



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Análisis molecular y morfológico de dos poblaciones de *Centruroides balsasensis* (Ponce-Saavedra y Francke, 2004) de la Depresión del Balsas

TESIS

que como requisito parcial para obtener el título profesional de

BIÓLOGA

presenta

Diana Alejandra Gutiérrez Cortés

Director de tesis: Dr. Javier Ponce Saavedra

Co-director de tesis: Dr. Omar Chassin Noria



Morelia, Michoacán

Diciembre 2019

DEDICATORIAS

A mi madre Ángeles Cortés, quién en su incansable trayectoria como mamá y amiga sembró la semilla de la curiosidad por la biología y ha sido la impulsora de este y de todos mis sueños.

A mi abuelo Hilario Gutiérrez, quién con sus experiencias y cariño ha sido un abuelo ejemplar y el mejor instructor de campo.

A mi José Manuel, quién con su amor, paciencia y apoyo ha sido mi principal pilar cumpliendo esta meta.

¿No has sabido, no has oído que el Dios eterno es Jehová, el cual creó los confines de la tierra? No desfallece, ni se fatiga con cansancio, y su entendimiento no hay quien lo alcance.

Isaías 40:28

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por abrir las puertas a estudiantes del estado y brindar albergue mediante casas de estudiante a aquellos cuya motivación es acceder a estudios universitarios sin tener las posibilidades económicas.

A la H. C. E. 16 de Septiembre, que fue mi casa durante 5 años, y en donde me brindaron muchas herramientas para concluir mis estudios.

Al Dr. Javier Ponce Saavedra por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, compartiendo conocimientos para todos sus estudiantes y tesis y en particular por su apoyo para el desarrollo de esta tesis fungiendo como un mentor académico y amigo.

Al Dr. Omar Chassin Noria por la orientación académica brindada y la disposición para desarrollar este trabajo, además de brindarme consejo en momentos difíciles.

A la Dra. Margarita por su constante apoyo, quién a pesar del poco tiempo de conocerla, siempre tuvo la disposición para brindarme asesoría.

A mi hermano Víctor Hugo por su apoyo incondicional a pesar de las adversidades y la distancia y a mi familia por estar siempre presentes de diferentes formas.

A mi Manu por su ayuda para elaborar el mapa, sus revisiones y sobretodo la paciencia en todos los momentos de esta etapa.

A la familia Rangel Rojas, que me brindaron todo su cariño y abrieron las puertas de su hogar para apoyarme en todo momento.

A mis tías Rosy Cortés y Mary Gutiérrez, quienes además de brindarme asilo también me manifestaron ése cálido afecto de familia que tanto se necesita.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Neto, Juan (Piojo), Miriam, Gaby, Willy, Yuca, Ami, Karlita, por su apoyo en campo, sus consejos académicos y su amistad.

Al Biól. Homero Galarza Horrostieta por su orientación al elegir ésta bella carrera, cuando esto aún era un sueño que se estaba gestando.

Al Dr. Alfredo Amador, por su amable disposición para correcciones de este trabajo y por su amistad.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
1. ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
4. ANTECEDENTES	7
4.1 La diversidad en escorpiofauna	7
4.2 Herramientas morfológicas y morfométricas en la taxonomía.....	9
4.3 Herramientas moleculares en la taxonomía.....	13
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS	16
6.1 General	16
6.2 Específicos.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1 Material biológico	17
7.2 Análisis molecular	19
7.3 Análisis Morfológico	24
8. RESULTADOS	25
8.1 Análisis molecular	25
8.1.2 Alineamiento y elección de modelo de sustitución	25
8.1.3 Distancias genéticas	28
8.1.4 Reconstrucciones filogenéticas.....	36
8.2 Análisis morfológico	40
9. DISCUSIÓN	49
10. CONCLUSIONES.....	51
11. LITERATURA CITADA.....	52
ANEXOS	64
Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN para Escorpiones	64

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Localidades de colecta de ejemplares de <i>C. balsasensis</i> usados para extracción de ADN.	18
Cuadro 2. Reactivos y concentraciones utilizadas para protocolo de PCR.	19
Cuadro 3. Condiciones de temperatura y tiempo para amplificación de ADN.	20
Cuadro 4. Secuencias obtenidas a partir del material depositado en el Laboratorio de Entomología <i>Biól. Sócrates Cisneros Paz UMSNH</i>	21
Cuadro 5. Secuencias del gen 16S obtenidas de Genbank, del género <i>Centruroides</i>	22
Cuadro 6. Medidas directas de estructuras de importancia taxonómica en alacranes.	24
Cuadro 7. Estimación de Criterios de información Bayesiano y de Akaike. BIC= Bayesian Information Criterion; AICc= Akaike Information Criterion, corrected. ...	27
Cuadro 8. Localidades donde se ha registrado la especie <i>C. balsasensis</i>	29
Cuadro 9. Distancias genéticas entre especies del género <i>Centruroides</i> mediante el modelo p-distance con resultados en la parte inferior y valores de desviación estándar en la parte superior.	31
Cuadro 10. Valores de p-distance obtenida entre grupos de secuencias (parte inferior) y valores de desviación estándar (parte superior).	32
Cuadro 11. Características morfológicas para diferenciar machos de las poblaciones de <i>C. balsasensis</i>	41
Cuadro 12. Características morfológicas para diferenciar hembras de las poblaciones de <i>C. balsasensis</i>	43
Cuadro 13. Características morfométricas que separan estadísticamente las poblaciones de <i>C. balsasensis</i> con prueba no paramétrica de Wilcoxon. *Significancia estadística <0.05.	44
Figura 1. Gen mitocondrial 16S. Se representa el genoma mitocondrial completo y la posición donde se ubica el gen 16S rDNA con la región amplificada.	25

Figura 2. Distribución actual de <i>C. balsasensis</i> en el Estado de Michoacán.....	30
Figura 3. Reconstrucción filogenética Neighbor Joining de las poblaciones de <i>C. balsasensis</i> en los nodos se indican los valores Bootstrap.....	38
Figura 4. Reconstrucción filogenética de máxima parsimonia en los nodos se muestran los valores Bootstrap.....	39
Figura 5. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de machos de <i>C. balsasensis</i> . Incisos a) y b) esternito VII vista ventral, c) y d) mano vista dorsal, e) y f) patela vista dorsal. Escala= 1mm.....	45
Figura 6. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de machos de <i>C. balsasensis</i> . g) y h) vista ventral de la región coxoesternal; i-k), j-l) Segmento metasomal V y telson en vista lateral. Escala = 1mm.....	46
Figura 7. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de hembras de <i>C. balsasensis</i> . m) y o) esternito VII vista ventral, p) y q) mano vista dorsal; r) y s) patela vista dorsal. Escala = 1mm.....	47
Figura 8. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de hembras de <i>C. balsasensis</i> . t) y u) vista ventral de la región coxoesternal; v) y w) segmento metasomal V y telson en vista lateral. Escala = 1mm.....	48

1. RESUMEN

Centruroides balsasensis es una especie distribuida en la Depresión del Balsas del estado de Michoacán, su descripción en 2004 se generó a partir de divergencias genéticas encontradas en poblaciones de alacranes del género *Centruroides* dentro de esta región. Sin embargo, las distancias genéticas encontradas entre poblaciones de *C. balsasensis* han planteado que uno o más taxa crípticos están incluidos en este taxón. El presente trabajo plantea la hipótesis de que esta especie incluye dos o más poblaciones que corresponden a taxa específicos aún no descritos. Para probar las diferencias genéticas entre poblaciones de la especie en estudio, se comparó ADN mitocondrial de la subunidad ribosomal 16S obteniendo las distancias genéticas entre individuos y probando la monofilia con inferencia filogenética de Neighbor Joining y Máxima parsimonia. Se analizó morfológicamente con caracteres de importancia taxonómica y se hicieron mediciones de estructuras para identificar diferencias morfométricas entre poblaciones. Los resultados indican la existencia de dos poblaciones genética y morfológicamente distintas de *Centruroides balsasensis*, que también pueden ser diferenciadas morfométricamente por mediciones de proporción. Se confirma la existencia de dos poblaciones que deben corresponder a taxa específicos distintos: taxón 1) de la localidad Churumuco y taxón 2) de las localidades Arúa-Zirándaro.

PALABRAS CLAVE: Especies crípticas, divergencia genética, taxonomía, *Centruroides balsasensis*.

1. ABSTRACT

Centruroides balsasensis is a specie distributed in the Balsas Depression from Michoacán state, it has been described in 2004 from genetic divergences founded in scorpions' populations of the genus *Centruroides* within this region. However, the genetic distances found inside *C. balsasensis* populations have suggested that one or more cryptic taxa are included in this taxon. This paper hypothesizes that this species includes two or more populations that correspond to specific taxa undescribed yet. In order to test the genetic differences between populations of the species under study, the mitochondrial DNA of the 16S ribosomal subunit was compared, obtaining genetic distances between individuals and testing the monophilia with phylogenetic inferences from Neighbor Joining and Maximum parsimony methods. Taxonomic importance characters were analyzed morphologically and there were made structures measurements to identify morphometric differences between populations. The results indicate the existence of two genetic and morphologically distinct populations of *Centruroides balsasensis*, which can also be morphometrically differentiated by proportions of its measurements. The existence of two populations that must correspond to different specific taxa is confirmed: taxon 1) from Churumuco locality and taxon 2) from Arúa-Zirándaro localities.

KEYWORDS: Cryptic species, genetic divergences, taxonomy, *Centruroides balsasensis*.

2. INTRODUCCIÓN

Los arácnidos (Arachnida) son artrópodos pertenecientes al subphylum Chelicerata, (“que poseen quelíceros”, primer apéndice modificado para la alimentación); se caracterizan por un cuerpo dividido en dos regiones: el anterior o prosoma y el posterior u opistosoma. Los arácnidos incluyen 11 órdenes y todos han sido reportados para el país (Francke, *et al.*, 2014).

Los escorpiones son un orden de arácnidos, que tienen el opistosoma conformado por un mesosoma de 7 segmentos y un metasoma de 5 segmentos; el telson, la estructura de las glándulas de veneno con terminación de aguijón y sus pedipalpos, los apéndices modificados que utilizan para la caza (Francke, *et al.*, 2014).

Estos animales son llamados pancrónicos porque su historia evolutiva data de 425-450 millones de años (Polis, 1990). Su distribución se considera cosmopolita, con una variedad de hábitats terrestres que incluyen desde bosques hasta desiertos e incluso cuevas (Francke, *et al.* 2014).

Estas y otras características de importancia médica y biológica, han sido de principal interés para el estudio de la escorpiofauna mexicana (Ponce, 2003); desde la problemática de morbilidad y mortalidad causada por alacranismo con los índices más altos en el mundo (250,000 picaduras reportadas al año según Chávez-Haro y Ortiz en 2015), hasta los estudios de veneno de las especies más tóxicas, principalmente las del género *Centruroides* (Santibáñez-López *et al.*, 2016), incluyendo la recopilación de información en colecciones, elaboración de listados y mapas de distribución de las especies (Beutelspacher, 2000; Ponce-Saavedra y Beutelspacher, 2001; González, 2004).

La cifra de especies descritas de escorpiones en el mundo es de 2,433 (Rein, 2019) número que continúa en incremento. En México, las estimaciones de diversidad en escorpiofauna referían hasta un 16% de la diversidad mundial (González, 2004); sin embargo, la cifra de especies reportadas para México es de 289 especies, 38 géneros y 8 familias; representando alrededor de 12% de la diversidad de escorpiones en el mundo (Ponce-Saavedra *et al.*, 2016; Ponce-Saavedra *et al.*, 2015b; Santibáñez-López *et al.*, 2016).

El incremento de estas cifras en México se debe al estudio de aspectos biológicos, ecológicos (Ponce *et al.*, 2006; Guzmán y Ponce, 2014) y taxonómicos de estos organismos, en especial los pertenecientes a la Familia Buthidae (González, 2004; Ponce y Francke, 2013; Quijano-Ravell y Ponce, 2014; Francke, 2014; Ponce-Saavedra *et al.*, 2015a; Quijano-Ravell, 2015), con la generación de listados, distribución y claves (Stahnke y Calos, 1977; Armas *et al.*, 2003; Martín-Frías y Armas, 2003; Armas y Martín-Frías, 2008; Ponce-Saavedra y Francke, 2013; Ponce-Saavedra *et al.*, 2016), la descripción de un nuevo género (Francke *et al.*, 2014) descripciones y redescripciones de especies (Martín-Frías *et al.*, 2005; Ponce-Saavedra *et al.*, 2009; Ponce-Saavedra *et al.*, 2015a). A razón del arduo trabajo con ésta familia de escorpiones y hallazgos de varias especies nuevas para la ciencia y un nuevo género, es evidente que aún hay mucho por estudiar y describir.

Esta búsqueda de identidad taxonómica de las especies de la Familia Buthidae, en particular del género *Centruroides*, incluye los datos aportados por Hoffmann en 1932 y la generación de listados y catálogos de especies en el país (Monroy y Monroy, 1960; Beutelspacher, 2000; Ponce-Saavedra y Beutelspacher, 2001).

Parte de estos estudios pioneros son las *Monografías para la Entomología Médica de México* (Hoffmann, 1932), generando grupos de alacranes “rayados y no rayados” como una herramienta de identificación para separar especies, además de la aportación de datos de distribución geográfica. Sin embargo, el uso de estos patrones de coloración y la similitud morfológica dentro del grupo ha generado complicaciones en la diagnosis (Santibáñez-López *et al.*, 2016).

Describir y diagnosticar especies por similitud morfológica y distribución, puede implicar el no tomarse en cuenta la variación fenotípica que es inducida por el ambiente en dichas especies. Núñez-Farfán *et al.* 2003, explican que en algunos organismos con un mismo genotipo, la plasticidad fenotípica es una *alternativa evolutiva* cuando el ambiente es heterogéneo, y este mecanismo puede funcionar como una adaptación local para las especies.

Los casos de plasticidad fenotípica pueden ser objeto de selección natural y es muy común en especies con interacción planta-insecto (Núñez *et al.* 2003).

En escorpiones, un ejemplo de desplazamiento de carácter se reporta en el complejo *C. anchorellus*, entre las especies *C. anchorellus* y *C. baracoae* que son muy parecidas morfológica y ecológicamente, sin embargo en las regiones donde son simpátricas los individuos presentan caracteres diagnósticos en su expresión extrema, mientras que en las regiones de distribución más alejadas entre sí, los individuos son difíciles de diferenciar (Teruel, 2000).

Claramente la similitud morfológica representa un conflicto para definir la identidad taxonómica de especies estrechamente relacionadas (Knowlton, 1993). Los términos que se han utilizado para referirse a especies de esta índole son: especies gemelas, hermanas, hermanadas, ecológicas, pares, sinmórficas, biológicas y especies crípticas; definiéndose como especies aisladas reproductivamente en la naturaleza, cuyos individuos presentan pocas diferencias o sus diferencias son ambiguas y generalmente no pueden ser diferenciadas por caracteres morfológicos o puramente estadísticos (utilizados en la sistemática tradicional), independientemente del grado de parentesco (Borkin *et al.*, 2004).

El reto taxonómico en estas especies implica las formas de vida crípticas en el sentido ecológico (Bickford *et al.*, 2007). En escorpiones, estas implicaciones ecológicas incluyen variaciones altitudinales y distribuciones amplias solo para algunas especies, denominándose complejos de especies (Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2014).

La evidencia de que estas especies existen en la naturaleza es primordial para la evaluación de variables biológicas, taxonómicas, de diversidad y para el desarrollo de estrategias de conservación adecuadas (Lukhtanov y Shapoval, 2008) mediante el estudio de los mecanismos de especiación (Bickford *et al.*, 2007) y sobretodo el entendimiento de una porción sustancial de la diversidad biológica (Borkin *et al.*, 2004).

En particular, los complejos de especies se han descrito como especies morfológicamente similares, un solo taxón puede incluir dos o más taxa específicos (Quijano-Ravell, 2015) y su principal característica es compartir una distribución geográfica muy amplia y alopátrica. Sin embargo, en sitios donde son simpátricas, prácticamente son indistinguibles morfológicamente (Teruel, 2000). Estas especies pueden ser similares en el tipo de vegetación y altitud donde

habitan (caso de *C. ornatus*, Quijano-Ravell, 2015) o incluso pueden presentar importantes diferencias altitudinales y ecológicas en su tipo de hábitat (caso *Mesomexovaejovis aff. variegatus*, Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2016).

