificio y dedicación que has dado en toda mi vida. Por ayudarme siempre a forjarme como un hombre de bien. Por todo te agradezco infinitamente mamá. Te amo.

A mi padre: Por ser siempre el soporte de la familia, porque en todas las etapas de mi vida me has demostrado tu apoyo, me has dado siempre ese sustento y siempre te lo voy a agradecer papá. Esto es gracias a ti mi viejo, estoy muy orgulloso de ti.

A mis abuelos: Galdino, Rodolfo e Isabel, que aunque ya no están aquí, siempre están presentes en mi corazón.

A mi abuela Imelda: que siempre te has preocupado por mí, gracias por tu amor abue.

AGRADECIMIENTOS

“Mi agradecimiento a todos ustedes que han hecho posible culminar este trabajo. Remito con relevancia mi gratitud por formar parte de esto y de mi vida, por contribuir de alguna manera al culmino de esta investigación”

A Armando González Solís: Hermano no hay palabras precisas ni frases con las que pueda agradecerte lo mucho que has influido en mi vida para culminar todas las etapas de mi vida, te quiero mucho hermanito.

A Berenice Carpio Austria: Mi amor, gracias por todas las palabras de aliento y motivación que tienes para mí, eres una mujer maravillosa que me ha demostrado su amor y apoyo incondicional en todos los ámbitos de mi vida, gracias por todo lo que haces y por cómo eres conmigo. Te amo.

A todos los miembros de mi familia, que siempre han tenido impacto en mi vida y que han influido en gran medida en mi formación académica.

A mi directora de tesis, la Doctora Norma Leticia Manríquez Morán, que no encuentro palabras de agradecimiento por aceptarme como su alumno, por enseñarme y transmitirme su conocimiento y en gran medida por impactar en mi vida en esos momentos en los cuales se presentaron problemas, me ha dejado una de las más grandes enseñanzas de mi vida y siempre voy a tenerlo presente. Gracias doctora, es usted una persona con una gran calidad humana.

A la doctora Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, miembro de mi comité tutorial, por mostrarme siempre su disposición, amabilidad y apoyo en la realización de este trabajo.

A la doctora Virginia León Régagnon, miembro de mi comité tutorial, por su amabilidad, disposición y objetividad que mostró en el desarrollo de este trabajo.

A la Doctora Claudia Teresa Hornung Leoni, miembro de mi comité tutorial, por las observaciones y consejos realizados a mi trabajo.

Al Doctor Alejandro Zaldívar Riverón, por su amabilidad y apoyo en la realización de este trabajo de investigación. Sus consejos enriquecieron este trabajo.

Al doctor Adrián Nieto Montes de Oca, por los tejidos facilitados para el desarrollo de este trabajo.

Al biólogo Jaime Escoto, por esas buenas charlas que hemos compartido amigo.

Al M. en C. Jesús Martín Castillo Cerón, por su apoyo y amistad brindada en mi formación académica.

A todos los maestros que he tenido en mi formación académica, gracias por transmitirme su conocimiento.

A todos los miembros y compañeros del laboratorio de sistemática molecular, son una gran familia.

A todos mis amigos y colegas que se hicieron presentes en esta etapa de mi formación académica, me llevo siempre su amistad y esos buenos momentos que hemos compartido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para llevar acabo mis estudios de maestría. Con número de CVU 412478.

RESUMEN

Los marcadores moleculares se han convertido en una herramienta importante para la identificación de las especies y dentro de ellos los códigos de barras genéticos han sido definidos como secuencias cortas de DNA estandarizadas para la identificación rápida de los organismos. Dichas secuencias se han usado para identificar especies bien definidas, sin embargo, en el presente estudio se pretende utilizar la secuencias del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa (empleada como código de barras genético para el grupo de los animales), de individuos pertenecientes a los 10 taxones del complejo *Aspidoscelis gularis* propuestos por García (2012), con la finalidad de probar si la secuencia del COI permite la identificación de esos taxones empleando los métodos de distancia genética. Para ello se obtuvieron 52 secuencias de los distintos taxones y se calcularon las distancias genéticas pareadas. Los análisis de las distancias genéticas mostraron que, bajo la utilización de un umbral arbitrario para identificar especies, no es posible distinguir los taxones que propuso García (2012). Sin embargo, cuando se emplearon análisis filogenéticos y se reconocieron 7 especies mediante el modelo GMYC, fue posible establecer un umbral de diferenciación genética propio del complejo, que permite identificar claramente a esos 7 taxones, los cuales además, presentan una distribución geográfica bien definida.

I. INTRODUCCIÓN

Los marcadores moleculares se han convertido en una parte importante en la identificación de las especies y sus relaciones filogenéticas, ya que han permitido incorporar información genética y métodos propios de la sistemática, lo que ha ayudado a esclarecer problemas taxonómicos y filogenéticos (Paz *et al.*, 2011). Los códigos de barras genéticos, definidos como secuencias cortas de DNA estandarizadas para la identificación rápida de un organismo (Borisenko *et al.*, 2009), son una de las herramientas más empleadas en la actualidad.

En el grupo de los animales, el gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) fue el fragmento elegido como código de barras (Hebert *et al.*, 2003b; Shen *et al.*, 2013). En el año 2004 fue creado el Consorcio del Código de Barras de la Vida (CBOL, por sus siglas en inglés), que tiene como objetivos promover el uso del COI como herramienta de identificación de las especies y crear una base de datos con las secuencias genéticas y sus ejemplares de referencia o *vouchers* (Ratnasingham y Herbert, 2007). La idea de este proyecto internacional hace una analogía entre los códigos de barras de los productos mercantiles y la secuencia de un fragmento de DNA de los organismos, donde para cada especie debe existir un código (secuencia genética) que la identifique y diferencie de otras. La aplicabilidad de este método depende del soporte de una biblioteca de referencia de códigos de barras de DNA.

El proyecto Barcode of Life es un sistema diseñado para identificar a las especies de forma rápida y desde el punto de vista de la biología, pretende acelerar el ritmo de descubrimiento de especies nuevas y aumentar la capacidad de los taxónomos de ampliar y completar el inventario mundial de la biodiversidad. Sin embargo algunos investigadores lo han empleado para delimitar especies usando métodos de distancia genética. Estos métodos de

distancia han sido la principal aplicación de los códigos de barras para discriminar e identificar a las especies, sin embargo a pesar de la importancia que ha cobrado, se ha observado que las divergencias genéticas entre las especies varían dependiendo del taxón (Sbordoni, 2010), por ello, los procedimientos basados en distancia que utilizan la información de la secuencia COI, pueden tener ciertas limitaciones, sobre todo cuando se trata de establecer límites entre especies con problemas taxonómicos y con características evolutivas y de especiación particulares (Lipscomb *et al.*, 2003; Wheeler, 2004; Tubaro y Díaz de Astarloa, 2008).

Históricamente uno de los grupos que más problemas taxonómicos ha presentado dentro de los reptiles, es el de los lacertilios que conforman al género *Aspidoscelis*, el cual se distribuye ampliamente en el Continente Americano, principalmente en los ecosistemas áridos y semiáridos del suroeste de Estados Unidos y México (Wright, 1993).

El género *Aspidoscelis* está constituido por 87 taxones, entre especies y subespecies, que en algunos casos integran complejos, debido a que los caracteres utilizados tradicionalmente no han permitido una delimitación adecuada de las especies. Uno de esos complejos es el de *A. gularis*, que actualmente se considera una especie politípica con poca variación morfológica y patrones de coloración que varían incluso ontogenéticamente (Walker 1981 a y b; Wright 1993; Reeder *et al.*, 2002).

Los integrantes del complejo *A. gularis* han sufrido diversos cambios taxonómicos (Duellman y Zweifel, 1962; Walker, 1981 a y b; Wright, 1993; Crother *et al.*, 2001; Reeder *et al.*, 2002) debido en gran medida, a la complejidad que ha existido para delimitar a los taxones que lo conforman (Reeder *et al.*, 2002) y a la falta de información acerca de su distribución (Dixon *et al.*, 1971; Orozco, 2011). Recientemente García (2012) realizó una filogenia molecular del

complejo, empleando los marcadores genéticos ND2 y Cytb y logró identificar a 10 especies. Debido a lo anterior, en el presente estudio se pretende emplear al código de barras genético para identificar a los taxones que conforman al complejo *Aspidoscelis gularis* y evaluar su efectividad en la discriminación de las especies del grupo.

II. ANTECEDENTES

1. EL GÉNERO *ASPIDOSCELIS*

Los lacertilios que conforman al género *Aspidoscelis*, son de actividad diurna y se caracterizan por presentar cuerpo alargado y cola que llega a medir el doble de la longitud del cuerpo (Wright, 1993; Reeder *et al.*, 2002). Sus especies se distribuyen en gran parte del Continente Americano y debido a la gran extensión territorial que ocupan, se les ha registrado en distintos ecosistemas, siendo los ambientes áridos y semiáridos de Estados Unidos y México el lugar donde se presenta la mayor diversidad. Su gran abundancia y naturaleza conspicua ha permitido su uso en diversos estudios ecológicos, biogeográficos y de historia natural (Wright, 1993).

El género *Aspidoscelis* está constituido por taxones gonocóricos y unisexuales, los cuales han sido divididos en cinco grupos: El grupo *Aspidoscelis cozumela* (conformado por cuatro especies unisexuales), el grupo *A. deppii* (formado por 19 taxones gonocóricos), el grupo *A. tessellata* (con cuatro especies unisexuales), el grupo *A. tigris* (constituido por 13 taxones gonocóricos) y el grupo *A. sexlineata* conformado por 49 taxones (gonocóricos y unisexuales), siendo este último grupo el que tiene mayor diversidad y en donde se ubica el complejo *Aspidoscelis gularis*. Las especies del género, se caracterizan por presentar poca variabilidad a nivel morfológico y poseer una gran variación en sus patrones de coloración. Lo anterior, ha generado la existencia de complejos de especies, que históricamente han sido difíciles de delimitar (Walker 1981 a y b; Wright 1993; Reeder *et al.*, 2002).

1.1 EL COMPLEJO *ASPIDOSCELIS GULARIS*

Las lagartijas del complejo *Aspidoscelis gularis* presentan una distribución que va desde el suroeste de los Estados Unidos hasta la parte del centro y sur de México (Dixon *et al.*, 1971; Walker 1981 a y b; Walker *et al.*, 2001; García 2012) y se considera a la zona sur de los Estados Unidos y norte de México como la región donde se presenta la mayor diversidad de los taxones (Orozco, 2011; García, 2012).

Diversos autores han utilizado a los patrones de coloración y escutelación como caracteres clave en la delimitación de los taxones de *A. gularis*, pero el solapamiento de dichos caracteres provocó, que los integrantes del complejo sufrieran varios cambios taxonómicos durante el siglo XX. Duellman y Zweifel (1962) colocaron a 5 taxones del complejo en dos especies: *Aspidoscelis gularis* (= *A. gularis gularis*) y *A. septemvittata* (*Aspidoscelis g. scalaris*, *A. g. pallida*, *A. g. septemvittata* y *A. g. semifasciata*) y señalaron su presencia en los estados de Aguascalientes, Distrito Federal, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí y Michoacán. Posteriormente Dixon *et al.* (1971) describieron a la subespecie *Aspidoscelis gularis colossus*, con una distribución al este del estado de Querétaro. Una década después Walker (1981a) sinonimizó a los taxones *A. scalaris* (= *A. septemvittata*) y *A. gularis* bajo el concepto biológico de especie y el mismo autor (1981b) describió un taxón nuevo (*A. gularis semiannulata*) y restringió su distribución a los estados de Aguascalientes, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas.

En un trabajo posterior, Walker *et al.* (2001) hicieron referencia a la presencia de organismos con patrones de coloración distintos a los ya descritos en el estado de Chihuahua, por lo que sugirieron hacer una revisión taxonómica del complejo. Un año después Reeder *et al.* (2002) realizaron un estudio filogenético del género *Aspidoscelis* y encontraron que los taxones

A. gularis gularis, *A. g. septemvittata* y *A. g. scalaris* están estrechamente relacionados y proponen realizar trabajos adicionales para esclarecer sus problemas taxonómicos.

Lo que hoy en día se considera como el complejo *Aspidoscelis gularis* incluye a los taxones que históricamente pertenecieron a las especies *Aspidoscelis septemvittata*, *A. scalaris* y *A. gularis* (Duellman y Zweifel, 1962; Walker, 1981 a y b; Wright, 1993; Crother *et al.*, 2001; Reeder *et al.*, 2002), los cuales posteriormente (Walker, 1981a,b) fueron colocados dentro de la especie polítipica *A. gularis*, la cual se integró por siete subespecies descritas con base en sus patrones de coloración (*A. gularis gularis*, *A. g. colossus*, *A. g. pallida*, *A. g. scalaris*, *A. g. septemvittata*, *A. g. semifasciata* y *A. g. semiannulata*) y varios taxones sin reconocimiento formal en los estados de Aguascalientes, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí, Michoacán y Distrito Federal (Orozco, 2011).

En 2012, García realizó una propuesta formal sobre las relaciones filogenéticas y el estado taxonómico de los integrantes del complejo, tomando en cuenta caracteres moleculares (genes ND2 y CytB del DNA mitocondrial). Su análisis para la delimitación de especies incluía la filogenia obtenida, redes de haplotipos y datos de distribución geográfica. Con dicha información la autora sugirió que *A. gularis* representa un complejo formado por grupos de haplotipos exclusivos apoyados por su distribución geográfica y propuso diez especies (*A. sp.1*, *A. septemvittata*, *A. scalaris*, *A. sp.2*, *A. semifasciata*, *A. sp.3*, *A. sp.4*, *A. sp.5*, *A. sp.6* y *A. gularis*; fig.1, cuadro 1).

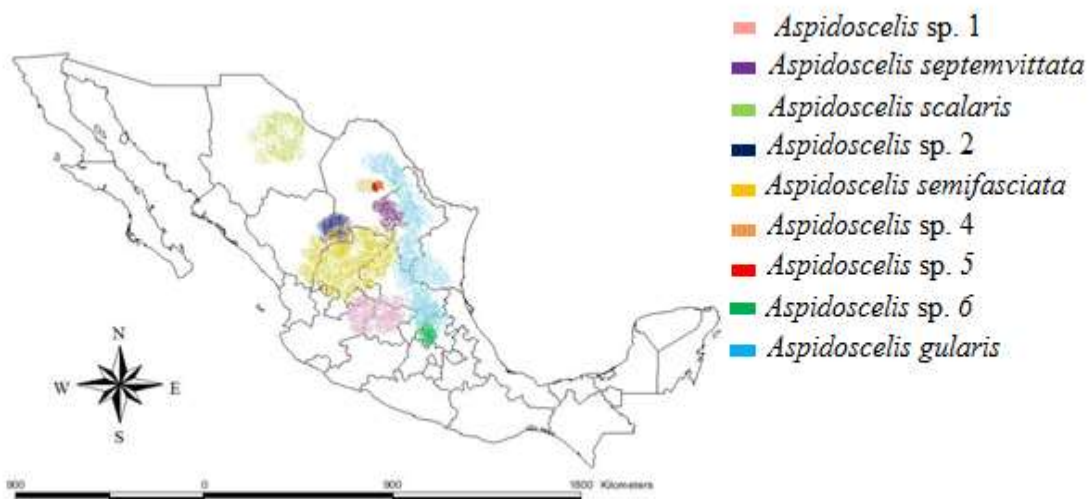


Figura 1. Distribución de los taxones propuestos por García (2012) para el complejo *Aspidoscelis gularis*.

Cuadro 1. Especies y distribución, reconocidas por García (2012).

Especie	Distribución geográfica
<i>Aspidoscelis</i> sp. 1	Parte sur de Aguascalientes y este de Guanajuato.
<i>Aspidoscelis septemvittata</i>	Valle de Cuatrociénegas Coahuila.
<i>Aspidoscelis scalaris</i>	Chihuahua, Coahuila y Aguascalientes.
<i>Aspidoscelis</i> sp. 2	Este de Durango, Coahuila, parte sur de la Sierra Madre Oriental y Altiplanicie Mexicana.
<i>Aspidoscelis semifasciata</i>	Sureste de Coahuila, sureste de Durango, este de Zacatecas, oeste de San Luis Potosí, norte de Aguascalientes, Sierra de Torreón-Monterrey y sur de la Altiplanicie Mexicana.
<i>Aspidoscelis</i> sp. 3	Suroeste del valle de Cuatrociénegas, norte de la Altiplanicie Mexicana.
<i>Aspidoscelis</i> sp. 4	Noreste del valle de Cuatrociénegas.
<i>Aspidoscelis</i> sp. 5	Este y sureste del valle de Cuatrociénegas, dentro de la zona de la Altiplanicie Septentrional.
<i>Aspidoscelis</i> sp. 6	Parte sur de la Altiplanicie Mexicana (Altiplanicie Meridional, en el estado de Hidalgo)
<i>Aspidoscelis gularis</i>	Noreste del valle de Cuatrociénegas, zona norte de la Altiplanicie Mexicana, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Querétaro e Hidalgo.

