



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

FILOGENIA MOLECULAR DEL GÉNERO *Salvadora*
(SERPENTES: COLUBRIDAE)

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA PRESENTA:

ANAHÍ ESQUIVEL RAMÍREZ

DIRECTORA: DRA. IRENE GOYENECHEA MAYER-GOYENECHEA

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1 La familia Colubridae	3
3.2 El género <i>Salvadora</i>	3
3.3 Distribución del género <i>Salvadora</i>	16
3.4 El concepto filogenético de especie	21
3.5 La aplicación del DNA mitocondrial en los estudios filogenéticos	23
4. Justificación	26
5. Objetivos	25
5.1 General	25
5.2 Específicos	25
6. Materiales y Método	26
6.1 Extracción de DNA	26
6.2 Amplificación de la región 16S del DNA mitocondrial	27

6.3 Reacción de secuenciación	27
6.4 Análisis filogenético	28
7. Resultados	29
7.1 Análisis filogenético	29
8. Discusión	32
8.1 Análisis filogenético	32
9. Conclusiones	35
10. Literatura citada	36
11. Anexos	46
11.1 Anexo 1 Extracción de DNA con Acetato de Amonio	46
11.2 Anexo 2 Purificación con polietilen-glicol (PEG)	48
11.3 Anexo 3 Precipitación con Acetato de Sodio	48

RESUMEN

Las serpientes del género *Salvadora* (Serpentes: Colubridae), se distribuyen desde el sur de Estados Unidos y a través de casi todo el territorio nacional. Actualmente se conocen siete especies monotípicas las cuales ocurren en México: *Salvadora bairdi*, *S. deserticola*, *S. grahamiae*, *S. hexalepis*, *S. intermedia*, *S. lemniscata* y *S. mexicana*. El género ha sido poco estudiado ya que no se han hecho revisiones morfológicas recientes del grupo y la mayoría de los trabajos corresponden a las descripciones de los tipos, por lo que la nomenclatura del grupo ha permanecido relativamente estable. Si bien no se cuenta con una filogenia que involucre a todos los taxones del género, propuestas previas de manera informal, consideran que *S. bairdi* está más relacionada con *S. grahamiae* que *S. lemniscata* es la especie más basal y que *S. mexicana* seguramente se ha derivado de ésta. En este estudio se realizó una filogenia molecular del género *Salvadora* y para ello, se utilizó el marcador mitocondrial 16S, las secuencias obtenidas corresponden a siete ejemplares. Los análisis de máxima parsimonia e inferencia bayesiana, indican que las relaciones filogenéticas dentro del género quedan parcialmente resueltas, ya que el grupo interno forma una politomía con el taxón utilizado como grupo externo *Sympholis sp.* De acuerdo con la distribución geográfica del género, las especies que se distribuyen en el norte se agrupan perfectamente, excepto *S. intermedia*, la cual solo se ha registrado en Guerrero, Puebla y Oaxaca y sin embargo, se agrupa junto con las especies del norte. Los resultados obtenidos no coinciden con los trabajos previos.

INTRODUCCIÓN

Más del ochenta por ciento de las serpientes se encuentran dentro de la superfamilia Colubroidea, la cual se reconoce como un grupo monofilético, con base en estudios moleculares y morfológicos (Lawson *et al.*, 2005). Ésta se divide en cuatro grandes familias: Viperidae (30 géneros con 230 especies), Elapidae (63 géneros y 272 especies), Atractaspididae (14 géneros y 65 especies) y Colubridae con 290 géneros (Heise *et al.*, 1995; Greene, 1997). La familia Colubridae cuenta con dos tercios de todas las especies de serpientes, esto es más de 1800 especies. Está distribuida prácticamente en todos los continentes con excepción de la Antártida, debido a su distribución casi cosmopolita, la diversidad de esta familia es muy alta (Pough *et al.*, 2005; Lawson *et al.*, 2005; Zug *et al.*, 2001).

El género *Salvadora* se encuentra dentro de la familia Colubridae, de acuerdo con Flores-Villela (1993), está conformado por siete especies y todas ellas ocurren en nuestro país: *Salvadora bairdi* Jan 1860, *S. deserticola* Schmidt 1940, *S. grahamiae* Baird y Girard 1853, *S. hexalepis* Cope 1867, *S. intermedia* Hartweg 1940, *S. lemniscata* Cope 1895, *S. mexicana* Duméril *et al.*, 1854.

El género ha sido poco estudiado, ya que no se han hecho revisiones morfológicas recientes y la mayoría de los trabajos, corresponden a las descripciones de los tipos, por lo que la nomenclatura del mismo ha sido relativamente estable. Algunos autores aún manejan subespecies (Liner, 1994; 2007), mientras que para otros autores como Bogert, Tanner (1985) y Flores-Villela (1993) éstas han entrado en sinonimia o bien se han elevado al nivel de especie. De acuerdo con las revisiones del género, se tienen propuestas previas acerca de las relaciones filogenéticas (Bogert, 1939; Smith, 1938), con base en caracteres morfológicos, pero no involucran a todos los taxones del grupo. Con este estudio se busca conocer si el género *Salvadora* es un grupo monofilético, así como las relaciones entre sus especies y para ello se propone una filogenia con base en caracteres moleculares que incluye a las siete especies monotípicas que lo conforman.

ANTECEDENTES

La familia Colubridae

Dentro del grupo Serpentes, la familia Colubridae es la más diversa y ampliamente distribuida, es posible encontrar taxones de este grupo en hábitats acuáticos, montañas, así como en desiertos, por lo que cuenta con una gran riqueza de especies. Sin embargo, el problema que aún permanece, es la composición y la estructura jerárquica dentro de las subfamilias (Dowling y Duellman, 1978; McDowell, 1987; Williams y Wallach, 1989; Heise *et al.*, 1995; Kraus y Brown, 1998; Vidal y Hedges, 2002; Kelly *et al.*, 2003).

De acuerdo con Zaher (1999), la familia Colubridae comprende doce subfamilias: Xenodermatinae, Calamariinae, Xenodontinae, Homalopsinae, Boodontinae, Colubrinae, Pseudoxyrhophiinae, Psammophiinae, Pseudoxenodontinae, Natricinae, Dipsadinae y Pareatinae. Diferentes estudios moleculares (Cadle, 1988; Dowling *et al.*, 1996; Gravlund, 2001; Kelly *et al.*, 2003;) sostienen la monofilia de sólo cuatro de éstas subfamilias: Colubrinae, Natricinae, Psammophiinae y Xenodontinae (Lawson *et al.*, 2005).

Los colúbridos son muy diversos, tanto en su comportamiento, ecología y forma del cuerpo, de tal suerte que muchos de los grupos de serpientes catalogados dentro de esta familia son diferentes, por lo que algunos autores no lo consideran como un grupo natural (Greene, 1997).

El género *Salvadora*

Son serpientes de talla mediana a grande, su cuerpo es alargado y cilíndrico; presentan la cabeza elongada; las escamas cefálicas son relativamente normales excepto por la escama rostral que es de forma triangular alargada y dirigida hacia atrás; presentan una sola escama loreal o bien puede estar dividida, con dos pares de escudos geniales, los cuales pueden o no estar separados por al menos tres pequeñas escamas (Figura 1); las escamas ventrales son immaculadas, en la región dorsal presentan 17 hileras de escamas en la parte anterior y media del cuerpo, mientras que en la parte posterior cuentan con 13 hileras de escamas.

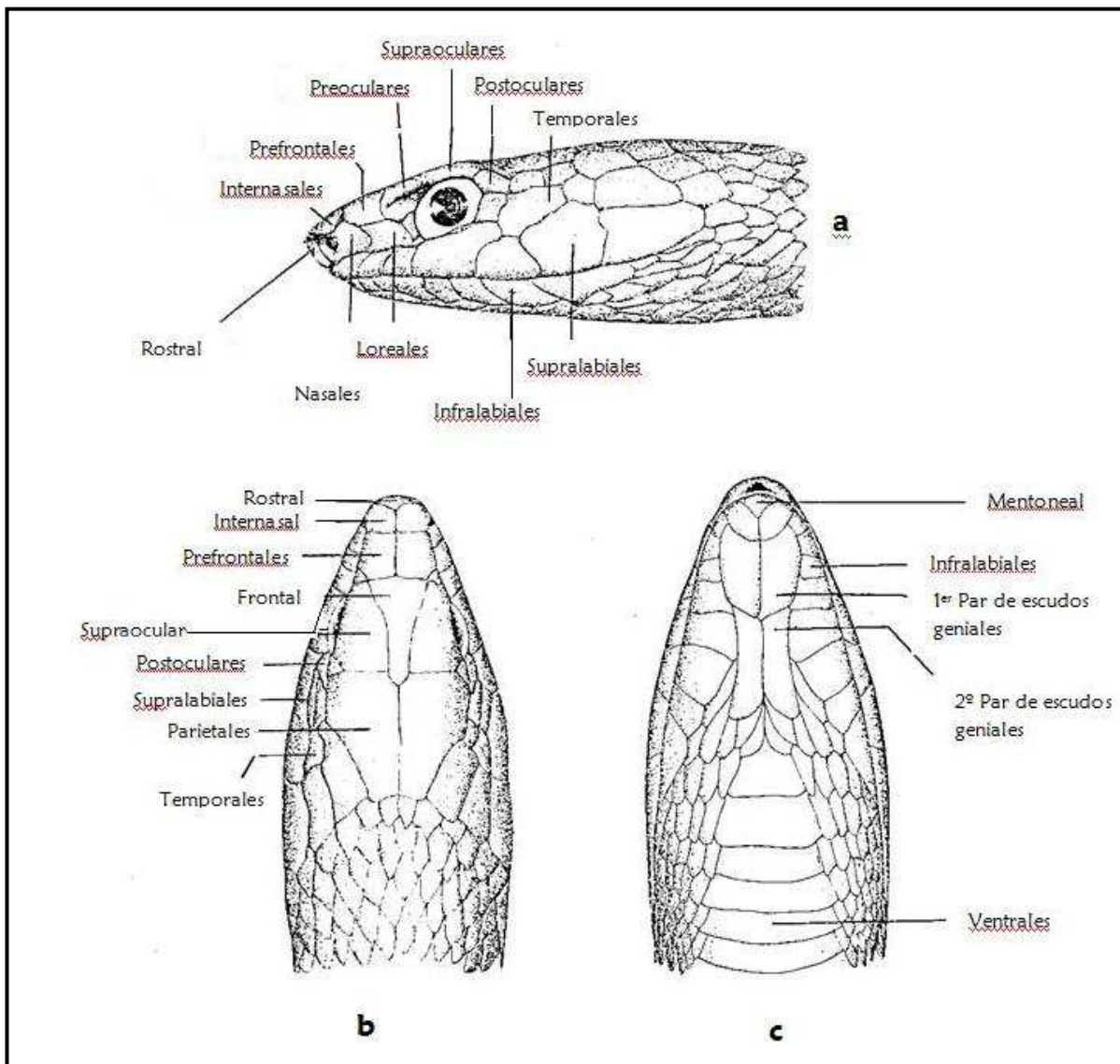


Figura 1. Escutelación cefálica de ejemplares pertenecientes a la familia Colubridae: a) vista lateral, b) vista dorsal y c) vista ventral. Modificado de Castellanos (2009).

La coloración dorsal presenta un patrón de líneas longitudinales amarillentas y pardas que empiezan detrás del ojo y recorren todo el cuerpo (Figura 2), excepto en la especie *Salvadora mexicana* donde las bandas longitudinales se rompen en la región anterior por la presencia de bandas transversales, justo detrás de la nuca. Generalmente las líneas longitudinales se encuentran encima de un fondo verde olivo o pardo (Bogert, 1939; Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2006; Schmidt, 1940; Smith, 1938; Cuadro 1).

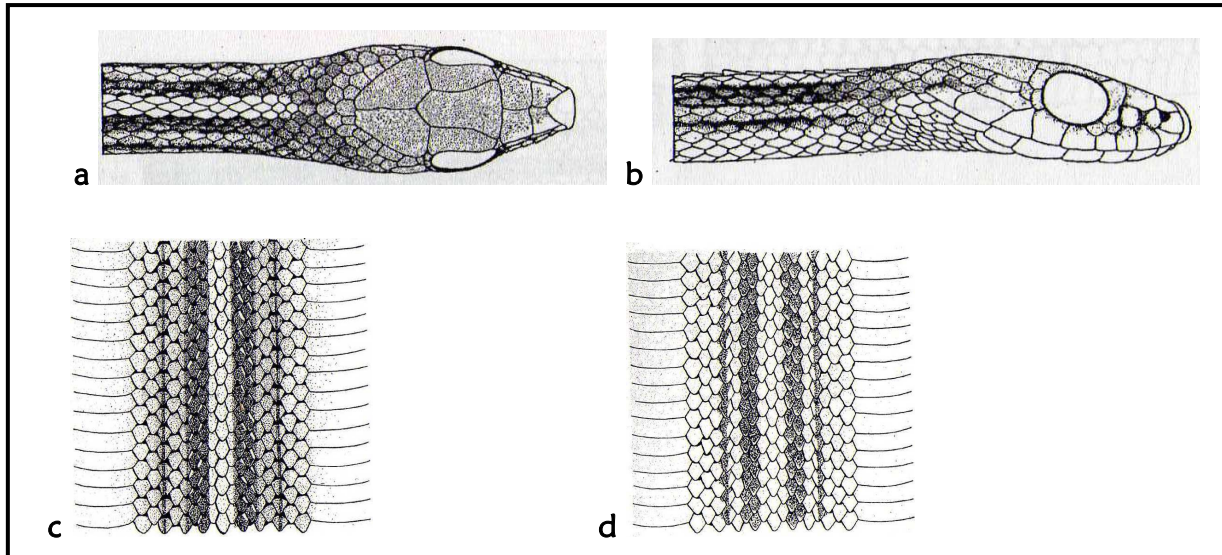


Figura 2. Patrón de coloración; a y b) *Salvadora bairdi*, tomado de Smith (1941); c) *S. grahamiae*; d) *S. deserticola*, tomado de Schmidt (1940).