Puesto que existe ésta evidencia de diversidad críptica en escorpiones (Miller *et al.*, 2014), dentro del género *Centruroides* se ha planteado la hipótesis de complejos de especies (Towler *et al.*, 2001; Ponce y Francke, 2004), corroborado con la redescipción y establecimiento de estatus específico para *C. tecomanus* (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009), *C. ornatus* (Ponce-Saavedra *et al.*, 2015b), la descripción de *C. huichol* (Teruel *et al.*, 2015) y recientemente con la descripción de *C. caribbeanus* (Teruel y Myers, 2017) y *C. romeroi* (Quijano-Ravell *et al.*, 2019) entre otros.

En el presente trabajo se revisan poblaciones identificadas como *Centruroides balsasensis* Ponce y Francke, 2004 que se presume puedan ser un complejo de especies.

4. ANTECEDENTES

4.1 La diversidad en escorpiofauna

En el mundo se conocen 2,433 especies de escorpiones en 18 familias (Rein, 2019). Ocho familias de alacranes, 38 géneros y 289 especies (11.9%) han sido reportadas en México. Las familias con mayor diversidad en nuestro país son Vaejovidae con 151 especies (52.2%), Diplocentridae con 58 especies (20.1%) (Ponce-Saavedra *et al.*, 2016) y Buthidae con 49 especies oficialmente descritas (Ponce *et al.*, 2016; Ponce-Saavedra y Francke, 2019; Francke *et al.*, 2014) representando un 16.6% de la diversidad de escorpiofauna mexicana.

La clasificación dentro del orden Scorpiones incluye diferentes revisiones de autores como Peters (1861), Thorell (1876), Stockwell, (1989), Sissom (1990), Fet *et al.* (2000), Lourenço y Sissom (2000) Fet y Soleglad, (2005) que reconocen diferentes números de familias, donde se reconocen desde nueve hasta dieciséis (Fet *et al.*, 2003; Coddington *et al.*, 2004).

Estos cambios en la sistemática de escorpiones incluyen la descripción de una nueva familia para la ciencia (Pseudochactidae, Gromov 1998) y autores como Prendini y Lourenço citados por Fet y Soleglad, 2005, elevan de categoría algunas subfamilias y se crean nuevas familias a partir de géneros.

La propuesta de Fet y Soleglad (2005) corresponde a 13 familias y la propuesta de Prendini y Wheeler (2005) a 17 familias; siendo una de las discusiones más fuertes el cambio de Diplocentridae, Hemiscorpiidae y Heteroscorpionidae al nivel de subfamilia.

Aunque no se ha llegado a un consenso en el número actual de familias, Prendini y Wheeler (2005) argumentan la necesidad de un registro de taxa evaluado por revisores internacionales y la necesidad de una “taxonomía unitaria” en la clasificación y filogenia del grupo para asegurar un control de calidad en la taxonomía. Autores como Sharma *et al.*, (2015) proponen una clasificación con 19 familias y concluyen en que la única separación clara es de los linajes bítidos y no bítidos.

La familia Buthidae C. L. Koch, 1837, constituye el taxón de escorpiones más diverso a nivel mundial, cuenta con un género extinto y 91 géneros actuales que comprenden 1,162 especies con distribución prácticamente cosmopolita, excepto en Antártida y Nueva Zelanda (Rein, 2019). Estos datos suponen que México, con 45 especies del género *Centruroides* Marx (1889) (Ponce-Saavedra y Francke 2019) y cuatro del género *Chaneke* (Francke *et al.*, 2014), alberga alrededor de 4.13% de la diversidad de bûtidos descrita hasta el momento en el mundo (Rein, 2019).

El género *Centruroides* se distribuye desde la región Sur de Estados Unidos hasta Centroamérica y algunas regiones en la parte Norte de Sudamérica (Fet *et al.*, 2000; Armas *et al.*, 2012) cuenta con 92 especies descritas en el mundo (Rein, 2019). La mayoría de las especies de *Centruroides* reportadas en el país se registran en los estados de Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Santibáñez-López *et al.*, 2016) y 36 especies son endémicas para México (Ponce-Saavedra y Francke, 2019).

Centruroides es considerado el género de alacranes de mayor importancia médica en el país y ha sido estudiado desde el punto de vista toxicológico y epidemiológico (Santibáñez-López *et al.*, 2016). En México se han propuesto 19 especies dentro de la categoría de importancia para la salud pública y ocho de ellas se encuentran reportadas para el Estado de Michoacán (Ponce-Saavedra *et al.*, 2016).

El estudio de las especies del género *Centruroides* dentro del estado de Michoacán ha implicado resolver algunos conflictos taxonómicos. En los estudios de la especie *C. limpidus* se encontraron divergencias entre las subespecies (Towler *et al.*, 2001) esto significaba que debería existir un mayor número de especies del que se tenía descrito. Esta evidencia llevó a plantear la hipótesis de que los ejemplares analizados pertenecían a poblaciones crípticas de la Depresión del Balsas (Towler *et al.*, 2001). Además, las dos subespecies de *C. limpidus* fueron registradas con simpatría en localidades de los municipios de Apatzingán y Huetamo (Beutelspacher, 2000), Tzitzio y J. Mújica (Ponce, 2003) en el estado de Michoacán, situación que resulta incongruente para considerarlas como subespecies dentro de una misma zona geográfica.

Ponce-Saavedra y Beutelspacher (2001) mencionan que *C. I. limpidus* y *C. I. tecomanus* no solo tenían diferencias en la espina subaculear sino que las diferencias morfométricas entre estas subespecies simpátricas también sugerían dos clados distintos.

Esta aparente simpatría de las subespecies de *C. limpidus* en cuatro municipios de Michoacán quedó aclarada con las descripciones de *C. balsasensis* (Ponce y Francke, 2004), especie distribuida en la Depresión del Balsas desde los límites del Eje Neovolcánico hasta la parte baja de la Sierra de Coalcomán, una localidad en Guerrero y una en Estado de México y la validación de *C. tecomanus* como un taxa específico y no subespecie de *C. limpidus* (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009). Al aclararse estas confusiones taxonómicas se ha documentado una mayor riqueza específica que la previamente contemplada para la zona.

4.2 Herramientas morfológicas y morfométricas en la taxonomía

En la familia Buthidae se reconocen 91 géneros actuales (Rein, 2019) y en México solo se registraban dos: *Centruroides* Marx 1890 y *Tytiopsis* Armas 1974 (Armas *et al.*, 2003) que también sufrieron cambios nomenclaturales cuando se describió el género *Chaneke* Francke, Teruel & Santibáñez-López (2014). Entonces el único registro de *Tytiopsis* formó parte del género *Chaneke* que incluye otras tres especies y constituye un clado monofilético (Francke *et al.*, 2014).

De estos dos géneros de bütidos en el país, *Centruroides* ha sido el más estudiado, por ser el más numeroso con 45 especies y el género *Chaneke* con 4 especies descritas actualmente (Ponce-Saavedra *et al.*, 2016; Ponce-Saavedra y Francke, 2019).

Antes de los años 2000, la taxonomía y sistemática del grupo *Centruroides* se había basado principalmente en descripciones morfológicas de las especies. Las descripciones de Pocock (1902) incluyen detalles de gránulos y proporciones, segmentos del metasoma, carapacho, pedipalpos y datos de longitud total del ejemplar incluyendo mediciones en milímetros de las estructuras, que buscaron mayor uniformidad en las descripciones de escorpiones.

Stahnke (1970) recopila información sobre la nomenclatura utilizada hasta ese momento y propone basarse en la terminología general de Snodgrass (1952) citado por Stahnke (1970), además de realizar una comparativa de los términos nomenclaturales en francés, alemán y español. En 2004, Prendini incluye la terminología de Couzijn (1976) en la segmentación de patas, Hjelle (1990) y Sissom (1990) en la segmentación de los pedipalpos, Prendini (2000, 2001, 2003) en carinas metasomales.

Hoffman (1932) define el patrón de color como un criterio auxiliar en la identificación de las especies, formando dos grupos: “alacranes rayados y no rayados”. Este criterio se usó en claves taxonómicas, que en opinión de Stahnke (1978), además de generar confusiones produjo especies artificiales debido a variaciones en las especies.

A pesar de que el criterio de Hoffman fue muy criticado, González-Santillán (2001) retoma el concepto de los grupos incluyendo la granulación y definiendo cuatro grupos dentro del género: rayados, *bertholdii*, *gracilis* y *thorelli*, generando separaciones más detalladas. En 2005 Ponce-Saavedra y Moreno-Barajas agrupan las especies de *Centruroides* registradas en México hasta ese momento en los 4 grupos, sin embargo, también mencionan dos subgrupos dentro del grupo “rayados”: “*limpidus-elegans*” y “*suffusus-infamatus*”.

Actualmente, Ponce-Saavedra y Francke (2019) proponen nuevos grupos, “*elegans*”, “*infamatus*” y “*nigrovariatus*” que antes eran incluidos como subgrupos de “rayados” tomando en cuenta la coloración y granulación. De acuerdo a ésta nueva propuesta, la especie en estudio *Centruroides balsasensis* pertenece al grupo “*elegans*”.

Otro factor al que se atribuyó importancia para separar especies fue la distribución geográfica, criterio que incluyó Hoffman (1932) en las Monografías para la Entomología Médica de México. Ponce y Francke (2013) mencionan que la escorpiofauna de Centro Occidente de México es un buen indicador de la heterogeneidad de hábitats y que también pueden auxiliar en caracterización de áreas biogeográficas.

Las aparentes amplias distribuciones contenían subespecies o poblaciones mal diagnosticadas como un solo taxa. Un claro ejemplo es la presencia de las subespecies de *C. limpidus* con distribución en la Depresión del Balsas en Michoacán, que incluía más de un taxa específico como se demuestra con la descripción de *Centruroides balsasensis* (Ponce y Francke, 2004) y la definición de *C. tecomanus* como especie válida y con distribución costera.

La inclusión de dos o más taxa crípticos en la descripción de un solo taxón, podría interpretarse como variación morfológica amplia en especies con grandes distribuciones geográficas. El conflicto con la nomenclatura de subespecies es que no encajan dentro del concepto filogenético de especie definido como: “El más pequeño y diagnosticable grupo (*cluster*) de organismos, que guardan una relación de parentesco de ancestro-decendencia” (Cracraft, 1983).

Autores como Prendini (2004) explican que las denominadas subespecies deben ser consideradas sinónimos de la especie, esto en el caso de que el único criterio para considerarla subespecie sea el aislamiento reproductivo, en caso contrario, si la especie reúne los suficientes caracteres morfológicos en el sentido diagnóstico, entonces ésta “subespecie” representa una especie válida. Un ejemplo de este caso es la sinonimia y la posterior revisión del complejo *C. anchorellus* (Armas, 1984; Teruel, 2000).

En el año 2003, Armas *et al.* exponen más conflictos taxonómicos con las subespecies de *Centruroides*: *C. elegans edentulus*, *C. limpidus tecomanus*, *C. infamatus ornatus*, *C. flavopictus meridionalis*, así como la necesidad de aclarar su estado taxonómico. Estas evidencias se confirmaron con la sinonimia de *C. elegans edentulus* con *C. limpidus* (Córdova-Athanasiadis, 2005), la descripción de especies como *C. tecomanus* que se consideraba como una subespecie de *C. limpidus* (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009) o la redescrición de *C. ornatus* que se consideraba subespecie *C. infamatus ornatus*, (Ponce-Saavedra *et al.*, 2015a).

La enorme variación morfológica entre especies y subespecies del grupo, descripciones de especies con distribución geográfica muy grande y la presencia de especies crípticas en una región en el grupo de *Centruroides* “rayados” plantea la necesidad de continuar con estudios más profundos y exhaustivos en la taxonomía actual de escorpiones en México (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009).

El concepto biológico de homología se refiere a caracteres o estructuras de organismos que comparten diferentes especies por medio de la ancestría común (Wagner, 1989). Sin embargo, en la morfometría una homología es definida como una “correspondencia de las partes”, éstas correspondencias están basadas en el tamaño, la forma y la relación entre forma y tamaño (alometría) (Dujardín, 2017) En este enfoque las correspondencias entre estructuras representan una herramienta útil como criterio en la sistemática para descartar o aceptar la existencia de uno o más taxa y su objetivo no es describir a los organismos sino compararlos (Dujardín *et al.*, 2014).

La morfometría, puede confirmar un carácter morfológico o proponer el uso de caracteres únicamente basados en la morfometría (uso de proporciones) como un carácter de valor taxonómico (García, 2008) y la importancia de esta herramienta radica en que su uso puede diferenciar especies crípticas (Dujardin, 2008) y diferenciar poblaciones, particularmente en la presencia de 2 o más taxa crípticos (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009).

El uso más afinado de estos métodos estadísticos hizo posible la descripción biológica desde una perspectiva cuantitativa (Lorenz *et al.*, 2017), ya que utilizar sólo herramientas de tipo morfológico y caracteres de coloración en especies de “amplia distribución geográfica” y/o ecológica y morfológicamente similares pueden resultar en un erróneo estatus taxonómico (García, 2008). Por ejemplo en el año 2010, el registro de la especie *C. limpidus* comprende seis estados del país (Martín-Frías *et al.*, 2010) y en las localidades registradas para Michoacán, se diagnosticaron erróneamente dos subespecies dentro de este taxón basándose en diferencias de coloración y el tubérculo subaculear: *C. l. limpidus* y *C. l. tecomanus*; la incongruencia se presentó en dos localidades con ambas subespecies registradas que llevaron finalmente a la descripción de dos taxa específicos (Ponce y Francke, 2004).

Las herramientas morfométricas y análisis estadísticos descriptivos se han usado en la taxonomía tradicional, sin embargo, en la taxonomía actual de escorpiones se ha usado en la detección de dos o más taxa dentro de complejos de especies, utilizando análisis de correlación. En el complejo *C. anchorellus*, en el cual se incluía a *C. baracoae* como un sinónimo debido a su parecido

morfológico y ecológico, además de una distribución alopátrica y en pocas localidades simpátrica, utilizando análisis de correlación con dos caracteres morfométricos para discriminar entre ambas especies (Teruel, 2000).

El uso de estos métodos ha resultado una herramienta fundamental para la validación de especies como *C. tecomanus* (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009), descripción de *C. serrano* (Santibáñez-López y Ponce-Saavedra, 2009) y *C. villegasi* (Baldazo-Monsivaiz *et al.*, 2013), así como descripciones de especies muy similares dentro de zonas geográficas adyacentes como la de *C. ruana* con respecto a *C. infamatus* (Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra, 2016).

4.3 Herramientas moleculares en la taxonomía

En las últimas dos décadas, la búsqueda de especies crípticas ha aumentado exponencialmente debido a la disponibilidad de secuencias de ADN. Estas técnicas moleculares proporcionaron otra herramienta para la estimación y definición de la diversidad, sobre todo en las especies donde la principal limitante para definir las es una morfología tan similar (Bickford *et al.*, 2007).

En artrópodos, ejemplos de especies crípticas y complejos de especies son bastos y comprenden diferentes órdenes (Lukhtanov y Shapoval, 2008, Kambestad *et al.*, 2017, Nettel-Hernanz *et al.*, 2015, Lucentini *et al.*, 2011, Pavan *et al.*, 2015, Muster *et al.*, 2004, Duncan *et al.*, 2010).

En escorpiones el estudio mediante técnicas moleculares ha contribuido a mostrar diversidad críptica en las familias Euscorpidae (Jacob *et al.*, 2004), Vaejovidae (Miller *et al.*, 2014), Scorpionidae (Talal *et al.*, 2015) y en Buthidae (Gantenbein *et al.*, 2001; Ponce y Francke, 2004; Coelho *et al.*, 2014 entre otros) y a nivel de subfamilias (Esposito *et al.*, 2018).

En la Familia Buthidae, los estudios pioneros de Gantenbein *et al.* (2001) mostraron inesperadas divergencias genéticas en las especies *C. exilicauda* y *C. sculpturatus* que incluso se habían sinonimizado por Williams (1980), debido a que las diferencias en morfología eran insignificantes. Este fue uno de los ejemplos más ilustrativos de especies crípticas dentro del género *Centruroides*.

Aunado a ello, estudios realizados por Towler *et al.* (2001) también mostraron evidencias de divergencias genéticas en otras subespecies, en poblaciones de *C. limpidus* de la Depresión del Balsas y la posterior descripción de *C. balsasensis*, especie endémica claramente divergente de *C. limpidus* (Ponce-Saavedra y Francke, 2004).