2. EL CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO

En el año 2003 un grupo de científicos de la Universidad de Guelph en Ontario, Canadá, propuso utilizar la secuencia parcial (las primeras 648 pares de bases) del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la Citocromo C-oxidasa (COI, Cox1 o mt-co1) como el “identificador universal” de las especies de animales. Esta región fue propuesta, debido a que su variación intraespecífica parecía ser más pequeña que la variación interespecífica (Hebert *et al.*, 2003a).

La aplicabilidad de este método depende del soporte de una biblioteca de referencia de códigos de barras del DNA y el registro de sus *vouchers* o ejemplares de referencia (Ratnasingham y Herbert, 2007). Por lo cual se creó la *Barcode of Life Database* (BOLD, por sus siglas en inglés), para albergar el registro de las secuencias del COI de las distintas especies (Ratnasingham y Herbert 2007; BOLD www.boldsystems.org).

En los años siguientes se unieron al proyecto numerosas instituciones científicas de varios países, con el fin de obtener una mayor cantidad de secuencias (Paz *et al.*, 2011) y hasta el momento se han obtenido resultados favorables y la idea de inventariar a todas las especies del planeta sigue adelante. Actualmente existen 2,652,577 especímenes pertenecientes a 193,707 especies con códigos de barras (The Barcode of Life Data System; www.boldsystems.org).

El proyecto fue diseñado con la finalidad de identificar de manera rápida, precisa y automática a las especies de animales, mediante el uso de secuencias de DNA cortas y estandarizadas (Herbert y Gregory 2005). Sin embargo, el código de barras se ha empleado en diferentes aplicaciones y disciplinas, por ejemplo, como herramienta para la detección de la biodiversidad (Smith *et al.*, 2008; Hebert *et al.*, 2009; Janzen *et al.*, 2009), como apoyo a la

taxonomía tradicional (Packer *et al.*, 2009), para el reconocimiento de especies crípticas (Hawkins *et al.*, 2007; April *et al.*, 2011; Carolan *et al.*, 2012), para evaluar divergencia evolutiva entre taxones (Barr *et al.*, 2012), para llevar a cabo análisis filogenéticos y biogeográficos (Hawkins *et al.*, 2007; Lowenstein *et al.*, 2011; Barr *et al.*, 2012; Carolan *et al.*, 2012;) y en muchos otros campos (Lanteri 2007; Ferri *et al.*, 2009).

Las primeras alianzas entre investigadores a nivel mundial fueron los proyectos para conocer los códigos de barras de aves, peces y lepidópteros (Hebert y Gregory, 2005). Dentro del grupo de los vertebrados, destaca el proyecto de la identificación de especies de peces de Australia (Ward *et al.*, 2005), donde los autores determinaron 754 secuencias del COI pertenecientes a 207 especies (en su mayoría marinas), los resultados que obtuvieron fueron exitosos en la determinación correcta de las especies de peces. El estudio incluyó especies congénicas y solo para 4 de las 211 que consideraron originalmente en el estudio no presentaron resultados exitosos, debido probablemente a la degradación del DNA. Al final concluyeron que el código de barras genético puede ser usado como una herramienta eficaz en la determinación de especies de peces.

Algo similar fue encontrado por Mabragaña *et al.* (2011) quienes secuenciaron 577 muestras del COI pertenecientes a 125 especies de peces marinos de Argentina. Los autores encontraron que todos los ejemplares utilizados en el estudio habían sido determinados correctamente a nivel de especie además, lograron identificar una posible especie nueva de raya (*Dipturus argentinensis*) cuyo código de barras genético era único e inequívocamente diferente al de las otras dos especies congénicas que también habitan aguas argentinas.

Otro estudio, fue el de las aves de Norteamérica (Hebert *et al.*, 2004a), donde se probó al código de barras como identificador de especies en el grupo de las aves, que son los organismos cuya taxonomía es la mejor conocida del reino animal. Los investigadores secuenciaron la región del COI de 260 especies de Norteamérica y observaron que las secuencias tienen diferencias interespecíficas claras en comparación con las intraespecíficas, por lo que sugieren que el código de barras es una herramienta efectiva para la determinación de especies.

Otro caso similar en aves, es el trabajo de Tubaro y Díaz de Astarloa (2008) donde analizaron 1,594 especímenes pertenecientes a 500 especies de Argentina; lo que los autores determinaron es que en el 98% de los casos las especies pudieron ser identificadas inequívocamente y en un 100% se llegó a nivel de género; también encontraron que los niveles de divergencia intraespecífica hallados en las secuencias COI eran comparables a los de las aves de Norteamérica. Además, encontraron que en el 3% de los casos analizados se presentó un nivel importante de estructuración genética que sugiere la existencia de posibles especies crípticas o razas geográficas que merecen ser elevadas al nivel de especies.

Se ha observado que la funcionalidad del código de barras genético como herramienta para la identificación de especies en grupos con complejidades taxonómicas es relativa y resulta prematuro hacer una valoración sobre su utilidad (Lipscomb *et al.*, 2003; Wheeler, 2004 y Tubaro y Díaz de Astarloa, 2008). Además, cabe resaltar que la mayor parte de las investigaciones que se han realizado no incluyen muestreos que permitan analizar la variación de cada especie a lo largo de su distribución geográfica, por lo que en ciertos casos su aplicabilidad puede ser cuestionada (Lipscomb *et al.*, 2003; Wheeler 2004; Hickerson *et al.*, 2006; Lanteri 2007).

En lo que respecta al grupo de los reptiles existen pocos registros en BOLD de códigos de barras, debido en gran medida a que este marcador molecular ha sido poco utilizado por los herpetólogos en trabajos filogenéticos y filogeográficos (Ratnasingham y Hebert, 2007; Nagy *et al.*, 2012). Hasta el día de hoy en la base de datos del proyecto se encuentran registradas 2,195 especies, de las cuales 1,775 cuentan con el registro de código de barras (cuadro 2). Estos registros representan a los cuatro órdenes de la clase Reptilia.

La familia Teiidae se encuentra representada por los géneros *Ameiva*, *Aspiloscelis*, *Cnemidophorus*, *Dracaena* y *Holcosus* con 37, 14, 2, 1 y 1 registros de especies respectivamente. El género *Aspiloscelis*, se encuentra representado por ocho especies de las cuales solo *Aspiloscelis scalaris* y *A. septemvittata* representan al complejo *A. gularis*, sin embargo ambas presentan un registro de un fragmento parcial menor a 500 pb del gen Citocromo oxidasa, subunidad I (BOLD, Systems).

Cuadro 2. Estadísticas de los reptiles, tomado de: *BOLD*, www.boldsystems.org

Registros de Especímenes	11,496
Especímenes con secuencias	10,535
Especímenes con códigos de barras	8,618
Especies	2,195
Especies con códigos de barras	1,775

3. EL CÓDIGO DE BARRAS GENÉTICO PARA LA IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES

Los estudios realizados en diversos grupos de animales, han mostrado la aplicabilidad de los códigos de barras en la identificación de especies (Shen *et al.*, 2013) y de manera general se ha encontrado que la divergencia entre individuos de una población o especie, es de manera general, más baja que el valor de la misma especie comparada con especies relacionadas cercanamente (Shen *et al.*, 2013). El sistema del código de barras asume que una secuencia nueva “sin identificar” al ser comparada con alguna de la base de datos mostrará un nivel de divergencia o distancia genética alta, si se tratase de una secuencia de una especie nueva.

Si bien se ha logrado observar la paradoja entre la divergencia intraespecífica y la interespecífica, también se ha cuestionado sobre los niveles o porcentajes de divergencia genética que deben ser tomados en cuenta para discriminar a las especies, debido en gran medida, a que no todas las especies pueden ser tratadas de la misma manera y bajo los mismos valores, pues cada taxón presenta su propia historia evolutiva y el grado de diversidad genética entre especies de diferentes taxones puede ser de magnitudes diferentes (Lohse, 2009).

Distintos trabajos realizados en animales (vertebrados e invertebrados) han mostrado que las distancias genéticas entre especies varían dependiendo del taxón (cuadro 3), por lo tanto el uso de los códigos de barras en la identificación de especies no puede ser estandarizado con valores de divergencia iguales en todos los animales (Vences *et al.*, 2005).

Cuadro 3. Valores de distancias genéticas utilizados para la delimitación de especies en diversos grupos de animales.

Grupo	Taxón	Distancia	Autores
Invertebrados	Coleopteros	Divergencia interespecífica de 8%.	Hebert <i>et al.</i> (2003b)
Invertebrados	Cnidarios	Divergencia interespecífica de 2%.	Hebert <i>et al.</i> (2003b)
Invertebrados	Lepidopteros	Divergencia interespecífica de 3%.	Hebert <i>et al.</i> (2004b)
Invertebrados	Arañas	Divergencia interespecífica de 16%	Barret y Hebert (2005)
Invertebrados	Decápodos	Divergencia interespecífica de 17%	Costa <i>et al.</i> (2007)
Invertebrados	Equinodermos	Divergencia interespecífica de 15%	Ward <i>et al.</i> (2008)
Invertebrados	Arañas	Divergencia interespecífica de 5-7%	Correa <i>et al.</i> (2010)
Invertebrados	Anélidos	Divergencia interespecífica del 2%	Oceguera <i>et al.</i> (2010)
Invertebrados	Moluscos	Divergencia interespecífica mayor al 4%.	Romero y Ramírez (2011)
Invertebrados	Moscas de la fruta	No fue posible diferenciar a las muestras de <i>Ceratitis capitata</i> de las muestras de <i>C. caetrata</i> .	Barr <i>et al.</i> (2012)
Vertebrados	Aves	Divergencia interespecífica de 8%	Hebert <i>et al.</i> (2004a)
Vertebrados	Peces	Divergencia interespecífica de 10%	Ward <i>et al.</i> (2005)
Vertebrados	Anfibios	Valores interespecíficos de 6.1-13.9% para diferentes especies del género <i>Nototrion</i> .	Townsend <i>et al.</i> (2013)
Vertebrados	Aves	Divergencia interespecífica de 2.6 %	Yoo <i>et al.</i> (2006)
Vertebrados	Murciélagos	Divergencia interespecífica de 8 %	Clare <i>et al.</i> (2007)
Vertebrados	Aves	Divergencia interespecífica de 2.7 %	Tavares y Baker (2008)
Vertebrados	Peces	Divergencia interespecífica de 10.8%	Steinke <i>et al.</i> (2009)
Vertebrados	Tortugas	Divergencia interespecífica de 8.2 %	Vargas <i>et al.</i> (2009)
Vertebrados	Peces	Divergencia interespecífica 13.7% Permitió distinguir especies crípticas.	April <i>et al.</i> (2011)
Vertebrados	Tortugas	Divergencia interespecífica de 2 %	Reid <i>et al.</i> (2011)

Vences *et al.* (2005) señalaron que en los taxones donde las divergencias intra e interespecíficas se solapan, existen complicaciones para definir los valores de distancias genéticas para delimitar a las especies. Para resolver esta controversia algunos científicos se dieron a la tarea de diseñar métodos con los cuales se pudieran obtener los valores de divergencia

intraespecífica e interespecífica, por lo que se creó la regla “10 x” la cual indica que el valor de la divergencia interespecífica es igual al valor de la intraespecífica multiplicada 10 veces (Hebert *et al.*, 2004a). Sin embargo, su aplicabilidad también ha sido cuestionada debido a que el solapamiento de la divergencia intra e interespecífica incrementa cuando en el análisis se aumenta el número de taxones cercanamente emparentados y disminuye la fiabilidad del código de barras (Moritz y Cicero, 2004; Meyer y Paulay, 2005; Paz *et al.*, 2011). Por ejemplo, se ha observado que en grupos como el de los anfibios, existen especies en las que individuos de una misma especie provenientes de diferentes regiones geográficas presentan variación intraespecífica que puede superar a la variación interespecífica encontrada entre especies del mismo género, lo que dificulta la discriminación de especies (Vences *et al.*, 2005).

Otra propuesta fue la utilización de un umbral de discriminación interespecífica del 2% para todas las especies animales, ya que cuando esta distancia fue propuesta, se observó que funcionaba bien para la mayoría de especies de invertebrados (Hebert *et al.*, 2003b), lo cual implicaba que cualquier valor menor al 2% sería una variación intraespecífica de la especie en cuestión. Sin embargo, cuando fue aplicado a diversas especies de vertebrados se observó que no era funcional, ya que no permitía una clara discriminación de las especies.

Se han observado discrepancias en el uso de las distancias del COI en diferentes taxones, con posturas a favor y en contra del uso de este método (Paz *et al.*, 2011) y se ha visto que la delimitación de especies ha sido una cuestión más arbitraria que metodológica, por lo que algunos autores se han dado a la tarea de implementar el uso de métodos filogenéticos; en los cuales se determinen los umbrales de discriminación específica con base en las relaciones de ancestría-descendencia (Monaghan *et al.*, 2009; Ceccarelli *et al.*, 2012; Bribiesca *et al.*, 2013)

Uno de estos métodos es el modelo general mezclado de coalescencia de Yule, (GMYC por sus siglas en inglés) el cual estima el límite de las especies mediante la identificación de linajes que evolucionan de manera independiente como una transición de los patrones de ramificación de coalescencia-especiación en un árbol filogenético (Monaghan *et al.*, 2009). El modelo fue puesto a prueba en 12 familias de insectos y los resultados mostraron que los agrupamientos de secuencias correspondían en un 97% con la morfología, identificando a 370 especies putativas (6% más que las determinadas taxonómicamente).

El mismo método fue probado por Ceccarelli *et al.* (2012) en el género de parásitos *Notiospathius*, los autores observaron que no todas las especies que recuperaron con el modelo GMYC eran congruentes con las identificadas con base en la morfología. Lograron identificar 71 especies y señalaron siete especies crípticas.

Bribiesca *et al.* (2013) emplearon el mismo modelo en especies de equinodermos y lo compararon con el método de distancia con la regla de 2%. Los resultados encontrados fueron que con la divergencia interespecífica de 2% identificaron 78 especies y con el análisis del modelo GMYC obtuvieron 70 especies putativas. El modelo GMYC fue mucho más congruente con los análisis morfológicos y de distribución en comparación de la distancia de 2%. También lograron identificar cuatro especies crípticas, que se encuentran restringidas a cavernas marinas.

III. JUSTIFICACIÓN

El código de barras genético se ha propuesto como una herramienta para la identificación de especies, sin embargo su funcionalidad ha sido cuestionada debido a que su efectividad varía dependiendo del taxón, por ello, en este trabajo se pretende utilizar el marcador mitocondrial citocromo oxidasa I para evaluar su utilidad en la identificación de especies del complejo *Aspidoscelis gularis*.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la funcionalidad del código de barras genético como herramienta en la identificación de las especies del complejo *Aspidoscelis gularis*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener la secuencia parcial del gen mitocondrial citocromo oxidasa I para establecer el código de barras genético de los taxones que integran al complejo *Aspidoscelis gularis*.
2. Evaluar la funcionalidad de los códigos de barras en la identificación de taxones del complejo *A. gularis* mediante el uso de distancias genéticas.
3. Evaluar la funcionalidad de los códigos de barras genéticos en la identificación de taxones del complejo *A. gularis* mediante el uso del modelo GMYC para el reconocimiento de especies.

V. MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE EJEMPLARES Y MUESTRAS DE TEJIDO HEPÁTICO

Se utilizaron 52 muestras de tejido de ejemplares de los diversos taxones del complejo *Aspidoscelis gularis*, que cuentan con todos los requerimientos necesarios para ser considerados ejemplares de referencia dentro del proyecto del código de barras de la vida (mismos que se encuentran depositados en la Colección de Anfibios y Reptiles del Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en la Colección Herpetológica del Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México).

A cada ejemplar se le tomaron datos de captura: hora, fecha y localidad de recolecta, coordenadas geográficas, altitud, tipo de vegetación y datos del colector; los cuales son utilizados para registrar al *voucher* y posteriormente registrar el código de barras (BOLD, www.boldsystems.org).

El trabajo de laboratorio consistió en la obtención del DNA genómico, la amplificación del gen COI y la secuenciación de la región para obtener el código de barras de cada uno de los ejemplares elegidos. Para ello se siguieron los protocolos propuestos para el proyecto Barcode of Life (Ivanova *et al.*, 2006).