El género *Salvadora* se distribuye desde el sur de Estados Unidos y a través de casi todo el territorio nacional. Fue descrito por Baird y Girard (1853) y la especie tipo fue *Salvadora grahamiae* (Figura 3a; b); posteriormente Duméril *et al.* (1854) describieron a la especie *Salvadora mexicana* (Figura 3c; d); Jan (1860) describió a la especie *Salvadora bairdi* (Figura 3e); Cope (1867) describió a *Salvadora hexalepis* (Figura 3f). La descripción de la especie *Salvadora lemniscata*, resultó un poco problemática, principalmente debido a su distribución, la cual ocurre al igual que *Salvadora mexicana* al sur de México. Sin embargo, nunca se designó una localidad tipo, e incluso en un principio algunos autores las consideraron la misma especie (Bogert, 1939; Figura 4a).

Bogert (1939) llevó a cabo una revisión del género *Salvadora*, encontró que *S. lemniscata*, había sido descrita en diferentes ocasiones, primero por Bocourt (1890), quien la llamó *Drymobius (Eudryas) pulcherrimus*; Boulenger (1893), *Zamenis pulcherrimus*; Cope (1895), *Drymobius lemniscatus*; Smith (1938), *Salvadora pulcherrima*; Bogert (1939) *S. mexicana*. A pesar de ello, no se contaba con un ejemplar tipo, por lo que Bogert realizó una redescipción de la especie.

Años más tarde, Schmidt (1940) describió a la especie *Salvadora deserticola* (Figura 4b). En ese mismo año Hartweg (1940) revisó 15 ejemplares del género *Salvadora* recolectados en Chilpancingo, Guerrero y describió a la especie *Salvadora intermedia* (Figura 4c; d).

Por otra parte, algunos autores describieron otras especies y subespecies dentro del género *Salvadora*. Bogert (1935), encontró que existían diferencias en el patrón de coloración entre los ejemplares recolectados por él en California. Por lo que revisó los trabajos anteriores de Klauber (1931), Stejneger (1902; 1933) y Blanchard (1925). Al igual que ellos llegó a la conclusión de que existían diferencias, entre las especies que se distribuyen en la costa y aquellas que ocurren en el desierto; sin embargo, consideró que antes de hacer una comparación de este tipo, primero se debía establecer la relación entre las formas orientales, *Salvadora grahamiae grahamiae* (*S. grahamiae*) y las del desierto *S. g. hexalepis* (*S. hexalepis*). Para Klauber (1931) *S. g. hexalepis* era la especie que definía el cambio de un hábitat a otro. Bogert (1935), examinó 263 ejemplares y determinó que había información suficiente tanto del patrón de coloración y escutelación, entre las especies que ocurren en la costa y en el desierto, para lo cual propuso una nueva subespecie costera a la que llamó *Salvadora grahamiae virgultea* (*Salvadora hexalepis*) que de acuerdo con el autor, difiere de la forma típica.

Smith (1938) revisó 33 ejemplares de seis especies y subespecies del género, la mayor parte distribuidos en México y los separó en dos grupos. En el primero ubicó a *Salvadora mexicana* y *S. pulcherrima* y en el segundo grupo a *S. bairdi*, *S. grahamiae grahamiae*, *S. g. hexalepis* y *S. g. virgultea*. En el primer grupo encontró que *S. mexicana* coincide en casi todos los caracteres morfológicos con *S. pulcherrima* (*S. lemniscata*). Mientras que en el segundo grupo, encontró que *S. bairdi* es muy parecida a *S. g. grahamiae*, pero existen tres diferencias en la escutelación cefálica que las separan. También observó que *S. bairdi* y *S. g. grahamiae* están más relacionadas entre sí, que esta última con *S. g. hexalepis* y *S. g. virgultea*.

Sin embargo, Wright y Wright (1957) en su manual de serpientes mencionan a *Salvadora hexalepis hexalepis* (Cope, 1867) en lugar de *S. g. hexalepis* (Cope, 1867) y *S. hexalepis virgultea* (Bogert, 1935) en lugar de *S. g. virgultea* (Bogert, 1935), al igual que Liner (1994;

2007) y Crother *et al.* (2001). De acuerdo con Flores-Villela (1993) estas dos subespecies son en realidad sinonimias de *S. hexalepis*.

Bogert (1939) revisó 29 ejemplares (17 machos y 12 hembras) la mayoría de la especie *Salvadora mexicana*, los cuales incluyeron localidades de Colima, Michoacán, Morelos y Guerrero. Los registros en el estado de Guerrero le fueron de particular interés, ya que los rangos de distribución de *Salvadora lemniscata* y *S. mexicana* son continuos y se puede esperar que exista intergradación entre estas dos especies. Sin embargo, no contó con ejemplares de las localidades exactas de colecta de ambas especies, que dieran indicios de que se solapan en su distribución. Aunado a estos datos, no existe indicación de la intergradación de ambas especies a nivel morfológico, ya que existen diferentes caracteres contrastantes que ayudan a distinguir una especie de la otra, entre ellos, el patrón moteado y las barras transversales en el cuello en la especie *S. mexicana*, así como la banda oscura que pasa a través de los parietales y supraoculares, mientras que en *S. lemniscata* se observan cuatro bandas longitudinales en el cuello, carece del patrón moteado y no existe una banda que pase a través de los parietales y supraoculares.

De acuerdo con los datos de Bogert (1939) casi no existen diferencias entre los sexos de ambos taxones, lo cual es una condición característica de las especies del género *Salvadora*. Como parte de su estudio, tomó en cuenta el intervalo de distribución de *S. lemniscata*, el cual es más restringido, por lo que consideró a éste taxón como el más primitivo de los dos y pensó que seguramente *S. mexicana*, en algún momento de su historia evolutiva, se derivó de éste.

Schmidt (1940) encontró algunos problemas con la identificación de tres formas: *Salvadora grahamiae*, *S. hexalepis* y *S. bairdi*, porque sólo revisó las colecciones texanas, lo cual fue discutido por Bogert (1935) quien revisó el género *Salvadora* en Estados Unidos y por Smith (1938) quien había trabajado con las formas mexicanas. Por lo que había discrepancias respecto a las especies del grupo, ya que aparentemente Bogert (1935) no tomó en cuenta los especímenes recolectados en Texas.

Stejneger (1902) quien anteriormente había trabajado con el género *Salvadora*, describió el problema como la designación de los nombres *S. hexalepis* Cope y *S. grahamiae* Baird y Girard ya que si bien la localidad tipo de *S. grahamiae* es Sonora y seguramente el sur de Arizona, también Stejneger (1902) designó el nombre a formas que se distribuyen al sudeste de Texas. Otro taxón que le trajo dificultades a Schmidt (1940) fue *Salvadora bairdi* el cual de acuerdo con su trabajo parece estar muy relacionado con la forma del sudeste de Texas la cual describió como *S. lineata*. Observó que la mayoría de las características en *S. lineata* están presentes en *S. grahamiae*, pero de esta se distingue por una línea lateral bien definida, la cual está en la tercera hilera de escamas en la parte anterior y en la segunda hilera en la región posterior, la banda dorso lateral oscura atraviesa sobre la región temporal al ojo (Schmidt, 1940).

Smith (1941) al hacer una revisión del género describió tres nuevos taxones; *Salvadora hexalepis celeris* (*Salvadora hexalepis*), *S. bogerti* (*S. bairdi*) y *S. intermedia richardi* (*S. intermedia*). Para la descripción del primer taxón, sólo se basó en un ejemplar, una hembra de San Blas, Sinaloa.

En un trabajo de los anfibios y reptiles de Sinaloa, Hardy y McDiarmid (1969) revisaron cuatro ejemplares machos de la especie *Salvadora bairdi*, las descripciones de los ejemplares revisados se compararon con estudios previos, como el de Bogert (1935), Smith (1939), Smith (1943), Smith y Taylor (1945), Bogert y Oliver (1945), Davis y Smith (1953), Dixon y Davis (1957). Los trabajos coinciden en que *S. bairdi* es muy parecida a *S. lineata* e incluso algunos autores como Dixon y Davis (1957) sugirieron que probablemente *S. bairdi* y *S. lineata* eran dos subespecies de una misma especie, pero las reportaron como especies distintas ya que no tenían ejemplares suficientes para corroborar su hipótesis. Los ejemplares de *S. bairdi* recolectados en Sinaloa, coinciden en la mayoría de los caracteres morfológicos descritos en trabajos anteriores. Sin embargo, de acuerdo con Duellman (1961), el parecido de algunos caracteres con *S. lineata* y *S. grahamiae*, sugiere que es necesario un estudio más a detalle tomando en cuenta los intervalos de distribución de las tres especies.

Cuadro 1. Características morfológicas de las especies y subespecies descritas dentro del género *Salvadora*.

Especie	Caracteres	Subespecie	Caracteres
<i>Salvadora bairdi</i>	Rostral un poco alargada, sin los bordes libres; 8-8 supralabiales; 9-9 infralabiales; 2 preoculares; 2 postoculares; 1 loreal; 9+3 maxilares; fórmula dorsal 17-17-13; patrón de coloración similar al de <i>S. grahamiae</i> , excepto porque los bordes de las bandas oscuras dorsolaterales en <i>S. bairdi</i> son negros solo en la parte media del cuerpo, estas bandas terminan sobre la nuca y no pasan a través de la región temporal (Smith, 1938; Schmidt, 1940; Schmidt y Taylor, 1945; Figura 3e).		
<i>Salvadora desarticola</i>	Rostral alargada sin los bordes libres; 9-10 supralabiales; 11-11 infralabiales; 1 loreal; 2-2 oculares; 2-3 temporales; internasales subtriangulares; nasal dividida; prefrontales rectangulares; frontal casi tan grande como los parietales; escudos geniales casi del mismo tamaño, 2º par de escudos geniales separado por dos escamas; fórmula dorsal 17-17-13; anal dividida, región supranal quillada; patrón de coloración: una banda dorsolateral oscura a cada lado de la sexta y séptima hileras de escamas; una estrecha línea lateral sobre la mitad inferior de la cuarta hilera de escamas; la banda dorsolateral se extiende hasta las postoculares y junto con la línea lateral se fusionan en el cuello, sobre la tercera hilera de escamas (Schmidt, 1940; Figura 4b).		
<i>Salvadora grahamiae</i>	El borde de la rostral solo ligeramente levantado; escudos geniales posteriores en contacto o ligeramente separados; 8-8 supralabiales; pocas ventrales, caudales más numerosas, así como la presencia de una banda ancha de color claro en la parte dorsal, los machos adultos de esta especie no presentan quilla (Schmidt, 1940; Figuras 3a; b).	1) <i>S. g. lineata</i>	8-8 Supralabiales; 10-10 infralabiales; nasal dividida; 1 loreal; 2-2 oculares; 2-2 y 2-3 temporales; fórmula dorsal 19-17-13. Presenta una banda dorsal de color amarillento pálido, de menos de tres hileras de escamas de ancho y a cada lado una banda dorsolateral oscura sobre la quinta, sexta, séptima y parte de la octava hilera de escamas la cual está bien definida, la banda oscura continúa hasta la región de la loreal; presenta una estrecha línea oscura a la mitad de la tercera hilera de escamas. Solo se diferencia de <i>grahamiae</i> por la línea lateral bien definida (Schmidt, 1940).

Especie	Caracteres	Subespecie	Caracteres
<i>Salvadora hexalepis</i>	Rostral visiblemente alargada, con los bordes prominentes y libres; 9-9 supralabiales; el 2º par de escudos geniales visiblemente separados, así como, las escamas supra anales quilladas; en cuanto al patrón de coloración, presenta bandas dorsolaterales que divergen en el cuello y pasan a través de la región temporal al ojo; una banda oscura lateral que se fusiona con las dorsolaterales en el cuello (Smith, 1938; Smith y Taylor, 1945; Wright y Wright, 1957; Figura 3f).	1) <i>S.h. celeris</i>	Una banda media dorsal de tres escamas de ancho en la región anterior, posteriormente la banda solo tiene dos y media hileras de ancho; adyacente a ésta, se encuentra una banda dorsolateral oscura, la cual abarca dos hileras de escamas y posteriormente solo una, diverge en la parte anterior y pasa a través del ojo; contigua a esta banda está una lateral oscura que involucra la cuarta y una pequeña parte de la tercera hilera de escamas, en la región anterior, posteriormente se reduce a la tercera hilera, ésta banda se fusiona con la dorsolateral en medio del cuello (Wright y Wright, 1957).
		2) <i>S.h. klauberi</i>	Dos loreales; una banda oscura de 3 y 4 hileras de escamas; 2 preoculares; fórmula dorsal 19-17-15-13; de 191 a 204 ventrales; los machos presentan 91-103 caudales mientras que las hembras 86-100 (Wright y Wright, 1957).
		3) <i>S.h. mojavenis</i>	Las supralabiales no alcanzan el ojo debido a la presencia de suboculares. La banda lateral sobre la 3ª y 4ª hileras de escamas es más tenue que la banda que ocupa la 6ª y 7ª (Wright y Wright, 1957).
		4) <i>S.h. virgultea</i>	El 2º par de escudos geniales separado por dos o más pequeñas escamas; loreal dividida; frontal y rostral más amplias; banda dorsal más estrecha y paralela a ésta, una sola banda café de 5 a 5 ½ escamas de ancho, posteriormente pueden ser menos conspicuas y solo apreciarse dos bandas. Difiere de <i>S. hexalepis</i> al tener en promedio menos escamas ventrales (Wright y Wright, 1957).