En la taxonomía tradicional de escorpiones, se hacía referencia al menos a 24 subespecies dentro del género *Centruroides* (Fet y Lowe, 2000). Autores como Towler *et al.* (2001) y Prendini (2004) discrepan en la clasificación infraespecífica puesto que no es válida desde el concepto monofilético de las especies.

El estatus taxonómico de algunas subespecies se ha aclarado con estudios que incluyen herramientas adicionales a la morfología. En estudios filogenéticos de escorpiones, se han usado los marcadores moleculares de la subunidad mitocondrial 16S y Citocromo Oxidasa I (COI) (Simon *et al.*, 1994; Gantenbein *et al.*, 2001; Fet *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2014, Esposito *et al.*, 2018). El uso de estos genes mitocondriales se considera una buena herramienta en la sistemática molecular, ya que su variación es muy poca y las variaciones que contienen estos genes son producto de la ancestría común y no de la variación por selección, además estas variaciones permanecen a través de largos periodos evolutivos (Boore y Brown, 1998).

El marcador molecular 16S ha sido referido en la evaluación taxonómica de especies de alacranes (Towler *et al.*, 2001) incluso poblaciones y subespecies (Gantenbein *et al.*, 2003; Ponce-Saavedra *et al.*, 2009). El conjunto de estas evidencias sustenta la hipótesis de Lourenço y Sissom (2000) sobre los complejos de especies crípticas en las especies mexicanas de *Centruroides*, siendo un grupo morfológicamente complejo y parafilético según los estudios filogenéticos de Teruel *et al.* (2006).

5. HIPÓTESIS

Existen diferencias genéticas y morfológicas suficientes que demuestran que las poblaciones de *Centruroides balsasensis* Ponce-Saavedra y Francke, 2004, en el área de Huetamo y la de Churumuco en el estado de Michoacán, podrían corresponder a dos taxa específicos diferentes.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Hacer un análisis molecular y morfológico de dos poblaciones de alacranes identificados como *Centruroides balsasensis* Ponce-Saavedra y Francke, 2004, de la Depresión del Balsas en el estado de Michoacán, México.

6.2 Específicos

- 1.- Comparar secuencias de ADN mitocondrial 16S de las poblaciones en estudio y otras poblaciones de especies cercanas geográficamente. .
- 2.- Comparar morfológicamente ejemplares machos y hembras procedentes de las poblaciones de *C. balsasensis* en Churumuco en el municipio del mismo nombre y una localidad del municipio de Huetamo, incluidas en la descripción original de la especie.
- 3.- Definir los caracteres morfológicos que puedan explicar la posible divergencia genética encontrada.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se identificaron 22 machos y 21 hembras de las localidades tipo, ejemplares que fueron utilizados en la descripción de la especie *C. balsasensis* referidas en Ponce y Francke, 2004 procedentes del Cerro de Turitzio cerca de Arúa en el municipio de Huetamo (18° 31' 49" N 100° 55' 45" O) y Cerro de las Letras en el municipio de Churumuco, Michoacán (18° 39' 37" N, 101° 39' 17" O); están depositados en la Colección Aracnológica de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CAFBUM). Estos ejemplares se utilizaron para el análisis morfológico y morfométrico, ya que Churumuco es la localidad de la que procede el holotipo, mientras que Arúa (Cerro de Turitzio) es la localidad de la que se consideraron paratipos machos y hembras en la descripción original de la especie (Ponce-Saavedra y Francke, 2004) y que se refleja en la variación reportada.

Se utilizó material adicional de 8 ejemplares de *C. balsasensis* colectados en campo solo para la extracción de ADN, procedente de las localidades indicadas en Cuadro 1 y se extrajo ADN también de otras especies indicadas en Cuadro 4.

Cuadro 1. Localidades de recolecta de ejemplares de *C. balsasensis* usados para extracción de ADN.

Localidad	Etiqueta y coordenadas
Huetamo, Huetamo	18°36'56.3"N 100°53'57.2" O 04/01/16 Col. Abel Pérez S.
Carretera Churumuco-Huetamo	18°35'54.3"N 100°55'44.6" O. 28/08/2015 Cols. D.A. Gutiérrez Cortés, J. Ponce S., A. F. Quijano, W. Linares, E. Oliveros
Churumuco, Churumuco.	18° 39' 37" N, 101° 39' 17" O. Cols. D.A. Gutiérrez Cortés, J. Ponce S., A. F. Quijano, W. Linares, E. Oliveros

Estos ejemplares fueron sacrificados en alcohol absoluto, etiquetados y depositados en un refrigerador en la Colección Aracnológica de la Facultad de Biología de la UMSNH (CAFBUM) ubicada en el Laboratorio de Entomología "Biól. Sócrates Cisneros Paz".

7.2 Análisis molecular

Se realizó la extracción de ADN de 11 ejemplares (Cuadro 4), de las piezas del alacrán que contienen un mayor tejido muscular y que no interfieren en la ingestión o digestión de las presas capturadas, éstos son fémur, patela y mano del pedipalpo. Se realizaron cortes con bisturí para extraer con ayuda de pinzas esterilizadas el tejido dentro de las piezas sin ningún resto de exoesqueleto.

La extracción de ADN se realizó con base en el protocolo de FitzSimmons (1997) para extracción de ADN de sangre de tortuga, con modificaciones (Anexo 1).

Se realizó amplificación del ADN por Reacción en Cadena de la Polimerasa según el protocolo para artrópodos propuesto por Simon *et al.* (1994) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Reactivos y concentraciones utilizadas para protocolo de PCR.

Reactivo	Concentración	Cantidad
Buffer	1x	2.5 µl
Desoxinucleótidos (DNTP's)	200 µM	0.5 µl
Primer uno (LRN 13398)	0.5 µM	1.25 µl
Primer dos (LRJ 12887)	0.5 µM	1.25 µl
Taq Polimerasa	1 U/ µl	1 µl
Cloruro de Magnesio MgCl	2 mM	1 µl

Utilizando 2 µl de ADN a un volumen final de 25 µl en Termociclador Applied Biosystems con las condiciones especificadas en cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones de temperatura y tiempo para amplificación de ADN.

Ciclos para amplificación de ADN: 30 ciclos	
Tiempo	Condiciones de Temperatura
5 minutos	94°C
30 segundos	94°C
30 segundos	50°C
30 segundos	72°C
7 minutos	72°C

Se utilizaron los *primers* propuestos por Simon *et al.* (1994) para mosquitos, utilizados con escorpiones en estudios a nivel de población (Miranda-López, 2012), especie (Towler, 2001) y subespecie (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009), para obtención ADN del gen 16S rDNA siendo los siguientes:

LRN 13398 5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'

LRJ 12887 5' CCGGTTTGAAGCTCAGATCATGT-3'

Se efectuó electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados, con TBE (Tris-Borato EDTA) como amortiguador y se visualizaron los productos en un transiluminador UV.

Las muestras obtenidas se enviaron para secuenciación a la empresa MacroGen USA. Se obtuvieron un total de once secuencias que se enlistan en el cuadro 4. Adicionalmente se usaron ocho secuencias publicadas en el repositorio GenBank de NCBI (*Natural Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) y enlistadas en Cuadro 5.

Cuadro 4. Secuencias obtenidas a partir del material depositado en el Laboratorio de Entomología *Biól. Sócrates Cisneros Paz UMSNH.*

Especie	Localidad	Etiqueta
<i>C. balsasensis</i>	Carretera Churumuco- Huetamo	C_balsasensis_Churumuco C_balsasensis_Churumuco (2)
	Churumuco, Churumuco, Mich.	C_balsasensis_Churumuco (3) C_balsasensis_Churumuco (4) C_balsasensis_Churumuco (5) C_balsasensis_Churumuco (6)
	Huetamo, Huetamo, Mich.	C_balsasensis_Huetamo C_balsasensis_Huetamo (2)
<i>C. tecomanus</i>	Playa Azul, Lázaro Cárdenas, Mich.	C_tecomanus_Playa
<i>C. nigrescens</i>	El Pinzán, Huetamo, Mich.	C_nigrescens_Elpinzán
<i>C. ochraceus</i>	Mil Piedras, Kanasín, Yucatán	C_ochraceus_Yucatán

Cuadro 5. Secuencias del gen 16S obtenidas de Genbank, del género *Centruroides*

Especie	Localidad	Clave de acceso Genbank	Autores
<i>C. balsasensis</i>	Zirándaro, Guerrero.	EU499934	Ponce <i>et al.</i> 2009
	Arúa, Cerro de Turitzio, Huetamo, Mich.	AF439760*	Towler <i>et al.</i> 2001
		EU499937	Ponce <i>et al.</i> 2009
<i>C. infamatus</i>	Zumpimito, Uruapan, Mich.	AF439753	Towler <i>et al.</i> 2001
<i>C. infamatus</i> (<i>C. ornatus</i>)**	Los Tábanos, Tangamandapio, Mich.	KY981895.1	Esposito <i>et al.</i> 2018
<i>C. limpidus</i>	Tacámbaro, Mich.	EU492908	Ponce <i>et al.</i> 2009
	Tzitzio, Mich.	EU499938	Ponce <i>et al.</i> 2009
<i>C. gracilis</i>	Tamazunchale, Hidalgo.	KY981894.1	Esposito <i>et al.</i> 2018
<p>*Las secuencias se encuentran depositadas en GenBank con la etiqueta <i>C. limpidus</i> antes de la descripción de <i>C. balsasensis</i> Ponce y Francke, 2004. ** La publicación refiere la especie <i>C. infamatus</i>; sin embargo, material procedente de esa localidad fue revisado y corresponde a la especie <i>C. ornatus</i> (Com. Per. J. Ponce).</p>			

Las secuencias se alinearon en el programa *Phylogenetic and molecular evolutionary analysis* MEGA versión 6 (Tamura *et al.*, 2013). Se tomó como referencia el gen mitocondrial 16S completo de *Centruroides vittatus* con clave de acceso de *Gen bank* MF975702.1 (Tsunemi *et al.*, 2017). El gen en estudio se encuentra del sitio 11,932 a 13,068 del genoma mitocondrial completo. Se eliminaron los extremos de baja calidad del fragmento de las secuencias a

analizar obteniendo un alineamiento con 19 secuencias nucleotídicas de longitud de 329 pares de bases.

Se realizó un análisis de distancias pareadas de p-distance, modelo que indica la proporción de sitios de nucleótidos en la que dos secuencias difieren, para comparar la distancia genética entre individuos y la existencia o no de poblaciones genéticamente separadas. Las secuencias que obtuvieron una distancia genética similar fueron agrupadas para un análisis de distancia genética entre grupos, estos grupos son tratados como una nueva unidad OTU (Unidades Taxonómicas Operacionales) infiriendo una posible estructura de árbol filogenético.

Se identificó el modelo de sustitución que mejor describe a los datos utilizados para las reconstrucciones filogenéticas, se usó el Criterio de Información Bayesiano (*Bayesian Information Criterion*, BIC) en el programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) que sugiere el modelo evolutivo ideal, probando todos los modelos evolutivos para encontrar el correcto entre los candidatos.

Para los análisis de reconstrucción filogenética se utilizó primeramente el método de Neighbor-Joining, que utilizando un principio de mínima evolución obtiene los pares de secuencias más cercanos entre sí para generar un árbol final que es producto de sus distancias genéticas (Saitou & Nei, 1997). Dado que éste método de distancia detecta la variabilidad intra e interespecífica es útil para detectar especies crípticas (Peña, 2011) y se ha utilizado como herramienta para validar especies dentro del género *Centruroides* (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009).

También se hicieron reconstrucciones filogenéticas con los métodos de Neighbor-Joining y Máxima parsimonia, para inferir si existen o no diferencias genéticas entre las poblaciones en estudio Churumuco y Huetamo de *C. balsasensis*.

7.3 Análisis morfológico

Para la comparación morfológica se utilizó la nomenclatura propuesta por Stahnke (1970) y Francke (1977) para los segmentos metasomales. Los ejemplares fueron primeramente sexados.

Se midieron ejemplares adultos 22 machos y 21 hembras, con un vernier digital en escala lineal, TTC con precisión de ± 0.005 " , ± 0.02 MM. Se consideraron las mediciones utilizadas por Ponce-Saavedra y Francke (2004) las cuales incluyen mediciones de proporción y mediciones directas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Mediciones directas de estructuras de importancia taxonómica en alacranes.

Estructura	Medidas
Fémur	Longitud y ancho
Patela	Longitud y ancho
Pedipalpos	Ancho, longitud de la base hasta el dedo fijo y longitud del dedo fijo.
Metasoma	Longitud, ancho y altura de los segmentos metasomales I, IV y V.
Vesícula	Longitud (distancia de la base al tubérculo subaculear) ancho y alto
Carapacho	Longitud, distancia de la parte anterior del carapacho a los ojos.
Base de los peines	Longitud y ancho
Peines	Número de dientes pectinales
Terguitos	Longitud de terguitos I al VI, longitud terguito VII

Se usó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para encontrar variables que demuestren significancia estadística entre poblaciones. La prueba de Wilcoxon es una prueba no paramétrica para dos muestras pareadas con una variable de respuesta ordinal o cuantitativa y que generalmente es utilizado como homólogo a la prueba paramétrica de t cuando el tamaño de la muestra es pequeño (Badii *et al.*, 2012).

8. RESULTADOS

8.1 Análisis molecular

8.1.2 Alineamiento y elección de modelo de sustitución

Para el alineamiento de las secuencias se tomó como referencia el genoma mitocondrial completo de *Centruroides vittatus* con una longitud de 14,602 pb (Clave de acceso GenBank: MF975702), para ubicar la posición que ocupa el gen en estudio. La longitud del gen mitocondrial 16S de la subunidad ribosomal 16 (16s ADNmt) (Figura 1) comprende 1,136 pb (Yamashita *et al.*, 2017).

Los productos de PCR generados se alinearon y se eliminaron los extremos de baja calidad, en total se usaron 19 secuencias nucleotídicas (cuadros 4 y 5) para generar las reconstrucciones filogenéticas y análisis de distancias presentados. La región del gen producto de estos alineamientos comprende un total de 329 pb de longitud (Figura 1).

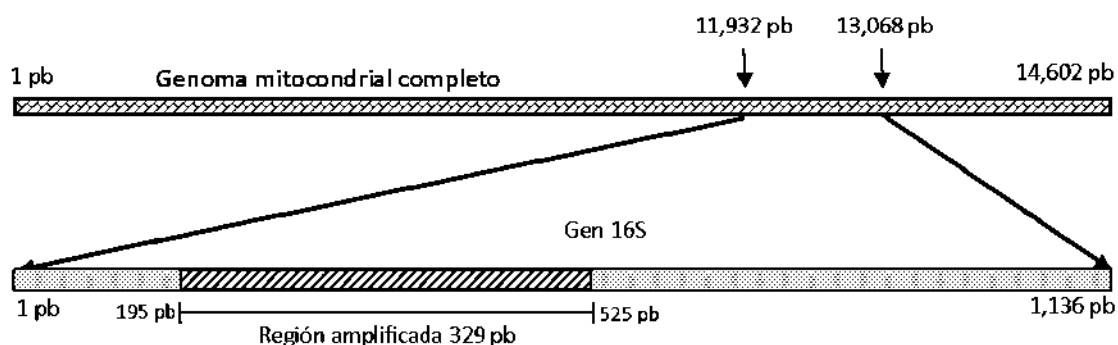


Figura 1. Gen mitocondrial 16S. Se representa el genoma mitocondrial completo de *C. vittatus* y la posición donde se ubica el gen 16S rDNA con la región amplificada.

Se realizó un análisis exploratorio de las secuencias alineadas con los siguientes resultados:

N° de secuencias	Longitud	Sitios conservados	N° Sitios Variables	Parsimony-info	Singleton
19	329 pb	203	121	78	42

Del total de 329 pb un 67.1% de los nucleótidos corresponden a regiones conservadas del gen en estudio. De los sitios variables hay un 33.77% del total de nucleótidos analizados que contienen dos o más tipos de nucleótidos en esa misma posición (N° sitios variables). Hay un total de 78 sitios (Parsimony-info) en el que hay dos o más nucleótidos con frecuencia mínima de dos y 42 sitios (singleton) en el que la variación de un nucleótido es única para una secuencia del total analizadas.

Una vez comprobada la calidad de las secuencias se realizó una estimación de los Criterios de Información Bayesiano (BIC) y de Akaike (AIC), para probar diferentes modelos de sustitución de acuerdo con el número de transiciones y transversiones (Cuadro 7). Entre 24 modelos probados el que mejor describe los patrones de sustitución corresponde *Tamura 3-Parameter + Gamma Distributed* (T92+G) con el valor más bajo para el criterio BIC. Utilizando este modelo (T92+G) se realizaron las reconstrucciones filogenéticas de Neighbor Joining.

