
DIVERGENCIA MORFOMÉTRICA ENTRE *Bothrops atrox* Y *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE)

MORPHOMETRIC DIVERGENCE BETWEEN *Bothrops atrox* AND *Bothrops asper* (SERPENTES: VIPERIDAE)

María A. Hoyos¹, Rafael Otero², Mónica Saldarriaga² y Nicolás Jaramillo³

Resumen

Se emplearon análisis morfométricos tradicionales para cuantificar las diferencias en la variación morfológica entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper*, cuya posición taxonómica es controversial. Para ello se examinaron doce hembras y dieciséis machos *B. atrox* y diecinueve hembras y once machos *B. asper*. Se seleccionó un conjunto de cinco distancias entre puntos anatómicos para utilizarlas en análisis de componentes principales multigrupo (ACPmg). El primer componente principal (CPmg-1) dio cuenta de la mayor porción de la variación en el nivel intragrupo y fue tomado como un estimador de tamaño. La proyección ortogonal de los individuos sobre el CPmg-1 rindió unos residuos que se consideraron representantes de la conformación biológica libre de tamaño, ya que por construcción matemática ellos son libres de alometría intragrupo. Tales residuos se emplearon en análisis discriminantes, utilizando la primera variable canónica resultante para representar la conformación libre del tamaño. Además, los análisis discriminantes permitieron evaluar la capacidad de reclasificar correctamente los individuos en sus grupos. En ambos sexos los resultados revelaron diferencias significativas de tamaño y conformación libre de tamaño entre *B. atrox* y *B. asper*. A causa de la técnica utilizada (ACPmg) se pudo asignar al componente genético de la varianza fenotípica total una porción alta de las diferencias morfométricas, lo que sugiere un nivel importante de divergencia genética entre ambas entidades biológicas. Sin embargo, la separación morfométrica no fue total, existiendo un nivel bajo pero significativo de individuos que no se pudieron asignar correctamente a sus respectivas taxa. Para llegar a conclusiones más definidas con relación a la posición taxonómica se requieren estudios con más poblaciones, utilizando herramientas analíticas adicionales como las de la morfometría geométrica.

Palabras clave: morfometría multivariada, análisis de componentes principales multigrupo, *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, alometría, tamaño, conformación libre de tamaño.

Abstract

In order to analyze the divergence resulting from genetic variation, traditional morphometrics was used to quantify the differences in morphological variation between *Bothrops atrox* and *Bothrops asper*, which are poorly defined and controversial taxa. Five distances among homologous anatomical points from head and body were measured on twelve females and sixteen males of *B. atrox*, and nineteen females and eleven males of *B. asper*. Morphometric variation was partitioned by multiple group principal components analysis (mgPCA). Most of the variation was within taxa, and it was accounted by the first principal component (mgPC-1), which was taken as representing the growth. Orthogonal projection of individuals onto mgPC-1 yielded residuals which were interpreted as representing size-free variation, since by construction they are free of allometry within group. Those residuals were used for discriminant analysis, taken the first canonical factor, derived from it, like the best size-free variation estimate. Moreover, discriminant analyses were used to evaluate the capacity of morphometrics to reclassify the individuals in their groups.

The analyses showed significant differences of size and size-free variation between *B. atrox* and *B. asper*, in both sexes. Because the mgPCA allowed to analyze the allometry-free variation, we could assign to the genetic variance a significant part of the total phenotypic variance. This suggests an important level of genetic divergence among both biological entities. However, the discrimination between *B. asper* and *B. atrox* was not total. A low but significant level of individuals could not be assigned to either taxon. More insight into taxonomic status of both groups can be gained by using additional analytic tools like those of the geometric morphometrics.

Recibido: marzo de 2003; aprobado para publicación: junio de 2003.

¹ Grupo de Morfometría Biológica, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: njaram@matematicas.udea.edu.co.

² Grupo de Ofidismo/Escorpionismo, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. E-mail: rotero@epm.net.co.