Especie	Caracteres	Subespecie	Caracteres
<i>Salvadora intermedia</i>	<p>Rostral débilmente proyectada con bordes libres; 2 preoculares; 2 postoculares en contacto con la quinta supralabial; 2+2+3 temporales; 8 supralabiales, la 4ª y 5ª entran en la órbita ocular; 10 infralabiales, el primer par en contacto con la parte posterior de la mentoneal; primer par de escudos geniales más grande que el posterior, el cual está separado por una o más escamas que presentan un arreglo en tándem; fórmula dorsal 17-15-13; 14 maxilares; patrón de coloración: una banda media dorsal amarillenta de tres escamas de ancho en la nuca, se extiende hacia los parietales y se reduce a una 1, o bien, a 1 ó 2 y media escamas de ancho, en la región posterior del cuerpo continúa hasta la cola. A cada lado está una banda dorsolateral oscura que ocupa las hileras de escamas 4-7 y el borde superior de la tercera hilera en la región anterior del cuerpo mientras que posteriormente ocupa la cuarta y quinta hileras y la mitad contigua de la tercera y sexta hileras de escamas. La banda lateral continúa sobre la cola como una estrecha línea (Hartweg, 1940; Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén, 2006; Figuras 4c; d).</p>		
<i>Salvadora lemniscata</i>	<p>Rostral en contacto con: la 1ª supralabial, la sección anterior de la nasal e internasales; 2 internasales; 2 prefrontales; 2 postoculares; temporales 2+2+2+2; 9 supralabiales, la 4ª, 5ª y 6ª entran en la órbita ocular o bien la 3ª, 4ª y 5ª; de 10 a 13 infralabiales; 2º par de escudos geniales más grande que el 1º, separados primero por una escama estrecha seguida de dos pares de escamas angostas. Anal dividida; fórmula dorsal 17-17-13. Con 4 bandas oscuras longitudinales que van de la cola al occipucio, color pardo, cerca del cuello se tornan de color negro (Bogert, 1939; Figura 4a).</p>		

Especie	Caracteres	Subespecie	Caracteres
<i>Salvadora mexicana</i>	<p>Rostral muy alargada; 9-9 supralabiales; 11-11 infralabiales; bandas longitudinales reemplazadas en la región anterior por un patrón moteado que incluye, barras transversales de color pardo que empiezan justo por detrás de la nuca y solo abarcan el primer tercio del cuerpo (Figura 3c) y por manchas que presentan un arreglo irregular, posteriormente presentan un patrón de 7 bandas longitudinales: 1 banda vertebral de una escama de ancho color amarillento, a cada lado 1 banda color pardo de tres escamas de ancho, seguida de 1 banda de color blanco amarillento de dos y media escamas de ancho y por último 1 banda de color pardo de dos escamas de ancho (Smith, 1938; Bogert, 1939; Smith y Taylor, 1945; Ramírez-Bautista, 1994; Figura 3d).</p>		



Figura 3. Fotografías de las especies del género *Salvadora*: a y b) *S. grahamiae*, tomado de Nafis (2009); c y d) *S. mexicana*; e) *S. bairdi*; f) *S. hexalepis*, tomado de Burkhardt (2005).

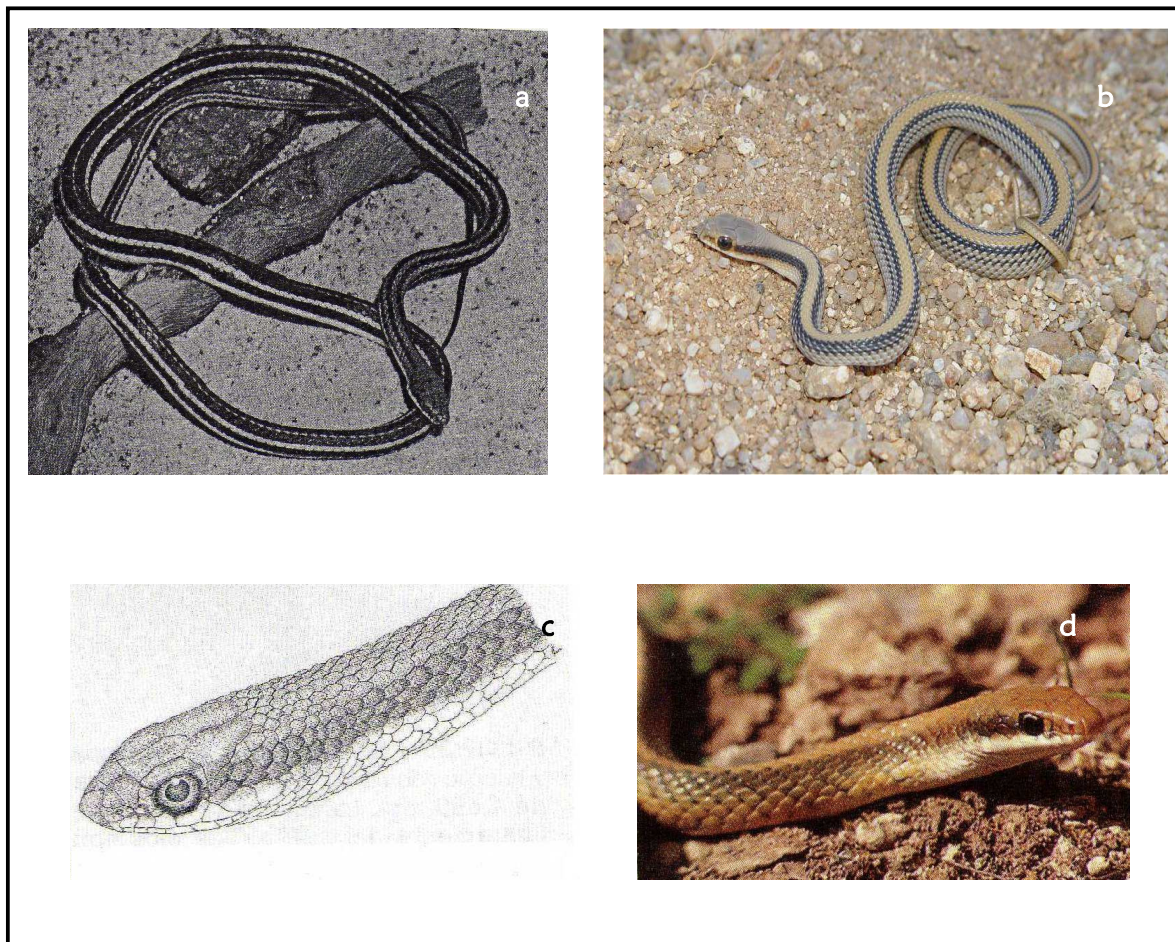


Figura 4. Fotografías de las especies del género *Salvadora*: a) *S. lemniscata*, tomado de Bogert (1939); b) *S. deserticola*, tomado de Burkhardt (2005); c y d) *S. intermedia*, tomado de Canseco-Márquez y Gutiérrez-Mayén (2006).

A lo largo de la historia nomenclatural del género *Salvadora* se han descrito más especies de las que son aceptadas en la actualidad, ya que muchas de ellas entraron en sinonimia, por ejemplo, *S. lineata* (*S. grahamiae*) o bien como en el caso de *S. hexalepis deserticola* que fue elevada a nivel de especie como *S. deserticola*. En un principio, Bogert y Degenhardt (1961) reconocieron a este taxón como otra especie más y no como una subespecie dentro del género, pero no explicaron que caracteres morfológicos tomaron en cuenta para elevar a *S. hexalepis deserticola* a nivel de especie como *S. deserticola*. Sin embargo, años más tarde Bogert (1985) explicó que se basó en los caracteres que había descrito anteriormente en Bogert (1945) y también por la ausencia de una forma intermedia (Crother, *et al.*, 2001). Por lo que actualmente se consideran

siete especies monotípicas formalmente descritas: *S. grahamiae*, *S. deserticola*, *S. hexalepis*, *S. bairdi*, *S. intermedia*, *S. lemniscata* y *S. mexicana* (Flores-Villela ,1993; Cuadro 2).

Cuadro 2. Historia nomenclatural del género *Salvadora* se muestran los taxones válidos del grupo así como aquellas subespecies que entraron en sinonimia o bien se elevaron a nivel de especie.

Especie válida	Sinonimia
<i>Salvadora bairdi</i> JAN 1860	<i>Salvadora bogerti</i> SMITH 1941
<i>Salvadora deserticola</i> SCHMIDT 1940	<i>Salvadora hexalepis deserticola</i> SCHMIDT 1940
<i>Salvadora grahamiae</i> BAIRD y GIRARD 1853	<i>Salvadora grahamiae grahamiae</i> BAIRD y GIRARD 1853 <i>Salvadora grahamiae lineata</i> SCHMIDT 1940 <i>Salvadora lineata</i> SCHMIDT 1940
<i>Salvadora hexalepis</i> COPE 1867	<i>Phimothyra hexalepis</i> COPE 1867 <i>Salvadora hexalepis celeris</i> SMITH 1941 <i>Salvadora hexalepis hexalepis</i> COPE 1867 <i>Salvadora hexalepis klauberi</i> BOGERT 1945 <i>Salvadora hexalepis mojavnensis</i> BOGERT 1945 <i>Salvadora hexalepis virgultea</i> BOGERT 1935
<i>Salvadora intermedia</i> HARTWEG 1940	<i>Salvadora intermedia intermedia</i> HARTWEG 1940 <i>Salvadora intermedia richardi</i> SMITH 1941
<i>Salvadora lemniscata</i> COPE 1895	<i>Drymobius lemniscatus</i> COPE 1895 <i>Drymobius pulcherrimus</i> BOCOURT 1890 <i>Salvadora mexicana</i> BOGERT 1939 <i>Salvadora pulcherrima</i> SMITH 1938 <i>Zamenis pulcherrimus</i> BOULENGER 1893
<i>Salvadora mexicana</i> BIBRON y DUMÉRIL 1854	<i>Zamenis mexicanus</i> DUMÉRIL, BIBRON y DUMÉRIL 1854

Distribución del género *Salvadora*

El género *Salvadora* ocurre en una gran diversidad de hábitats. Es posible encontrar especies del grupo en bosques de encino, bosque mesófilo, bosques perennifolios, subperennifolios, selva baja caducifolia, en matorral xerófilo, así como en pastizales (Smith y Taylor, 1945; García y Ceballos, 1994; Flores-Villela y Gerez, 1994) al igual que en ambientes húmedos en las zonas costeras del Pacífico (Ramírez-Bautista, 1994). El género se ha registrado en las provincias biogeográficas desde el Desierto de Sonora y Península de Baja California, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental y la Provincia Tamaulipeca, pasando por la Meseta Central de México, Costa del Pacífico, Cuenca del río Balsas y Depresión Central de Chiapas, El Eje Volcánico, Sierra Madre del Sur y las Tierras Altas del norte Oaxaca (Flores-Villela, 1993). De las siete especies, *Salvadora bairdi* y *Salvadora grahamiae* tienen un área de distribución más amplia y ocurren en la mayoría de los sitios donde se encuentran las demás especies del grupo (Flores-Villela, 1993).

La especie *Salvadora bairdi* Jan (1860) se distribuye en: Aguascalientes, Coahuila, Chihuahua, Distrito Federal, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Nayarit, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Sinaloa, Veracruz y Zacatecas (Smith y Taylor, 1945; Smith y Smith, 1976; Uribe-Peña *et al.*, 1999; Ramírez-Bautista *et al.*, 2004a). Habita entre los 1600 y 2700 metros sobre el nivel del mar en matorral xerófilo, bosque mixto, bosque de encino, bosque tropical caducifolio, así como en zonas agrícolas asociadas a pastizales, es una especie endémica de México (Figura 5).

Salvadora deserticola Schmidt (1940) se distribuye en EUA al sureste de Arizona, suroeste de Nuevo México y al oeste de Texas; mientras que en México, se encuentra en los estados de Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Sinaloa y Sonora (Smith y Taylor, 1945; Smith y Smith, 1976). Habita principalmente en matorral xerófilo, cerca de arbustos de *Larrea tridentata* (gobernadora), en tierras planas, desiertos, colinas, en altitudes que van de los 600 a 1500 msnm (Figura 6).

Salvadora grahamiae Baird y Girard (1853) se distribuye en EUA al suroeste de Arizona, en Nuevo México y Texas; en México ocurre en Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí,

Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Smith y Taylor, 1945; Smith y Smith, 1976). Ocurre en áreas extremadamente desérticas, así como en sitios donde hay asociaciones de lechuguilla con *Nolina* y también en sitios menos inhóspitos con asociación de cedro y acacias, en zonas rocosas entre otras, en altitudes que van de los 300 a los 1900 msnm (Wright y Wright, 1957; Figura 7).

Salvadora hexalepis Cope (1867) se distribuye en EUA al sur de California, Nevada, Arizona, Nuevo México y al suroeste de Texas, mientras que en México se encuentra en Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua y Sinaloa (Smith y Taylor, 1945; Smith y Smith, 1976). Habita en desiertos arenosos, en arbustos de *Larrea tridentata*, en general el tipo de vegetación donde se ha registrado la presencia de esta especie es muy similar al de *S. grahamiae*, mientras que la altitud varía de los 300 e incluso hasta 2100 msnm (Wright y Wright, 1957; Figura 8).

Salvadora intermedia Hartweg (1940) solo se ha registrado en Guerrero, Puebla y Oaxaca (Smith y Taylor, 1945; Smith y Smith, 1976; Ramírez-Bautista *et al.*, 2004b) por lo que su distribución es restringida, se trata de una especie endémica de México que habita en bosque de pino y encino, así como en selva mediana subperennifolia en altitudes que van de 1500 a 1800 msnm (Figura 9).