Cuadro 7. Estimación de Criterios de información Bayesiano y de Akaike. BIC= Bayesian Information Criterion; AICc=Akaike Information Criterion, corrected.

Model	BIC	AICc
T92+G	3046.042902	2793.678085
T92+G+I	3052.974776	2793.982563
T92+I	3054.106995	2801.742179
HKY+G	3063.192007	2797.573108
HKY+G+I	3070.104988	2797.860117
TN93+G	3070.803455	2798.558584
HKY+I	3071.222635	2805.603737
TN93+I	3078.859307	2806.614436
TN93+G+I	3079.458321	2800.588189
GTR+G	3091.618609	2799.500096
GTR+I	3098.915392	2806.796879
GTR+G+I	3100.273475	2801.531842
K2+G	3161.482283	2915.745575
K2+G+I	3169.548158	2917.183341
T92	3181.642289	2935.905581
HKY	3199.279534	2940.287321
TN93	3206.455095	2940.836197
GTR	3227.567751	2942.073072
K2	3269.794315	3030.686425
K2+I	3278.445414	3032.708706
JC+G	3300.306756	3061.198867
JC+G+I	3308.538362	3062.801653
JC	3399.169057	3166.690697
JC+I	3407.822454	3168.714565

8.1.3 Distancias genéticas

C. balsasensis es una especie que se distribuye en la Depresión del Balsas en Michoacán y cuya descripción se obtuvo a partir de la identificación de ejemplares que en ése entonces aún se consideraban subespecies de *C. limpidus*. Además de ser una especie descrita desde 2004 con distribución registrada dentro del Estado de Michoacán, esta especie también se ha registrado en localidades de otros estados (Cuadro 8) como en Morelos, Estado de México, Guerrero y Guanajuato. En el presente trabajo se enlistan los registros existentes de la especie y las localidades referidas en su descripción original de acuerdo a Ponce-Saavedra (2019, Com. Pers.) (Cuadro 8; figura 2).

Basándose en la distribución de *C. balsasensis*, se comparó la divergencia genética de este taxón con especies geográficamente cercanas como *C. tecomanus* de distribución en la costa de Michoacán, *C. limpidus* simpátrica al Este de Michoacán con *C. balsasensis* y *C. infamatus* simpátrica con *C. balsasensis* en la Sierra de Coalcomán y regiones adyacentes en la parte Norte del Estado (Ponce y Francke, 2004).

Estas especies, además son morfológicamente similares y pertenecen al grupo de alacranes “rayados”, la especie que se asemeja más en morfología a *C. balsasensis* es *C. limpidus* y las diferencias específicas radican en su patrón de coloración y morfometría (Ponce y Francke, 2004).

Para este análisis se incluyeron especies geográficamente lejanas, como *C. ochraceus* de Yucatán y *C. gracilis* de Hidalgo, para obtener datos en divergencia genética con especies donde no influya la simpatría ni relaciones de ancestro común recientes.

Las distancias genéticas entre individuos se obtuvieron utilizando el modelo de p-distance que indica la proporción respecto al número de diferencias entre el total de nucleótidos comparados. Los resultados de este análisis se muestran en el cuadro 9 e incluyeron las 19 secuencias nucleotídicas que se enlistan en los Cuadros 4 y 5, se muestra la distancia genética entre pares y los valores de desviación estándar con 500 repeticiones Bootstrap.

Cuadro 8. Localidades donde se ha registrado la especie *C. balsasensis*

Localidad o coordenadas	Estado	Referencia
Amacuzac, Axochiapan, Cuautla, Coatlán del Rio, Emiliano Zapata, Juitepec, Jonacatepec, Micatlán, Temixco, Tepalcingo, Tlauiltenango, Tlaltizapan, Villa de Ayala, Xochitepec, Yautepec, Yecapixtla, Zacualpan de Amilpas.	Morelos	Córdoba-Athanasiadis; 2005, Santibañez-López <i>et al.</i> , 2011.
1 km al Sureste de Mango Matus, localidad de Tejupilco Lat 18°40'00" Long 100°26'39"	Estado de México	Ponce <i>et al.</i> 2004.
Zirándaro	Guerrero	Towler <i>et al.</i> , 2001
Tres puentes, Tzitzio	Mich.	Towler <i>et al.</i> , 2001
Irapuato	Guanajuato	Quijano-Ravell y Ponce-Saavedra 2014.
Comunidades Matamoros y Paso de vacas. Mpio. Coahuayutla	Guerrero	Baldazo-Monsivaiz <i>et al.</i> , 2012.
Arteaga, Buenavista Tomatlán, Churumuco, Gabriel Zamora, La Huacana, J. Mújica, Nuevo Urecho, Parácuaro, San Lucas, Taretan, Tepalcatepec.	Michoacán	Ponce y Francke, 2004
Arúa, municipio de Huetamo	Michoacán	Towler <i>et al.</i> , 2001

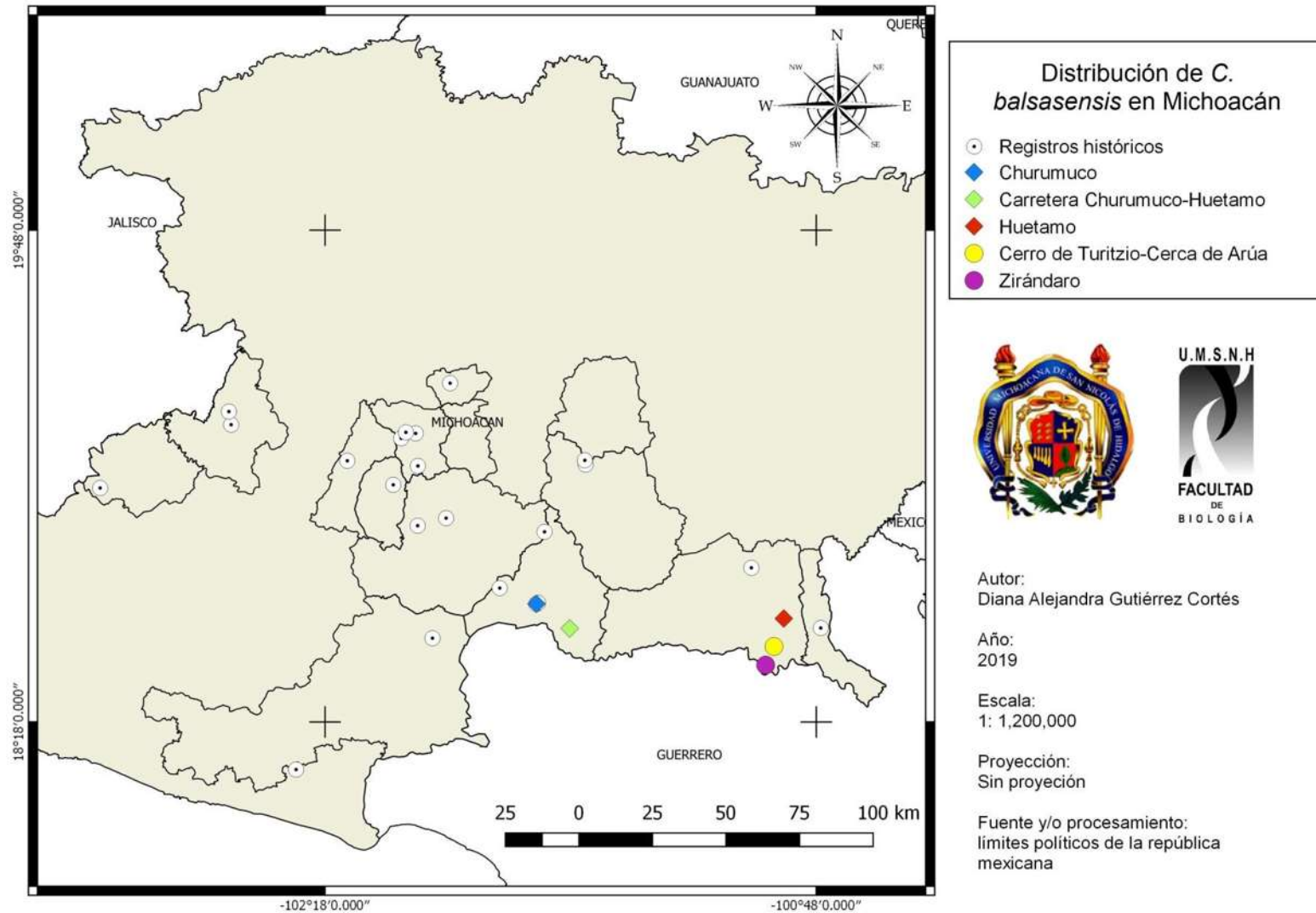


Figura 2. Distribución de *C. balsasensis* en el Estado de Michoacán

Cuadro 9. Distancias genéticas entre especies del género *Centruroides* mediante el modelo p-distance con resultados en la parte inferior y valores de desviación estándar en la parte superior.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	C_balsasensis_Churumuco		0.006	0.004	0.004	0.008	0.005	0.016	0.013	0.017	0.017	0.015	0.021	0.017	0.018	0.017	0.017	0.021	0.016	0.018
2	C_balsasensis_Churumuco(2)	0.013		0.006	0.006	0.008	0.007	0.015	0.012	0.017	0.017	0.014	0.022	0.017	0.018	0.017	0.017	0.021	0.017	0.017
3	C_balsasensis_Churumuco(3)	0.006	0.013		0.004	0.007	0.005	0.015	0.012	0.017	0.017	0.014	0.021	0.017	0.018	0.018	0.017	0.021	0.016	0.017
4	C_balsasensis_Churumuco(4)	0.006	0.013	0.006		0.008	0.005	0.015	0.012	0.017	0.016	0.014	0.021	0.016	0.017	0.017	0.017	0.021	0.016	0.017
5	C_balsasensis_Churumuco(5)	0.019	0.025	0.019	0.019		0.007	0.016	0.013	0.017	0.018	0.015	0.021	0.017	0.018	0.017	0.018	0.022	0.017	0.018
6	C_balsasensis_Churumuco(6)	0.009	0.016	0.009	0.009	0.016		0.016	0.012	0.017	0.017	0.015	0.022	0.017	0.018	0.017	0.017	0.021	0.017	0.018
7	C_balsasensis_AruaCerroTuritzio	0.102	0.096	0.099	0.096	0.096	0.099		0.011	0.019	0.019	0.010	0.024	0.020	0.019	0.019	0.020	0.022	0.019	0.019
8	C_balsasensis_AruaCerroTuritzio(2)	0.060	0.053	0.057	0.053	0.066	0.057	0.041		0.019	0.019	0.011	0.022	0.018	0.018	0.019	0.019	0.022	0.017	0.016
9	C_balsasensis_Huetamo	0.111	0.111	0.111	0.104	0.117	0.114	0.153	0.130		0.003	0.018	0.020	0.018	0.007	0.005	0.018	0.021	0.017	0.019
10	C_balsasensis_Huetamo(2)	0.108	0.108	0.108	0.101	0.121	0.111	0.150	0.127	0.003		0.018	0.021	0.017	0.007	0.006	0.018	0.021	0.017	0.019
11	C_balsasensis_Tzirandaro	0.080	0.073	0.076	0.073	0.089	0.083	0.035	0.041	0.132	0.129		0.022	0.019	0.018	0.018	0.018	0.021	0.018	0.017
12	C_gracilis_Hidalgo	0.151	0.151	0.148	0.145	0.159	0.155	0.201	0.168	0.151	0.154	0.176		0.021	0.021	0.020	0.019	0.019	0.021	0.022
13	C_infamatus_Uruapan	0.104	0.104	0.104	0.098	0.111	0.101	0.141	0.111	0.119	0.116	0.132	0.138		0.019	0.018	0.019	0.022	0.015	0.017
14	C_limpidus_Tacámbaro	0.123	0.123	0.123	0.117	0.123	0.120	0.156	0.127	0.016	0.019	0.131	0.164	0.129		0.005	0.019	0.022	0.018	0.019
15	C_limpidus_Tzitzio	0.117	0.117	0.117	0.111	0.117	0.114	0.160	0.131	0.009	0.013	0.135	0.158	0.123	0.006		0.019	0.022	0.017	0.019
16	C_nigrescens_Elpinzan	0.117	0.117	0.117	0.111	0.127	0.120	0.163	0.133	0.145	0.145	0.138	0.129	0.135	0.151	0.152		0.020	0.018	0.020
17	C_ochraceus_Yucatan	0.152	0.146	0.146	0.146	0.162	0.149	0.185	0.159	0.155	0.155	0.164	0.132	0.161	0.170	0.165	0.148		0.023	0.021
18	C_ornatus_Tangamandapio	0.101	0.101	0.101	0.095	0.114	0.104	0.141	0.111	0.110	0.107	0.125	0.145	0.072	0.126	0.120	0.135	0.174		0.016
19	C_tecomanus_Playa	0.111	0.105	0.105	0.105	0.124	0.114	0.125	0.096	0.126	0.123	0.103	0.167	0.098	0.136	0.137	0.151	0.152	0.088	

Cuadro 10. Valores de p-distance obtenida entre grupos de secuencias (parte inferior) y valores de desviación estándar (parte superior).

No. de secuencias usadas por grupo	Grupo		1	2	3	4	5	6	7	8	9
6	1	Churumuco		0.013	0.016	0.014	0.017	0.016	0.016	0.017	0.015
2	2	Arúa, Cerro Turitzio	0.078		0.018	0.010	0.018	0.018	0.018	0.016	0.016
2	3	Huetamo	0.110	0.140		0.018	0.017	0.017	0.006	0.018	0.016
1	4	Zirándaro	0.079	0.038	0.130		0.020	0.018	0.018	0.017	0.016
1	5	C_infamatus	0.104	0.126	0.118	0.132		0.014	0.018	0.017	0.016
1	6	C_ornatus	0.103	0.126	0.108	0.125	0.072		0.017	0.016	0.017
2	7	C_limpidus	0.119	0.143	0.014	0.133	0.126	0.123		0.018	0.016
1	8	C_tecomanus	0.111	0.110	0.125	0.103	0.098	0.088	0.136		0.017
3	9	Externos	0.140	0.168	0.151	0.160	0.145	0.151	0.160	0.157	

Los resultados del análisis de distancias genéticas indican que ejemplares de *C. balsasensis* de Churumuco en todos los casos donde se comparan con ejemplares de Huetamo muestran una distancia genética de entre 0.10 y hasta 0.12 en distancias pareadas.

Los dos ejemplares del Cerro de Turitzio en Arúa, Huetamo tienen un 0.04 de distancia genética entre sí, no obstante, comparando con ejemplares de Churumuco hay una distancia entre individuos desde 0.05 hasta 0.10 y con individuos de Huetamo desde 0.12 hasta 0.15.

Las distancias genéticas encontradas entre dos individuos procedentes de Cerro de Turitzio, localidad de Arúa, Huetamo (0.04) pueden deberse a error en alguna de las secuencias. Sin embargo, no se puede constatar si esta distancia genética es por motivo de baja calidad de los productos amplificados por PCR, ya que son secuencias publicadas por Towler *et al.* 2001 y Ponce *et al.* 2009 y no se cuenta con el electrofenograma para corroborar los nucleótidos que puedan ser ambiguos. No obstante, al comparar estas secuencias de Cerro de Turitzio con individuos de Huetamo que es la población más cercana, hay una divergencia genética considerable, haciendo suponer que pertenecen a una población independiente.

Las distancias genéticas entre individuos de *C. balsasensis* con otras especies son iguales o mayores a 0.09 en todos los casos, excepto con la población de Huetamo, que es más cercana a *C. limpidus* que a cualquier otro taxa (distancia genética menor a 0.01).

Comparaciones interespecíficas entre *C. infamatus* (Uruapan) respecto a *C. balsasensis* de Churumuco hay desde 0.09 a 0.10 de diferencias, 0.11 con individuos de Huetamo y 0.11 a 0.14 con individuos de Cerro de Turitzio, Arúa, Huetamo. La especie *C. limpidus* con *C. balsasensis* de Churumuco tiene valores 0.11 a 0.12 de diferencias 0.12 a 0.16 al comparar con individuos de Cerro de Turitzio (Arúa, Huetamo) y apenas 0.009 a 0.01 cuando se compara con individuos de Huetamo.