³ Profesor, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: njaram@matematicas.udea.edu.co.

Key words: multivariate morphometrics, multiple group principal components analysis, *Bothrops atrox*, *Bothrops asper*, allometry, size, size-free variation.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la subfamilia Crotalinae se encuentra el género *Bothrops* (Brattstrom, 1964), que incluye aproximadamente 60 especies, localizadas principalmente en las regiones tropicales de Latinoamérica (Salomão *et al.*, 1997; Werman, 1992). Las especies responsables de la mayoría de los envenenamientos en humanos son *B. asper* en Centroamérica y *B. asper*, *B. atrox* y *B. jararaca* en Sudamérica. En Colombia, por ejemplo, *B. atrox* y *B. asper* están implicadas en 50 a 70% de los accidentes ofídicos, respectivamente (Bolaños, 1984; García, 1998; Otero *et al.*, 1992; Silva, 1989).

B. atrox y especies afines constituyen un complejo y controversial grupo taxonómico (Wüster *et al.*, 1996). *B. atrox* y *B. asper* son muy similares morfológicamente y son simpátricas en la Orinoquia colombiana (Campbell y Lamar, 1989). Varios trabajos de taxonomía tradicional, comparaciones del veneno y cladística, empleando isoenzimas, morfología externa y anatomía craneal, no han sido suficientes para permitir obtener una diferenciación consistente entre las dos especies (Brattstrom, 1964; Burger, 1971; Peters y Orejas-Miranda, 1970; Pérez-Santos y Moreno, 1988; Campbell y Lamar, 1989; Werman, 1992; Saldarriaga *et al.*, 2000).

Utilizando técnicas morfométricas de análisis de componentes principales (ACP) se evaluó el patrón de variación geográfica de poblaciones brasileras de *B. moojeni*, *B. marajoensis*, *B. isabellae*, *B. leucurus*, *B. pradoi* y *B. atrox*, hallándose un nivel bajo de diferenciación fenotípica entre las especies, aparentemente relacionado con diferencias ecológicas (Wüster *et al.*, 1996, 1997 y 1999). En estos trabajos no fue posible separar la variación morfométrica causada por diferencias fisiológicas de aquella debida a diferencias evolutivas. Modificaciones del ACP, tales como el análisis de componentes principales multigrupo (ACPMg), eliminan la variación individual intragrupo y per-

miten examinar las diferencias de tamaño y las de conformación libre de tamaño entre los grupos, estas últimas resultantes probablemente de efectos genéticos (Dujardin, 2001). En este trabajo se comparan por primera vez los fenotipos de *B. atrox* y *B. asper*, utilizando análisis ACPmg para determinar la magnitud de las diferencias fenotípicas que resultan de la divergencia filogenética entre las especies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se examinaron 58 individuos adultos, de cuatro y cinco años de edad, discriminados en doce hembras y dieciséis machos *B. atrox* nacidos y crecidos en el laboratorio, descendientes de una hembra proveniente del departamento de Meta, y diecinueve hembras y once machos *B. asper*, de los cuales seis nacieron en cautiverio, mientras que los demás fueron capturados en el estadio adulto en diferentes localidades del departamento de Antioquia y por ello probablemente eran descendientes de diferentes madres. Las serpientes se mantuvieron individualizadas en cajas de madera, bajo condiciones ambientales homogéneas en el serpentario de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Se midieron dieciséis distancias entre caracteres de la cabeza, seleccionados por su fácil ubicación y presencia en todos los individuos, además de la longitud total (distancia desde la inserción de la escama rostral hasta la cloaca). Los caracteres se midieron en milímetros utilizando un calibre digital marca Fowler Sylvac modelo ultra-cal Mark III, sobre las serpientes anestesiadas con Ketamina en dosis de 60 mg/kg, vía intracelómica, 30 minutos antes de iniciar las mediciones (tabla 1). La toma de distancias se repitió dos veces para poder cuantificar la precisión de la medición. Adicionalmente se realizaron conteos de escamas y descripciones de los patrones de coloración presentes en cada grupo