Salvadora lemniscata se ha registrado en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Smith y Taylor, 1945; Smith y Smith, 1976) por lo que su distribución es restringida; se trata de una especie endémica que habita principalmente en bosques de encino (Figura 10). *Salvadora mexicana* Bribon y Duméril (1854) ocurre en los estados de Nayarit, Colima, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos y Puebla (Smith y Taylor, 1945; Smith y Smith, 1976; Ramírez-Bautista *et al.*, 2004c). Habita en bosques caducifolios, subperennifolios así como en matorrales y pastizales en altitudes que van de 1 a 1100 msnm (Figura 11), es una especie endémica de México (Flores-Villela y Gerez, 1994; Ramírez Bautista *et al.*, 2004c).

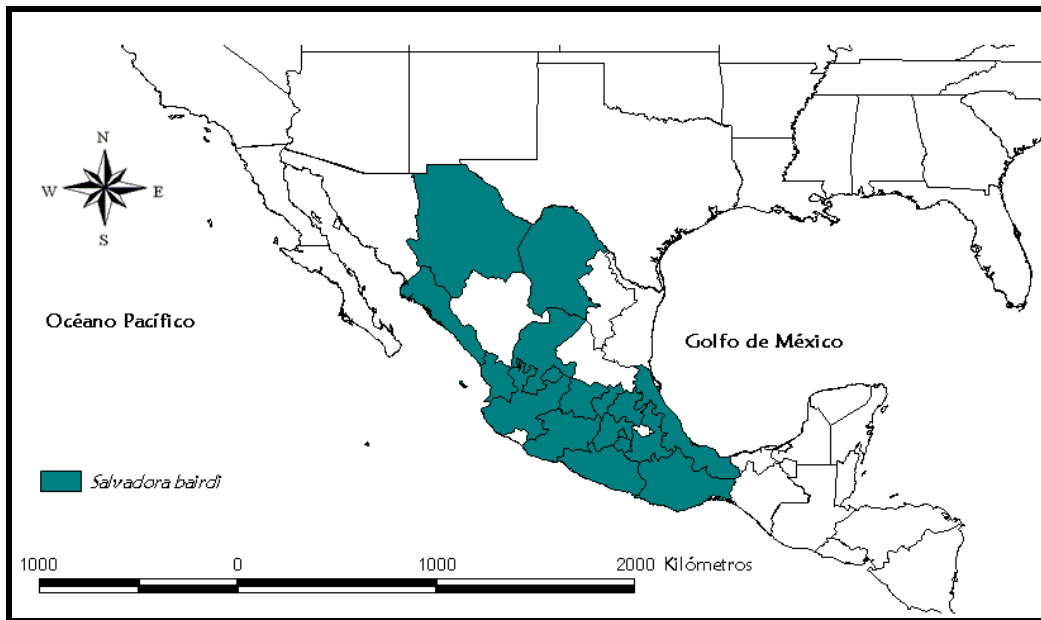


Figura 5. Distribución de *Salvadora bairdi*, ocurre en el norte, centro y sur de México, de los 1600 a 2700 msnm.

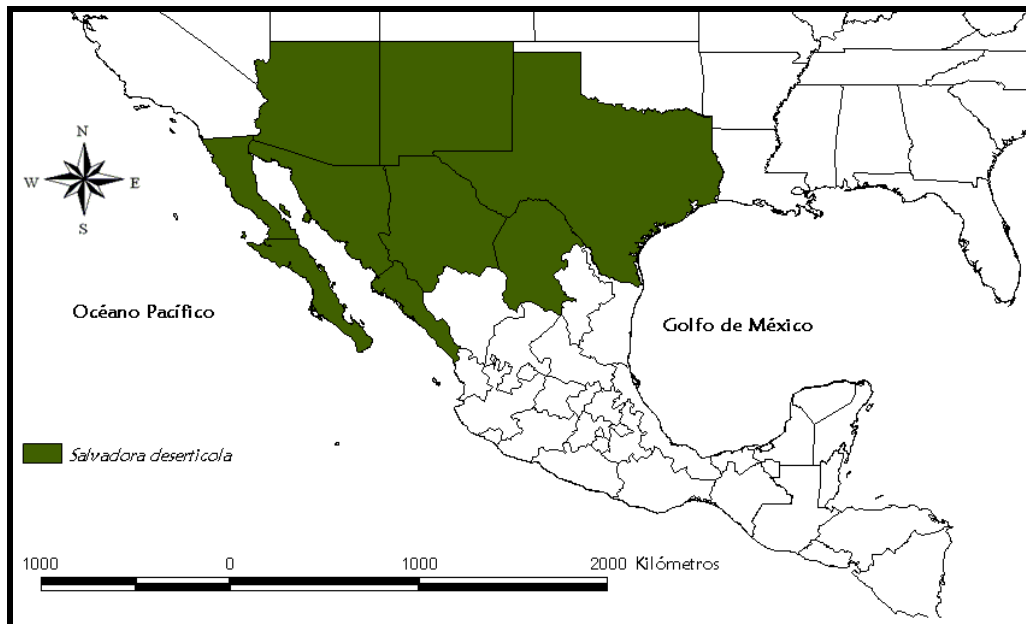


Figura 6. Distribución de *Salvadora deserticola*, ocurre al sur de E.U.A. y norte de México, de los 600 a 1500 msnm.

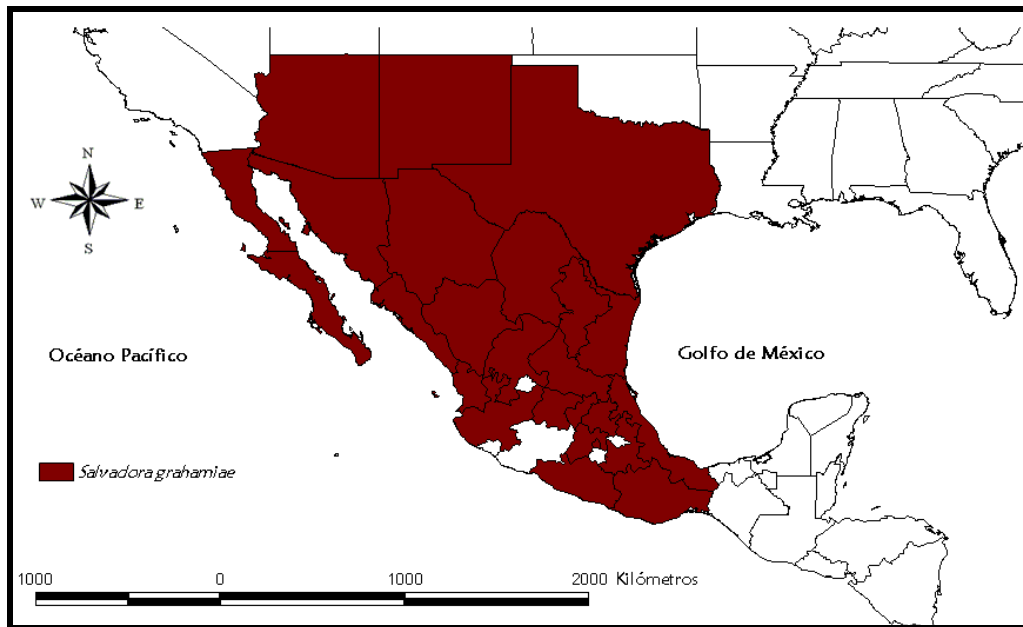


Figura 7. Distribución de *Salvadora grahamiae*, ocurre al sur de E.U.A.; al norte, centro y sur de México, de los 300 a 1900 msnm.

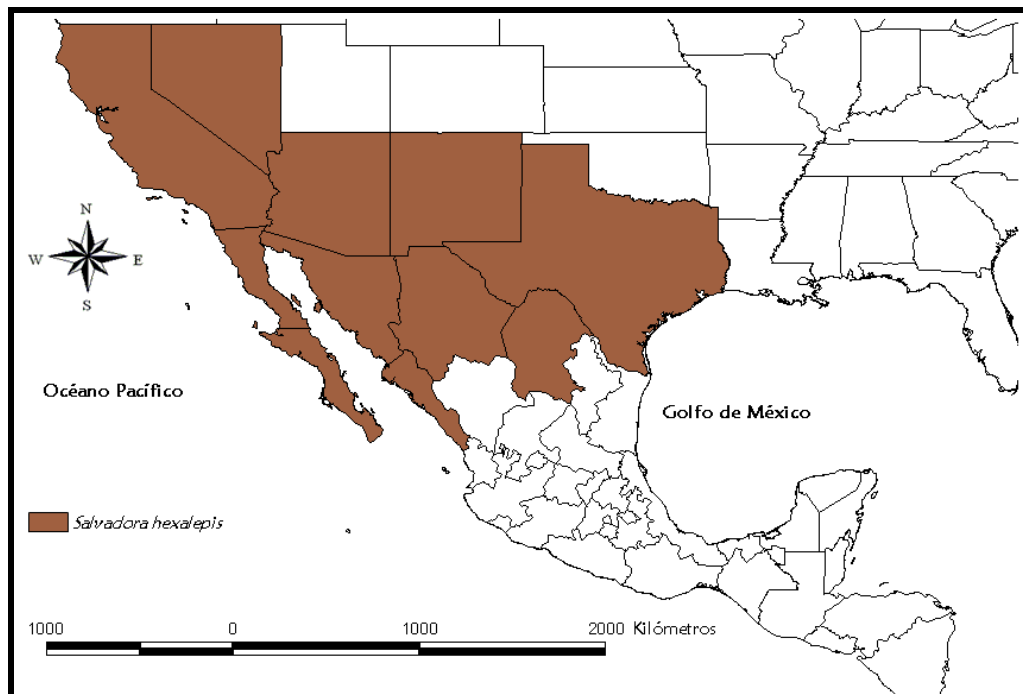


Figura 8. Distribución de *Salvadora hexalepis*, ocurre al sur de E.U.A. y noroeste de México, hasta los 2150msnm.

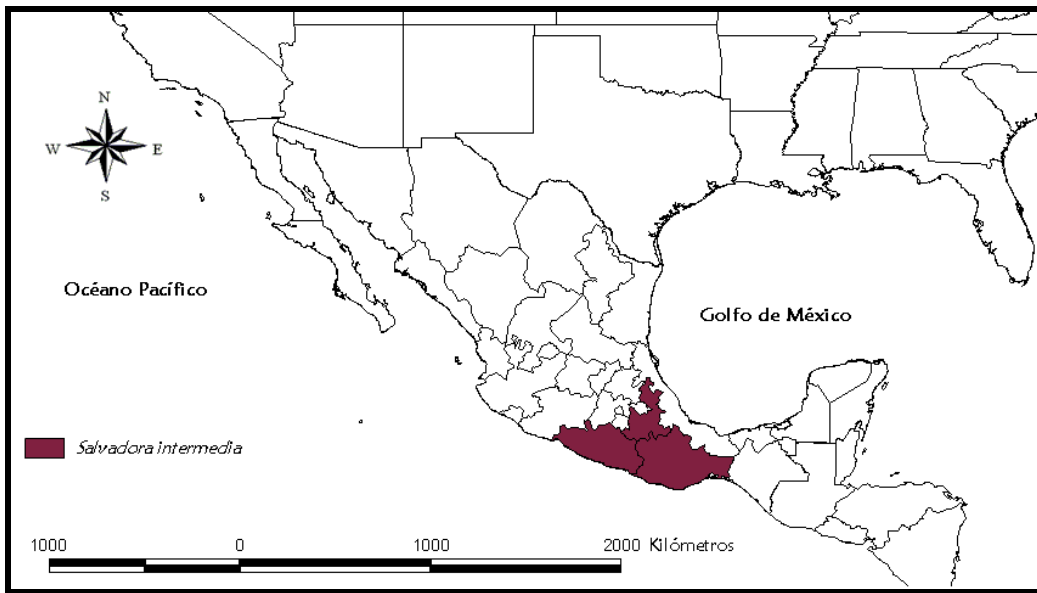


Figura 9. Distribución de *Salvadora intermedia*, ocurre al sur de México, de los 1500 a 1800 msnm.

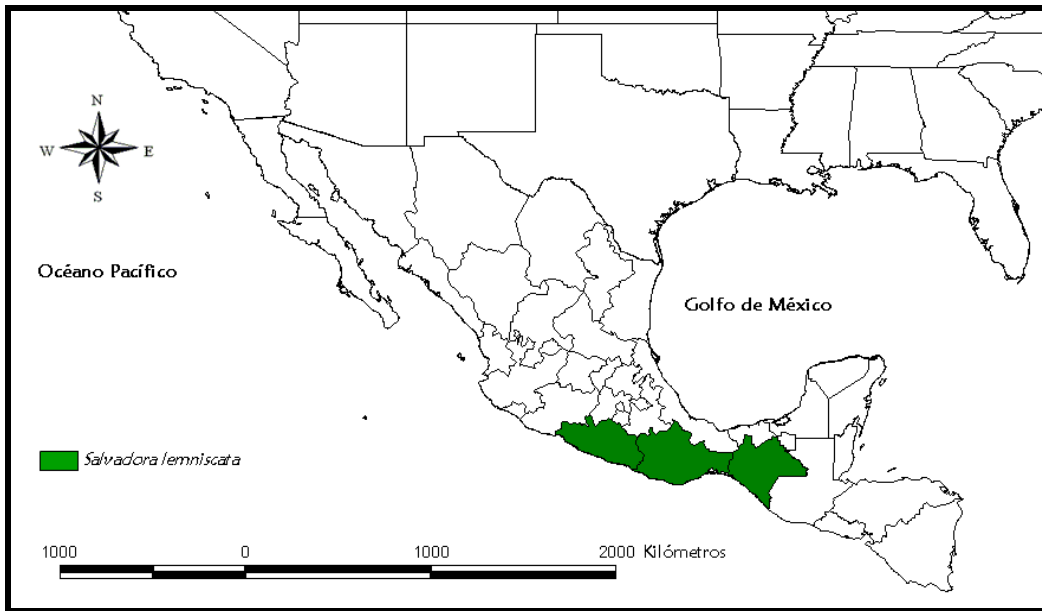


Figura 10. Distribución de *Salvadora lemniscata*, ocurre al sur de México.