Se siguieron los protocolos de extracción, amplificación y secuenciación del DNA, establecidos por el CBOL para especímenes animales recientes y en buena condición (Ivanova *et al.*, 2006), además de otras técnicas alternativas que han generado resultados adecuados en la obtención de secuencias moleculares (Simpson *et al.*, 1999; Applied Biosystems, 2002; Manríquez y Hernández, 2009).

Cuadro 4. Secuencias de los *primers* de Nagy *et al.* (2012) utilizados para amplificar el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI)

Nombre	Secuencia
RepCOI-R	5'-TNT TMT CAA CNA ACC ACA AAG A-3'
RepCOI-F	5'-ACT TCT GGR TGK CCA AAR AAT CA-3'

Para la extracción del DNA genómico se empleó el protocolo propuesto por Fetzner (1999) que fue diseñado para la extracción de DNA de las mudas de reptiles y asegura la extracción de una cantidad adecuada de DNA de calidad alta, que puede utilizarse en estudios de PCR, enzimas de restricción y secuenciación (anexo 1).

En el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se siguió el protocolo general planteado por Palumbi (1996), las recomendaciones propuestas por Ivanova *et al.* (2009) para el código de barras genético (anexo 1) y los oligonucleótidos (*primers*) propuestos por Nagy *et al.* (2012; cuadro 4).

Con el propósito de visualizar los productos de la amplificación, se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del DNA por medio del método de Polietilen-glicol (PEG; anexo 1), método que permite eliminar los productos que no se utilizaron durante la PCR.

Los productos purificados fueron utilizados para llevar a cabo la reacción de secuenciación, utilizando el kit BigDye 3.1 (Applied Biosystems; anexo 1). El DNA obtenido de la reacción fue purificado con *sephadex* utilizando columnas *Centri-sep* (Pricenton separations, anexo 1). Finalmente las secuencias fueron obtenidas mediante un secuenciador automático *Applied Biosystems* 3100.

2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Una vez obtenidas, las secuencias de cada uno de los ejemplares fueron ensambladas y editadas utilizando el conjunto de programas conocidos como Staden Package v. 1.5.3 (Staden, 1996). Posteriormente se realizó el alineamiento de secuencias, utilizando el programa Clustal X 2.0.10 (Larkin *et al.*, 2007). Para la edición final de la matriz se empleó el programa MEGA v 5.05 (García, 2012).

3. DISTANCIAS GENÉTICAS ENTRE LAS SECUENCIAS

Las distancias genéticas se calculan entre pares de secuencias y pretenden describir el grado de diferenciación entre dos muestras (secuencias). Permiten mostrar el número de mutaciones que han ocurrido a nivel nucleotídico en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo de divergencia (Piñero *et al.*, 2008).

Inicialmente se calcularon las distancias absolutas que hacen referencia al número de nucleótidos distintos entre dos secuencias (Manríquez, 2002). Posteriormente, las secuencias fueron analizadas con el programa MEGA v 5.05 para obtener el modelo de sustitución nucleotídica que se ajustara mejor a los datos de la matriz y para calcular las distancias corregidas (Hebert *et al.*, 2003b). Con las distancias corregidas, se construyó un árbol de distancia utilizando el método de Neighbor Joining, con la finalidad de obtener una representación gráfica de los patrones de divergencia entre los taxones del complejo *Aspidoscelis gularis* (Hebert *et al.*, 2003a).

4. ANÁLISIS Y LÍMITES ENTRE LAS ESPECIES DEL COMPLEJO *ASPIDOSCELIS GULARIS*

La identificación de las especies del complejo se realizó (primeramente) identificando a las Unidades Taxonómicas Moleculares Operacionales o MOTU's por sus siglas en inglés (Jones *et al.*, 2011), las cuales fueron distinguidas empleando el criterio de divergencia genética, tomando como valor umbral el 1.8%. Se tomó este valor de manera arbitraria considerando la información de la filogenia de García (2012) y datos de distribución geográfica.

Una vez que las unidades taxonómicas fueron identificadas en el árbol de distancia, se procedió a calcular la divergencia intraespecífica e interespecífica para observar las distancias entre los grupos. Se graficaron los valores mínimos y máximos para las distancias intra e interespecíficas de cada taxón (Barr *et al.*, 2012). Para poder discriminar a los taxones debe existir una diferencia clara (*gap* o hueco) entre los valores máximos de las distancias intraespecíficas y el mínimo de las interespecíficas (Barr *et al.*, 2012).

La matriz de datos también fue analizada mediante el modelo GMYC (General Mixed Yule-Coalescent) con la finalidad de identificar a las MOTU's que pueden ser discriminadas como especies. El modelo GMYC es un método basado en la coalescencia y recientemente ha sido empleado para la delimitación de especies (Monaghan *et al.*, 2009; Ceccarelli *et al.*, 2013; Briebiesca *et al.*, 2013).

El modelo se basa en la identificación de linajes que evolucionan de manera independiente en los procesos de transición de coalescencia-especiación de los patrones de ramificación observados en un árbol filogenético, de tal manera que permite identificar los límites entre las especies empleando la variación genética y las relaciones ancestría-descendencia.

Para aplicar este método se obtuvo un árbol filogenético ultramétrico, el cuál fue obtenido empleando inferencia bayesiana en el programa BEAST versión 1.7.5 recurriendo a los parámetros Log normal relaxed clock y el modelo de sustitución nucleotídica K2+G (Briebiesca *et al.*, 2013). El análisis fue corrido por 10 millones de generaciones muestreando árboles cada 1000 generaciones.

Una vez obtenido el árbol se procedió a identificar los “límites entre especies” empleando umbrales estadísticos en los análisis del GMYC en el programa SPLITS package (<http://r-forge.r-project.org/projects/splits/>), paquete para estadísticos R (versión x64 2.14.1; <http://www.R-project.org/>) utilizando un solo umbral.

Una vez identificadas las MOTU's en el árbol filogenético se calcularon las distancias genéticas corregidas entre los pares de secuencias, empleando el modelo de sustitución nucleotídica de dos parámetros de Kimura con una distribución gamma.

Subsecuentemente se calculó la divergencia intraespecífica e interespecífica para observar las distancias entre las MOTU's. Se graficaron los valores mínimos y máximos para las distancias intra e interespecíficas (Barr *et al.*, 2012). Para poder discriminar claramente a las MOTU's debió existir una diferencia clara (*gap* o hueco) entre los valores máximos de las distancias intraespecíficas y el mínimo de las interespecíficas (Barr *et al.*, 2012).

VI. RESULTADOS

1. EJEMPLARES Y SECUENCIAS OBTENIDAS

Se utilizaron 52 ejemplares de diferentes poblaciones del complejo *Aspidoscelis gularis* (anexo 2) de los que se obtuvo la secuencia del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa

2. DISTANCIAS GENÉTICAS

Se construyó una matriz de datos con las 52 secuencias de una longitud de 650 pares de bases, a partir de la cual se obtuvieron las distancias genéticas absolutas y corregidas (anexo 3). El modelo de sustitución de nucleótidos elegido para calcular las distancias corregidas fue el de dos parámetros de Kimura con una distribución gamma ($K2 + G$), debido a que fue el que mejor se ajustó a los datos. El promedio de las distancias corregidas obtenidas entre todas las muestras fue de 4.51%.

Se obtuvieron 1,325 combinaciones de divergencias genéticas que variaron de 0.0% a 7.7%. La mayor parte de las distancias pareadas (89.81%) mostraron un porcentaje de más del 2% de divergencia genética (fig. 2).

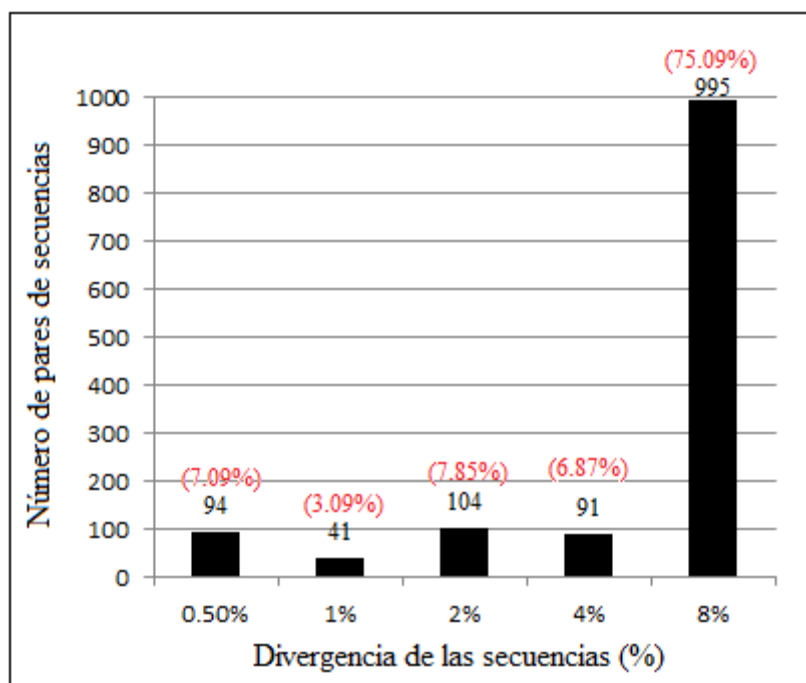


Figura 2. Frecuencias de distancias pareadas de la secuencia COI para 1525 combinaciones, de las 52 muestras de taxones del complejo *Aspidoscelis gularis*. (En rojo se muestra el porcentaje que representan).

3. ÁRBOL DE DISTANCIAS GENÉTICAS DENTRO DEL COMPLEJO *ASPIDOSCELIS GULARIS*

El árbol de distancia construido utilizando el método de Neighbor Joining mostró 12 agrupamientos de MOTU's (fig. 3). El primer grupo de secuencias se encuentra conformado por 11 individuos, provenientes de los estados de Coahuila y Zacatecas, en Sacramento-Monclova (km. 16 al este de Sacramento), Melchor Múzquiz-Las Rusias (24.1 km. al noroeste de Melchor Múzquiz), Carretera Palau-Minas de Barroterán, Saltillo, Concepción de Oro (km. 13.5 al noreste de concepción de Oro Zacatecas), carretera Cuatrociénegas-Monclova (km. 11 al oeste de Sacramento), carretera Sacramento-Monclova (km. 3.5 al este de Nadadores), Cañón de Fernández, Carretera Dolores-Estanque de Norias y de carretera Saltillo-Agua Nueva (20. 5 km. al sureste de Saltillo).

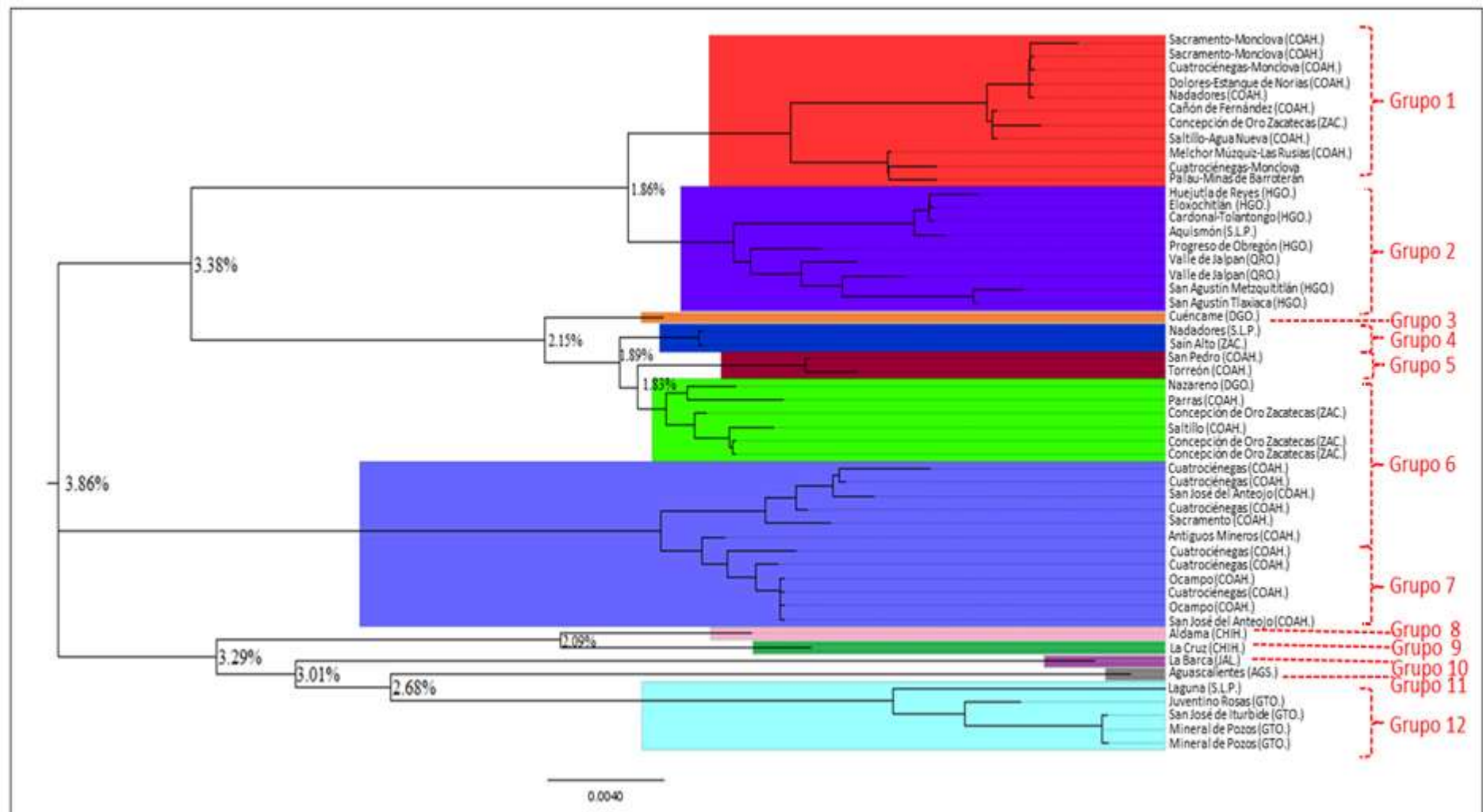


Figura 3. Dendrograma de distancias corregidas, construido con el método de Neighbor Joining.

El segundo grupo se encuentra constituido por individuos de los estados de Hidalgo (Huejutla de Reyes, Cardonal, Tolantongo, Progreso de Obregón, Eloxochitlán, San Agustín Metzquititlán y San Agustín Tlaxiaca), Querétaro (Valle de Jalpan) y San Luís Potosí (Aquismón, fig. 4).

Un individuo recolectado en el municipio de Cuéncame Durango (carretera libre Cuéncame-Torreón; 22.2 km. al norte de Cuéncame) representa el grupo 3 (fig. 4).

El grupo 4 está constituido por dos individuos, de los estados de San Luís Potosí (carretera Ilesca-El Barril del municipio de Nadadores) y de Zacatecas (carretera Rio Grande-Saín Alto, 5.7 km al norte de Saín Alto; fig. 4).

El grupo 5 está integrado por dos ejemplares del estado de Coahuila, uno proveniente de San Pedro (carretera San Pedro-Cuatrociénegas; 15 km. al noreste de San Pedro) y el otro de la Sierra de Jimulco, en Torreón (fig. 4).

El grupo 6 está conformado por seis individuos de los estados de Zacatecas, Durango y Coahuila, (uno recolectado en Saltillo-Concepción de Oro Zacatecas km. 13.5 al noreste de Concepción de Oro, uno de la Unión-Cuéncame km. 25.4 al sureste de Nazareno Durango, otro más de Nazareno Durango, otro de Saltillo-Concepción de Oro, uno de los alrededores de Parras en Coahuila y uno proveniente de Agua Nueva en el municipio de Saltillo, Coahuila; fig. 4).

El grupo 7 se compone de 12 individuos exclusivos al estado de Coahuila, de las localidades de Cuatrociénegas (Cuatrociénegas-Monclova km. 11 al oeste de Sacramento, El Cañón, San José del Anteojo, Rancho la Casita en Sierra Madera y de Cuatrociénegas-Monclova km. 12 al oeste de Sacramento; fig. 4).

Un individuo proveniente del estado de Chihuahua (km. 26 al este de Aldama) en el municipio de Aldama, representa al grupo 8 (fig. 4).

El grupo 9 se encuentra representado por un individuo del estado de Chihuahua, en el municipio de la Cruz (km 3.5 al norte de la Cruz).

El grupo 10 está representado por un solo individuo proveniente del estado de Jalisco en la localidad de la Barca. Un individuo del estado de Aguascalientes (camino a Microondas Los Gallos; 6 km. al este del aeropuerto de Aguascalientes) representa al grupo 11 (fig. 4).