para su identificación taxonómica mediante las claves de Peters y Orejas-Miranda (1970), Hoge y Romano-Hoge (1980), Pérez-Santos y Moreno (1988) y Campbell y Lamar (1989). La identificación taxonómica convencional permitió validar las diferencias morfométricas observadas en este trabajo, aunque el propósito no fue posibilitar la clasificación de los individuos en su especie sino emplear la morfometría multivariada para cuantificar la magnitud de la divergencia presente entre ambas entidades.

Se estimó la precisión y exactitud de las mediciones siguiendo los criterios de Sokal y Rohlf (1995). Considerando que el número de individuos por grupo debe ser al menos el doble del número de caracteres medidos (Bookstein, 1996), y que el grupo más pequeño que se estudió fue de once machos de *B. asper*, se buscó una combinación de cinco variables para las cuales los dos grupos de serpientes mostraran homogeneidad de varianzas (homoscedasticidad) y un eje de crecimiento alométrico común. Para ello, a partir de las siete variables que mostraron mayor precisión y exactitud (DCC, DIC, DAC, DPRS, DARS, DFS, DCR) se construyeron veintiuna

combinaciones de cinco variables, cada una de las cuales se evaluó para las condiciones estadísticas mencionadas. De las veintiuna combinaciones, el conjunto DCC, DAC, DPRS, DF, DCR exhibió homoscedasticidad y presencia de un eje alométrico común entre *B. atrox* y *B. asper*, por lo cual fueron elegidas para los subsecuentes análisis multivariados (tabla 1).

La comparación entre las especies se efectuó para machos y hembras por separado, considerando el dimorfismo sexual de tamaño en ambas especies (Solórzano y Cerdas, 1989; Thorpe, 1989; Wüster *et al.*, 1996, 1997; el presente estudio). Las variables fueron transformadas a logaritmos naturales y se sometieron a análisis de componentes principales multigrupo (ACPmg) y a análisis de componentes principales comunes (ACPC). Los resultados aquí mostrados son los derivados del ACPmg, porque fueron los más resolutivos y estables en términos matemáticos. Al contrario del análisis de componentes principales convencional, que no permite estudiar por separado la variación causada por efectos ontogénicos intragrupo de aquella causada por efectos filogenéticos intergrupos (tamaño y conformación libre de tamaño)

Tabla 1. Distancias medidas entre varios rasgos de cabezas y cuerpos de *Bothrops atrox* y *B. asper*

1	Distancia desde la inserción de la escama rostral hasta la cloaca (DCC)
2	Distancia entre la inserción de los colmillos (DIC)
3	Distancia entre canto externo de los ojos (DEO)
4	Distancia entre canto interno de los ojos (DIO)
5	Distancia entre borde posterior de narinas (DPN)
6	Distancia entre borde anterior de narinas (DAN)
7	Distancia externa entre los bordes más extremos posteriores de las escamas supraoculares (DES)
8	Distancia entre borde anterior de fosetas (DAF)
9	Distancia entre los bordes más agudos de los huesos cuadrados (DAC)*
10	Promedio entre las distancias derecha e izquierda desde el borde posterior de foseta y extremo posterior de la escama supraocular (DFS)*
11	Promedio entre las distancias derecha e izquierda desde el borde más agudo del hueso cuadrado a la inserción de la escama rostral (DCR)*
12	Promedio entre las distancias derecha e izquierda desde el extremo posterior de la escama supraocular a la inserción de la escama rostral (DPSR)*
13	Promedio entre las distancias derecha e izquierda desde el extremo anterior de la escama supraocular a la inserción de la escama rostral (DASR)

* Caracteres seleccionados para los análisis multivariados.

(Jaramillo y Dujardin, 2002), el ACPmg y el ACPc permiten examinar por separado estos dos componentes de la varianza total.