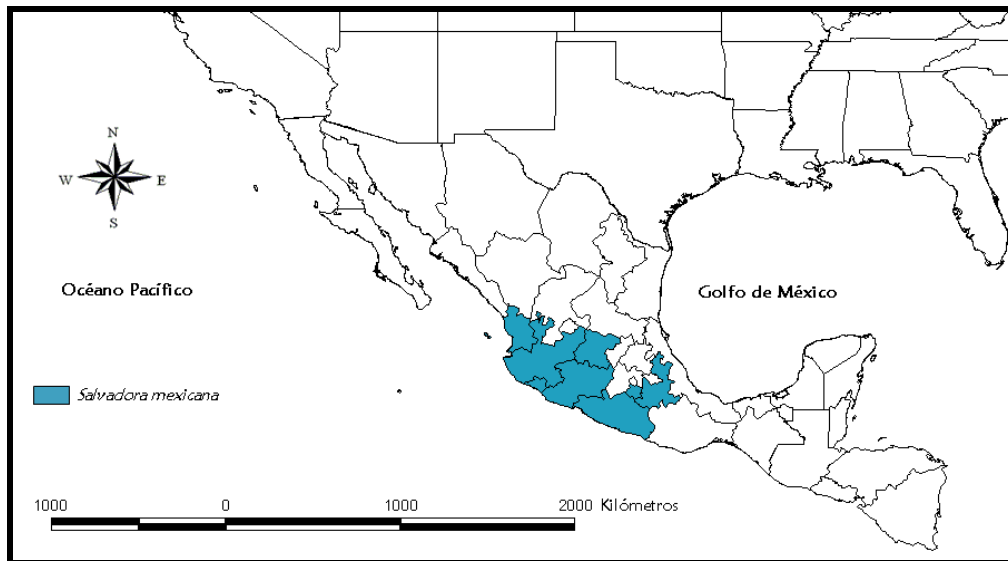


Figura 11. Distribución de *Salvadora mexicana*, ocurre al centro y sur de México, entre 1 y 1100 msnm.

El concepto filogenético de especie

La especie es la categoría jerárquica y la unidad más importante en estudios sistemáticos, ecológicos y evolutivos; por lo tanto, su descripción y delimitación resultan fundamentales como la diversidad de especies en la biota. Históricamente, en todos los grupos de organismos, las especies se han descrito con base en la presencia de caracteres morfológicos diagnósticos, los cuales distinguen una especie de otra (Crisci, 1994; Wiens y Servedio, 2000; Agapow *et al.*, 2004).

Al consultar la literatura se pueden encontrar distintas definiciones del concepto de especie y una de las causas es el espacio temporal (si se está trabajando con especies fósiles o recientes), también el tipo de caracteres que se deben tomar en cuenta (morfológicos o moleculares), de manera que se tienen “unidades” no comparables lo cual dificulta aún más la concepción de especie (Cracraft, 1989; Templeton, 1989; Luna, 1994; Baum y Donoghue, 1995; Cadena, 2003).

El concepto filogenético de especie representa un paso muy importante para el desarrollo de la teoría filogenética y también sobre otros conceptos de especie, ya que puede relacionar las especies a patrones históricos de evolución (Olmstead, 1995). El primero en proponer el concepto filogenético de especie fue Cracraft (1983) el cual dice;

“una especie es la agrupación diagnosticable más pequeña de organismos individuales dentro de la cual hay un patrón de ancestría y descendencia“, con una diagnosis estrictamente basada en uno o más caracteres sinapomórficos que identifican un agregado monofilético de individuos. A pesar de ello, varios autores a favor de un concepto filogenético difieren entre sí (Avice y Wollemborg, 1997; Mishler y Theriot, 2000; Wheeler y Platnick, 2000).

Los diferentes conceptos filogenéticos de especie, formulados hasta ahora, coinciden en que se debe dar mayor énfasis a las relaciones filogenéticas y no al tipo de reproducción, es decir, sí hay o no entrecruzamiento (de Queiroz y Donoghue, 1988; Avice y Wollenberg, 1997). Por otra parte, también coinciden en que las especies son grupos de organismos que comparten al menos un carácter derivado (Nixon y Wheeler, 1990; Agapow *et al.*, 2004) y posiblemente un patrón de ancestría y descendencia (Agapow *et al.*, 2004). El concepto filogenético de especie es el más utilizado en la práctica, ya que puede aplicarse a poblaciones alopátridas y a organismos con reproducción asexual. Por lo tanto, no depende del tipo de reproducción para poder probarse, permite recuperar la filogenia, así como la diagnosticabilidad, es decir, se puede reconocer a la especie en la naturaleza por una combinación única de caracteres, de tal modo que se pueden utilizar distintos métodos para llevar a cabo la delimitación de especies; permite hacer análisis objetivos de la especiación; sin embargo, siguiendo este concepto se reconocen varias especies, por lo cual debería incluir criterios biológicos y las unidades se pueden diagnosticar por caracteres triviales (Luna, 1994; Olmstead, 1995; Sites y Marshall, 2003; Agapow *et al.*, 2004).

Un factor muy importante dentro del concepto filogenético de especie, es el hecho de que bajo esta filosofía, no se reconoce a las subespecies, puesto que todas se han descrito bajo el concepto biológico de la taxonomía tradicional, es decir aquellas especies que tienen más de un tipo de formas (politípicas) son consideradas como subespecies, cuando en realidad se trata de taxones diferentes o del mismo taxón que aún no se alcanza a diferenciar. Para Cracraft (1983) y Echelle (1990) no deben erigirse categorías subespecíficas ni reconocer grupos en ellas, ya que las especies son las unidades de la evolución y los subgrupos generalmente son arbitrarios. A final de XIX y primera mitad del XX fueron descritas un gran número de subespecies para distinguir a los miembros de

una especie que presentaban variación geográfica. Sin embargo, existió un abuso de esta práctica por parte de ornitólogos y entomólogos principalmente. Por esta razón, se ha propuesto solución al problema, elevando muchas subespecies a la categoría de especie, aunque esto conduce a incrementar enormemente el número de especies. De acuerdo con Cracraft (1983) “las subespecies no existen si se define a los taxones como la unidad diagnosticable más pequeña, esto es, si las variantes geográficas se aceptan como especies”. Por lo tanto, las subespecies bajo el concepto filogenético son poblaciones delimitadas arbitrariamente y por consiguiente el uso de éstas, resulta inadecuado (Luna, 1994; Rodríguez-Robles y De Jesús-Escobar, 2000).

Es por eso que en este estudio se usa el concepto filogenético de especie y se consideran las siete especies del género *Salvadora* que de acuerdo con Flores-Villela (1993) son monotípicas: *Salvadora bairdi*, *S. deserticola*, *S. grahamiae*, *S. hexalepis*, *S. intermedia*, *S. lemniscata* y *S. mexicana*.

La aplicación del DNA mitocondrial en los estudios filogenéticos

En los inicios de la sistemática molecular los primeros marcadores que se utilizaron en análisis filogenéticos consistían principalmente en lípidos, cariotipos y electroforesis de proteínas, entre otros. Con el desarrollo posterior de tecnologías como la PCR, el potencial del DNA como fuente de datos informativos, se incrementó de manera notable siendo en la actualidad la principal fuente de datos utilizada en análisis moleculares (Saiki *et al.*, 1985; Mullis, 1990; Hillis *et al.*, 1997; Gernandt *et al.*, 2007). En el campo de la sistemática molecular, es fundamental la elección de marcadores moleculares adecuados, por lo que es importante tomar en cuenta; que datos se necesitan estudiar, así como, el tipo de herencia y la tasa de evolución del marcador. En general, el tipo de datos utilizados, para inferir relaciones filogenéticas, son las secuencias de DNA. Tanto el tipo de herencia, como las características genéticas del genoma mitocondrial, son los responsables de la aplicación del DNA mitocondrial (mtDNA) como marcador molecular en sistemática (Carranza, 2001).

Entre algunas de estas características está el hecho de que el mtDNA es la unidad mejor conocida del DNA eucarionte, porque es más fácil de purificar que cualquier otro segmento de DNA nuclear, principalmente porque presenta un elevado número de

copias y por no estar en el núcleo. El DNA mitocondrial es muy pequeño, por esta razón carece de intrones y secuencias repetitivas; por la notable uniformidad de su contenido génico, la cual, se ha probado en diferentes organismos, incluso en algunos protozoarios, ya que todos presentan el mismo conjunto de 37 genes. La tasa de cambio del DNA mitocondrial es notoriamente más elevada que la del DNA nuclear, así que al hacer comparaciones, las secuencias de DNA mitocondrial resultan más factibles; otra característica importante es que el DNA mitocondrial sólo se hereda por vía materna. Esta característica, aunada al hecho de que prácticamente no existe la recombinación en el DNA mitocondrial, lo han convertido en una herramienta con potencial elevado para estudios genealógicos (Nieto-Montes de Oca y Llorente, 1994).

Las secuencias de distintas regiones de DNA mitocondrial han permitido construir filogenias de diferentes grupos de vertebrados (Bryson *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 2005), incluyendo la familia Colubridae; así como también han permitido el estudio de poblaciones genéticas, dando lugar a disciplinas como la filogeografía (Avice, 1998).

Sin embargo, el uso de secuencias de DNA mitocondrial en estudios moleculares, trae consigo ciertas desventajas a considerar. Entre ellas, se ha encontrado evidencia de la presencia de secuencias repetitivas y pseudogenes en el mtDNA (Buburuzan *et al.*, 2007), lo cual refleja variación entre y dentro de los organismos. Estudios en vertebrados revelaron que también existe variación en el tamaño de las secuencias, precisamente debido a la duplicación, así como, más de un tipo de mtDNA en la célula (heteroplasmia). En cuanto a la variación en la talla del genoma mitocondrial, los estudios muestran que, se debe en parte a la tasa metabólica de los organismos, que además está relacionada con otros factores como la talla corporal, el tiempo de generación de los organismos y la división celular (Rand, 1994).

El grupo de las serpientes ha sido en general bien estudiado en cuanto a sus caracteres morfológicos, ya que con base en estos se han descrito nuevas especies (Bryson *et al.*, 2005; Murphy *et al.*, 2005; Stafford, 2004; Nieto-Montes de Oca, 2003; Grismer *et al.*, 2003) dentro del grupo. Sin embargo los resultados obtenidos con los caracteres moleculares, no siempre coinciden con las hipótesis que se tenían previamente con respecto a la integridad taxonómica propuesta por los datos morfológicos (Rodríguez-Robles y De Jesús Escobar, 2000) debido a ello resulta necesario integrar

datos moleculares a las hipótesis filogenéticas ya que existen taxones donde los caracteres morfológicos no resuelven los problemas taxonómicos debido a que hay poca variabilidad de un taxón a otro o bien la homología de los caracteres no es muy clara (González, 1997; Salgado, 2006; Contreras-Ramos y Goyenechea, 2007).

JUSTIFICACIÓN

Debido a la falta de estudios recientes del género *Salvadora* sobre todo la inexistencia de trabajos acerca de las relaciones filogenéticas de todo el grupo, es necesario realizar la filogenia con base en caracteres moleculares, ya que se tienen hipótesis previas acerca de las relaciones de parentesco de algunas especies del género, pero todas ellas están basadas en caracteres morfológicos. Las relaciones filogenéticas del grupo son poco conocidas y no se tiene una hipótesis filogenética del género que permita conocer la diversificación evolutiva del grupo y sí existe una relación entre la filogenia y la distribución geográfica de las especies que conforman el género *Salvadora*.

OBJETIVOS

General

Conocer las relaciones filogenéticas del género *Salvadora*, mediante un estudio molecular utilizando el marcador 16S del mtDNA.

Particulares

Realizar un análisis cladístico para conocer las relaciones filogenéticas de las especies del género *Salvadora*.

Realizar un análisis bayesiano el cual va a permitir incluir la información del modelo de sustitución de nucleótidos presente en las secuencias y con ello comparar las probabilidades posteriores, para determinar, si existe congruencia con el análisis de máxima parsimonia.

MATERIALES Y MÉTODO

Extracción de DNA

Se utilizaron muestras de tejido hepático congelado y almacenado en alcohol al 100% que corresponden a seis de las siete especies del género: *Salvadora deserticola*, *S. grahamiae*, *S. hexalepis*, *S. intermedia*, *S. lemniscata* y *S. mexicana*, que fueron donadas por el Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias (MZFC) de la UNAM y por el Royal Ontario Museum (ROM) de Canadá. El tejido que se usó para la especie *S. bairdi* fue de una muda. Las siglas JAC y CSL corresponden, a los colectores de campo; JAC, Jonathan Campbell, de un ejemplar del MZFC y CSL de un ejemplar del ROM (Cuadro 3).

Cuadro 3. Relación de los tejidos que se utilizaron para la extracción de DNA

Número de catálogo	Especie	Estado	Localidad
Muda	<i>S. bairdi</i>	Tlaxcala	Tzompantepec, Colonia Tzauilla
CSL-6471	<i>S. deserticola</i>	Arizona (EUA)	E de Portal camino a Rodeo
ROM-23326	<i>S. grahamiae</i>	Arizona(EUA)	
MZFC-11428	<i>S. hexalepis</i>	BCS	Mulegé, 14 Km N Santa Rosalía, arroyo El Infierno
MZFC-14384	<i>S. intermedia</i>	Puebla	Tepanco de López al NNE de San Luis Temalacayuca.
JAC-21887	<i>S. lemniscata</i>	Oaxaca	Cerca de Mixtequilla, Cerro del Mármol
JAC-22332	<i>S. mexicana</i>	Guerrero	En el lado N de Tierra Colorada

Para la extracción de DNA se utilizó acetato de amonio 7.5M (Anexo 1) siguiendo el protocolo de extracción de Sambroock *et al.* (1989). La calidad del DNA se evaluó cualitativamente, mediante una electroforesis en gel de agarosa (1%), cargando 2µl de DNA genómico de cada muestra. Posteriormente el DNA se almacenó a -20 °C.