Finalmente, el grupo 12 se compone de 5 individuos de los estados de San Luís Potosí y Guanajuato, uno proveniente del municipio de Laguna en San Luis Potosí y cuatro de poblaciones del estado de Guanajuato: uno de carretera San José de Iturbide-Mineral de Pozos (5.8 km. al sur de Mineral de Pozos), uno más de Juventino Rosas (4.5 km. al noreste de Juventino Rosas) y dos de Mineral de Pozos (fig. 4).

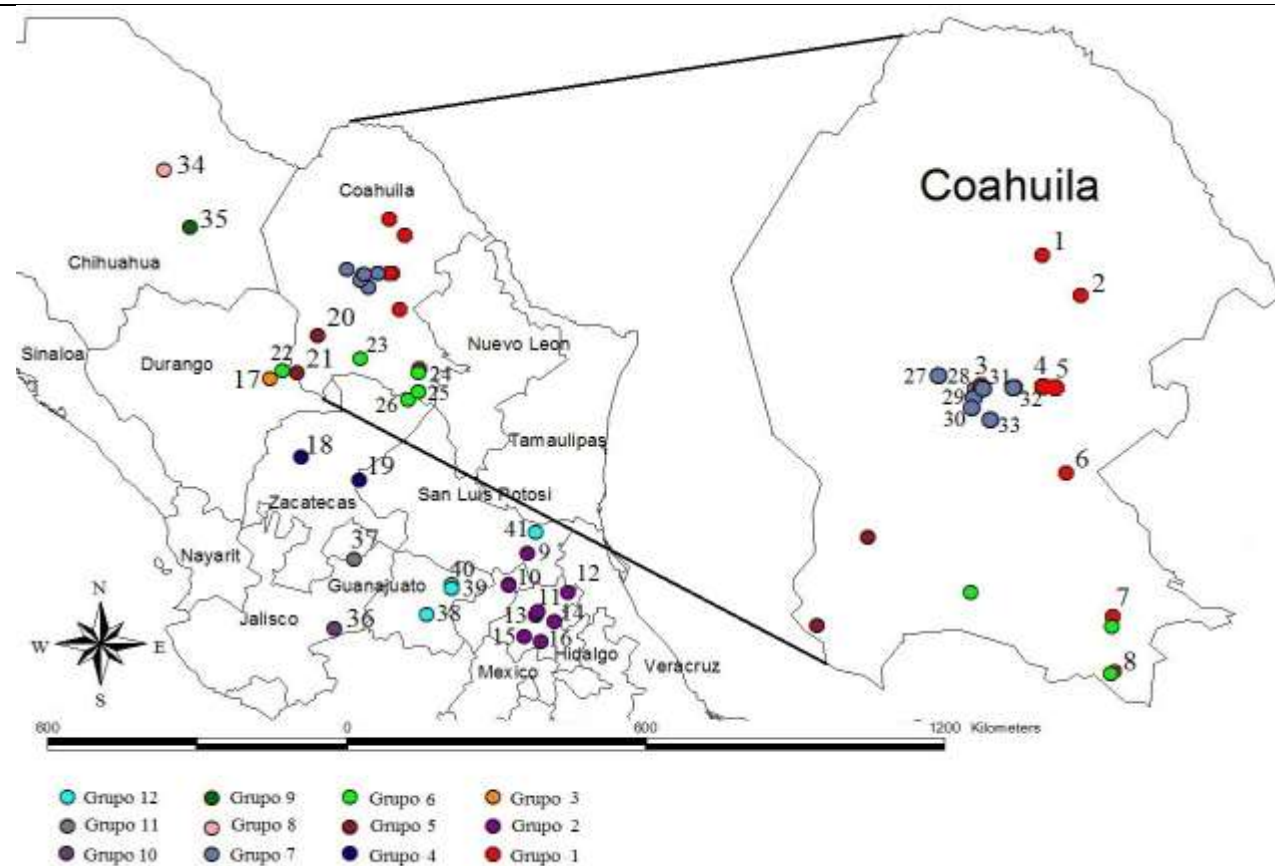


Figura 4. Distribución de los 12 agrupamientos de secuencias recuperados con el método de distancia. Los números indican las poblaciones de colecta. 1=Melchor Múzquiz-Las Rusias. 2= Palau-Minas de Barroterán. 3= Cuatrociénegas-Monclova. 4= El Cañón de Fernández. 5= Sacramento-Monclova. 6= Dolores-Estanque de Norias. 7= Saltillo-Agua Nueva. 8= Saltillo-Concepción de Oro. 9= Aquismón. 10= Valle de Jalpan. 11= Eloxochitlán. 12= Huejutla. 13= Cardonal-Tolantongo. 14= San Agustín Metzquitlán. 15= Progreso de Obregón. 16= San Agustín Tlaxiaca. 17= Cuéncame-Torreón. 18= Río Grande-Saín Alto. 19= Ilesca-Nadadores. 20= San Pedro. 21= Torreón. 22= Nazareno. 23= Parras. 24= Agua Nueva-Saltillo. 25= Saltillo-Concepción de Oro. 26= Concepción de Oro. 27= Rancho la Casita, Ocampo. 28= Montañas atrás de San José del Antejio. 29= San José del Antejio. 30= Cuatrociénegas-Nueva Atalaya. 31= El Cañón Cuatrociénegas. 32= Cuatrociénegas-Monclova. 33= Antiguos-Mineros. 34= Aldama. 35= La Cruz. 36= La Barca. 37= Aguascalientes. 38= Juventino Rosas. 39= San José de Iturbide. 40= Mineral de Pozos. 41= Laguna.

4. DISTANCIAS ENTRE LAS MOTU'S DEL COMPLEJO *ASPIDOSCELIS GULARIS*

Los valores promedio de las divergencias intraespecíficas entre las secuencias del COI fueron superadas casi 17 veces por los valores promedio de las divergencias interespecíficas, con 0.30% y 4.91% respectivamente.

Se calcularon las distancias intraespecíficas promedio para cada taxón, sin embargo para los grupos 3, 8, 9, 10 y 11 no pudieron ser calculadas pues se encontraban representados por un solo individuo (cuadro 5). Por otra parte, se identificaron los valores mínimos y máximos de divergencia intraespecífica (cuadro 5; fig. 5). Los datos indican, que ningun valor promedio de divergencia intraespecífica superó el 2%.

Cuadro 5. Promedios de divergencia intraespecífica e interespecífica y valores mínimos y máximos encontrados para cada MOTU en el complejo *Aspidoscelis gularis*. n/c = valor no calculado puesto que eran taxones representados por un solo individuo.

Distancia intraespecífica				Distancia interespecífica			
MOTU's	Promedio	Mínimo	Máximo	MOTU's	Promedio	Mínimo	Máximo
Grupo 1	0.0065	0.0000	0.0153	Grupo 1	0.0541	0.0153	0.0770
Grupo 2	0.0098	0.0000	0.0171	Grupo 2	0.0514	0.0153	0.0744
Grupo 3	n/c	0.0000	0.0000	Grupo 3	0.0393	0.0084	0.0465
Grupo 4	0.0000	0.0000	0.0000	Grupo 4	0.0386	0.0050	0.0607
Grupo 5	0.0017	0.0000	0.0017	Grupo 5	0.0423	0.0084	0.0670
Grupo 6	0.0037	0.0000	0.0067	Grupo 6	0.0386	0.0050	0.0609
Grupo 7	0.0061	0.0000	0.0135	Grupo 7	0.0553	0.0462	0.0729
Grupo 8	n/c	0.0000	0.0000	Grupo 8	0.0451	0.0153	0.0603
Grupo 9	n/c	0.0000	0.0000	Grupo 9	0.0467	0.0153	0.0641
Grupo10	n/c	0.0000	0.0000	Grupo10	0.0580	0.0424	0.0729
Grupo11	n/c	0.0000	0.0000	Grupo11	0.0607	0.0486	0.0770
Grupo 12	0.0085	0.0000	0.0170	Grupo 12	0.0587	0.0486	0.0767

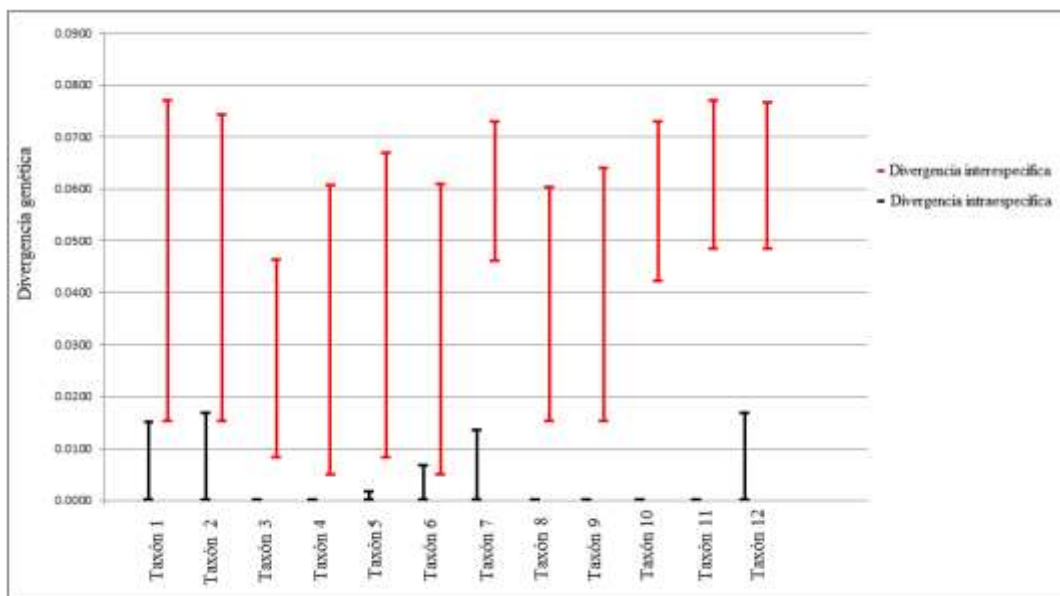


Figura 5. Valores mínimos y máximos encontrados para cada grupo del fenograma construido con ejemplares del complejo *Aspidoscelis gularis*, empleando las distancias corregidas con el modelo K2P.

Para el caso de la divergencia interespecífica, las medias aritméticas (cuadro 6) mostraron que los valores de divergencia entre grupos van de 0.58% a 7.32%, muchas de las muestras presentaron valores menores al 1.8% por lo que no sobrepasan el umbral de discriminación específica. Los valores mínimos y máximos para ambas medidas de divergencia (intra e interespecífica) señalan que existe un solapamiento ligero entre ambas distancias (grupos 1, 2, y 6), por el contrario los grupos 5, 7 y 12 presentaron *gaps* evidentes entre distancias intra e intergrupo (fig. 5).

Cuadro 6. Distancias intraespecífica e interespecífica entre MOTU's en el complejo *Aspidoscelis gularis* (en rojo se muestra la divergencia intraespecífica).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7	Grupo 8	Grupo 9	Grupo 10	Grupo 11	Grupo 12
Grupo 1	0.655%											
Grupo 2	2.331%	0.977%										
Grupo 3	4.416%	4.198%	n/c									
Grupo 4	4.509%	4.358%	1.179%	0.000%								
Grupo 5	4.997%	4.844%	0.922%	1.096%	0.166%							
Grupo 6	4.736%	4.562%	1.093%	0.584%	1.010%	0.366%						
Grupo 7	5.827%	5.616%	5.061%	5.245%	5.345%	5.145%	0.608%					
Grupo 8	5.543%	5.627%	3.868%	4.048%	4.527%	3.890%	5.021%	n/c				
Grupo 9	6.052%	5.487%	4.069%	4.249%	4.733%	4.090%	5.231%	1.526%	n/c			
Grupo 10	6.918%	6.471%	5.476%	6.070%	6.591%	5.831%	6.469%	4.238%	4.442%	n/c		
Grupo 11	7.323%	6.313%	6.696%	5.679%	6.194%	5.850%	5.429%	6.033%	6.016%	6.051%	n/c	
Grupo 12	6.883%	6.725%	5.997%	5.405%	6.325%	5.641%	6.413%	5.281%	5.466%	5.294%	5.141%	0.846%

No todos los *gaps* pudieron ser identificados para las unidades taxonómicas (fig. 5). Sin embargo, los que pudieron ser calculados mostraron que existe divergencia que permite diferenciar a esos grupos (tal es el caso de los grupos 1, 4, 5, 7 y 12). Con respecto a los grupos 2 y 6 se observó solapamiento entre ambas medidas de divergencia y no mostraron diferenciación genética.

Para los grupos 3, 8, 9, 10 y 11 no pudieron ser calculados los valores mínimos y máximos de divergencia intraespecífica puesto que están representados por un solo individuo. Sin embargo, presentan una divergencia interespecífica alta con respecto a los demás grupos.

5. ANÁLISIS DEL MODELO GMYC

Los resultados del análisis filogenético y la aplicación del modelo GMYC permitieron recuperar 7 especies putativas (fig. 6).

La especie 1 está constituida por 5 individuos: 4 provenientes del estado de Guanajuato (Mineral de Pozos, San José de Iturbide y Juventino Rosas) y uno de Laguna en San Luís Potosí (fig. 7). El árbol filogenético indica que esta especie es hermana de la especie 2 (fig. 6) y ambas conforman el grupo más basal del árbol.

La especie 2 está representada por un individuo proveniente de Aguascalientes (camino a Microondas-Los Gallos; 6 km. al este del aeropuerto de Aguascalientes, fig. 7). Esta especie está más estrechamente relacionada con la especie 1 (distribuida en el estado de Guanajuato) que con el resto de los integrantes del complejo *A. gularis* (fig. 6).

La especie 3 está representada por un individuo proveniente de la población de la Barca en el estado de Jalisco y se encuentra más emparentada con la especie 4, constituida por dos individuos provenientes del estado de Chihuahua (poblaciones de Aldama y La Cruz, fig. 6 y 7).

La especie 5 está representada por 12 individuos correspondientes a poblaciones exclusivas al estado de Coahuila (municipios de Sacramento, San José del Anteojo, Antiguos Mineros, Ocampo y de Cuatrociénegas; fig. 7). En el árbol filogenético (fig. 6) se observa que para este clado a nivel más inclusivo se presentan dos grupos, uno formado por las poblaciones de: Rancho la casita en Ocampo, El Cañón de Cuatrociénegas y de carretera Cuatrociénegas-Monclova en Sacramento (que corresponden a la zona Norte y Noreste del valle de Cuatrociénegas) y el otro grupo formado por las poblaciones de: San José del Anteojo, Antiguos Mineros, Ocampo y Nueva Atalaya en Cuatrociénegas (que corresponden a la parte Sur y Noroeste del valle de Cuatrociénegas, Coahuila (fig. 7).

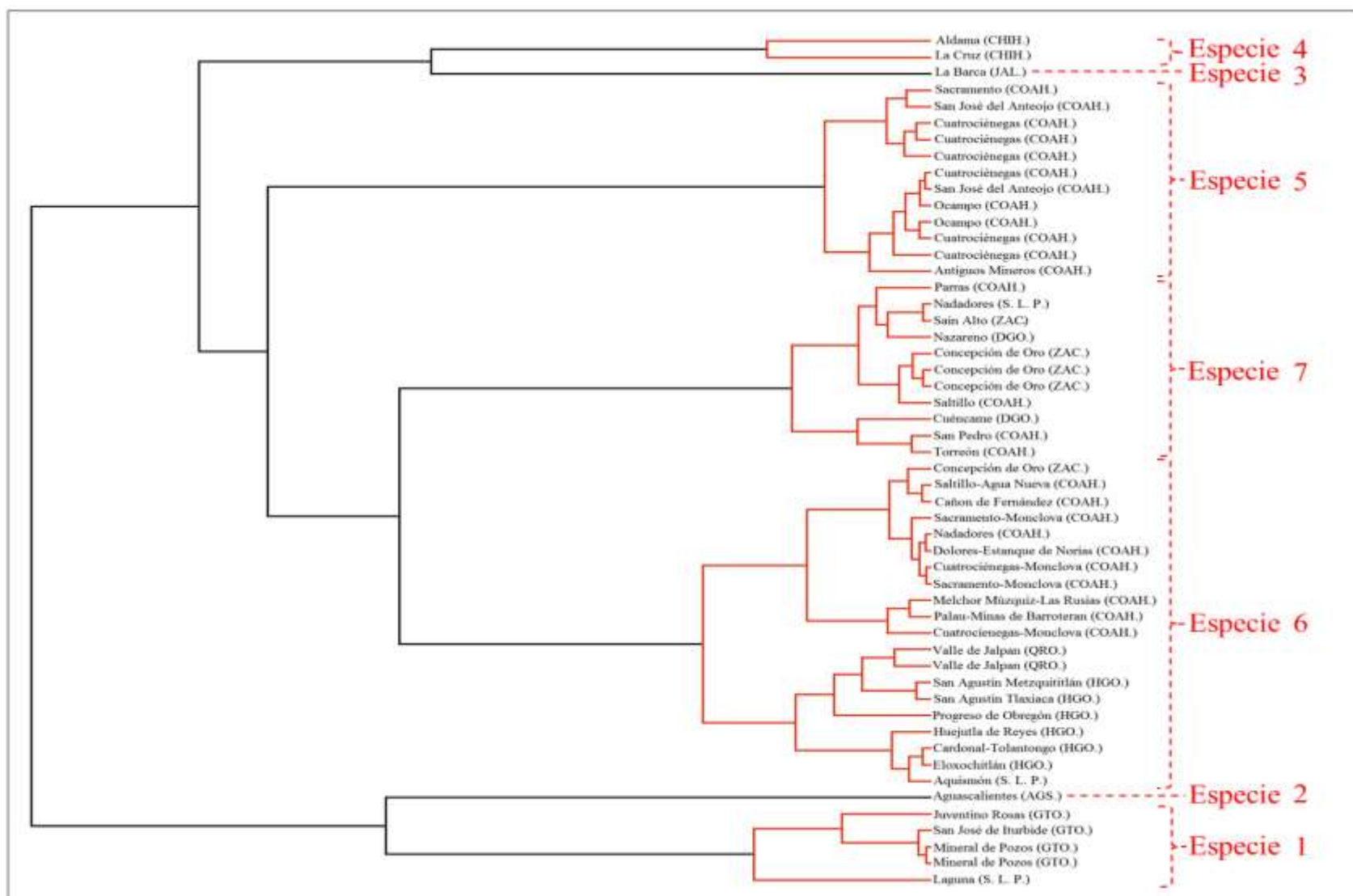


Figura 6. Árbol filogenético construido mediante análisis Bayesianos, el modelo GMYC recuperó 7 especies. Los nodos para las especies presentan valores de probabilidad posterior a ≥ 0.95 . En rojo se muestran las especies formadas por más de dos secuencias, en negro los *singletons*.