Respecto a *C. ornatus* se describe como una especie endémica del Cinturón Volcánico Transversal en la parte Norte de Michoacán y oriental de

Jalisco, siendo una especie estrechamente relacionada a *C. infamatus* (Ponce-Saavedra *et al.*, 2015a), por esta razón se tomó de referencia a “*C. infamatus*” de Los Tábanos, Tangamandapio, Mich. (referido en Esposito *et al.*, 2018) como un *C. ornatus* y al *C. infamatus* “verdadero” el de la localidad de Uruapan, Mich. (referida en Towler *et al.*, 2001 como *C. infamatus infamatus*).

Una referencia para comparación interespecífica es *C. ochraceus*, especie utilizada como grupo externo porque es geográficamente distante y sus características morfológicas lo ubican dentro del grupo “bertholdii” (Ponce-Saavedra y Francke, 2019); ésta especie mantiene distancias de 0.14 a 0.16 con ejemplares de Churumuco, 0.15 a 0.18 con Cerro de Turitzio, Arúa y 0.15 con Huetamo.

El principal hallazgo encontrado con este análisis es que las divergencias genéticas encontradas indican que el clado conocido como *C. balsasensis* contiene una variación considerada interespecífica y que este grupo corresponde a tres poblaciones genéticamente distintas: 1) Población Churumuco, 2) Población Arúa-Cerro de Turitzio/Zirándaro y 3) Población Huetamo/limpidus; de los cuales la población 1 y 2 corresponden a dos taxa específicos diferentes del clado conocido como *C. balsasensis* y la población 3 debe ser considerada dentro del clado *C. limpidus* por similitud genética con éste taxa.

Dadas las divergencias encontradas entre los individuos de *C. balsasensis* en estudio, también se hizo un análisis de p-distance con distancias entre grupos, los resultados se muestran en el cuadro 10. En éste análisis a diferencia de las distancias entre individuos, las secuencias agrupadas representan una población y el resultado es promedio del número de cambios en valores p-distance dentro del grupo comparándolo respecto al promedio de los otros grupos.

En el grupo número 1 se incluyeron las seis secuencias de *C. balsasensis* de Churumuco, en grupo 2 las dos secuencias de *C. balsasensis* de Cerro de Turitzio, Arúa, en grupo 3 las dos secuencias de Huetamo, en grupo 4 la secuencia de Zirándaro, en grupo 5 la secuencia de *C. infamatus* Uruapan, en grupo 6 la secuencia de *C. ornatus* de los Tábanos, Tangamandapio, en grupo 7 las dos secuencias de *C. limpidus* procedentes de Tacámbaro y Tzitzio, en grupo

8 una secuencia de *C. tecomanus* de Playa Azul, Lázaro Cárdenas y en el grupo 9 se incluyeron las especies *C. ochraceus*, *C. nigrescens* y *C. gracilis* que indicaron ser las tres especies más lejanas de *C. balsasensis* en el análisis de distancias entre especies (Cuadro 9) y demuestran ser buen grupo externo.

Los resultados de distancias genéticas por grupos confirman que la población Zirándaro constituye un mismo grupo con la población Arúa, ambos con distancia de 0.07 respecto a Churumuco, por tanto deben considerarse una misma población.

Las comparaciones entre grupos que son considerados especies claramente distintas en la literatura como *C. tecomanus* y *C. infamatus* con 0.09 de distancia o *C. limpidus* con *C. tecomanus* 0.13, afirman la separación que tiene *C. balsasensis* de Churumuco respecto al resto de los grupos.

Las distancias genéticas entre los grupos Churumuco y Huetamo (0.11) confirman que se trata de dos poblaciones evidentemente separadas, ya que al comparar grupo Churumuco con otra especie distinta morfológicamente como *C. tecomanus*, hay una distancia interespecífica también de 0.11 y hasta 0.14 comparando con las especies geográficamente lejanas y morfológicamente diferentes (“Grupo externo”).

Cabe destacar que la divergencia entre la población de *C. balsasensis* de Huetamo y *C. limpidus* se considera intraespecífica (0.014), por tanto, la identidad taxonómica correcta para la población de Huetamo es correspondiente a la población de Tacámbaro: *Centruroides limpidus*.

8.1.4 Reconstrucciones filogenéticas

En las reconstrucción filogenética de Máxima parsimonia se probó la monofilia de las poblaciones de *C. balsasensis* de Churumuco y Huetamo y se compararon las distancias con Neighbor Joining con otros individuos de la misma especie (Cerro de Turitzio Arúa, Huetamo y Zirándaro, Gro.) y las referidas como localidad tipo en Ponce-Saavedra y Francke (2004).

En estos árboles se incluyen a las especies con rangos de distribución más cercanas a la Depresión del Balsas, las especies del norte de Michoacán (*C. infamatus*), especies del noroeste (*C. limpidus*, *C. infamatus*) y de la costa Michoacana (*C. tecomanus*) que es la especie más parecida morfológicamente (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se incluyen especies de *Centruroides* que corresponden a distribuciones al Golfo de México (*C. gracilis*), y Península de Yucatán (*C. ochraceus*), como punto de comparación para las reconstrucciones filogenéticas que involucran distancias, ya que son especies geográficamente lejanas y morfológicamente muy distintas; *C. gracilis* pertenece al grupo “gracilis” y *C. ochraceus* al grupo “bertholdii” (Ponce-Saavedra y Francke, 2019). Se incluye a la especie *C. nigrescens* como una especie que comparte cercanía en su distribución geográfica pero de características morfológicas muy distintas a las poblaciones en estudio al pertenecer al grupo de alacranes “no rayados”.

Los árboles obtenidos con método de Neighbor Joining y de Máxima parsimonia se estimaron con 500 repeticiones Bootstrap y se eligió a *C. ochraceus* como grupo externo.

Los resultados del árbol de Neighbor Joining (Figura 3) muestra un grupo conformado solo por *C. balsasensis* pertenecientes a Churumuco con valor de Bootstrap 99%. Se observa un segundo grupo conformado por individuos de Arúa y Zirándaro (Bootstrap 99%) y a los haplotipos de Huetamo formando un clado con *C. limpidus* soportado por valores Bootstrap de 100%.

La reconstrucción filogenética de Máxima Parsimonia (Figura 4) conserva la misma topología, se puede observar que el clado correspondiente

a *C. balsasensis* (*sensu lato*) la población de Churumuco se mantiene en tres subgrupos pero dentro de un mismo clado (Bootstrap 77%), nuevamente se mantiene el clado Arúa-Zirándaro (Bootstrap 96%).

En ambas reconstrucciones la población de Churumuco supone siempre un grupo separado de Cerro de Turitzio, cerca de Arúa y Zirándaro y también se distingue a lo que se conoce como *C. balsasensis* de Huetamo más cercano con el grupo *C. limpidus* de Tacámbaro y Tzitzio (Bootstrap 100%), por lo que se reporta que esta población pertenece a la especie *C. limpidus*.

Conforme a los resultados aquí presentados se confirma que el clado conocido como *C. balsasensis* es parafilético y está conformado por dos especies. Como resultado de este trabajo, también se reporta por primera ocasión a *Centruroides limpidus* en Huetamo, ampliando la distribución hasta esa zona en Michoacán.

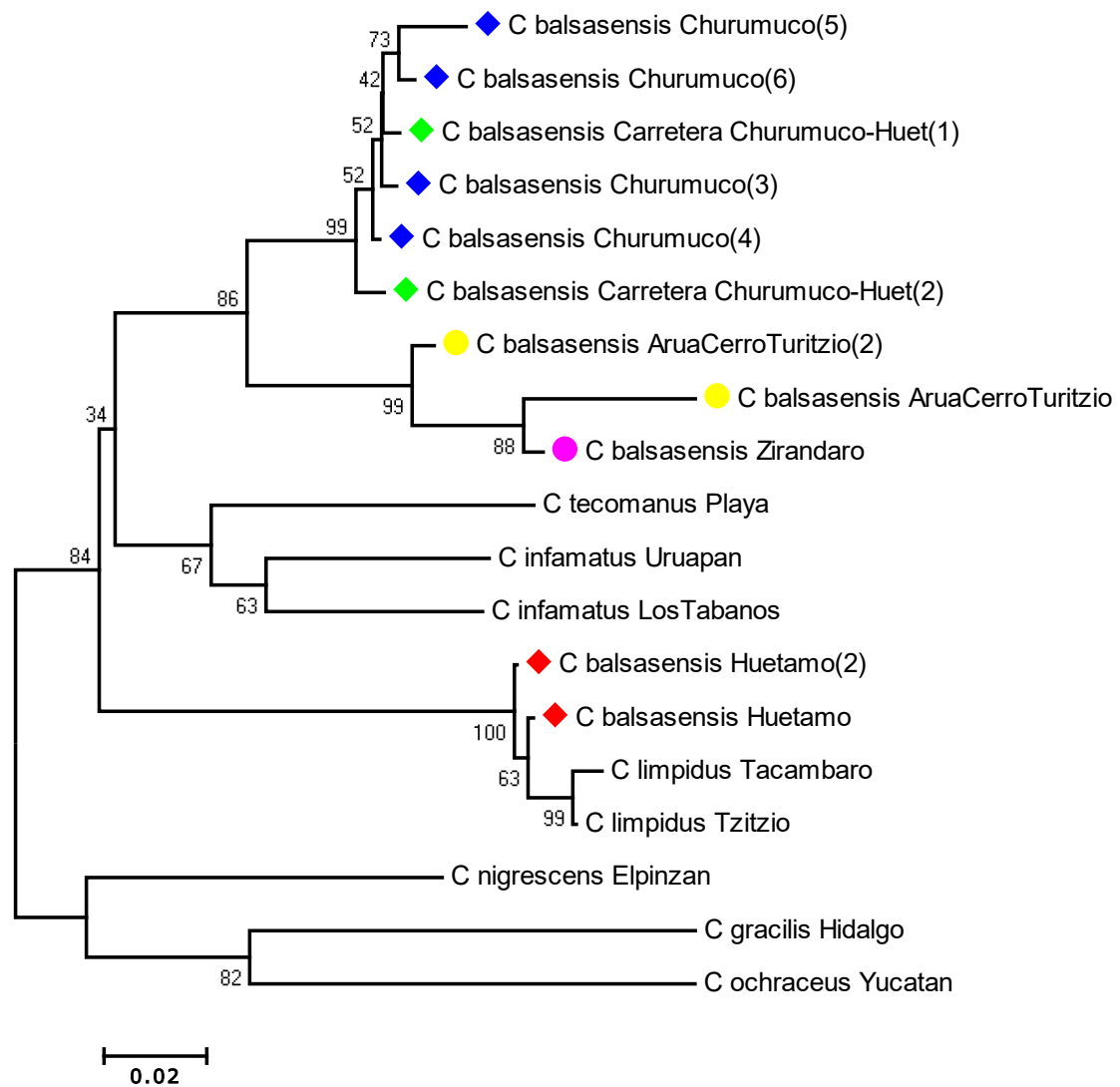


Figura 3. Reconstrucción filogenética Neighbor Joinning de las poblaciones de *C. balsasensis* en los nodos se indican los valores Bootstrap. La simbología y colores se indican conforme a las poblaciones resaltadas en el mapa de distribución de Figura 2.

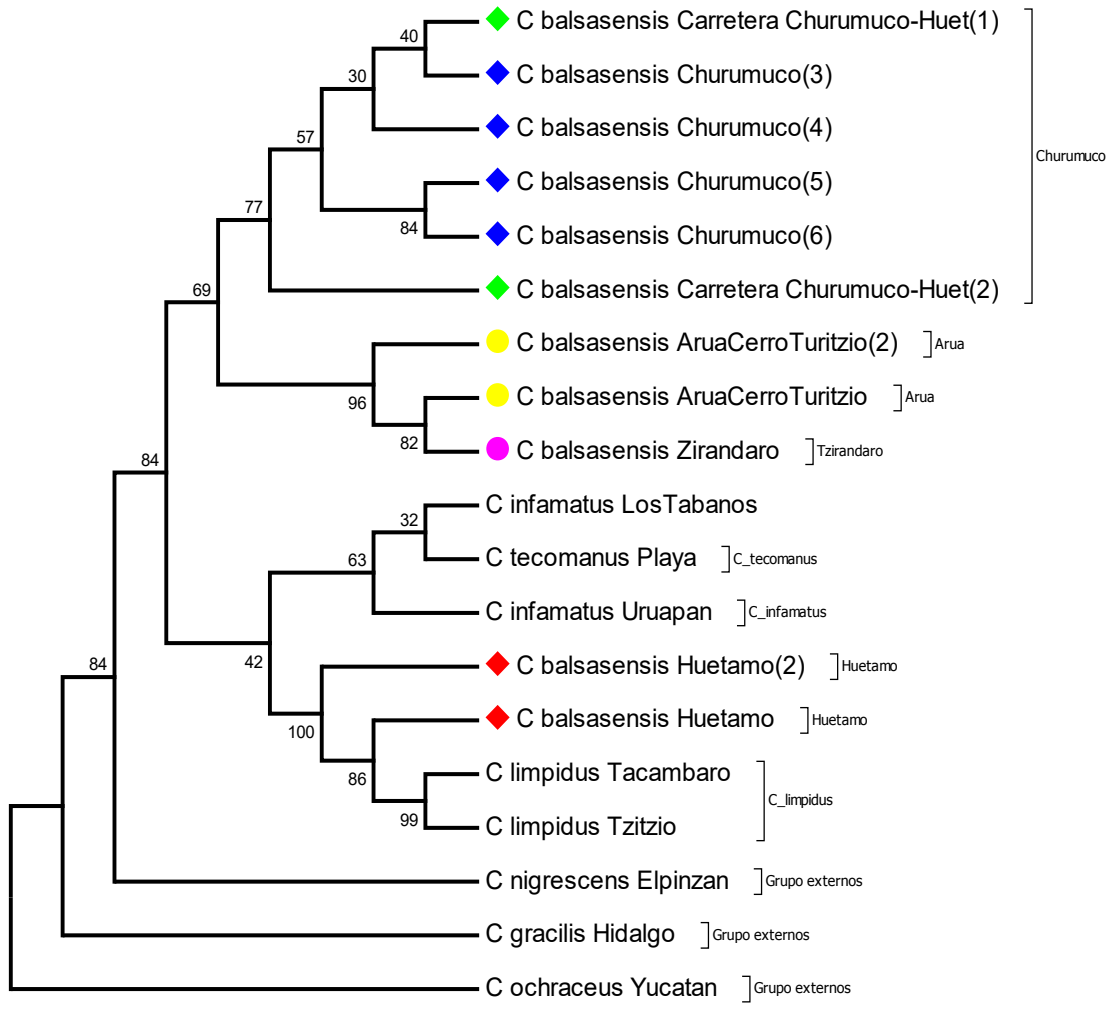


Figura 4. Reconstrucción filogenética de máxima parsimonia en los nodos se muestran los valores Bootstrap.

8.2 Análisis morfológico

Se hizo la comparación entre 22 machos y 21 hembras de las dos localidades en estudio, Churumuco (localidad tipo de la especie) y Cerro de Turitzio (Arúa, cerca de Huetamo), agregando Zirándaro, población que según el análisis con RNAm 16S, correspondería al mismo taxón que la población Arúa. Las poblaciones de Huetamo se omiten en este análisis ya que corresponden a la especie *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) y las diferencias con *C. balsasensis* pueden revisarse en la descripción original de la especie (Ponce y Francke, 2004).

Se analizaron machos y hembras de cada localidad por separado, debido al dimorfismo sexual en los escorpiones, por lo que el tamaño de muestra para cada población es pequeño y se eligió un análisis no paramétrico por esta razón.

El análisis morfométrico mediante la prueba de Wilcoxon aplicado a las mediciones obtenidas, mostró que algunas proporciones tienen diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) para separar las poblaciones de machos y hembras y pueden usarse como características diferenciales adicionales a las morfológicas (Cuadro 13).

Se encontraron 10 diferencias morfológicas entre los machos (Cuadro 11; Figura 5 y 6) y 7 diferencias entre las hembras (Cuadro 12; Figura 7 y 8). Puede notarse que hay 3 características morfológicas en común entre machos y hembras que ayudan a diferenciar ambas poblaciones: Quillas dorsolaterales y ventrales de las manos, Carena media de la Patela y las Quillas ventrales del V segmento metasomal.

Cuadro 11. Características morfológicas para diferenciar machos de las poblaciones de *C. balsasensis*.