Amplificación de la región 16S del DNA mitocondrial

La región del 16S del mtDNA, se amplificó por medio del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizaron los *primers* 16Sar-F (5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3)' y 16Sbr-R (5' CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3'; Palumbi *et al.*, 1991). El volumen de las reacciones fue de 25 μ l. Para ello cada tubo contenía 19.45 μ l de ddH₂O; 2.5 μ l de buffer 10X, 1.5 μ l de MgCl 50X, 0.2 μ l de dNTPs, 0.5 μ l de cada *primer* 50X y 0.2 μ l de Taq polimerasa (concentraciones finales). Los *primers* se utilizaron tanto para las reacciones de amplificación como para la secuenciación.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador, con las siguientes condiciones; 94°C por 60s, 48° C por 50s, 72° C por 80s; 40 ciclos. Además se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94°C por siete minutos y una elongación final a 72°C por siete minutos.

Los productos de PCR se evaluaron, colocando 2 μ l por cada muestra en un gel de agarosa (1%), y las reacciones positivas se purificaron con PEG (Anexo 2), proceso mediante el cual se eliminan los *primers*, el cloruro de magnesio, la polimerasa y los dNTPs restantes que no fueron utilizados durante la amplificación. Los productos purificados se resuspendieron en 30 μ l de agua destilada.

Reacción de secuenciación

El volumen final de la reacción de secuenciación fue de 10 μ l, los cuales corresponden a 6 μ l del producto amplificado, 1 μ l de buffer 5X, 1 μ l de *primer* (16Sar-F o 16Sbr-R) y 2 μ l de “Big Dye Terminador Reaction Mix” (Applied Biosystems, Inc.). La reacción de secuenciación se llevó a cabo en un termociclador, con las siguientes condiciones: 96°C por 30s, 50°C por 15s, 60°C por 4 minutos; 69 ciclos. Los productos de la reacción de secuenciación fueron purificados mediante precipitación con acetato de sodio (Anexo 3). Los productos purificados se eluyeron con 25 μ l de “Template Supression Reagent” (Applied Biosystems, Inc.).

Los productos se secuenciaron usando el secuenciador automático ABI modelo 310 (Applied Biosystems, Inc.). Las corridas se realizaron con un capilar corto (47cm) a un

tiempo de inyección de 35s y con un tiempo de corrida de 45 minutos. Las secuencias obtenidas fueron alineadas y editadas manualmente con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

Análisis filogenético

La matriz de datos consta de ocho secuencias correspondientes a la región 16S del DNA mitocondrial. Siete de ellas pertenecen a taxones del género *Salvadora* y una al grupo externo *Sympholis sp.*, que también forma parte de la subfamilia Colubrinae. Cada una de las secuencias tuvo una longitud de 436 pb. Para inferir la filogenia del género *Salvadora* se utilizaron dos métodos, máxima parsimonia e inferencia bayesiana.

En el análisis de máxima parsimonia (MP), se llevó a cabo utilizando el programa PAUP* 4.0B8 de Windows (Swofford, 1998). Para ello se realizó una búsqueda exhaustiva, considerando a todos los caracteres con el mismo peso y los *gaps* fueron tratados como datos faltantes. La medida de apoyo de las ramas se determinó con el método de remuestreo (*bootstrap*) con una búsqueda exacta (*branch-and-bound*) con 10000 réplicas de incorporación de taxones al azar (*random addition sequence*) e intercambio de ramas (*tree-bisection-reconnection*). Para el análisis bayesiano (IB) primero se obtuvo el modelo de sustitución de nucleótidos TIM2+G con el programa jModelTest 0.1.1 (Posada, 2003). El modelo fue sugerido por el criterio AIC (Criterio de Información de Akaike) y el BIC (Criterio de Información Bayesiano). Posteriormente se utilizó el programa MrBAYES 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), en el cual se indicaron los parámetros para poder iniciar el análisis.

El análisis bayesiano de las secuencias de mtDNA se corrió por 4 millones de generaciones por cuatro cadenas, con una frecuencia de muestreo de 1000. Durante el análisis fueron ignorados los primeros mil árboles ya que a partir de estos los valores de verosimilitud fueron estables. Por lo tanto el consenso posterior de los árboles se construyó a partir de 4001 muestras, utilizando el programa PAUP* 4.0B8 (Swofford, 1998), donde el porcentaje que recobró un clado particular, representa la probabilidad posterior (PP) de ese clado.

RESULTADOS

🌿 Análisis filogenético

El análisis de máxima parsimonia (MP) mostró que de los 436 caracteres totales, 373 fueron constantes, 39 fueron variables y sólo 24 resultaron informativos. Se obtuvo un árbol con una longitud de 95 pasos, el índice de consistencia (IC) fue de 0.8526 y el índice de retención (IR) de 0.6744. De acuerdo con la topología del cladograma, las relaciones filogenéticas dentro del género *Salvadora* quedan parcialmente resueltas, ya que se forma una politomía entre las especies del grupo interno y el taxón elegido como grupo externo. En el cladograma se pueden observar un grupo formado por cinco especies, las cuales se distribuyen en la región norte esto es: (*Salvadora bairdi*, ((*S. hexalepis*+ *S. deserticola*)+ *S. intermedia*)+ *S. grahamiae*)) con excepción de *S. intermedia*, mientras que las especies que se distribuyen en el sur de México, forman otro grupo *S. lemniscata*+ *S. mexicana* (Figura 12).

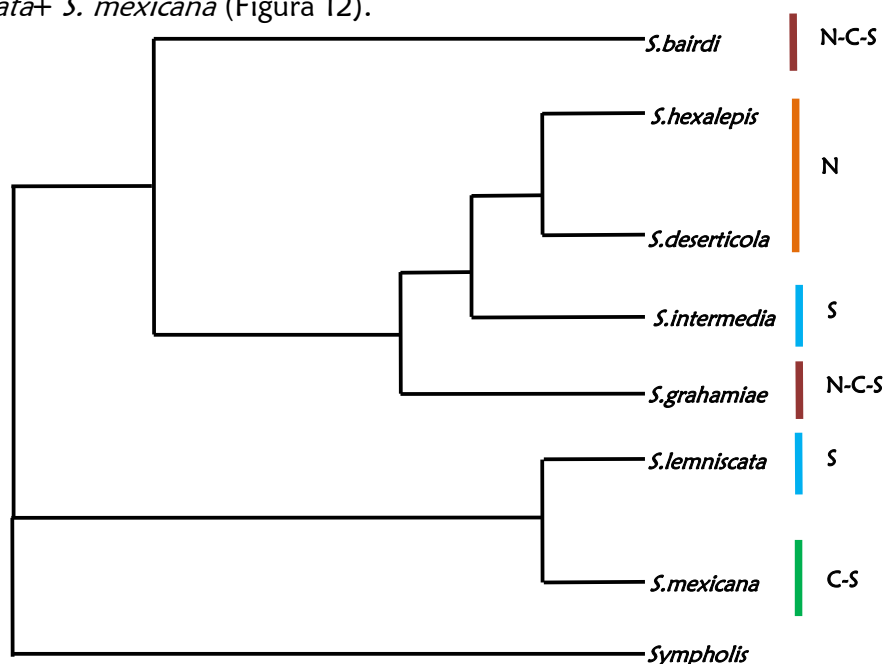


Figura 12. Árbol filogenético de MP de los taxones del género *Salvadora*, (L= 95; IC=0.8526; IR=0.6744), Norte; Centro; Sur.

En el análisis de remuestreo para el apoyo de las ramas, el consenso del árbol se obtuvo mediante una regla de mayoría de 50%. Los valores de soporte de cada una de las ramas indican que el grupo de las especies que se distribuyen en el norte (*Salvadora bairdi*, ((*S. hexalepis*+ *S. deserticola*)+ *S. intermedia*)+ *S. grahamiae*)), queda apoyado con una frecuencia de BTP=95. Dentro de este grupo *S. hexalepis*+ *S. deserticola* presentan un apoyo de BTP=83, mientras que la relación de estas dos especies con *S. intermedia* queda apoyada con BTP=79 ((*S. hexalepis*+ *S. deserticola*)+ *S. intermedia*), la posición de *S. grahamiae* con respecto a estas tres especies presenta un apoyo de BTP=61. En cambio, el clado formado por (*S. mexicana*+ *S. lemniscata*) tiene un apoyo de BTP=59 el cual es relativamente bajo, lo cual indica que no forman un grupo hermano (Figura 13).

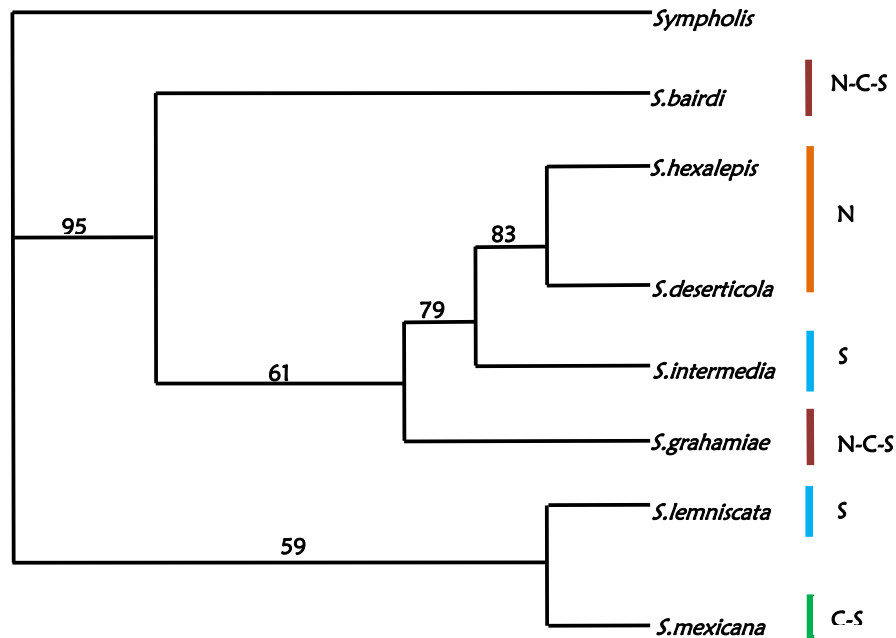


Figura 13. Árbol de consenso del remuestreo (10000 réplicas) obtenido por análisis de MP. Los números por arriba de las ramas indican los valores de *bootstrap* por más del 50% de las réplicas. Norte; Centro; Sur.

La topología del árbol resultante del análisis bayesiano fue similar a la obtenida con máxima parsimonia, donde se observa un grupo formado por cinco especies del género *Salvadora*, pero no se definen las relaciones de *S. lemniscata* y *S. mexicana* con respecto a éste. La posición de estos dos taxones en la topología del árbol de inferencia bayesiana es

congruente con el análisis de máxima parsimonia, *Salvadora lemniscata* y *S. mexicana* no forman un grupo hermano. En el árbol se puede observar un clado que contiene a las cinco especies que se distribuyen en la región norte de México y sur de Estados Unidos (*Salvadora bairdi*, ((*S. hexalepis*+ *S. deserticola*)+ *S. intermedia*)+ *S. grahamiae*). Este grupo quedó apoyado por PP=98. El consenso de regla de mayoría (75%) muestra que la relación entre *Salvadora hexalepis* y *S. deserticola* queda apoyada por PP=100, y con respecto a *S. intermedia* el soporte fue PP=93, con *S. grahamiae* fue PP=77 (Figura 14).

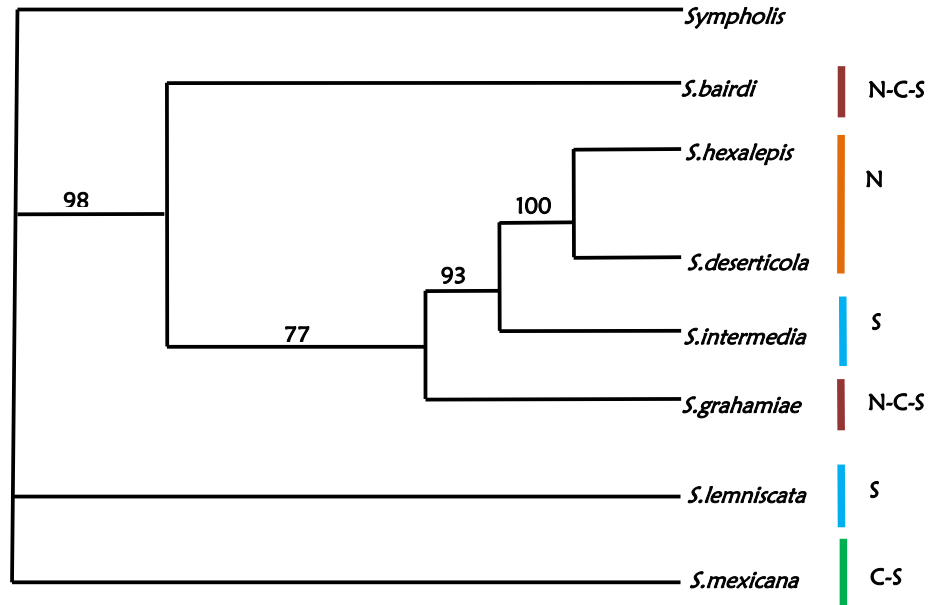


Figura 14. Árbol obtenido con inferencia bayesiana utilizando el modelo TIM2+G. Los números por encima de las ramas indican las probabilidades posteriores. Norte; Centro; Sur.