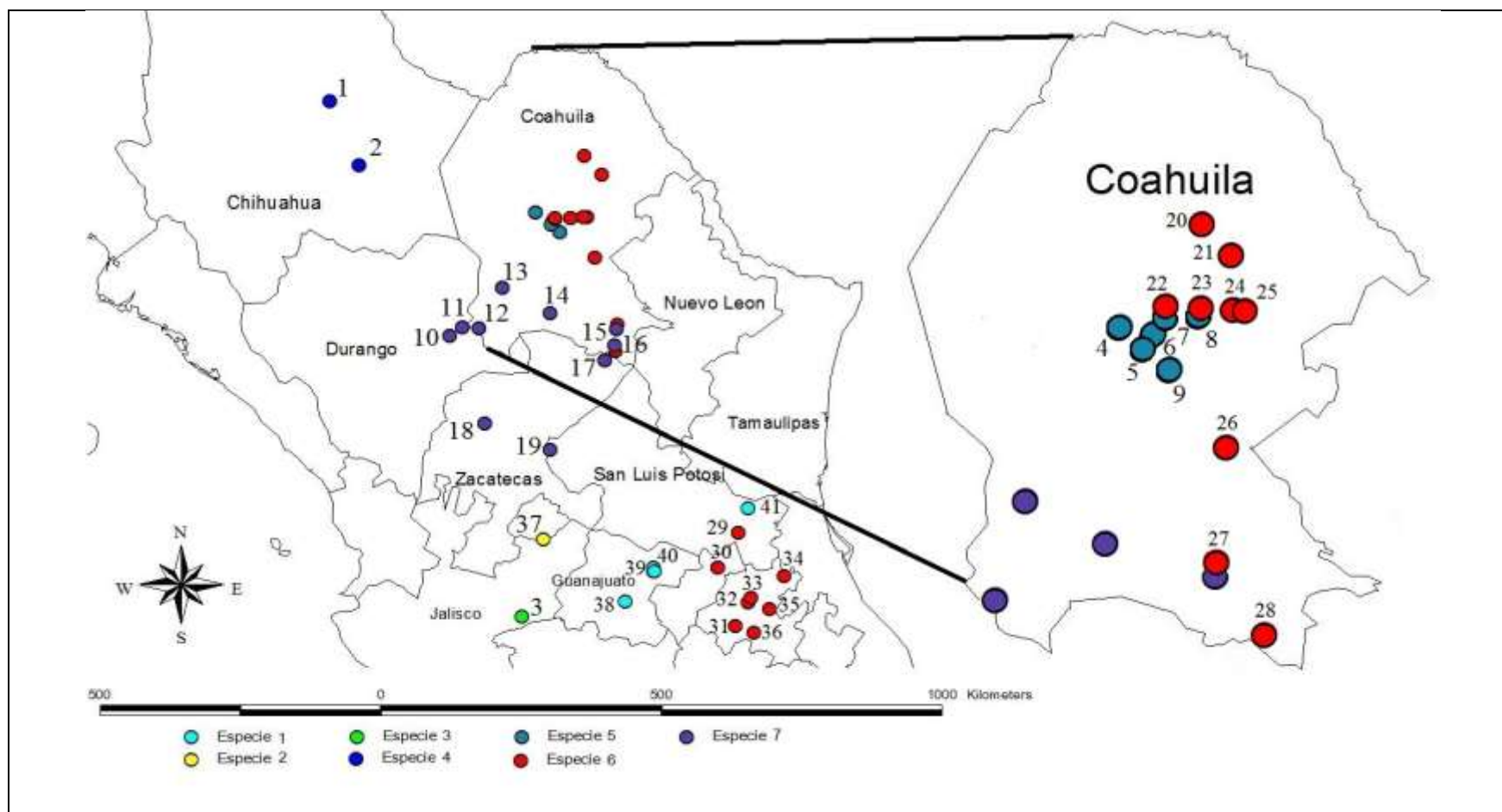


Figura 7. Distribución de las siete especies recuperadas mediante el análisis GMYC. Los números indican las poblaciones de colecta. 1=Aldama. 2=La Cruz. 3=La Barca. 4=Rancho la Casita, Ocampo. 5=Cuatrociénegas-Nueva Atalaya. 6=San José del Anteojo. 7=El Cañón Cuatrociénegas. 8=Cuatrociénegas-Monclova, Sacramento. 9=Antiguos Mineros. 10=Cuéncame. 11=Nazareno. 12=San Pedro-Monclova, Torreón. 13=San Pedro. 14=Parras. 15=Agua Nueva. 16=Saltillo-Concepción de Oro. 17=Concepción de Oro. 18=Saín Alto. 19=Ilesca-El Barril, Nadadores. 20=Melchor Múzquiz-Las Rusias. 21=Palau-Minas de Barroterán. 22=Cañón de Fernández. 23=Cuatrociénegas-Monclova. 24=Sacramento-Monclova. 25=Nadadores. 26=Dolores-Estanque de Norias. 27=Saltillo-Agua Nueva. 28=Saltillo-Concepción de Oro. 29=Aquismón. 30=Valle de Jalpan. 31=Progreso de Obregón. 32=Cardonal-Tolantongo. 33=Eloxochitlán. 34=Huejutla de Reyes. 35=San Agustín Metzquititlán. 36=San Agustín Tlaxiaca. 37=Los Gallos, Aguascalientes. 38=Juventino Rosas. 39=Mineral de Pozos. 40=San José de Iturbide. 41=Laguna.

La especie 6 agrupó a 20 individuos, de los cuales 10 corresponden al estado de Coahuila (carretera Saltillo-Agua Nueva, carretera Sacramento-Monclova, carretera Dolores-Estanque de Norias, carretera Cuatrociénegas-Monclova, carretera Melchor Múzquiz-Las Rusias, carretera Palau-Minas de Barroterán, Nadadores, el Cañón de Fernández y carretera Satillo-Concepción de Oro), uno de Aquismón (San Luís Potosí), dos del Valle de Jalpan, Querétaro y 6 del estado de Hidalgo (San Agustín Metzquitlán, San Agustín Tlaxiaca, Progreso de Obregón, Huejutla de Reyes, Eloxochitlán y carretera el Cardonal-Tolantongo; fig. 7). Esta especie se encuentra distribuida hacia la parte este de la Altiplanicie Mexicana y Sierra Madre Oriental. A nivel más inclusivo, el clado que conforma a esta especie (fig. 6) presenta dos grupos, uno constituido por 11 individuos correspondientes al estado de Coahuila y el otro formado por individuos del Estado de Hidalgo, Querétaro y San Luís Potosí.

Por último la especie 7 fue representada por 11 individuos: 4 provenientes de Coahuila (Parras, Saltillo, San Pedro y Torreón), 3 de Concepción de Oro y uno de Saín Alto en el estado de Zacatecas, dos de Durango (Cuéncame y Nazareno) y uno de Nadadores en San Luís Potosí (fig. 7). Esta especie mostró una distribución amplia en la zona del territorio mexicano conocida comúnmente como Altiplanicie Mexicana y en las mesetas y cordilleras de Coahuila (fig. 7) y filogenéticamente se encuentra más relacionada con la especie 6 (fig. 6).

Finalmente las 7 MOTU's recuperadas como especies putativas mediante el modelo GMYC mostraron una distribución geográfica congruente, además de mostrar similaridad a la reportada por García (2012, fig. 8).

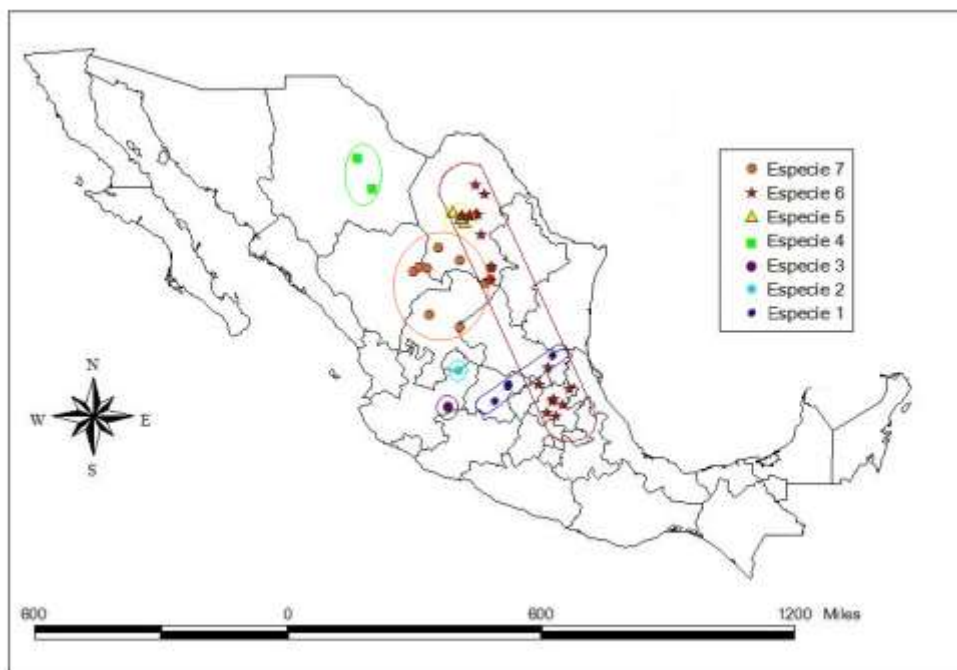


Figura 8. Mapa de distribución geográfica de las especies resultantes del modelo GMYC para el complejo *Aspidoscelis gularis*. Dentro de los óvalos se encuentran los puntos de colecta de los ejemplares utilizados en el presente estudio.

6. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE DISTANCIA PARA EL RECONOCIMIENTO DE LAS 7 ESPECIES RECUPERADAS CON EL MODELO GMYC EN EL COMPLEJO *ASPIDOSCELIS GULARIS*

Una vez recuperadas las 7 especies mediante el modelo GMYC y observado que mostraron correspondencia geográfica y concordancia con la filogenia propuesta anteriormente por García (2012), se procedió a establecer el umbral para la identificación de las especies putativas mediante los métodos de distancia que emplean los códigos de barras genéticos, el cual resultó en un valor del 2.68%.

Mediante este umbral de identificación genética se observó que los valores promedio de las divergencias intraespecíficas fueron superadas casi 6 veces más por los valores promedio de las divergencias interespecíficas, con 1.05% y 5.67% respectivamente.

Debido a que las especies 2 y 3 se encontraban representadas por una sola secuencia no fue posible calcular las distancias intraespecíficas promedio para todas las especies (cuadro 7).

Por otra parte, también se identificaron los valores mínimos y máximos de divergencia intraespecífica e interespecífica (cuadro 7). Para el caso de la divergencia interespecífica entre las especies se observó que los valores varían de 4.13% a 6.87% (cuadro 8).

Cuadro 7. Promedios de divergencia intraespecífica e interespecífica y valores mínimos y máximos encontrados para cada especie recuperada con el modelo GMYC en el complejo *Aspidoscelis gularis*. n/c = valor no calculado puesto que fueron especies representadas por una sola secuencia.

Distancia Intraespecífica				Distancia Interespecífica			
Especie	Promedio	Mínimo	Máximo	Especie	Promedio	Mínimo	Máximo
Especie 1	0.0085	0.0000	0.0170	Especie 1	0.0633	0.0486	0.0767
Especie 2	n/c	0.0000	0.0000	Especie 2	0.0611	0.0486	0.0770
Especie 3	n/c	0.0000	0.0000	Especie 3	0.0625	0.0424	0.0729
Especie 4	0.0153	0.0000	0.0153	Especie 4	0.0516	0.0367	0.0641
Especie 5	0.0061	0.0000	0.0135	Especie 5	0.0566	0.0462	0.0729
Especie 6	0.0159	0.0000	0.0297	Especie 6	0.0559	0.0388	0.0770
Especie 7	0.0073	0.0000	0.0118	Especie 7	0.0498	0.0367	0.0670

Cuadro 8. Distancias intraespecífica e interespecífica entre las especies recuperadas con el modelo GMYC en el complejo *Aspidoscelis gularis* (en rojo se muestra la divergencia intraespecífica).

	Especie 4	Especie 3	Especie 5	Especie 7	Especie 6	Especie 2	Especie 1
Especie 4	0.0152591						
Especie 3	0.0434	n/c					
Especie 5	0.0513	0.0647	0.0060788				
Especie 7	0.0413	0.0598	0.0519	0.0072627			
Especie 6	0.0569	0.0672	0.0573	0.0464	0.0158935		
Especie 2	0.0602	0.0605	0.0543	0.0596	0.0687	n/c	
Especie 1	0.0537	0.0529	0.0641	0.0575	0.0681	0.0514	0.008462

Los valores mínimos y máximos para ambas medidas de divergencia (intra e interespecífica) no mostraron solapamiento y por el contrario se identificó una distancia considerable en los *gaps* (valores que van aproximadamente de 1% a casi 3%, fig. 9).

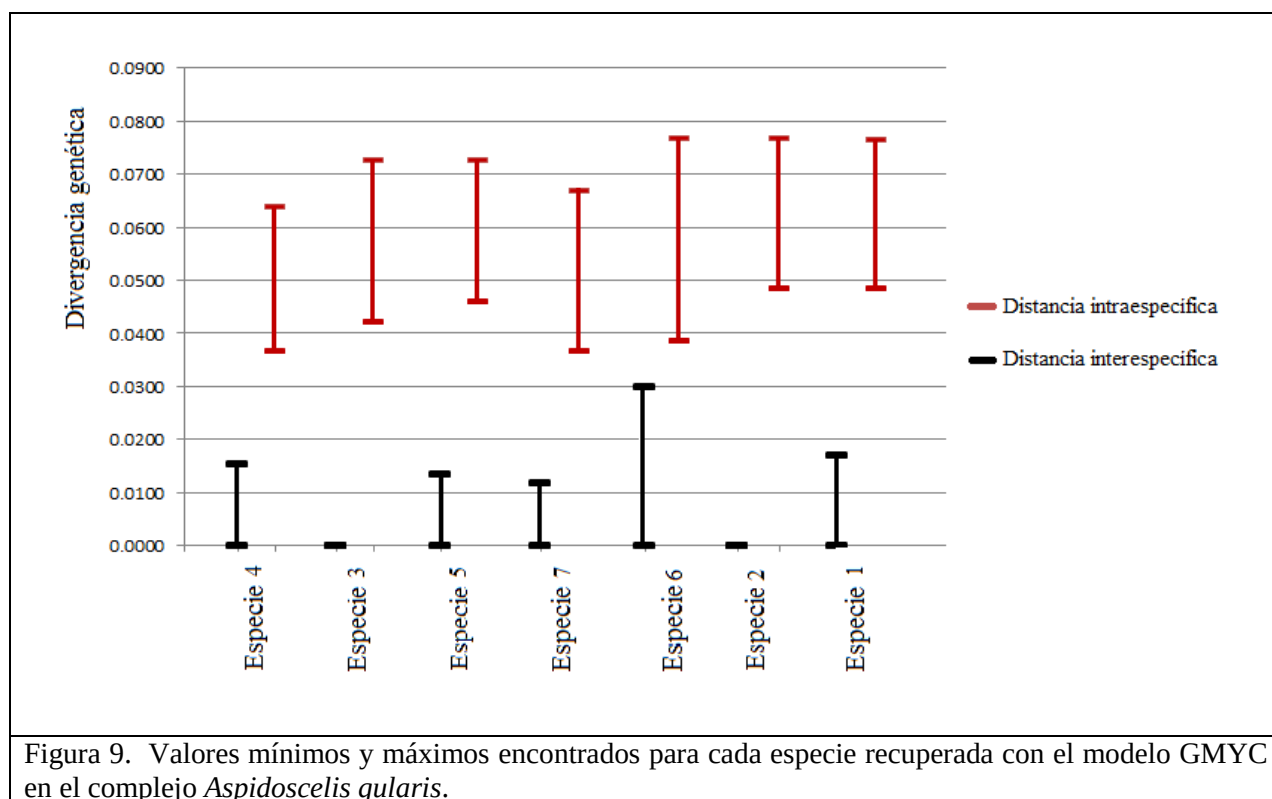


Figura 9. Valores mínimos y máximos encontrados para cada especie recuperada con el modelo GMYC en el complejo *Aspidoscelis gularis*.