Diferencias Morfológicas Machos		
	Población Churumuco, Chur.	Población Arúa, Huet.
Esternito VII	1) Esternito de superficie plana, sin surcos entre carenas medias ni rebordes.	Espacios intercarenales con surcos profundos. Carenas laterales con un reborde bien definido.
Manos	2) Quillas dorsolaterales lisas, moderadamente desarrolladas y quillas ventrales granulares débilmente desarrolladas a obsoletas en la base de la mano.	Quillas dorsolaterales aserradas, fuertemente desarrolladas y quillas ventrales granulares moderadamente desarrolladas en la base de la mano.
Patela	3) Quilla dorsal interna recta desde su parte proximal hasta su parte distal. Carena media es recta y paralela a la carena dorsointerna. 4) La carena media se une a la carena dorsoexterna de la patela en la parte distal. 5) Superficie intercarenal lisa.	Quilla dorsal interna recurveada en la parte media. Carena media sinuosa, forma una curvatura y no se une a la quilla dorsoexterna ni dorsointerna hacia los extremos. Superficie intercarenal finamente granulosa. La proporción de Ancho patela/ancho mano logra diferenciar ambas poblaciones.
Base de los	6) Borde anterior con una	Borde anterior con una muesca en

peines	<p>muesca prominente en su parte media y rebordes poco engrosados.</p> <p>7) Borde posterior recto a ligeramente recurvado.</p> <p>8) Entre la placa basal de los peines y placas genitales un pliegue de tejido poco visible.</p>	<p>la parte media moderadamente profunda y con rebordes muy engrosados.</p> <p>Borde posterior recurvado con un lóbulo convexo en la parte media.</p> <p>Entre la placa basal de los peines y placas genitales pliegue con los extremos lobulados.</p>
V Segmento metasomal	9) Quillas ventrales bien desarrolladas hasta cerca de la parte distal.	Quillas ventrales poco desarrolladas a obsoletas en la parte distal.
Telson	10) Tubérculo subaculear bien desarrollado, cónico más ancho en su base.	Tubérculo subaculear poco desarrollado, espiniforme.

Cuadro 12. Características morfológicas para diferenciar hembras de las poblaciones de *C. balsasensis*.

Diferencias Morfológicas Hembras		
	Población Churumuco, Chur.	Población Arúa, Huet.
Esternito VII	<p>1) Superficie intercarenal granulosa.</p> <p>2) Pre-esternito con carena de dos curvaturas en la región media.</p>	<p>Superficie intercarenal lisa lustrosa, finamente granulosa solo hacia los bordes laterales.</p> <p>Pre-esternito con carena de una curvatura en la región media.</p>
Manos	<p>3) Quillas dorsolaterales lisas a granulares moderadamente desarrolladas y quillas ventrales granulares débilmente desarrolladas a obsoletas en la base de la mano.</p>	<p>Quillas dorsolaterales aserradas fuertemente desarrolladas y quillas ventrales aserradas desarrolladas en la base de la mano.</p>
Patela	<p>4) Quilla dorsal interna recurveada.</p> <p>5) Carena media es ligeramente sinuosa. La carena media se une a la quilla dorsoexterna de la patela en la parte distal.</p>	<p>Quilla dorsal interna muy recurveada en la parte media.</p> <p>Carena media sinuosa, forma una curvatura y no se une a la quilla dorsoexterna ni dorsointerna hacia los extremos.</p>
V Segmento metasomal	<p>6) Quillas ventrales bien desarrolladas casi hasta la parte distal.</p> <p>7) Segmento no es acanalado dorsalmente en su parte distal.</p>	<p>w) Quillas ventrales poco desarrolladas a obsoletas en la parte distal.</p> <p>El segmento es ligeramente acanalado en la parte dorsal distal.</p>

Cuadro 13. Características morfométricas que separan estadísticamente las poblaciones de *C. balsasensis* con prueba no paramétrica de Wilcoxon.

*Significancia estadística <0.05

	VARIABLES MORFOMÉTRICAS MACHOS				
	Población Churumuco (n=11)		Población Arúa, Huetamo (n=11)		Significancia estadística
	Media	Desv. Est.	Medi a	Desv. Est.	Valor <i>p</i>
Longitud carapacho/largo dedo fijo	1.030	±0.041	0.996	±0.027	0.0215*
Ancho patela/ancho mano	0.939	±0.035	0.901	±0.032	0.0058*
Longitud carapacho/largo segmento metasomal I	1.031	±0.039	1.091	±0.047	0.0151*
Largo dedo fijo/largo segmento metasomal I	1.001	±0.024	1.097	±0.061	0.0006*
Largo vesícula/largo segmento metasomal I	0.573	±0.024	0.607	±0.021	0.0047*
	VARIABLES MORFOMÉTRICAS HEMBRAS				
	Población Churumuco n=10		Población Arúa, Huetamo n=11		Significancia estadística
	Media	Desv. Est.	Medi a	Desv. Est.	Valor <i>p</i>
ancho patela/ancho fémur	1.390	±0.040	1.449	±0.046	0.0028*
Longitud Carapacho/largo dedo fijo	1.056	±0.034	0.986	±0.067	0.0183*
largo dedo fijo/largo segmento metasomal I	1.273	±0.046	1.378	±0.127	0.0022*
largo dedo fijo/largo segmento metasomal IV	0.924	±0.021	1.017	±0.139	0.0035*
Largo dedo fijo/largo vesícula	2.03	±0.11	2.36	±0.41	0.0008*

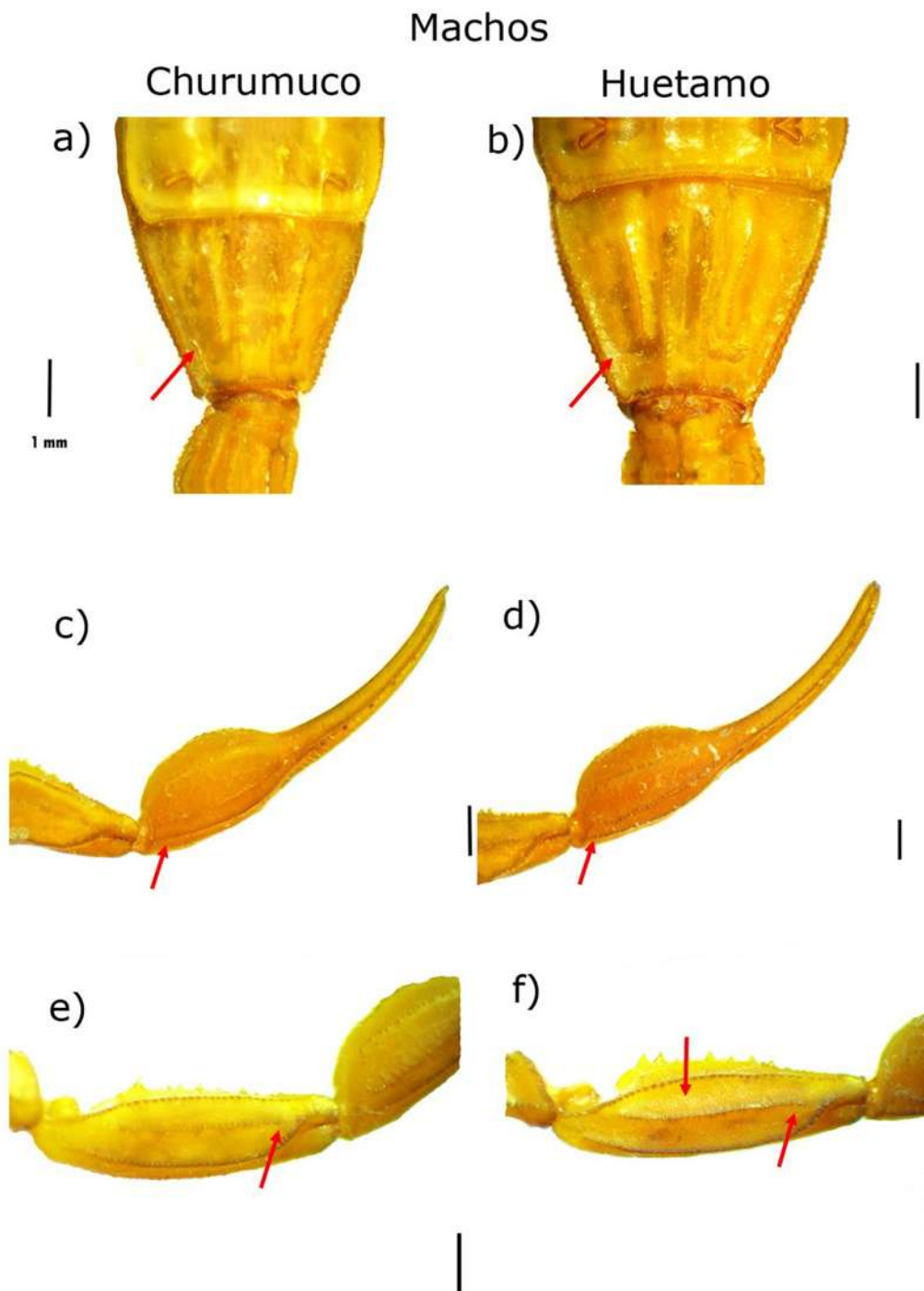


Figura 5. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de machos de *C. balsasensis*. Incisos a) y b) esternito VII vista ventral, c) y d) mano vista dorsal, e) y f) patela vista dorsal. Escala= 1mm.

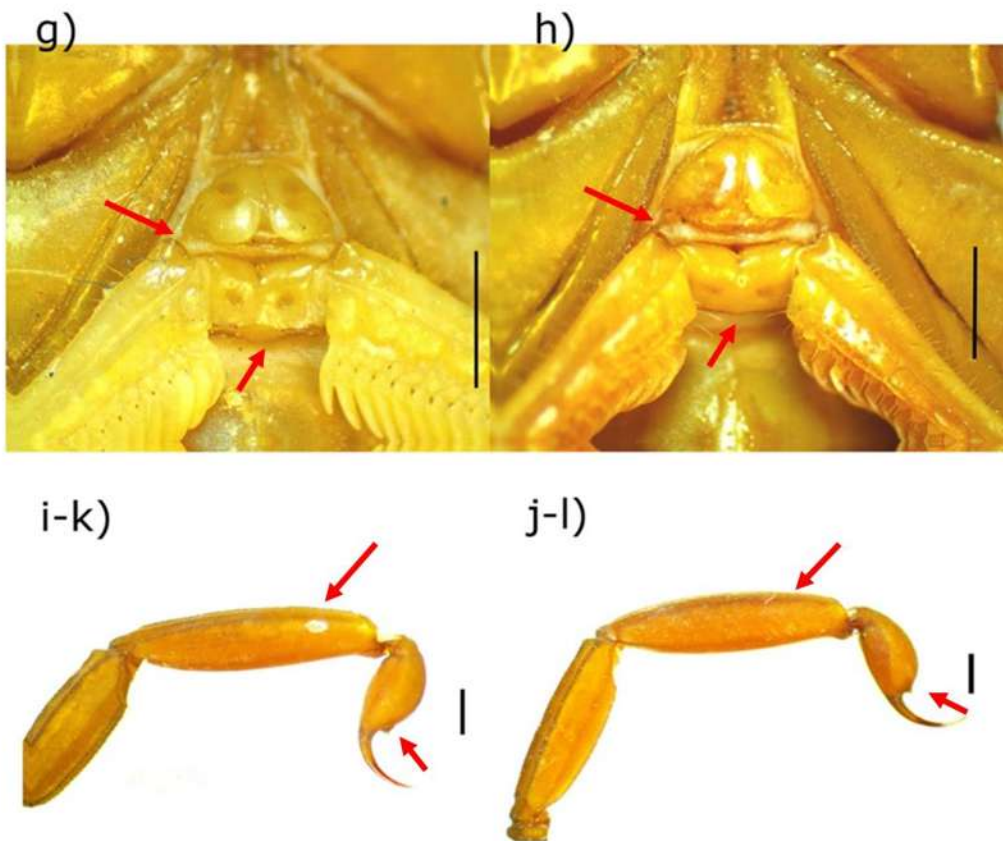


Figura 6. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de machos de *C. balsasensis*. g) y h) vista ventral de la región coxoesternal; i-k), j-l) Segmento metasomal V y telson en vista lateral. Escala = 1mm

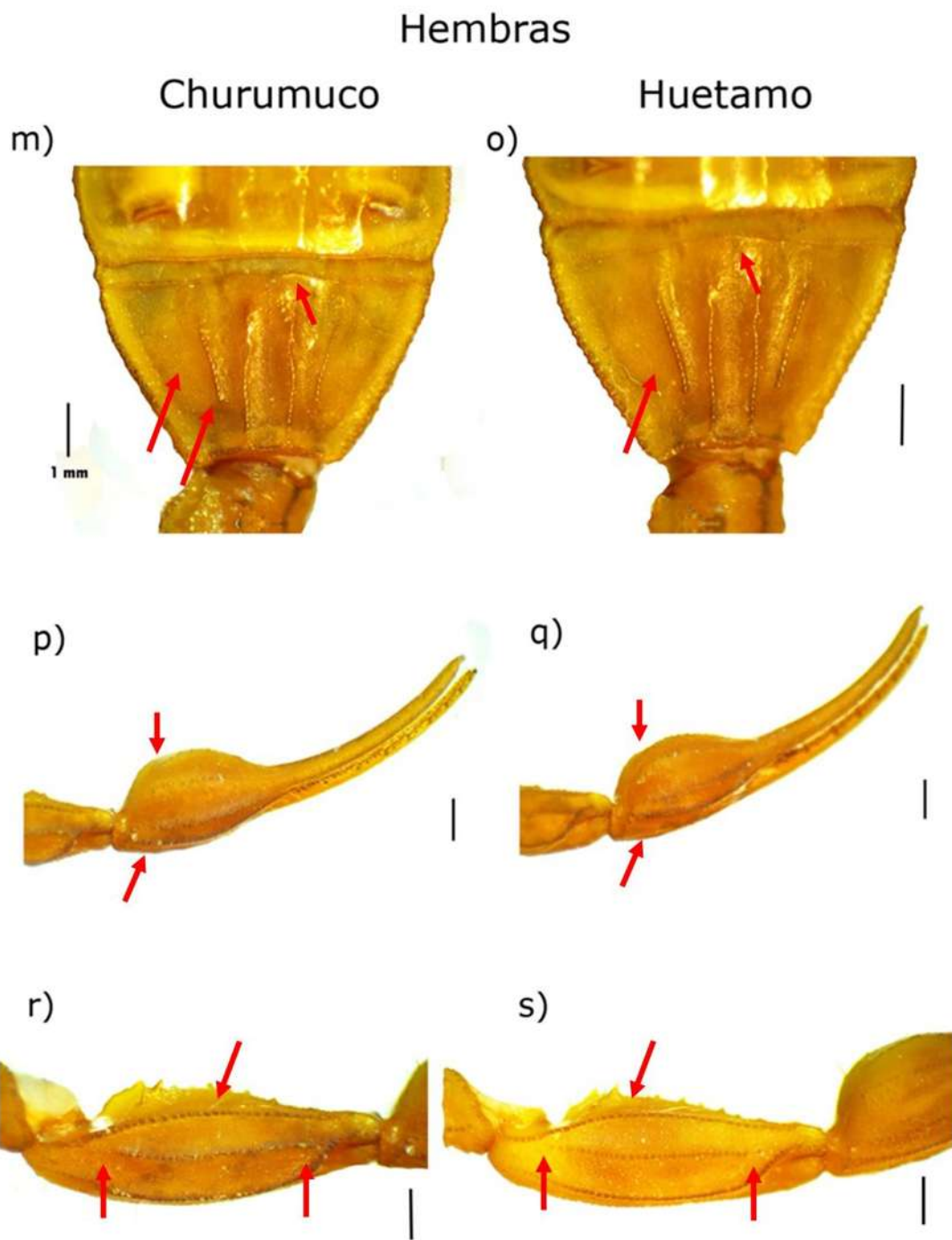


Figura 7. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de hembras de *C. balsasensis*. m) y o) esternito VII vista ventral, p) y q) mano vista dorsal; r) y s) patela vista dorsal. Escala = 1mm.