DISCUSIÓN

Análisis filogenético

En años recientes el número de estudios que utilizan secuencias de genes mitocondriales para inferir relaciones filogenéticas dentro del grupo de los colúbridos se ha incrementado notablemente (Heise *et al.*, 1995; Rodríguez-Robles y De Jesús-Escobar, 2000; Bryson *et al.*, 2007; Lawson *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos genes resultan ser mejores que otros en cuanto a la topología de árboles se refiere (Nagy *et al.*, 2004).

Los trabajos que se han realizado del género *Salvadora* corresponden a las descripciones de las especies tipo, así como a revisiones morfológicas no muy recientes (Baird y Girard, 1853; Bibron y Duméril, 1854; Jan, 1860; Cope, 1867 y 1895; Bogert, 1939; Schmidt, 1940; Hartweg, 1940). Sin embargo, se tienen propuestas previas acerca de las relaciones filogenéticas de algunas especies del género, ya que de acuerdo con Hartweg (1940), *S. intermedia* parece estar cercana a *S. grahamiae*, mientras que Smith (1938) mencionó que *S. mexicana* coincidía en casi todos sus caracteres morfológicos con *S. lemniscata* por lo que en su estudio agrupó a estas dos especies y, además, mencionó que *S. bairdi* era muy similar a *S. grahamiae*, lo cual coincide con el trabajo de Schmidt (1940). Por otra parte Bogert (1939) mencionó que *S. mexicana* parece estar relacionada con *S. lemniscata* e incluso consideró que *S. lemniscata* era la especie más basal y que *S. mexicana* se derivó de ésta.

De acuerdo con el marcador molecular 16S del mtDNA, las relaciones filogenéticas dentro del género *Salvadora* quedan parcialmente resueltas. En los análisis de máxima parsimonia e inferencia bayesiana, se puede observar que todos los taxones del grupo interno forman una politomía con el taxón utilizado como grupo externo. Sin embargo, cinco de las siete especies del género, forman un grupo, el cual se mantiene en los dos análisis tanto de MP como IB (*Salvadora bairdi*, ((*S. hexalepis*+ *S. deserticola*)+ *S. intermedia*)+ *S. grahamiae*) y las relaciones al interior del clado son las mismas en los dos árboles.

Sin embargo, las relaciones filogenéticas del género *Salvadora* podrían definirse, utilizando más de un taxón como grupo externo, o bien, al integrar un mayor número de secuencias del 16S o bien de otras regiones del DNA mitocondrial o incluso nuclear, lo cual ayudaría a probar si se trata de un grupo monofilético.

Por otra parte, es necesario considerar que los resultados que se obtienen con datos moleculares no siempre coinciden con los estudios basados en caracteres morfológicos. Lo ideal en sistemática sería que al integrar datos moleculares, en las hipótesis filogenéticas basadas en morfología, coincidan con la integridad taxonómica propuesta por estos caracteres, lo cual no siempre ocurre (Rodríguez-Robles y De Jesús Escobar, 2000), aunque lo mejor es utilizar matrices combinadas.

De acuerdo con las propuestas previas acerca de las relaciones de algunas especies del género, la topología del árbol de MP, no coincide con los trabajos anteriores (Smith, 1938; Bogert, 1939; Schmidt, 1940). Bogert (1939) encontró que *S. lemniscata* es muy similar a *S. mexicana*, pero la primera tiene una distribución restringida por lo que consideró que *S. lemniscata* era un taxón más basal y que *S. mexicana* seguramente se derivó de ésta. En la topología del árbol de máxima parsimonia (Figura 12) estas dos especies parecen compartir más caracteres moleculares entre sí, que con el clado formado por las otras cinco especies, sin embargo los valores de remuestreo son muy bajos (BTP=59) lo cual indica que no se trata de un grupo hermano (Figura 13).

Con respecto a las cinco especies del género que se agrupan, se mantiene la posición taxonómica de *Salvadora hexalepis*+ *S. deserticola* e incluso los valores de remuestreo en MP son los más altos para este grupo (BTP=83), lo mismo ocurre en el análisis bayesiano (PP=100), estas dos especies coinciden en su distribución la cual solo ocurre en la parte norte de México y el suroeste de E.U.A. y de acuerdo con los caracteres morfológicos, *S. deserticola* es muy parecida a *S. hexalepis* (Schmidt, 1940) e incluso algunos autores como Liner (1994; 2007) consideran a *S. deserticola* como una subespecie de *S. hexalepis*. Sin embargo, de acuerdo con el trabajo de Bogert y Degenhart (1961) son dos taxones distintos. Por lo tanto, en este caso en particular, tanto la distribución y los estudios con base en caracteres morfológicos coinciden con el análisis de caracteres moleculares utilizando los dos métodos de inferencia filogenética.

La posición taxonómica de *Salvadora intermedia* con respecto a los taxones que se distribuyen en el norte, tiene un soporte de 83 y 93 en parsimonia y análisis bayesiano respectivamente. De acuerdo con el estudio de Hartweg (1940) *S. intermedia* está cercanamente relacionada con *S. grahamiae*, sin embargo, los dos análisis filogenéticos indican que *S. intermedia* está más relacionada con el grupo hermano formado por:

Salvadora hexalepis + *S. deserticola*. En cuanto a su distribución *S. intermedia* solo ha sido registrada en Guerrero, Puebla y Oaxaca (Smith y Taylor, 1945) y se esperaría que se agrupara con *S. mexicana* y *S. lemniscata* que presentan una distribución sureña; sin embargo, en el cladograma se ubica junto a las especies que se distribuyen en el norte de México y sur de E.U.A. Por otra parte, la posición taxonómica de *S. grahamiae* más su grupo hermano (*S. hexalepis* + *S. deserticola*) + *S. intermedia*, tiene un soporte de BTP=61 y PP=77 en los análisis de parsimonia y bayesiano respectivamente, mientras que el clado formado por *S. bairdi* más su grupo hermano (((*S. hexalepis* + *S. deserticola*) + *S. intermedia*) + *S. grahamiae*) queda apoyado por BTP=95 y PP=98 (Figuras 13; 14). De acuerdo con un estudio de Smith (1938), *S. grahamiae* es más parecida en cuanto a su morfología a *S. bairdi*, lo cual también coincide con Schmidt (1940). Sin embargo, los dos análisis de inferencia filogenética, indican que *S. grahamiae* es el grupo hermano del formado por: *S. hexalepis*, *S. deserticola* y *S. intermedia*, por lo tanto *S. bairdi*, que es el grupo más basal, no está estrechamente relacionado con *S. grahamiae*. Los análisis de MP e IB, no son consistentes con las hipótesis previas que se tienen del género, pero en ambos se observa un clado formado por cinco, de las siete especies del género *Salvadora*, donde las relaciones al interior del árbol se mantienen en los dos análisis.

CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, las relaciones filogenéticas dentro del género *Salvadora* quedan parcialmente resueltas.
- En el análisis de máxima parsimonia se observa un clado formado por: (*Salvadora bairdi*, (((*S. hexalepis*+ *S. deserticola*)+ *S. intermedia*)+ *S. grahamiae*)), y por otro lado (*S. lemniscata*+ *S. mexicana*), sin embargo, se forma una politomía entre los taxones del grupo interno y el taxón utilizado como grupo externo.
- Los resultados del análisis bayesiano apoyan las relaciones de: (*Salvadora bairdi*, (((*S. hexalepis*+ *S. deserticola*)+ *S. intermedia*)+ *S. grahamiae*)), donde las probabilidades posteriores son superiores a 70, por lo tanto es congruente con el análisis de máxima parsimonia.

LITERATURA CITADA

- Agapow, P. M., Bininda-Emonds, O. R. P., Crandall, K. A., Gittleman, J. L., Mace, G. M., Marshall, J. C. y Purvis, A. 2004. The impact of the species concept on biodiversity studies. *Quarterly Review Biology* 79:161–179.
- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7:371-379.
- Avise, J. C. y Wollenberg, K. 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7748-7755.
- Baird, S. F. y Girard, C. 1853. Catalogue of North American reptiles in the Museum of the Smithsonian Institution. Part 1.-Serpents. *Smithsonian Institution Washington* 16:172.
- Balakrishnan, R. 2005. Species concepts, species boundaries, and species identification: a view from the tropics. *Systematic Biology* 54:689–693.
- Baum, D. A. y Donoghue, M. J. 1995. Choosing in among alternative phylogenetic species concepts. *Systematic Botany* 20:560-573.
- Blanchard, F. N. 1925. A key to the snakes of the United States, Canada and Lower California. *Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters* 4:1-65.
- Bocourt (non Cope). 1890. *Drymobius (Eudryas) pulcherrimus*. *Mission Scientifique au Mexique Reptiles Livre* 12:725.
- Bogert, C. M. 1935. *Salvadora grahamiae virgultea*. A new subspecies of the Patch-nosed snake. *Bulletin of Southern California Academy of Science* 34:88-94.
- Bogert, C. M. 1939. Notes on snakes of genus *Salvadora* with a redescription of a neglected mexican species. *Copeia* 3:140-147.
- Bogert, C. M. 1985. [title unavailable]. *Snake System Newsl.* Nov. (3). [not examined: discusses *Salvadora deserticola* sp. status]

- Bogert, C. M. y Oliver, J. A. 1945. A preliminary analysis of the herpetofauna of Sonora. *Bulletin of American Museum of Natural History* 83:297-426.
- Bogert, C. M. y Degenhardt, W. G. 1961. An addition to the fauna of the United States, the Chihuahua ridge-nosed rattlesnake in New Mexico. *American Museum Novitates* 2064.
- Boulenger, G. A. 1893. Catalogue of the snakes in the British Museum. *Natural History Museum London* 1: 392; 3:622.
- Buburuzan, A., Gorgan, L. D. y Bara, I. I. 2007. Types of DNA used in speciation and phylogeny studies. *Analele Științifice ale Universității Alexandru Ioan Cuza, Secțiunea Genetica și Biologie Moleculară* 8:25-30.
- Cadena, C. D. 2003 Taxonomía de *Cistothuros apolinari* (Troglodytidae), conceptos de especie y conservación de las aves amenazadas de Colombia: un comentario. *Ornitología Colombiana* 1:71-75.
- Cadle, J. E. 1988. Phylogenetic relationships among advanced snakes: a molecular perspective. *University of California Publications in Zoology* 119:1-70.
- Canseco-Márquez, L. y M. G. Gutiérrez-Mayén. 2006. Guía de campo de los anfibios y reptiles del Valle de Zapotlán, Puebla. Sociedad Herpetológica Mexicana A.C. Escuela de Biología, BUAP 52-62.
- Carranza, S. 2001. Capítulo XI: Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los anfibios y reptiles ibéricos. Atlas y libro rojo de los anfibios y reptiles de España. 551-579.
- Contreras-Ramos, A. y Goyenechea, I. 2007. Capítulo 4: Controversias en sistemática filogenética. En: Contreras-Ramos, A. Goyenechea, I. Cuevas, C. C. e Iturbe, A. U. (eds.) *La sistemática base del conocimiento de la biodiversidad*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 47-53.
- Cope, E. D. 1867. On the reptilia and batrachia of the Sonoran Province of the Nearctic Region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Philadelphia* 18:300-314.

- Cope, E. D. 1895. *Drymobius lemniscatus*. *Transactions of the American Philosophical Society* 18:203.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation. *Current Ornithology* 1:159-187.
- Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. En: Otte, D. y Endler, J. A. (eds.) *Speciation and consequences*. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts.
- Crisci, J. 1994. III. La especie: realidad y conceptos. En: Llorente, B. J. y Luna, V. I. (comps.) *Taxonomía Biológica*, Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. 53-64.
- Crother, B. I., Boundy, J., Campbell, J. A., de Queiroz, K., Frost, D. R., Highton, R., Iverson, J. B., Meylan, P. A., Reeder T. W., Seidel, M. E., Sites Jr., J. W., Taggart, T. W., Tilley, S. G. y Wake, D. B. 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.
- Davis, W. B. y Dixon, J. R. 1957. Notes on Mexican snakes (Ophidia). *Southwestern Naturalist* 2:19-27.
- Davis, W. B. y Smith, H. M. 1953. Snakes of the Mexican state of Morelos. *Herpetologica* 8:133-149.
- de Queiroz, K. y Donoghue, M. J. 1988. Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics* 4:317-338.
- Dobzhansky, T. 1937. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Dowling, H. G., Hass, C. A., Hedges, S. B., y Highton, R. 1996. Snake relationships revealed by slow-evolving proteins: a preliminary survey. *Journal Zoology of London* 240:1-28.
- Dowling, H. G. y Duellman, W. E. 1978. *Systematic herpetology: a synopsis of families and higher categories*. HISS Publications, New York.

- Duellman, W. E. 1961. The amphibians and reptiles of Michoacán, México. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History* 15:1-148.
- Duméril, A. M. C., Bibron, G. y Duméril, A. H. A. 1854. *Erpétologie générale ou Histoire Naturelle complète des Reptiles*. 7 (1): Paris, xvi + 780 S.
- Echelle, A. E. 1990. In defense of the phylogenetic species concept and the ontological status of hybridogenetic taxa. *Herpetologica* 46:109-113.
- Flores-Villela, O. 1993. *Herpetofauna Mexicana: lista anotada de las especies de anfibios y reptiles de México, cambios taxonómicos recientes y nuevas especies*. The Carnegie Museum of Natural History, Pittsburgh.
- Flores-Villela, O. y Gerez, P. 1994. *Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo*. México.
- Frost, D. R. y Hillis, D. M. 1990. Species in concept and practice: herpetological applications. *Herpetologica* 46:87-104.
- García, A. y Ceballos, G. 1994. *Guía de campo de anfibios y reptiles de la Costa de Jalisco, México*. México, D.F.
- Gernandt, D. S., Zerón, F. O. y Goyenechea, I. 2007. Inferencia filogenética mediante secuencias de DNA: un ejemplo de los pinos piñoneros. En: Contreras-Ramos, A. Goyenechea, I. Cuevas, C. C. e Iturbe, A. U. (eds.) *La sistemática base del conocimiento de la biodiversidad*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. 55-65.
- González, D. 1997. El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60:137-157.
- Gravlund, P. 2001. Radiation within the advanced snakes (Caenophidia) with special emphasis on African opistoglyph colubrids, based on mitochondrial sequence data. *Biological Journal of the Linnean Society* 72:99-114.
- Greene, H. W. 1997. *Snakes: The evolution of mystery innature*. University of California Press. Berkeley, Los Angeles London.