No todos los *gaps* pudieron ser identificados para todas las especies (fig. 9), esto se debió a que las especies 2 y 3 fueron representadas por una sola secuencia. Por otra parte se observó que existe una divergencia amplia entre los *gaps*, lo cual permite diferenciar claramente a las 7 especies putativas recuperadas con el análisis filogenético.

VII. DISCUSIÓN

1. DISTANCIAS GENÉTICAS

Los resultados encontrados mostraron que los grupos obtenidos mediante el análisis de distancia de los integrantes del complejo *Aspidoscelis gularis* tienen una divergencia genética baja (4.52%), comparada con la que se ha observado en otros grupos de animales (Hebert *et al.*, 2003b; Hebert *et al.*, 2004 a y b; Tavares y Baker., 2008; Vargas *et al.*, 2009), en los que debido a su divergencia, los autores lograron discriminar sin problemas a las especies mediante el uso de la distancia interespecífica (cuadro 3).

El umbral de 1.8% de divergencia interespecífica empleado arbitrariamente con información de la filogenia previa (García, 2012) permitió identificar 12 MOTU's en el árbol de distancia construido con el método de Neighbor Joining. Estos 12 agrupamientos no presentaron una clara correspondencia con la topología de los clados formados por los taxones establecidos en la filogenia de García (2012), ni con su distribución geográfica. De las 12 MOTU's identificadas en el árbol de distancia, solo el grupo 2 fue congruente con la especie *Aspidoscelis*

sp. 6 propuesta en la filogenia de la autora. Sin embargo, es importante señalar que en el agrupamiento se identificó una muestra proveniente de Aquismón en San Luis Potosí y dos del Valle de Jalpan en Querétaro, muestras que García (2012) no tomó en cuenta en su filogenia y no se sabe en que clado se agrupen y cuáles son sus relaciones con el resto de los taxones del complejo. Tampoco fue posible distinguir las identidades taxonómicas que concurren en la zona del valle de Cuatrociénegas, sitio que la autora señala como el de mayor diversificación y donde propuso tres especies (*Aspidoscelis* sp. 3, *Aspidoscelis* sp. 4 y *Aspidoscelis* sp. 5).

Para el caso de los 11 grupos restantes, se observó una mezcla de taxones diferentes, los cuales tampoco presentaron una clara congruencia geográfica.

Aunado a lo anterior se observó que bajo ninguna de las propuestas para establecer umbrales para diferenciar especies basadas en distancia genética (regla de 10x y valor de divergencia interespecífica del 1.8%) se pudieron distinguir a los taxones propuestos por García (2012). Incluso el valor de divergencia arbitrario (1.8%) distinguió más de 10 grupos, lo cual no concuerda con la filogenia propuesta anteriormente. Lo anterior corrobora la idea de que cuando de manera empírica se emplean valores estandarizados o arbitrarios para identificar especies, los resultados pueden ser erróneos y se llega a subestimar o sobrestimar el número real de taxones, algo similar reportaron Barr *et al.* (2012), quienes también se dieron cuenta de la problemática que existe en la identificación de especies cuando se emplean valores estandarizados o arbitrarios.

Bajo la misma idea, los autores observaron que cuando las medidas de distancia genética (intraespecífica e interespecífica) muestran solapamiento, dificultan la identificación de las especies, haciendo de los métodos de distancia que emplean los códigos de barras genéticos una

herramienta con alto grado de incertidumbre. Algo similar se encontró en el presente estudio, cuando se aplicaron los métodos de distancia y se utilizó un valor umbral. Se observó que los resultados de los valores de distancias genéticas intra e intergrupo de los ejemplares pertenecientes al complejo *Aspidoscelis gularis* mostraron solapamiento (grupos 2 y 6) lo cual se debió a que en esos grupos se encontraron secuencias que mostraron una diferenciación genética significativa (1.7%) a nivel intraespecífico, pero no llegaron al valor de discriminación taxonómica del 1.8% propuesto para diferenciar a las posibles especies y poder ser considerados como unidades taxonómicas independientes.

Sin embargo, se ha visto que cuando los métodos de distancias genéticas se aplican a grupos con dificultades taxonómicas (como el complejo *Aspidoscelis gularis*) pueden llegar a revelar agrupamientos de secuencias que muestran indicios de divergencia genética, estos linajes divergentes pueden ser objeto de estudio en análisis más robustos (p. ej. filogenéticos, revisiones taxonómicas, datos sobre su distribución geográfica, historias de vida, etc.) para posteriormente establecer su identidad taxonómica (Pons *et al.*, 2006).

Meyer y Paulay (2005) señalaron que la existencia de *gaps* amplios en las muestras indican que la discriminación de las especies es acertada. En los 12 agrupamientos de secuencias encontrados se observó que los valores de divergencia intra e interespecíficos entre los integrantes del complejo *A. gularis* no permiten indicar una correcta discriminación debido en gran medida a que algunas de las secuencias de esos agrupamientos presentaban divergencias intraespecíficas cercanas al umbral de 1.8% considerado para delimitar a las especies e influían en el solapamiento entre ambos valores de divergencia.

Los valores umbrales para la diferenciación específica son tema de un debate controvertido que ha surgido desde que se empezó a usar la herramienta del código de barras genético para identificar y descubrir especies (Wiens y Penkroft, 2002; Hebert *et al.*, 2004a; Meyer y Paulay, 2005; Hubert *et al.*, 2008) y se ha visto que en grupos de especies con problemas taxonómicos resulta también complicado establecer sus límites interespecíficos. Con lo anterior se comprueba la idea de que la utilización *a priori* de umbrales de diferenciación genética en taxones con problemas de identidad taxonómica es un error que incide en la identificación de especies, tal es el caso del complejo *Aspidoscelis gularis*, donde utilizando el método de distancia genética no es posible generalizar y tomar como válida la existencia de 12 especies, ya que los métodos de distancia solo agrupan las secuencias con base en su similitud, además de que la delimitación de especies conlleva otro tipo de información como por ejemplo filogenias, trabajo taxonómico, genética de poblaciones, etc., que permitan establecer la identidad de una especie de manera robusta.

Por todo lo anterior y tomando en cuenta los resultados de las distancias genéticas, no fue posible establecer los umbrales de discriminación específica, ni identificar a las especies propuestas con base en la filogenia molecular de García (2012) empleando un valor umbral de diferenciación genética estandarizado o arbitrario.

2. IDENTIFICACIÓN Y DELIMITACIÓN DE ESPECIES MEDIANTE EL MODELO GMYC

El análisis para la delimitación de especies del modelo GMYC permitió distinguir 7 especies potenciales, de las cuales dos se encuentran representadas por una sola secuencia o *singleton* (unidad taxonómica operacional molecular representada por una sola secuencia).

Monaghan *et al.* (2009) señalan que generalmente estas secuencias representan especies nuevas, por lo que se sugiere aumentar el número de muestras para obtener una mayor representatividad de la variación genética.

Por otra parte las 7 especies recuperadas muestran congruencia geográfica, la cual es considerada como una propiedad de las especies (Pons *et al.*, 2006). La distribución geográfica encontrada para los integrantes del complejo fue similar a la presentada por García (2012); por ejemplo, la autora observó que los individuos provenientes de la Altiplanicie Meridional (*Aspidoscelis* sp. 6) se encuentran cercanamente emparentados con los de la zona sur del Valle de Cuatrociénegas (*Aspidoscelis gularis*) y presentan una distribución continua desde la zona sureste de la Altiplanicie Mexicana hacia lo largo de la Sierra Madre Oriental y hasta el noroeste del Valle de Cuatrociénegas, cubriendo los estados de Hidalgo, Querétaro, Veracruz, San Luís Potosí, Tamaulipas, Nuevo León y Coahuila; y fue la misma distribución encontrada en el presente estudio y corresponde a la MOTU nombrada como especie 6 (fig. 7).

Por su parte la especie 7 presentó una distribución geográfica correspondiente a las zonas bajas de las subprovincias del Bolsón de Mapimí y la laguna de Mayrán a la subprovincia Sierra de la Paila, similar a lo que registró García (2012) para el taxón nombrado como *Aspidoscelis* sp. 2. La especie 5 mostró que su distribución concurre en el valle de Cuatrociénegas, abarcando parte de las sub-provincias de las Llanuras Coahuilenses, Sierra de la Paila, Sierra Transversal y Pliegues de Saltillo-Parras.

La especie 4 presentó una distribución en la zona noroeste de la Altiplanicie Mexicana en el estado de Chihuahua, mientras que la especie 3 se encontró distribuida en la zona suroeste de la Altiplanicie Mexicana.

La especie 2 presentó congruencia geográfica hacia la parte sur del estado de Aguascalientes, en la zona conocida como Altiplanicie Meridional. Finalmente la especie 1 se encontró distribuida hacia la parte central de la Altiplanicie Mexicana, en los estados de Guanajuato y San Luis Potosí.

Con lo anterior se observa que geográficamente las 7 MOTU's recuperadas como especies muestran una distribución bien definida, además de congruente, aunado a esto, se observa que esas especies presentan una divergencia genética clara y evidente, que permiten diferenciarlas empleando los métodos de distancia genética, por lo que la herramienta de los códigos de barras resulta útil en la identificación de estos 7 taxones.

Los resultados del modelo GMYC no permitieron identificar como MOTU's independientes a todos los taxones propuestos por García (2012), de los 10 taxones que propuso la autora solamente pudieron ser identificados 4 (*Aspidoscelis scalaris*, *Aspidoscelis* sp. 1, *Aspidoscelis* sp. 2 y *Aspidoscelis* sp. 6).

Aspidoscelis scalaris se encontró representada por la MOTU nombrada como especie 4 del presente estudio. *Aspidoscelis* sp. 2 concuerda (*sensu* García) con un subclado dentro de la MOTU señalada como especie 7 recuperada por el análisis GMYC. *Aspidoscelis* sp. 1 (*sensu* García) se encontró representada por las especies 1 y 2 recuperadas por el modelo GMYC. Finalmente *Aspidoscelis* sp. 6 (*sensu* García) fue representada por la especie 6, pero debido a que dentro del clado que conforma a esta especie se observa una separación clara entre los individuos de Coahuila y los del Estado de Hidalgo y poblaciones cercanas (en la zona conocida como Altiplanicie Meridional), se considera como un taxón independiente. Algo similar fue encontrado por García (2012) ya que en su análisis filogenético mostró que las poblaciones del estado de

Hidalgo tienen como taxón hermano a las poblaciones de Coahuila (*Aspidoscelis gularis*, *sensu* García, 2012), con una distribución hacia la zona noroeste del valle de Cuatrociénegas y el norte de la Altiplanicie Mexicana.

Con respecto a las MOTU's restantes recuperadas por el modelo GMYC se observó que presentaban agrupamientos de diferentes taxones de García (2012). Por ejemplo, la MOTU nombrada como especie 5 agrupó ejemplares de los taxones de *Aspidoscelis septemvittata*, *Aspidoscelis* sp. 3 y *Aspidoscelis* sp. 5 (*sensu* García). La MOTU nombrada como especie 7 agrupó a ejemplares de *Aspidoscelis semifasciata*, *Aspidoscelis* sp. 2 y *Aspidoscelis* sp. 5 (*sensu* García). Finalmente la especie 3 no representó a ningún taxón propuesto por García (2012), esto fue debido a que se trata de ejemplares de una población que la autora no tomó en cuenta para su análisis. Sin embargo, presenta una distribución bien definida hacia la zona suroeste de la Altiplanicie Mexicana y debido a que su divergencia genética es claramente evidente al compararla con las otras MOTU's se sugiere que se trata de un taxón nuevo, por lo que se propone aumentar el número de muestras para obtener una mejor representatividad genética y anexarla a la filogenia actual para corroborar su estado taxonómico.

Ceccarelli *et al.* (2012) y Bribiesca *et al.* (2013) mostraron que las especies recuperadas por el análisis GMYC presentan mayor congruencia con las especies identificadas morfológicamente, en el presente estudio no se tienen aún bien establecidos los caracteres morfológicos que puedan diagnosticar a las especies recuperadas. Sin embargo, las 7 MOTU's señaladas como especies potenciales pueden ser objeto de revisiones taxonómicas para encontrar los caracteres diagnósticos de cada una y establecer su identidad taxonómica.

El análisis GMYC mostró un menor número de especies recuperadas en comparación con el criterio de distancia genética de 1.8% (con 7 y 12 MOTU's respectivamente). Sin embargo, el análisis filogenético junto con la aplicación del modelo GMYC mostró mayor congruencia geográfica respecto a los grupos de especies conformados.

3. IDENTIFICACIÓN DE LAS 7 ESPECIES RECUPERADAS POR EL ANÁLISIS FILOGENÉTICO EMPLEANDO LAS DISTANCIAS GENÉTICAS.

Las 7 MOTU's recuperadas por el modelo GMYC mostraron relaciones filogenéticas y correspondencia geográfica similares a las encontradas en la filogenia establecida por García (2012). Una vez recuperadas estas 7 especies potenciales, se observó que los métodos de distancia que emplea la herramienta del código de barras permite una correcta identificación mediante la aplicación del umbral de 2.68%. Se observó que las medidas de distancias genéticas (intraespecífica e interespecífica) no mostraron solapamiento. Contrariamente, mostraron “gaps” que como señalan Meyer y Paulay (2005) indican una clara identificación de especies.

Se ha observado que emplear valores arbitrarios de distancia genética es un problema en el descubrimiento de las especies y que depende específicamente de los umbrales que se usen para delimitarlas (Hickerson *et al.*, 2006), por lo que los métodos de distancia para la delimitación de especies deben ser usados con ciertas precauciones, principalmente en especies que presentan problemas taxonómicos (p. ej. el complejo *Aspidoscelis gularis*), pues al no tener clara su identidad taxonómica es posible que por simple similitud entre secuencias se pueda sobrestimar o subestimar el número de especies, además de omitir la diversidad genética, su historia evolutiva a la cual están sujetas y sus patrones de distribución geográfica.

Se resalta que la aplicación de los métodos de distancia que han sido empleados en conjunto con los códigos de barras ayudan en primera instancia a detectar problemas taxonómicos (p. ej. linajes divergentes, especies crípticas), posteriormente pueden emplearse análisis más robustos (como los filogenéticos) para conocer la identidad taxonómica de las especies y consecutivamente establecer un umbral de diferenciación genética (Paz *et al.*, 2011) exclusivo a la especie o grupo en cuestión.

Aunque la herramienta del código de barras genético ha sido propuesta y principalmente utilizada en especies bien delimitadas, mediante este estudio se demuestra que también puede ser utilizado en complejos de especies, siempre y cuando se incluyan los métodos filogenéticos para definir a las especies. Con base en el modelo filogenético de coalescencia-especiación, se recuperaron siete especies dentro del complejo *Aspidoscelis gularis*, las cuales pueden ser identificables claramente bajo los métodos de distancia. Además, dichas especies presentan una correspondencia geográfica clara y relaciones filogenéticas similares a las de la filogenia establecida previamente por García (2012).

Ante la crisis de la pérdida de especies que se vive actualmente, la herramienta del código de barras puede ser un método usado para identificar de manera rápida linajes divergentes y en casos excepcionales especies, que por una parte contribuyan al conocimiento de la biodiversidad y todos los procesos que conlleva (Avise, 2000; Will *et al.*, 2005) y por otra permita establecer políticas y lugares prioritarios para conservar a las especies, ya que muchas veces los métodos invasivos tienden a destruir y reducir el número de individuos en las poblaciones y por ende alterar los procesos evolutivos subyacentes.