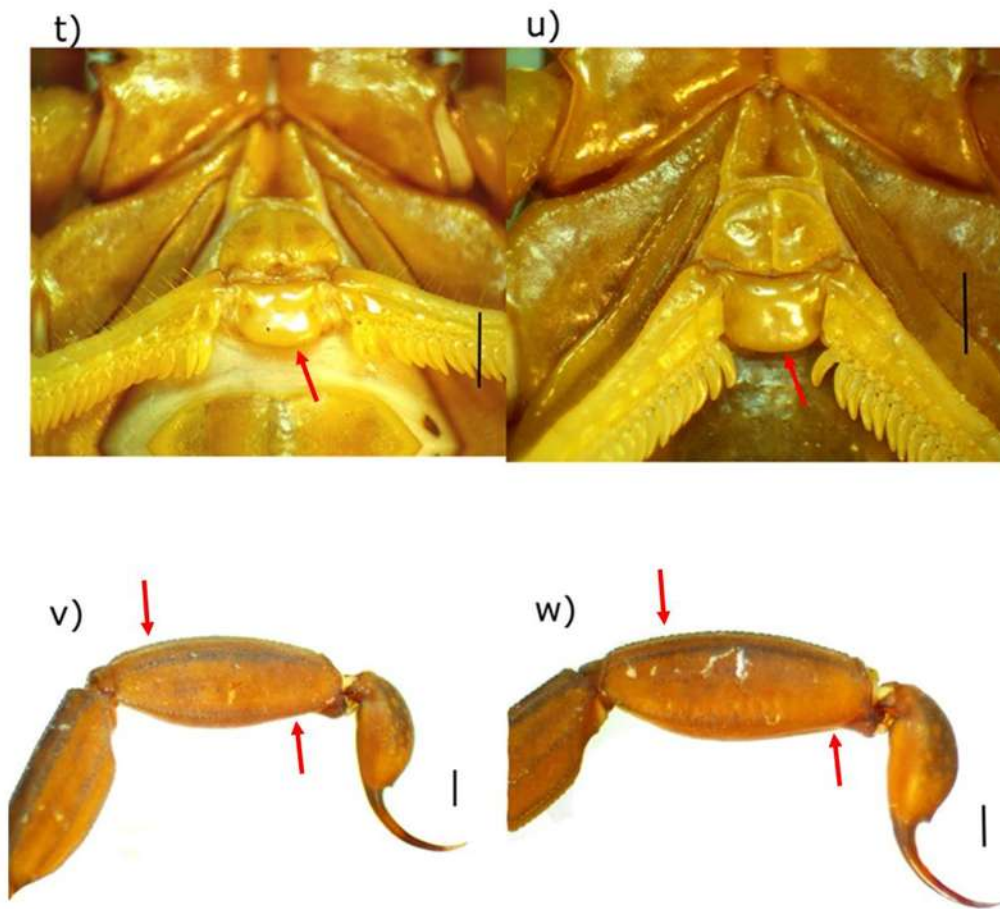


Figura 8. Características morfológicas que pueden diferenciar a las poblaciones de hembras de *C. balsasensis*. t) y u) vista ventral de la región coxoesternal; v) y w) segmento metasomal V y telson en vista lateral. Escala = 1mm.

9. DISCUSIÓN

El análisis de las dos poblaciones de *C. balsasensis* comprende especies morfológicamente similares, confirmando lo previamente mencionado por Lourenço y Sissom (2000) sobre los complejos de este género de alacranes.

Los tres principales hallazgos de este trabajo son:

- a) La especie denominada como *C. balsasensis* consta de dos poblaciones morfológicamente similares y genéticamente diferentes.

Las diferencias morfológicas en esta especie pueden confundirse como variación fenotípica, tal como lo consideraron en su descripción (Ponce y Francke, 2004). Sin embargo, Ponce (2003) demostró que las evidencias moleculares obtenidas entre las poblaciones de Churumuco y las de Arúa (Cerro de Turitzio) mostraban una divergencia genética importante (0.07), no tomada en cuenta en ese momento.

En cuanto a la plasticidad fenotípica que presenta la especie *C. balsasensis*, se demostró que para diferenciar las poblaciones de Churumuco y Arúa, existen pocos caracteres morfológicos que pueden ayudar como diagnósticos. Por ejemplo, en las especies *C. baracoae* y *C. anchorellus* se reporta un efecto de desplazamiento de carácter, en el que la plasticidad fenotípica ha derivado en caracteres de expresión extrema donde las especies son simpátricas y, caracteres casi indistinguibles en distribuciones marginales (Teruel, 2000). Para demostrar que este efecto sucede en *C. balsasensis*, será necesario analizar material de las localidades adyacentes que confirmen que estos caracteres son de utilidad en su identificación.

Considerando que, la descripción del holotipo se hizo con un ejemplar macho de Churumuco y que la variación morfológica se reportó revisando ejemplares de ambas localidades, se propone que el trabajo de Ponce y Francke en 2004 sea corregido, especificando que posiblemente se trata de dos taxa distintos.

- b) Las poblaciones Arúa (Cerro de Turitzio) y Zirándaro constituyen un clado genéticamente distinto al de Churumuco.

Estudios en artrópodos indican divergencias genéticas de 5 a 8% entre géneros y de 4 a 6% entre especies de dípteros (Xiong y Kocher, 1991). En escorpiones se documenta la divergencia genética intraespecífica de 2%, en divergencia no corregida por cada millón de años para el gen mitocondrial 16S (Gatenbein *et al.* 2001 y Towler *et al.*, 2001).

Las distancias genéticas que se reportan entre especies de *Centruroides spp.*, son de 0.09 a 0.10 en *C. limpidus* respecto a *C. limpidus tecomanus*, de 0.07 y 0.08 entre *C. infamatus* y *C. infamatus ornatus* (Towler *et al.*, 2001) y de 0.10 entre *C. romeroi* y *C. ornatus* (Quijano-Ravell *et al.* 2019). Comparando la divergencia genética obtenida en el presente trabajo, la población de *C. balsasensis* de Churumuco, respecto a la población de Arúa (Cerro de Turitzio) y Zirándaro, resultó en distancias mayores a 5% (p-distance=0.05), mostrando que pudieran representar especies distintas.

Teruel *et al.* (2006) mencionan que el género *Centruroides* es morfológicamente complejo y parafilético, concordando con el trabajo de Gatenbein *et al.* (2001) con *C. exilicauda*, donde muestran 3 clados distintos con valores Bootstrap mayores al 88% en su análisis de máxima parsimonia. En consecuencia, el presente trabajo confirma que el clado *C. balsasensis* es parafilético debido a que se conforma por el grupo Churumuco (Bootstrap 77%) y el clado Arúa-Zirándaro (Bootstrap 96%).

c) La población de la localidad de Huetamo corresponde a la especie *C. limpidus*, reportada como simpátrica en esa zona.

La distribución reportada para la especie *C. limpidus* se menciona en poblaciones aledañas a la Depresión del Balsas en Michoacán (Ponce-Saavedra *et al.*, 2009), sin embargo, la distancia genética reportada en este trabajo (p-distance=0.01) sugiere que esta población corresponde al mismo taxón específico con respecto a *C. limpidus*.

10. CONCLUSIONES

Al analizarse molecular y morfológicamente dos poblaciones de *C. balsasensis* en las localidades de Churumuco y Arúa, comparando el gen mitocondrial 16S, se comprobó que existe divergencia genética y se especificaron los caracteres morfológicos que pueden ser de utilidad para diferenciarlas. Además, se determinaron proporciones que sustentan diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones.

Las poblaciones de Arúa (Cerro de Turitzio) y Zirándaro deberán analizarse con mayor detenimiento, a fin de lograr argumentos morfológicos y morfométricos que permitan su separación y posterior descripción taxonómica para validarlos como una nueva especie.

La población ubicada en Churumuco, constituye un grupo bien diferenciado y consistente en las reconstrucciones filogenéticas. Dado que el holotipo para *C. balsasensis* se seleccionó de esta población, esta debe permanecer con el mismo nombre, pero es indispensable una redesccripción que corrija la variación morfológica reportada.

Las poblaciones correspondientes a la etiqueta Huetamo deben ubicarse en el taxón específico *Centruroides limpidus* de acuerdo con los resultados de distancias genéticas, además, debe considerarse la modificación de su distribución en la Depresión del Balsas.

11. LITERATURA CITADA

- Armas, L. F. de. 1984. **Escorpiones del archipiélago cubano. VII. Adiciones y enmiendas (Scorpiones: Buthidae, Diplocentridae)**. Poeyana, 275: 1-37.
- Armas, L. F. de, E. Martín-Frías y J. Estévez-Ramírez. 2003. **Lista anotada de las Especies Mexicanas del género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae)**. Revista Ibérica de Aracnología. 8:93-98
- Armas, L. F. de y E. Martín-Frías. 2008. **El género *Centruroides* Marx, 1890. (Scorpiones: Buthidae) en el Estado de Veracruz, México**. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. 43:7-22.
- Armas, L. F. de, D. Luna S. y E. Flores D. 2012. **Composición del género *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) en Colombia, con la descripción de una nueva especie**. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa. 50: 105-114.
- Badii, M.H., A. Guillen, L. A. Araiza, E. Cerna, J. Valenzuela y J. Landeros. 2012. **Métodos No-Paramétricos de Uso Común**. International Journal of Good Conscience. 7(1): 132-155.
- Baldazo-Monsivaiz, J. G., J. Ponce-Saavedra y M. Flores-Moreno. 2012. **Los alacranes (Arachnida: Scorpionida) de importancia médica del estado de Guerrero, México**. Dugesiana 19(2): 143-150.
- Baldazo-Monsivaiz, J. G., J. Ponce-Saavedra y M. Flores-Moreno. 2013. **Una especie nueva de alacrán del género *Centruroides* de importancia médica (Scorpiones: Buthidae) del estado de Guerrero, México**. Revista Mexicana de Biodiversidad. 84:100-116.
- Beutelspacher, B. C. R. 2000. **Catálogo de los Alacranes de México**. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 175 pp.
- Bickford, D., D. J. Lohman, N. S. Sodhi, P. K. L. Ng, R. Meier, K. Winker, K. K. Ingram, y I. Das. 2007. **Cryptic species as a window on diversity and conservation**. Trends in Ecology & Evolution. (22)3:184-155.

- Boore, J. L. y W.M. Brown. 1998. **Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool.** Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 668-674.
- Borkin, L.Ya., Litvinchuk, S.N., Rozanov, Yu.M., and Skorinov, D.V., 2004. **On Cryptic Species (by Example of Amphibians),** Zool. Zh. 83(8): 936–960
- Capinera, John L. 2008. **Encyclopedia of Entomology.** Springer, New York. 4336 pp.
- Chávez-Haro, A. L., y E. Ortiz. 2015. **Scorpionism and dangerous species around the world: Mexico.** In: Schwartz E. F., Rodríguez de la Vega R.C., Possani LD, (eds). Handbook of toxinology – scorpion venoms. Berlin: Springer. 201-213 pp.
- Coddington, J. A., G. Giribet, M. S. Harvey, L. Prendini, y D. E. Walter. 2004. **Arachnida.** In: Cracraft J. y M. J. Donoghue (eds). **Assembling the tree of life.** New York, N. Y.: Oxford University Press. 296-318 pp.
- Córdova-Athanasiadis, M. 2005. **Escorpiofauna (Arachnida: Scorpiones) del estado de Morelos, México.** Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 123 p
- Coelho P., P. Sousa, D. J. Harris, A. van der Meijden. 2014. **Deep intraspecific divergences in the medically relevant fat-tailed scorpions (Androctonus, Scorpiones).** Acta Tropica 134: 43-51.
- Cracraft, J. 1983. **Species concepts and speciation analysis.** Current Ornithology. 1: 159-187.
- Couzijn, H.W.C. 1976. **Functional anatomy of the walking-legs of Scorpionida with remarks on terminology and homologization of leg segments.** Netherlands Journal of Zoology 26:453–501.
- Dujardin, J. P. 2008. **Morphometrics applied to medical entomology.** Infection, Genetics and Evolution. 8: 875-890.

- Dujardin, J. P., D. Kaba, P. Solano, M. Dupraz, K. D. McCoy y N. Jaramillo-O. 2014. **Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies**. *Infection, Genetics and Evolution* 28: 704-714.
- Dujardin, J. P. 2017. **Modern Morphometrics of Medically Important Arthropods**. 285-311 pp. *In: Tibayrenc M. (Ed.) Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)*. London. Elsevier. 285-311 pp.
- Duncan, R. P., M. R. Rynerson, C. Ribera y G. J. Binford. 2010. **Diversity of *Loxosceles* spiders in Northwestern Africa and molecular support for cryptic species in the *Loxosceles rufescens* lineage**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55:234-248.
- Esposito L. A., H. Y. Yamaguti, R. Pinto-Da-Rocha y L. Prendini. 2018. **Plucking with the plectrum: phylogeny of the New World buthid scorpion subfamily Centruroidinae Kraus, 1995 (Scorpiones: Buthidae) reveals evolution of three pecten-sternite stridulation organs**. *Arthropod systematics & phylogeny*. 76(1): 87-122.
- Fet, V. y G. Lowe. 2000. **Family Buthidae C. L. Koch, 1837**. Pp. 54-286, In **Catalog of the scorpions of the world (1758-1998)**. V. Fet, W. D. Sissom, G. Lowe & M. E. Braunwalder (eds.). The New York Entomological Society, New York.
- Fet, V., W.D. Sissom, G. Lowe y M. Braunwalder. 2000. **Catalog of the scorpions of the world (1758-1998)**. The New York Entomological Society. 690 pp.
- Fet, V., B. Gatenbein, A. V. Gromov, G. Lowe y W. R. Lourenço. 2003. **The first molecular phylogeny of Buthidae (Scorpiones)**. *Euscorpius*. 4: 1-10.
- Fet, V. y M. E. Söglad. 2005. **Contributions to scorpion systematics. I. On recent changes in high-level taxonomy**. *Euscorpius*. 31:1-13.

- FitzSimmons, N. 1997. **Male Marine Turtles. Gene Flow. Philopatry and Mating Systems of the Green Turtle *Chelonia mydas***. Tesis Doctoral. Universidad de Queensland, Australia. 241 p.
- Francke, O. F. 1977. **Scorpions of the Genus *Diplocentrus* from Oaxaca, Mexico (Scorpionida, Diplocentridae)**. The Journal of Arachnology. 4 :145-200.
- Francke, O. F. 2014. **Biodiversidad de Arthropoda (Chelicerata: Arachnida ex Acari) en México**. Revista Mexicana de Biodiversidad. 85: 408-418
- Francke, O. F., R. Teruel y C. E. Santibáñez-López. 2014. **A new genus and a new species of scorpion (Scorpiones: Buthidae) from southeastern Mexico**. The journal of Arachnology. 42: 220-232.
- García, Z. 2008. **¿Es o son? Morfometría Geométrica de dos especies de avispas sociales (Hymenoptera, Vespidae)**. Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle 9 (1): 11-16.
- Gatenbein, B., V. Fet y M. D. Barker. 2001. **Mitochondrial DNA reveals a deep, divergent phylogeny in *Centruroides exilicauda* (Wood, 1863) (Scorpiones: Buthidae)**. In: Fet V, Selden P.A, (eds.). Scorpions 2001: Memoriam Gary A. Polis. The British Arachnological Society; Burnham Beeches, Bucks: 2001. pp. 235–244.
- Gatenbein, B., V. Fet. y A. Gromov. 2003. **The First DNA Phylogeny of four species of *Mesobuthus* (Scorpiones, Buthidae) from Eurasia**. The Journal of Arachnology. 31:412-420.
- González-Santillán, E. 2001. **Catálogo de escorpiones de la Colección Nacional de Arácnidos (CNAN)**. Tesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 148 p.
- González, S. 2004. **Diversidad, taxonomía y hábitat de alacranes**. In: García A. N., Ayala R. (Eds.) **Artrópodos de Chamela**. Instituto de Biología UNAM. México, DF. 25-35 pp.