- Grismer, L. L., Das, I. y Tzi Ming-Leong. 2003. A new species of *Gongylosoma* (Squamata:Colubridae) from Pulau Tioman, West Malaysia. *Herpetologica* 59:565-572.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hardy, L. M. y McDiarmid, R. W. 1969. The amphibians and reptiles of Sinaloa, Mexico. *University of Kansas Publications, Museum of Natural History* 18:196-199.
- Haro, J. 1999. ¿Qué es una especie? *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 26: 105-112.
- Hartweg, N. 1940. Description of *Salvadora intermedia*, new species, with remarks on the *grahamiae* group. *Copeia* 4:256-265.
- Hillis, D. M., Muritz, C. y Mable, B. K. 1996. *Molecular systematics*. 2ª Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland Massachusetts USA.
- Huelsenbeck, J. P. y Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Jan, 1860. *Salvadora bairdii*. *Iconographie générale des ophidiens Livre 2 pl.2.fig. 2*.
- Kelly, C. M. R., Barker, N. P. y Villet, M. H. 2003. Phylogenetics of advanced snakes (Caenophidia) based on four mitochondrial genes. *Systematic Biology* 52:439-459.
- Klauber, L. M. 1931. A statistical survey of the snakes of the Southern Border of California. *Bulletin of the Zoological Society of San Diego* 8:1-93.
- Kraus, F. y Brown, W. M. 1998. Phylogenetic relationships of colubroid snakes based on mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society* 122:455-487.
- Lawson, R., Slowinski, J. B., Crother, B. I. y Burbrink F. T. 2005. Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): new evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37:581-601.

- Liner, E. A. 1994. Scientific and common names for the amphibians and reptiles of México in english and spanish. Nombres científicos y comunes en inglés y español de los anfibios y reptiles de México. *SSAR Herpetological Circular USA*.
- Liner, E. A. 2007. A Checklist of the amphibians and reptiles of México. Louisiana State University. *Occasional Papers of the Museum of Natural Science*.
- Luna, V. I. 1994. V Los conceptos de especie evolutiva y filogenética. En: Llorente, B. J., Luna, V. I. (comps.) *Taxonomía biológica*, Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. 83-94.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist. Columbia University Press. New York.
- Mayr, E. 1987. The species as category, taxon and population. En: Roger, J. y Fischer, J. L. (eds.) *'Histoire du Concept d'Espécedans les Sciences de la Vie'*. Paris: Fondation Singer-Polignac. 294-311.
- McDowell, S. B. 1987. Systematics. En: Seigel, R. A., Collins, J. T. y Novak, S. S. (eds.) *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*. Macmillan Publishing, New York, NY. 3-50.
- Mishler, B. D. y Theriot, E. C. 2000. The phylogenetic species concept (sensu Mishler and Theriot): monophyly, apomorphy, and phylogenetic species concepts. En: Wheeler Q. D. y Meier, R. (eds.) *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. Columbia University Press. New York. 44-54.
- Mullis, K. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 4:56-65.
- Murphy, J. C., Voris, H. K. y Auliya, M. 2005. A new species of Enhydryis (Serpentes: Colubridae: Homalopsinae) from the Kapuas River System, West Kalimantan, Indonesia. *Raffles Bulletin of Zoology* 53:271-275.
- Nieto-Montes de Oca, A. 2003. A new species of the *Geophis dubius* group (Squamata: Colubridae) from the Sierra de Juárez of Oaxaca, México. *Herpetologica* 59:572-585.

- Nieto-Montes de Oca, A. y Llorente, B. J. 1994. IX. Caracteres moleculares en los métodos de la sistemática moderna. En: Llorente, B. J., Luna, V. I. (comps.) *Taxonomía biológica*, Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. 157-205.
- Nixon, K. C. y Wheeler, Q. D. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6:211-223.
- Olmstead, R. G. 1995. Species concepts and plesiomorphic species. *Systematic Botany* 20: 623-630.
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice L. y Grabowski, G. 1991. The simple fool's guide to PCR. Special Publication, Department of Zoology. University of Hawaii, Honolulu.
- Posada D. In press. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*. Guindon S and Gascuel O (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52:696-704.
- Pough, F. H., Janis, C. M. y Heiser, J. B. 2005. *Vertebrate life*. 7ª Ed. Prentice Hall. 336-337.
- Ramírez-Bautista, A. 1994. Manual y claves ilustradas de los anfibios y reptiles de la región de Chamela, Jalisco, México.
- Ramírez-Bautista, A. y Arizmendi, M. C. 2004a. *Salvadora bairdi*. Sistemática e historia natural de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W013. México. D.F. 1-6.
- Ramírez-Bautista, A., Mendoza-Quijano, F. y Arizmendi, M. C. 2004b. *Salvadora intermedia*. Estatus y conservación de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W043. México. D.F. 1-4.

- Ramírez-Bautista, A., Mendoza-Quijano, F. y Arizmendi, M. C. 2004c. *Salvadora mexicana*. Estatus y conservación de algunos anfibios y reptiles de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Universidad Nacional Autónoma de México. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W043. México. D.F. 1-5.
- Rand, D. M. 1994. Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends in Ecology and Evolution* 9:125-131.
- Rodríguez-Robles, J. A. y De Jesús-Escobar, J. M. † 2000. Molecular systematics of new world Gopher, Bull, and Pinesnakes (*Pituophis*: Colubridae), a transcontinental species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14:35-50.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., y Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Salgado, H. E. 2006. Sistemática Molecular de las especies del género *Astragalus* (Fabaceae) distribuidas en el centro de México. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. VI. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2ª Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 6-62.
- Schmidt, K. P. 1940. Notes on Texas snakes of the genus *Salvadora*. *Zoological Series of Field Museum of Natural History* 24:143-150.
- Sites Jr, J. W. y Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: a renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution* 18:462-470.
- Smith, H. M. 1938. Notes on the snakes of the genus *Salvadora*. *Department Zoology, Universidad de Kansas*. 229-237.
- Smith, H. M. 1941. Further notes on mexican snakes of the genus *Salvadora*. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 99:1-12.

- Smith, H. M. 1943. Summary of the collections of snakes and crocodylians made in Mexico under the Walter Rathbone Bacon traveling scholarship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:393-504.
- Smith, H. M. y Smith, R. B. 1976. Synopsis of the herpetofauna of Mexico. Volume III. Source Analysis and Index for Mexican Reptiles. John Johnson, North Bennington, Vermont, EUA.
- Smith, H. M. y Taylor, E. H. 1945. An annotated checklist and key to the snakes of Mexico. *Bulletin of American Museum of Natural History* 187:1-239.
- Stafford, P. J. 2004. A new species of *Tantilla* (Serpentes: Colubridae) of the Taeniata group from Southern Belize. *Journal of Herpetology* 38:43-52.
- Stejneger, L. 1902. The reptiles of the Huachuca Mountains, Arizona. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 25:149-158.
- Stejneger, L. y Barbour, T. 1933. A check list of North American amphibians and reptiles. 3ª Ed. Harvard University Press. I-XIV:1-85.
- Swofford, D. L. 1998. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tanner, W. W. 1985. Snakes of western Chihuahua. *The Great Basin Naturalist* 45:615-676.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: a generic perspective. En: Otte, D. y Endler, J. A. (eds.) *Speciation and Its consequences*. Sunderland, England: Sinauer Associates.
- Uribe-Peña, Z., Ramírez-Bautista, A. y Casas-Andreu, G. 1999. Anfibios y reptiles de las Serranías del D.F., México. Instituto de Biología, UNAM. México, D.F.
- Vidal, N. y Hedges, S. B. 2002. Higher-level relationships of caenophidian snakes inferred from four nuclear and mitochondrial genes. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Paris Biologies* 325:987-995.

- Wheeler, Q. D. y Platnick, N. I. 2000. A critique from the Wheeler and Platnick phylogenetic species concept perspective: problems with alternative concepts of species. En: Wheeler Q. D. y Meier, R. (eds.) *Species concepts and phylogenetic theory: a debate*. Columbia University Press. New York. 133-145.
- Wiens, J. J. y Servedio, M. R. 2000. Species delimitation in systematics: inferring diagnostic differences between species. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 267:631-636.
- Williams, K. y Wallach, V. 1989. Snakes of the World, vol. 1. Synopsis of snake generic names. Krieger, Malabar.FL.
- Wright, A. H. y Wright, A. 1957. Handbook of snakes of the United States and Canada. Cornell University Press.
- Zaher, H. 1999. Hemipenial morphology of the South American xenodontine snakes, with a proposal for a monophyletic Xenodontinae and a reappraisal of colubroid hemipenes. *Bulletin of American Museum of Natural History* 240:1-168.
- Zug, G. R., Vitt, L. J. y Caldwell, J. P. 2001. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. Academic Press, New York, NY.
- Burkhardt, T. 2005. Archive for the *Salvadora* category. México Herpetology. <http://mexico-herps.com/Serpentes/Salvadora>
- Castellanos, W. 2009. Todo sobre las serpientes. mailxmail. http://imagenes.mailxmail.com/cursos/imagenes/14669_15
- Nafis, G. 2009. *Salvadora grahamiae grahamiae*- Mountain patchnosed snake. California-Herps. <http://www.californiaherps.com/noncal/southwest/swsnakes/pages/s.g.grahamiae.html>

ANEXOS

Anexo 1.Extracción de DNA con Acetato de Amonio

Digestión

1. Colocar el tejido (en pequeños fragmentos) en 900 μ l de buffer de lisis con 20 μ l de proteinasa K (10mg/ml).
2. Mezclar con vortex y colocarlos a 55°C durante toda la noche, con agitación ocasional durante las primeras horas.

Extracción

1. Sacar la muestra de la estufa y dejar enfriar a temperatura ambiente.
2. Una vez que la muestra alcance la temperatura ambiente, agregar 4 μ l de RNasa (10 μ l). Agitar con vortex y colocar en baño maría a 37°C por una hora.
3. Enfriar la muestra a temperatura ambiente y agregar 300 μ l de acetato de amonio 7.5 M. Agitar con vortex por 10 segundos y colocarlo en hielo por 10-15 minutos.
4. Remover la muestra del hielo y centrifugar a velocidad máxima (13-14 rpm) por tres minutos.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (1.5 ml) y centrifugar por 2-3 minutos más.
6. Transferir el sobrenadante de la segunda centrifugación a dos tubos de 1.5ml (500-550 μ l en cada tubo), que deben de contener 450 μ l de isopropanol. Invertir el tubo aproximadamente 20 veces para observar el DNA. Si el DNA no es observado, colocar la muestra a -20°C durante toda la noche. Si se observa DNA, centrifugar inmediatamente a velocidad máxima para obtener el botón de DNA.
7. Después de la centrifugación, eliminar el isopropanol y lavar el botón con 500 μ l de etanol al 70%. Centrifugar la muestra por 2 minutos y eliminar

el etanol (completamente) Colocar los tubos en una placa caliente (50-60°C) por 5 minutos (o hasta que todo el alcohol se haya evaporado).

8. Se resuspende el botón de DNA (de ambos tubos en 30-100 μ l de dH₂O, dependiendo de su tamaño.

Preparación de reactivos para la extracción

1. Buffer de lisis

TRIS Base 10 mM

EDTA 10 mM

SDS 2%

*Peso molecular TRIS=121.1

*Peso molecular EDTA =372.2

Para preparar 100 ml de buffer

0.1211 g de TRIS

0.3772 g de EDTA

2g de SDS

2. Acetato de amonio 7.5 M

Para preparar 250 ml: 144.68 g en 250 ml de agua destilada.

Para preparar 50 ml: 28.34 g en 50 ml de agua destilada.

3. RNAsa

Disolver 0.02g de RNAsa en 1 ml de dH₂O

Dividir la muestra en 5 tubos. Guardar 4 tubos a -20°C y mantener uno (200 μ l) a -4°C, para su uso.

Anexo 2. Purificación con polietilen-glicol (PEG)

1. Cambiar las muestras producto de las PCR a un tubo limpio.
2. Agregar 45 μ l de PEG.
3. Colocar las muestras a baño maría a 37°C por 15 minutos.
4. Sacar las muestras del baño y centrifugar por 20 minutos a 14000rpm.
5. Eliminar el sobrenadante y agregar 150 μ l de etanol al 80%, centrifugar 15 minutos a 14000 rpm.
6. Eliminar el sobrenadante y agregar 150 μ l de etanol al 95%, centrifugar y posteriormente eliminar el sobrenadante.
7. Secar las muestras y resuspender el botón de DNA.

Anexo 3. Precipitación con acetato de sodio

1. Por cada 10 μ l de reacción de secuenciación, agregar 25 μ l de etanol al 95% y 1 μ l de acetato de sodio 3M con un pH de 4.6.
2. Agitar los tubos y dejarlos a temperatura ambiente por 25 min para que los productos se precipiten.
3. Centrifugar los tubos por 20 min a 12000 rpm.
4. Posteriormente eliminar el líquido con una micropipeta y agregar 150 μ l de etanol al 70%, enseguida centrifugar los tubos por 5min a 12000 rpm.
5. Nuevamente eliminar el líquido y secar los tubos en un concentrador de DNA por 20 min.