VIII. CONCLUSIONES

- Se obtuvo la secuencia parcial del gen mitocondrial citocromo oxidasa I, reconocida como código de barras genético en animales, de 52 ejemplares, las cuales presentaron diferentes niveles de divergencia entre sí.
- Utilizando el criterio del umbral de 1.8% de distancia genética, los códigos de barras genéticos no resultaron ser funcionales en la identificación de las especies que conforman al complejo *Aspidoscelis gularis*. Este método sobreestimó el número de especies que conforman al complejo.
- El método filogenético y la aplicación del modelo GMYC permitieron identificar a 7 MOTU's, las cuales podrían ser señaladas como especies identificables mediante los códigos de barras genéticos. La diferenciación genética entre esas especies fue clara empleando los métodos de distancia bajo el umbral del 2.68%, además la distribución geográfica fue congruente con la filogenia.

IX. LITERATURA CITADA

Applied Biosystems. 2002. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing: Protocol. 72 p.

April, J., R. L. Mayden, R. H. Hanner y L. Bernatchez. 2011. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, USA 108: 10602–10607.

Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, USA. 447 p.

Barcode of Life Database, www.boldsystems.org

Barrett, R. D. y P. D. Hebert. 2005. Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83: 481–491.

Barr, N. B., M. S. Islam, M. de Meyer y B. A. McPherson. 2012. Molecular Identification of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) using DNA Sequences of the COI Barcode Region. *Annals of the Entomological Society of America* 105: 339-350.

Borisenko, A. V., J. E. Sones y P. D. N. Hebert. 2009. The front-end logistics of DNA barcoding: challenges and prospects. *Molecular Ecology Resources* 9: 27-34.

Bribiesca, C. G., F. A. Solís, F. A. Laguarda y A. Zaldívar. 2013. Identification of echinoderms (Echinodermata) from an anchialine cave in Cozumel Island, Mexico, using DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources* 6: 1137-1145.

Carolan, J. C., T. E. Murray, Ú. Fitzpatrick, J. Crossley, H. Schmidt, B. Cederberg, L. McNally, R. Paxton, H. Williams y M. Brown. 2012. Colour Patterns Do Not Diagnose Species: Quantitative Evaluation of a DNA Barcoded Cryptic Bumblebee Complex. *PLoS ONE* 1: 1-10.

Ceccarelli, F. S., M. J. Sharkey y A. Zaldívar. Species identification in the taxonomically neglected, highly diverse, neotropical parasitoid wasp genus *Notiospathius* (Braconidae:

Doryctinae) based on an integrative molecular and morphological approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 1: 485–495.

Correa, M. M., M. L. Jiménez y F. J. D. León. 2010. Testing species boundaries in *Pardosa sierra* (Araneae: Lycosidae) using female morphology and COI mtDNA. *The Journal of Arachnology* 38: 538–554.

Costa, F. O., J. R. de Waard, J. Boutillier, S. Ratnasingham, R. T. Dooh, M. Hajibabaei y P. D. N. Hebert. 2007. Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 64: 272–295.

Clare, E. L., B. K. Lim, M. D. Engstrom, J. L. Eger y P. D. N. Hebert. 2007. DNA barcoding of Neotropical bats: Species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7: 184–190.

Crother, B. I., J. Boundy, J. A. Campbell, K. de Queiroz, D. R. Frost, R. Highton, J. B. Iverson, P. A. Meylan, T. W. Reeder, M. E. Seidel, J. W. Sites, Jr., T. W. Taggart, S. G. Tilley y D. B. Wake. 2001. Scientific and standard English names of amphibians and reptiles of North America north of Mexico, with comments regarding the confidence in our understanding. *Herpetological Circular* 29.

De Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biologists* 56: 879–886.

Dixon, J. R., C. S. Lieb y C. A. Ketschersid. 1971. A new lizard of the genus *Cnemidophorus* from Querétaro, México. *Herpetologica* 27: 344–354.

Duellman, W. E. y R. G. Zweifel. 1962. A synopsis of the lizards of the *sexlineatus* group (genus *Cnemidophorus*). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 123: 155–210.

Ferri, E., M. Barbuto, O. Bain, A. Galimberti, S. Uni, R. Guerrero, H. Ferté, C. Bandi, C. Martin y M. Casiraghi. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* 6: 1.

- Ferrusquía-Villafranca, I. 1998. Geología de México: una sinopsis. *In* Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. p. 3-108.
- Fetzner, J. 1999. Extracting high-quality DNA from shed reptiles skins: A simplified method. *Biotechniques* 26: 1052–1054.
- García, C. M. C. 2012. Relaciones filogenéticas y delimitación de especies en el complejo *Aspidoscelis gularis* (Sauria: Teiidae). Tesis de Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. 88 p.
- Hawkins, M., J. R. Sites y B. Noonan. 2007. *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae) of the Guiana Shield: using DNA barcodes to assess identity and diversity. *Zootaxa* 1540: 61–67.
- Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak, y C. M. Francis. 2004a. Identification of Birds through DNA Barcodes. *Public Library of Science Biology* 2: 1657-1663.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen y W. Hallwachs. 2004b. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 101: 14812–14817.
- Hebert, P. D. N. y T. R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology* 54: 852-859.
- Hebert, P., A. Cywinska, S. Ball y J. de Waard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: 313-322.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham, J. R. de Waard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 270: 596–S599.
- Hickerson, M. J., C. P. Meyer y C. Moritz. 2006. DNA Barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. *Systematic Biology* 55: 729-739.
- Hubert, N., R. Hanner, E. Holm, N. E. Mandrak, E. Taylor, M. Burridge, D. Watkinson, P.

- Dumont, A. Curry, P. Bentzen, J. Zhang, J. April y L. Bernatchez. 2008. Identifying Canadian Freshwater Fishes through DNA Barcodes. PLoS ONE 6: 1.
- Ivanova, V. N., J. R. de Ward., M. Hajibabaei y P. D. N. Hebert. 2006. Protocols for High-Volume DNA Barcode Analysis. Consortium for the Barcode of Life. Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario. Canada 24 p.
- Ivanova, V. N., A. V. Bosirenko y P. D. N. Hebert. 2009. Barcoding methodology and applications. Express barcodes: racing from specimen to identification. Molecular Ecology Resources 9: 35-41.
- Janzen, D. H., W. Hallwachs, P. Blandin, J. M. Burns, J. M. Cadiou, I. Chacon, T. Dapkey, A. R. Deans, M. E. Epstein, B. Espinoza, J. G. Franclemont, W. A. Haber, M. Hajibabaei, J. P. Hall, P. D. N. Hebert, I. D. Gauld, D. J. Harvey, A. Hausmann, I. J. Kitching, D. Lafontaine, J. F. Landry, C. Lemaire, J. Y. Miller, J. S. Miller, L. Miller, S. E. Miller, J. Montero, E. Munroe, S. R. Green, S. Ratnasingham, J. E. Rawlins, R. K. Robbins, J. J. Rodríguez, R. Rougerie, M. J. Sharkey, M. A. Smith, M. A. Solís, J. B. Sullivan, P. Thiaucourt, D. B. Wahl, S. J. Weeller, J. B. Withfield, K. R. Willmott, D. M. Wood, N. E. Woodley y J. J. Wilson. 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. Molecular Ecology Resources 9: 1-26.
- Jones, M., A. Ghoorah y M. Blaxter. 2011. jMOTU and taxonator: turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. PLoS ONE 4: 1-10.
- Hebert, I. D. Gauld, D. J. Harvey, A. Hausmann, I. J. Kitching, D. Lafontaine, J. F. Landry, C. Lemaire, J. Y. Miller, J. S. Miller, L. Miller, S. E. Miller, J. Montero, E. Munroe, S. R. Green, S. Ratnasingham, J. E. Rawlins, R. K. Robbins, J. J. Rodríguez, R. Rougerie, M. J. Sharkey, M. A. Smith, M. A. Solis, J. B. Sullivan, P. Thiaucourt, D. B. Wahl, S. J. Weller, J. B. Whitfield, K. R. Willmott, D. M. Wood, N. E. Woodley y J. J. Wilson. 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. Molecular Ecology Resources 8:1-26.
- Lanteri, A. A. 2007. Código de Barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. Revista de la Sociedad Entomológica Argentina 66: 15-25.

- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentn, I. M. Wallace, A. Wilm, R. López, J. D. Thompson, T. J. Gibson y D. G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lipscomb, D., N. Platnick y Q. Wheeler. 2003. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 65-66.
- Lohse, K. 2009. Can mtDNA barcodes be used to delimit species? A response to Pons *et al.* (2006). *Systematics Biology* 58: 439–442.
- Lowenstein, J. H., T. W. Osmundson, S. Becker, R. Hanner y M. L. Stiassny. 2011. Incorporating DNA barcodes into a multi-year inventory of the fishes of the hyperdiverse Lower Congo River, with a multigene performance assessment of the genus *Labeo* as a case study. *Mitochondrial DNA* 22: 52–70.
- Mabragaña, E., J. M. Díaz de Astarloa, R. Hanner, J. Zhang y M. González Castro. 2011. DNA Barcoding Identifies Argentine Fishes from Marine and Brackish Waters. *PLoS ONE* 12.
- Manríquez, N. L. 2002. Origen y diversidad clonal en las especies de lagartijas partenogenéticas del complejo *Cnemidophorus cozumela* (Reptilia: Teiidae). Tesis de doctorado. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 108 p.
- Manríquez, N. L., y E. Salgado. 2009. Obtención de secuencias de DNA Manual de prácticas para la asignatura de Sistemática Molecular. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 8 p.
- Meyer, C.P. y G. Paulay. 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology* 3:422.
- Mittermeiner, R. A. 1988. Primate diversity and the tropical forest: case studies from Brazil and Madagascar and the importance of the megadiversity countries. *In* Biodiversity, E. Wilson (ed.). Biodiversity. National Academic Press. Washington, D. C. p. 54-145.
- Moritz, C. y C. Cicero. 2004. DNA barcoding: promise and pitfalls. *Systematic Biology* 2:1529-1531.

- Monaghan, M. T., R. Wild, M. Elliot, T. Fujisawa, M. Balke, D. J. Inward, D. C. Lees, R. Ranaivosolo, P. Eggleton, T. G. Barraclough y A. P. Vogler. 2009. Accelerated Species Inventory on Madagascar Using Coalescent-Based Models of Species Delineation. *Systematic Biologists* 3: 298-311.
- Nagy, Z.T., G. Sonet, F. Glaw y M. Vences. 2012. First Large-Scale DNA Barcoding Assessment of Reptiles in the Biodiversity Hotspot of Madagascar, Based on Newly Designed COI Primers. *PLoS ONE* 3: 1-11.
- Orozco, L. D. 2011. Patrones de coloración y escutelación en poblaciones del complejo *Aspidoscelis gularis* en el estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. 51 p.
- Oceguera, A., V. León-Règagnon y M. Siddall. 2010. DNA barcoding reveals Mexican diversity within the freshwater leech genus *Helobdella* (Annelida: Glossiphoniidae). *Mitochondrial DNA* 21: 24-29.
- Packer, L., J. Gibbs, C. Sheffield y R. Hanner. 2009. DNA Barcoding and the mediocrity of morphologistsinclairry. *Molecular Ecology Resources* 9: 42–50.
- Palumbi, S. R. 1996. Nucleic Acids II: The polymerase chain reaction. *In* *Molecular Systematics*, D. M. Hillis, C. Moritz y B. K. Mable (eds.). Sinauer Associates, Sunderland, MA. p. 205-247.
- Paz, A., M. González y A. Crawford. 2011. Códigos de barras de la vida: Introducción y perspectiva. *Acta Biológica Colombiana* 3: 161-176.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha y R. Salas. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, *In* *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio. México. p. 415-435.

- Pons, J., T. G. Barraclough, J. Gomez Zurita, A. Cardoso, D. P. Durán, S. Hazell, S. Kamoun, W. D. Sumlin y A. P. Vogler. 2006. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Systematic Biologists* 9: 595-609.
- Ratnasingham, S. y P. D. N. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes* 7: 355–364.
- Reeder, T. W., C. J. Cole y H. C. Dessauer. 2002. Phylogenetic Relationships of Whiptail Lizards of the Genus *Cnemidophorus* (Squamata: Teiidae): A Test of monophyly, reevaluation of karyotypic evolution, and review of hybrid origins. *American Museum Novitates* 3365: 1-61.
- Reid, B. N., M. Le, W. P. McCord, J. B. Iverson, A. Georges, T. Bergmann, G. Amato, R. Desalle y E. Narro. 2011. Comparing and combining distance-based and character-based approaches for barcoding turtles. *Molecular Ecology Resources* 11: 956–967.
- Romero, P. y R. Ramírez. 2011. Divergencia intraespecífica y código de barras de ADN en *Systrophiahelicycloides* (Gastropoda, Scolodontidae). *Revista Peruana de Biología* 2: 201-208.
- Rzedowski, J. 1973. Geographical relationships of the flora of Mexican dry regions. *In* Vegetation and vegetational history of Northern Latin America, A. Graham (ed.). Amsterdam, Elsevier. p. 61-72.
- Sbordoni, V. 2010. Strength and limitations of DNA barcode under the multidimensional species perspectives. *In* Tool for identifying biodiversity: Progress and problems, P. L. Nimis y R. VignesLebbe (eds.), p. 275-280.
- Simpson, R. J., S. Craig y J. Grahame. 1999. Extracting High-Quality DNA from Shed Reptile Skins: A Simplified Method. *BioTechniques* 26: 1052-1054.
- Shen, Y., X. Chen y R. W. Murphy. 2013. Assessing DNA Barcoding as a Tool for Species Identification and Data Quality Control. *PLoS ONE* 2: 1-5.
- Smith, M. A., J. J. Rodriguez, J. B. Whitfield, A. R. Deans, D. H. Janzen, W. Hallwachs y P. D. N. Hebert. 2008. Extreme diversity of tropical parasitoid wasps exposed by iterative

- integration of natural history, DNA barcoding, morphology, and collections. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 105: 12359–12364.
- Staden, R. 1996. The Staden Sequence Analysis Package. Molecular Biotechnology 5: 233-241.
- Steinke, D., T. S. Zemlak y P. D. N. Hebert. 2009. Barcoding Nemo: DNA-Based Identifications for the Ornamental Fish Trade. PLoS ONE 7: 1-5.
- Tavares, E.S. y A. J. Baker. 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. BMC Evolutionary Biology 8: 1-81.
- The Barcode of Life Data System. www.barcoding.org. Consultado el día 11/11/2013.
- Tubaro, P. L. y J. M., Diaz de Astarloa. 2008. ¿Qué bicho es? Ciencia Hoy 18: 39-48.
- Vargas, S. M., F. C. F. Araújo y F. R. Santos. 2009. DNA barcoding of Brazilian sea turtles (Testudines). Genetics and Molecular Biology 32: 608–612.
- Vences, M., M. Thomas, A. van der Meijden, Y. Chiari y D. R. Vieites. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. Frontiers in Zoology 1: 1-5.
- Walker, J. M. 1981a. Systematics of *Cnemidophorus gularis*. I. Reallocation of populations currently allocated to *Cnemidophorus gularis* and *Cnemidophorus scalaris* in Coahuila, Mexico. Copeia 1981: 826–849.
- Walker, J. M. 1981b. Systematics of *Cnemidophorus gularis*. II. Specific and subspecific identity of the Zacatecas whiptail (*Cnemidophorus gularis semiannulatus*). Copeia 1981: 850.
- Walker, J. M., J. A. Lemos Espinal, J. E. Cordes, H. L. Taylor y H. M. Smith. 2001. Allocation of populations of whiptail lizards to *septemvittatus* Cope 1892 (Genus *Cnemidophorus*) in Chihuahua, México and the *scalaris* problem. Copeia 2001: 747-765.
- Ward, R. D, Zemlak T. S, Innes B. H, Last P. R, y P. D. N., Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. Philosophical Transaction of the Royal Society of London 360: 1847-1857.
- Ward, R. D., B. H. Holmes y T. D. O' Hara. 2008. DNA Barcoding discriminates echinoderm species. Molecular Ecology Resources 8: 1202-1211.

- Wiens, J. J. y T. A. Penkrot. 2002. Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematics Biologists* 51: 69–91.
- Will, K.W., B. D. Mishler y Q. D. Wheeler. 2005. The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biologists* 54: 844–851.
- Wheeler, Q. D. P. 2004. Taxonomic triage and the poverty of phylogeny. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 359: 571-583.
- Wright, J. W. 1993. Evolution of the lizards of the genus *Cnemidophorus*. *In* Biology of whiptail lizards (genus *Cnemidophorus*), J. W. Wright y L. J. Vitt (eds.). Norman, Oklahoma Museum of Natural History. p. 27:81.
- Yoo, H., J. Eah, J. Kim, Y. J. Kim, M. S. Min, W. K. Paek, H. Lee y C. B. Kim. 2006. DNA Barcoding Korean Birds. *Molecules and Cells* 22: 323-327.