- Guzmán, P. V. M y J. Ponce S. 2014. **Actividad superficial de *Centruroides ornatus* Pocock, 1902 (Scorpiones: Buthidae) en época de lluvias en la cuenca de Cuitzeo.** Entomología Mexicana 1:49-52.
- Hjelle, J.T. 1990. **Anatomy and morphology.** In: Polis, G.A. (Ed.) **The Biology of Scorpions.** Stanford University Press, Stanford, CA. 9-63 pp.
- Hoffmann, C. C. 1932. **Monografías para la entomología médica de México. Monografía Num. 2, Los escorpiones de México. Segunda parte: Buthidae.** Anales del Instituto de Biología Universidad Autónoma de México 3(3): 243- 282; (4) 283 – 361.
- Jacob, A., B. Gantenbein, M. E. Braunwalder, W. Nentwig y C. Kropf. 2004. **Complex male genitalia (hemispermatofores) are not diagnostic for cryptic species in the genus *Euscorpius* (Scorpiones: Euscorpiidae).** Organisms, Diversity and Evolution. 4:59-72
- Kambestad, M., L. R. Kirkendall, I. L. Knutsen y B. H. Jordal. 2017. **Cryptic and pseudo-cryptic diversity in the world's most common bark beetle-*Hypothenemus eruditus*.** Organisms Diversity and Evolution. 17:633-652.
- Knowlton, N. 1993. **Sibling species in the sea.** Annual Reviews of Ecology and Systematics 24:189–216.
- Lorenz, C., F. Almeida, F. Almeida-Lopez, C. Louise, S. N. Pereira, V. Petersen, P. O. Vidal, F. Virginio, L. Suesdek. 2017. **Geometric morphometrics in mosquitoes: What has been measured?** Infection, Genetics and Evolution. 54:205-215.
- Lourenço, W. R. y W. D. Sissom. 2000. **Scorpiones.** In: Llorente, J., E. González & N. Papavero (eds.), **Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento, Vol. II,** UNAM, Mexico, D.F., pp. 115-135.
- Lucentini, L., M. Reborá, M. E. Puletti, L. Gigliarelli, D. Fontaneto, E. Gaino y F. Panara. 2011. **Geographical and seasonal evidence of cryptic**

- diversity in the *Baetis rhodani* complex (Ephemeroptera, Baetidae) revealed by means of DNA taxonomy. *Hydrobiologia*. 673:215-228.
- Lukhtanov, V. A. y N. A. Shapoval. 2008. **Detection of Cryptic Species in Sympatry Using Population Analysis of Unlinked Genetic Markers: A Study of the *Agrodiaetus kendevari* Species Complex (Lepidoptera: Lycaenidae)**. *Biological Sciences*. 423:432-436.
- Martín-Frías, E. y L. F. de Armas. 2003. **Presencia del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) en el Estado de Querétaro, México**. *Revista Ibérica de Aracnología*. 7:247-249.
- Martín-Frías, E., L. F. de Armas y J. Paniagua-Solís. 2005. **Redescription of the Mexican scorpion *Centruroides hoffmanni* Armas, 1996 (Scorpiones: Buthidae)**. *Euscorpius*. 22: 1-7.
- Martín-Frías, E., L. F. de Armas, y L. Olguín. 2010. **Nuevos datos taxonómicos sobre *Centruroides limpidus* (Karsch, 1879) (Scorpiones: Buthidae) del estado de Veracruz, México**. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*. 46:188.
- Miller, A. L., R. A. Makowsky, D. R. Formanowicz, L. Prendini y C. L. Cox. 2014. **Cryptic genetic diversity and complex phylogeography of the boreal North American scorpion, *Paruroctonus boreus* (Vaejovidae)**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 71: 298-307
- Miranda-López, E. P. 2012. **Análisis sistemático del complejo “*Pusillus*” (Scorpiones: Vaejovidae) en México**. Tesis de maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 154 pp.
- Monroy, V. J. y J. M. Monroy N. 1960 - 1961. **Alacranes Venenosos de México**. Reimpreso de los trabajos publicados por la Revista Mexicana de Ciencias Médicas y Biológicas. 2ª. Época. Núms. 1,3, 4, 5 y 6: 1-27
- Muster, C., T. Schmarda y T. Blick. 2004. **Vicariance in a Cryptic Species Pair of European Pseudoscorpions (Arachnida, Pseudoscorpiones, Chthoniidae)**. *Zoologischer Anzeiger*. 242:299-311.

- Nettel-Hernanz, A., L. Jean-Paul, D. Fresneau, R. A. López-Muñoz y C. Poteaux. 2015. **Biogeography, cryptic diversity, and queen dimorphism evolution of the Neotropical ant genus *Ectatomma* Smith, 1958 (Formicidae, Ectatomminae)**. *Organisms Diversity and Evolution*. 15:543-553.
- Núñez-Farfán, J., S. A. Careaga, J. Forfoni, L. Ruiz-Montoya y P. L. Valverde. 2003. **La evolución de la plasticidad fenotípica**. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 6(1): 16-24.
- Pavan, M. G., G. B. S. Rivas, F. B. S. Dias y R. Gurgel-Gonçalves. 2015. **Looks Can be Deceiving: Cryptic Species and Phenotypic Variation in *Rhodnius* spp., Chagas Disease Vectors**. In: Pontarotti P. (eds) **Evolutionary Biology: Biodiversification from Genotype to Phenotype**. Springer, Cham. 345-372 p.
- Peters. 1861. **Ueber eine neue Eintheilung der Skorpione**. *Monatsbericht d. königl. Akad. D. Wissensch. Zu Berlin. Annals and Magazine of Natural History*. 4(17):507-516.
- Peña, C. 2011. **Métodos de inferencia filogenética**. *Revista Peruana de biología*. 18(2): 265-267.
- Pocock, R. I. 1902. **A contribution to the Systematics of Scorpions**. *The annals and magazine of Natural History*. 10: 364-380.
- Polis, G.A. 1990. **The Biology of Scorpions**. Stanford University Press. Stanford, California. 587 p.
- Ponce-Saavedra, J. y C. R. Beutelspacher B. 2001. **Alacranes de Michoacán**. Ediciones Michoacanas/Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. 112 p.
- Ponce, S. J. 2003. **Ecología y distribución del género *Centruroides* Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en la depresión del Balsas, Michoacán, México**. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, Qro. 254 pp.

- Ponce, S. J. y O. Francke. 2004. **Una nueva especie de alacrán del género *Centruroides* Marx (1890) (Scorpiones: Buthidae) de la Depresión del Balsas, México.** Acta Zoológica Mexicana. 20(2): 221-232.
- Ponce-Saavedra y Moreno-Barajas. 2005. **El género *Centruroides* Marx 1890 (Scorpiones: Buthidae) en México.** Biológicas (7): 42-51.
- Ponce, S. J., O. Francke B. y H. Suzán A. 2006. **Actividad superficial y utilización del hábitat por *Centruroides balsasensis* Ponce y Francke (Scorpiones: Buthidae).** Biológicas. 8:130-137.
- Ponce-Saavedra, J., O. Francke, H. Cano-Camacho, y E. Hernández-Calderón 2009. **Evidencias morfológicas que validan como especie a *Centruroides tecomanus* (Scorpiones, Buthidae).** Revista Mexicana de Biodiversidad. 80(1): 71-84.
- Ponce, S. J. y O. Francke B. 2013. **Actualización taxonómica sobre alacranes del Centro Occidente de México.** Dugesiana 20(2): 73-79
- Ponce-Saavedra, J., A. F. Quijano-Ravell, R. Teruel y O. F. Francke. 2015a. **Redescription of *Centruroides ornatus* Pocock, 1902 (Scorpiones: Buthidae), a montane scorpion from Central Mexico.** Revista Ibérica de Aracnología 27: 81-89
- Ponce-Saavedra, J., I. Martínez-Rodríguez y A. F. Quijano-Ravell. 2015b. **Alacranes de importancia médica en la Depresión del Balsas.** Entomología Mexicana 2: 66-70.
- Ponce-Saavedra, J., O. F. Francke B., A. F. Quijano-Ravell y R. Cortés S. 2016. **Alacranes (Arachnida: Scorpiones) de importancia para la salud pública en México.** Folia Entomológica Mexicana. (2)3: 45-70.
- Ponce-Saavedra J. y O. F. Francke. 2019. **Una especie nueva de alacrán del género *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) del noroeste de México.** Revista Mexicana de Biodiversidad. 90: 1-16.

- Prendini, L. 2000. **A new species of Parabuthus Pocock (Scorpiones: Buthidae), and new records of Parabuthus capensis (Ehrenberg), from Namibia and South Africa.** Cimbebasia 16:31-45.
- Prendini, L. 2001. **Phylogeny of Parabuthus (Scorpiones, Buthidae).** Zoologica Scripta 30: 13–35.
- Prendini, L. 2003. **Discovery of the male of Parabuthus muelleri, and implications for the phylogeny of Parabuthus (Scorpiones: Buthidae).** American Museum Novitates 3408:1–24.
- Prendini, L. 2004. **The systematics of Southern African *Parabuthus* Pocock (Scorpiones, Buthidae): Revisions to the taxonomy and key to the species.** Journal of Arachnology. 32(1): 109-187.
- Prendini, L. y W. C. Wheeler. 2005. **Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing.** Cladistics 21: 446- 494.
- Quijano-Ravell, A. F. y Ponce J. 2014. **Actualización taxonómica y distribución de los alacranes del Estado de Michoacán.** Biológicas 16(2): 17-22.
- Quijano-Ravell, A. F. 2015. **Identidad taxonómica y estudio bionómico de *Centruroides ornatus* Pocock 1902 (Scorpiones: Buthidae) en México.** Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán. 191 pp.
- Quijano-Ravell, A. F. y Ponce-Saavedra, J. 2016. **A new species of scorpion of the genus *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from the state of Michoacán, México.** Revista Mexicana de Biodiversidad. 87:49-61.
- Quijano-Ravell, A. F., L. F. de Armas, O. F. Francke, J. Ponce-Saavedra. 2019. **A new species of the genus *Centruroides* Marx (Scorpiones, Buthidae) from western Michoacán State, México using molecular and morphological evidence.** Zookeys. 859:31-48.

- Rein, J.O. (Ed). **Scorpion Files**. <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>. Último acceso: 26 de Septiembre de 2019.
- Saitou N. y M. Nei. 1987. **The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Santibáñez-López, C. E. y J. Ponce-Saavedra. 2009. **A new species of *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) from the northern mountain range of Oaxaca, México**. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 80:321-331.
- Santibáñez-López, C. E., O. Francke y M. Córdova-Athanasiadis. 2011. **The genus *Diplocentrus* Peters (Scorpiones: Diplocentridae) in Morelos, México**. *Revista Ibérica de Aracnología*. 19: 3-13.
- Santibáñez-López, C. E., O. Francke, C. Ureta y L. D. Possani. 2016. **Scorpions from Mexico: From Species Diversity to Venom Complexity**. *Toxins*. 8(2): 18.
- Sharma, P.P., R. Fernández, L. Esposito, E. González-Santillán y L. Monod. 2015. **Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological phylogenetic signal**. *Proceedings of the Royal Society of London*. 282.
- Simon C., F. Frati, A. Beckembach, B. Crespi, H. Liu y P. Flook. 1994. **Evolution weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and compilation of conserved polymerase chain reaction primers**. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87: 651-701.
- Sissom, W. D. 1990. **Systematics, biogeography and paleontology**. In: Polis, G. A. (Ed.), *The Biology of Scorpions*. Stanford University Press, Stanford, C.A. pp. 64-160.
- Soleglad, M. E., V. Fet y F. Kovařík. 2005. **The systematic position of the scorpion genera *Heteroscorpion* Birula, 1903 and *Urodacus* Peters, 1861 (Scorpiones: Scorpionoidea)**. *Euscorpius*. 20:1-38.
- Stahnke, H. L. 1970. **Scorpion nomenclature and mensuration**. *Entomological news*. 81:297-316.

- Stahnke, H. L. y M. Calos. 1977. **A key to the species of the Genus *Centruroides* Marx (Scorpionida: Buthidae).** Entomological News. 88: 111-120.
- Stahnke, H. L. 1978. **The genus *Centruroides* (Buthidae) and its venom.** In: Bettini S. (Ed.). **Arthropod Venoms.** Springer Berlin Heidelberg. Germany. 277-307 pp.
- Stockwell, S. A. 1989. **Revision of the phylogeny and higher classification of scorpions (Chelicerata).** Tesis Doctoral. University of California, Berkeley. 413 pp.
- Tamura, K. Stecher, G., Peterson D., Filipowski, A. y Kumar, S. 2013. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.** Molecular Biology and Evolution. 30, 12(1): 2725–2729.
- Talal, S., I. Tesler, J. Sivan, R. Ben-Shlomo, H. Muhammad T., L. Prendini, S. Snir y E. Gefen. 2015. **Scorpion speciation in the Holy Land: Multilocus phylogeography corroborates diagnostic differences in morphology and burrowing behavior among Scorpion subspecies and justifies recognition as phylogenetic, ecological and biological species.** Molecular Phylogenetics and Evolution 91:226-237.
- Teruel, R. 2000. **Taxonomía del complejo *Centruroides anchorellus* Armas, 1976 (Scorpiones: Buthidae).** Revista Ibérica de Aracnología. 1:3-12.
- Teruel, R., V. Fet y M. R. Graham. 2006. **The first mitochondrial DNA Phylogeny of Cuban Buthidae (Scorpiones: Buthoidea).** Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa. 39: 219-226.
- Teruel, R., J. Ponce-Saavedra y A. F. Quijano Ravell. 2015. **Redescription of *Centruroides noxius* and description of a closely related new species from western Mexico (Scorpiones: Buthidae).** Revista Mexicana de la Biodiversidad. 86: 896-911.
- Teruel, R. y B. Myers. 2017. **A new Island species of *Centruroides* Marx, 1890 (Scorpiones: Buthidae) from the southwestern Caribbean.** Euscorpius. 252:1-14.
- Thorell, T. 1876. **On the classification of Scorpions.** – The Annals of Magazine of Natural History. 97:1-15.
- Towler, W. I., J. Ponce S., B. Gatenbein y V. Fet. 2001. **Mitochondrial DNA reveals a divergent phylogeny in tropical *Centruroides* (Scorpiones: Buthidae) From Mexico.** Biogeographica. 77(4): 157-172.

- Tsunemi, Y, D. Rhoads y J. Pummill. 2017. **The complete mitochondrial genome of the scorpion *Centruroides vittatus* (Arachnida: Scorpiones)**, Mitochondrial DNA Part B. 2(2): 841-842.
- Wagner, G. P. 1989. **The Biological homology concepts**. Annual Review of Ecology and Systematics. 20:51-69.
- Williams, S. C. 1980. **Scorpions of Baja California, México, and adjacent islands**. Occ. Pap. Calif. Acad. Sci. 135:1-1
- Xiong, B. y T. D. Kocher. 1991. **Comparison of mitochondrial DNA sequences of seven morphospecies of black flies (Diptera: Simuliidae)**. Genome 34: 306-311.
- Yamashita, T., Rhoads, D., y Pummill, J. (2017). **The complete mitochondrial genome of the scorpion *Centruroides vittatus* (Arachnida: Scorpiones)**. Mitochondrial DNA. Part B, Resources, 2(2), 841–842.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN para Escorpiones

Modificado de FitzSimmons (1997).

Este protocolo ha sido probado con ejemplares previamente fijados en Alcohol absoluto y conservados en refrigeración, teniendo mejor resultado en ejemplares de colectas recientes (menos de un año). No ha sido efectivo con ejemplares fijados en alcohol a otras concentraciones. Las piezas a utilizar son fémur, patela, mano, coxas, patas o estructuras del ejemplar que contengan una mayor cantidad de tejido en su interior y que no interfieran en la ingestión o digestión de las presas. Utilizar partes de exoesqueleto deberá evitarse debido a que son estructuras muy rígidas, por lo que se recomienda un corte transversal de la pieza con un bisturí esterilizado y con ayuda de pinzas entomológicas realizar un raspado del tejido en el interior de la pieza, el cual podrá ser degradado más fácilmente por la enzima proteinasa K. Se utiliza un aproximado de 1 gramo de tejido, el equivalente al tejido muscular que contiene una patela.

Estas fibras musculares se colocan en un vial de 1.5 ml con 300 μ l de solución de extracción* y 5 μ l de proteinasa K (solución 10 mg/ml). El tiempo de incubación es de 1 a 2 horas, a temperatura de 60°C.

Las proteínas de la muestra se precipitan añadiendo 150 μ l de Acetato de Amonio 7.5 M y refrigerando a -70°C por 40 a 45 minutos para obtener una precipitación adecuada debido a la consistencia del tejido muscular. Centrifugar a 13,000 rpm por 20 minutos a 4°C.

El sobrenadante se transfiere a un vial limpio, al que se agrega 1 ml de Etanol frío en concentración 95%, la muestra se refrigera a -70°C por 30 minutos para precipitar el ADN, esta precipitación puede dejarse toda la noche. Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

El Etanol en el sobrenadante se elimina por inversión del vial, manteniendo intacta la pastilla en el fondo. Adicionar 600 μ l de Etanol frío a concentración 70%, centrifugar a 13,000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Se elimina el sobrenadante de Etanol, cuidando no perder la pastilla y se deja secar a temperatura ambiente. La pastilla con el ADN se resuspende en 30 μ l de agua bidestilada desionizada.

8 μ l de la muestra se corren en geles de agarosa al 1.4% teñidos con bromuro de Etidio, visualizados con transiluminador UV.

*Solución de Extracción: 10 mM Tris; 1 mM EDTA; 10 mM Na Cl y 0.1% SDS.