ANEXO 1

Protocolo de extracción de DNA. Fetzner, 1999.

1. Un pedazo de aproximadamente 1 centímetro cuadrado de piel mudada o tejido se coloca en 900 mL de buffer de lisis celular (10 mM Tris-base, 100 mM de EDTA, sulfato dodecil sódico al 2% [SDS], pH 8,0) y 9 ml de proteinasa K (20 mg / ml). La muestra es mezcla a fondo y se coloca en baño de agua a 55 ° C durante varias horas.
2. La muestra se retira del baño y se enfría a temperatura ambiente (la piel no se disuelve después de la digestión con proteinasa K, pero el DNA es liberado en la solución). Una vez que la muestra alcanza la temperatura ambiente, se agregan 4ml de RNasa A (10 mg / ml) a la muestra y se coloca a 37 ° C en baño de agua durante una hora.
3. Posteriormente se deja enfriar a temperatura ambiente y se agregan 300 µl de acetato de amonio 7.5 M. la muestra se agita en el vortex por 10 segundos y se deja enfriar en hielo por 10 o 15 minutos.
4. Una vez retirada del hielo se centrifuga a velocidad máxima (ca.13-14k rpm) durante 3 minutos para poder eliminar los restos de piel, SDS y restos celulares. (A veces los restos de la piel no se precipitan correctamente, de modo que el siguiente paso es necesario).
5. Se extrae tanto como sea posible la mayor parte del sobrenadante y se transfiere a un nuevo tubo microcentrifuga de 1,5-ml. Después se centrifuga a una velocidad superior a la adicional por unos 2-3 minutos para sedimentar las partículas restantes.
6. A continuación el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de 2-mL que contiene 900 µl de isopropanol y se invierte suavemente sobre la mezcla. Si se llegan a observar sedimentos después de la adición de isopropanol la muestra puede ser colocada a -20 °C durante una noche, o puede ser centrifugada a máxima velocidad (16000 x g) durante dos minutos para sedimentar el botón de DNA en la parte inferior del tubo.
7. Después de la centrifugación se retira el isopropanol y se lava el botón de DNA con 500 µl de etanol al 70%. Se centrifuga la muestra por dos minutos y se retira el etanol.

Posteriormente la muestra se coloca en un concentrador de vacío hasta que todos los restos de etanol se hayan evaporado.

8. Finalmente se vuelve a resuspender el botón de DNA con 30-100 μ l de TE buffer (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) dependiendo del tamaño de la muestra.

Protocolo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Modificado de Palumbi, 1996.

Para una reacción de 25 µl. Se muestran las cantidades y concentraciones recomendadas:

Reacción	Ejemplar	DNA	Primer 1	Primer 2	dNTP's (2 mM)	Buffer (10x)	MgCl ₂ (20 x)	Taq	H ₂ O
1	Ejemplar 1	1 µl	0.2 µl	0.2 µl	1 µl	2 µl	1.5 µl	0.15 µl	18.95 µl
2	Ejemplar 2	1 µl	0.2 µl	0.2 µl	1 µl	2 µl	1.5 µl	0.15 µl	18.95 µl
3	Ejemplar 3	1 µl	0.2 µl	0.2 µl	1 µl	2 µl	1.5 µl	0.15 µl	18.95 µl
4	Ejemplar4	1 µl	0.2 µl	0.2 µl	1 µl	2 µl	1.5 µl	0.15 µl	18.95 µl
5	Ejemplar5	1 µl	0.2 µl	0.2 µl	1 µl	2 µl	1.5 µl	0.15 µl	18.95 µl

1. Hacer una mezcla madre con la cantidad total de los primers, dNTP's, Buffer, MgCl₂, Taq polimerasa y colocar 5.05 µl en cada tubo de reacción.
2. Posteriormente agregar el DNA genómico a cada tubo de reacción.
3. Agregar el agua y mezclar.
4. Colocar los tubos de reacción en el termociclador, tomando en cuenta los siguientes parámetros:

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización Inicial	96	3 min
38 ciclos		
Desnaturalización	96	30 s
Alineamiento	48	30 s
Elongación	72	60 s
Elongación final	72	5 min

Protocolo para la purificación de los productos de PCR (Precipitación con Polietilen-glicol)

1. Transferir los productos de la PCR a un tubo de 1.5 ml y agregar 20 µl de PEG al 20%-NaCl 2.5 M.
2. Colocar los tubos en baño maría a 37 °C durante 20 minutos.
3. Centrifugar durante 20 minutos a velocidad máxima.
4. Eliminar el sobrenadante.
5. Agregar 150 µl de etanol al 80% frío (-20 °C).
6. Centrifugar durante 10 minutos a velocidad máxima.
7. Eliminar el sobrenadante.
8. Agregar a los tubos 150 µl de etanol al 95% frío (-20 °C).
9. Centrifugar a velocidad máxima durante 10 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante.
11. Colocar los tubos en un concentrador de DNA, a temperatura media (50-60 °C) por 10 minutos o hasta que el alcohol se haya evaporado.
12. Resuspender el botón de DNA en 10-15 µl de dH₂O. Final del formulario

ANEXO 2. LOCALIDADES DE COLECTA DE LOS EJEMPLARES UTILIZADOS EN EL PRESENTE ESTUDIO.

Colector	Localidad	Municipio	Estado	Taxón
ANMO1468	Sacramento Monclova (km 16 al este de Sacramento)	Sacramento	Coahuila	<i>Aspidoscelis gularis</i>
ANMO1484	Carr. Melchor Múzquiz-Las Rusias; 24.1 km. NW de Melchor Múzquiz	Melchor Múzquiz	Coahuila	<i>Aspidoscelis gularis</i>
ANMO1499	Carr. Palau-Minas de Barroterán	Minas de Barroterán	Coahuila	<i>Aspidoscelis gularis</i>
APG266	Chihuahua-Ojinaga (km. 26 al E de Aldama)	Aldama	Chihuahua	<i>Aspidoscelis scalaris</i>
APG296	La Cruz (km 3.5 al N de la Cruz)	La Cruz	Chihuahua	<i>Aspidoscelis scalaris</i>
ANMO 1423	La Unión Cuéncame (km. 25.4 al Sureste de Nazareno, Durango)	Nazareno	Durango	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO 1550	Saltillo Concepción de Oro km. 13.5 al NE de Concepción de Oro, Zacatecas	Concepción de Oro	Zacatecas	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO1524	Carr. Libre Parras-Saltillo; Alrededores de Parras	Parras	Coahuila	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO1539	Saltillo Concepción de Oro km. 13.5 al NE de Concepción de Oro, Zacatecas	Concepción de Oro	Zacatecas	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO1540	Saltillo Concepción de Oro km. 13.5 al NE de Concepción de Oro, Zacatecas	Concepción de Oro	Zacatecas	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO1579	Carr. Ilesca-El Barril	Nadadores	San Luis Potosí	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO1537	Agua Nueva	Saltillo	Coahuila	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO1600	Carr. Rio Grande-Saín Alto, 5.7 Km N Saín Alto	Saín Alto	Zacatecas	<i>Aspidoscelis semifasciata</i>
ANMO1459	Cuatrociénegas-Monclova km. 11 al oeste de Sacramento	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
ANMO1460	Carr. Cuatro Ciénegas-Monclova; 11 km. W de Sacramento	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
ANMO1463	Cuatrociénegas-Monclova km. 11 al oeste de Sacramento	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>

UOGV2027	El Cañón de Fernández	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
UOGV2128	Montañas, atrás de San José del Anteojo	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
UOGV2131	Montañas, atrás de San José del Anteojo	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
UOGV2129	San José del Anteojo	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
UOGV2032	Antiguos Mineros	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
ANMO1452	Carr. Cuatro Ciénegas-Nueva Atalaya	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis septemvittata</i>
OIGS201	Valle de Jalpan	Valle de Jalpan	Querétaro	<i>Aspidoscelis</i> sp. ?
OIGS202	Valle de Jalpan	Valle de Jalpan	Querétaro	<i>Aspidoscelis</i> sp. ?
SFDG374	Aquismón	Aquismón	San Luis Potosí	<i>Aspidoscelis</i> sp. ?
ISZ574	La Barca	La Barca	Jalisco	<i>Aspidoscelis</i> sp. ?
Laguna	Laguna	Laguna.	San Luis Potosí	<i>Aspidoscelis</i> sp. ?
CPA001	Mineral de Pozos	Mineral de Pozos	Guanajuato	<i>Aspidoscelis</i> sp. 1
CPA003	Mineral de Pozos	Mineral de Pozos	Guanajuato	<i>Aspidoscelis</i> sp. 1
ANMO1357	Carr. San José Iturbide-Mineral de Pozos; 5.8 km. S de Mineral de Pozos	San José de Iturbide	Guanajuato	<i>Aspidoscelis</i> sp. 1
ANMO1632	Camino a Microondas Los Gallos; 6 km. E de aeropuerto de Aguascalientes	Aguascalientes	Aguascalientes	<i>Aspidoscelis</i> sp. 1
ANMO1641	4.5 km. NE Juventino Rosas	Juventino Rosas	Guanajuato	<i>Aspidoscelis</i> sp. 1
ANMO1414	Carr. Libre Cuéncame-Torreón; 22.2 Km. N de Cuéncame	Cuéncame	Durango	<i>Aspidoscelis</i> sp. 2

ANMO1426	Carr. San Pedro-Cuatro Ciénegas; 15 km. NE de San Pedro	San Pedro	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 2
UOGV 1398	San Pedro Monclova Coahuila y de la Sierra de Jimulco, Torreón Coahuila	Torreón	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 2
UOGV2075	Rancho La Casita, Sierra Madera	Ocampo	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 3
UOGV2030	Rancho La Casita, Sierra Madera	Ocampo	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 3
ANMO1474	Carr. Sacramento-Monclova; 3.5 KM. E de Nadadores	Nadadores	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 4
ANMO1467	Carr. Sacramento-Monclova; 16 km. E de Sacramento	Sacramento	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 4
ANMO1538	Carr. Saltillo-Concepción de Oro; 39 km. NE de Concepción de Oro	Saltillo	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 5
ANMO1435	Cañón de Fernández	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 5
ANMO1461	Cuatrociénegas-Monclova km. 12 al oeste de Sacramento	Sacramento	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 5
ANMO1462	Cuatrociénegas-Monclova km. 12 al oeste de Sacramento	Sacramento	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 5
ANMO1510	Carr. Dolores-Estanque de Norias	Dolores	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 5
ANMO1536	Carr. Saltillo-Agua Nueva; 20. 5 km SE de Saltillo	Saltillo	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 5
UOGV2024	El Cañón	Cuatrociénegas	Coahuila	<i>Aspidoscelis</i> sp. 5
LDOR28	Huejutla de Reyes	Huejutla	Hidalgo	<i>Aspidoscelis</i> sp. 6
JCHZ049	Cardonal, Tolantongo	Cardonal	Hidalgo	<i>Aspidoscelis</i> sp. 6
JCHZ063	Progreso de Obregón	Progreso de Obregón	Hidalgo	<i>Aspidoscelis</i> sp. 6
LDOR33	Eloxochitlán	Eloxochitlán	Hidalgo	<i>Aspidoscelis</i> sp. 6
NLMM451	San Agustín Metzquititlán	San Agustín Metzquititlán	Hidalgo	<i>Aspidoscelis</i> sp. 6
SFDG014	San Agustín Tlaxiaca	San Agustín Tlaxiaca	Hidalgo	<i>Aspidoscelis</i> sp. 6

ANEXO 3. MATRIZ DE DISTANCIAS ABSOLUTAS Y CORREGIDAS

ANEXO 4. EJEMPLARES EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO, SE INDICA EL COLECTOR, LOCALIDAD, MOTU'S Y COORDENADAS GEOGRÁFICAS.

			Coordenadas geográficas					
		MOTU's	Latitud			Longitud		
Colector	Estado	Análisis del modelo GMYC	Grados	Minutos	Segundos	Grados	Minutos	Segundos
ANMO1468	Coahuila	Especie 5	27	2	10.20	101	37	32.70
ANMO1484	Coahuila	Especie 5	28	2	52.40	101	37	7.00
ANMO1499	Coahuila	Especie 5	27	44	26.70	101	20	8.50
ANMO1540	Zacatecas	Especie 5	24	49	8.50	101	6	36.40
ANMO1463	Coahuila	Especie 5	27	1	41.20	101	49	46.60
ANMO1474	Coahuila	Especie 5	27	2	4.70	101	34	8.10
ANMO1467	Coahuila	Especie 5	27	2	10.20	101	37	32.70
ANMO1435	Coahuila	Especie 5	27	1	8.90	102	5	11.40
ANMO1462	Coahuila	Especie 5	27	1	41.20	101	49	46.60
ANMO1510	Coahuila	Especie 5	26	22	17.20	101	26	31.00
ANMO1536	Coahuila	Especie 5	25	15	27.90	101	5	28.60
OIGS201	Querétaro	Especie 5	21	13	25.02	99	28	22.70
OIGS202	Querétaro	Especie 5	21	13	22.57	99	28	14.66
SFDG374	San Luis Potosí	Especie 5	21	48	25.80	99	8	27.61
LDOR28	Hidalgo	Especie 5	21	4	55.00	98	24	32.00
JCHZ049	Hidalgo	Especie 5	20	38	57.80	98	59	41.70
JCHZ063	Hidalgo	Especie 5	20	15	14.38	99	11	54.85
LDOR33	Hidalgo	Especie 5	20	43	40.00	98	56	51.80
NLMM451	Hidalgo	Especie 5	20	32	9.10	98	39	3.10
SFDG014	Hidalgo	Especie 5	20	9	28.30	98	53	39.70
ANMO1414	Durango	Especie 4	25	3	57.80	103	46	32.20
ANMO1579	San Luis Potosí	Especie 4	23	11	17.00	102	10	4.90
ANMO1600	Zacatecas	Especie 4	23	36	58.20	103	12	33.70

ANMO1426	Coahuila	Especie 4	25	52	13.10	102	55	11.90
UOGV 1398	Coahuila	Especie 4	25	11	23.40	103	18	3.60
ANMO 1423	Durango	Especie 4	25	13	3.40	103	33	38.50
ANMO 1550	Zacatecas	Especie 4	24	40	9.00	101	17	35.50
ANMO1524	Coahuila	Especie 4	25	26	37.20	102	9	25.50
ANMO1539	Zacatecas	Especie 4	24	49	8.50	101	6	36.40
ANMO1537	Coahuila	Especie 4	25	10	55.60	101	5	48.80
ANMO1538	Zacatecas	Especie 4	24	49	8.50	101	6	36.40
ANMO1459	Coahuila	Especie 3	27	1	41.20	101	49	46.60
ANMO1460	Coahuila	Especie 3	27	1	41.20	101	49	46.60
UOGV2027	Coahuila	Especie 3	27	0	33.70	102	4	42.30
UOGV2128	Coahuila	Especie 3	26	58	52.55	102	6	26.46
UOGV2131	Coahuila	Especie 3	26	46	57.70	102	0	20.20
UOGV2129	Coahuila	Especie 3	26	58	52.55	102	6	26.46
UOGV2032	Coahuila	Especie 3	26	46	55.70	102	0	22.90
ANMO1452	Coahuila	Especie 3	26	54	43.20	102	8	27.50
UOGV2075	Coahuila	Especie 3	27	6	45.40	102	23	39.70
UOGV2030	Coahuila	Especie 3	27	6	47.80	102	23	34.10
ANMO1461	Coahuila	Especie 3	27	1	41.20	101	49	46.60
UOGV2024	Coahuila	Especie 3	27	0	33.70	102	4	42.30
APG266	Chihuahua	Especie 1	28	57	26.75	105	41	32.06
APG296	Chihuahua	Especie 1	27	54	11.02	105	12	58.54
ISZ574	Jalisco	Especie 2	20	25	0.60	102	37	9.30
ANMO1632	Aguascalientes	Especie 6	21	41	55.10	102	15	48.50
Laguna	San Luis Potosí	Especie 7	22	12	19.77	98	59	7.07
CPA001	Guanajuato	Especie 7	21	9	56.21	100	30	7.35
CPA003	Guanajuato	Especie 7	21	13	33.47	100	30	25.92
ANMO1357	Guanajuato	Especie 7	21	9	48.20	100	29	49.80
ANMO1641	Guanajuato	Especie 7	20	40	0.50	100	57	24.20