Para el ACPmg se calculó primero la matriz de varianza-covarianza de cada grupo y luego una matriz consenso entre las matrices individuales, de la cual se extrajeron los componentes principales. Se supone que el primer componente principal (CPmg-1) es un estimador del tamaño individual, es decir, de la dirección de crecimiento alométrico (Thorpe, 1988). Los estimadores de conformación libre de tamaño (componentes libres de alometría) se obtuvieron proyectando los individuos sobre un subespacio que es ortogonal al eje de crecimiento, CPmg-1 (Burnaby, 1966). Los primeros cuatro componentes de conformación libre de tamaño fueron utilizados en un análisis discriminante, generando variables canónicas. La primera variable canónica (VC-1) se consideró como el mejor estimador de las diferencias en la conformación libre de tamaño. Este análisis elimina la variación intragrupo, resaltando la variación intergrupos.

Mediante la prueba de Shapiro-Wilk se confirmó que los estimadores de tamaño (CPmg-1) y conformación libre de tamaño (VC-1) exhibieron una distribución cercana a la normal ($P > 0.1$) en hembras y machos en ambas especies. Mediante la prueba de Levene se confirmó que VC-1 exhibió homogeneidad de varianzas entre *B. atrox* y *B. asper* ($P > 0.1$) en ambos sexos. Una vez se verificaron los supuestos requeridos por las pruebas estadísticas paramétricas, se evaluaron las posibles diferencias de tamaño entre *B. atrox* y *B. asper* mediante un Welch-anova (Sokal y Rohlf, 1995) y las diferencias de conformación libre de tamaño mediante un anova convencional. Las distancias de Mahalanobis derivadas de los análisis discriminantes se utilizaron para reasignar los individuos en su grupo, midiendo qué tan lejos estaba cada individuo de la media multivariada del grupo (Manly, 1991). El estadístico Kappa midió el grado de concordancia en la reclasificación, con valores de Kappa entre 0.6 y 0.8 que indican un nivel de reclasificación considerable (Landis y Koch, 1977).

Las alometrías fueron examinadas indirectamente mediante un análisis de regresión lineal del estimador de conformación libre de tamaño, VC-1, sobre el estimador de tamaño, CPmg-1. El ACPmg elimina la alometría dentro de cada grupo, resultando en conformación libre de tamaño, lo cual se puede verificar por la ausencia de relación lineal intragrupo entre VC-1 y CPmg-1 (Jaramillo y Dujardin, 2002). Se asume que esta alometría responde a causas principalmente ambientales (Dujardin, 2001). Pero es posible encontrar una relación significativa entre tales estimadores entre grupos, señalando que la variación de conformación puede ser explicada parcialmente por la variación de tamaño intergrupos, lo que indica la presencia de alometría que resulta probablemente de causas evolutivas y no ontogénicas (Dujardin, 2001).

Los datos fueron analizados usando los programas de computador NTSYSpc (Applied Biostatistics Inc., 1998), JMP (SAS Inst., 1999) y Excel (Microsoft, 2000).

RESULTADOS

Análisis del tamaño. Se detectaron diferencias significativas de tamaño entre *B. atrox* y *B. asper*, en hembras y machos. La proyección de los individuos sobre el estimador de tamaño (CPmg-1) mostró que *B. asper* es significativamente más grande que *B. atrox* (prueba Welch-anova; hembras: $F = 5.396$, $P < 0.05$; machos: $F = 11.381$, $P < 0.005$). Sin embargo, la variación de *B. asper* fue mayor, existiendo individuos pequeños que se confundieron con *B. atrox* (figuras 1A, 1B).

Análisis de la conformación libre de tamaño. Se encontraron diferencias significativas entre *B. atrox* y *B. asper* en hembras y machos, utilizando como estimador de conformación libre de tamaño la primera variable canónica (VC-1). Se observó discriminación significativa entre los centroides (media multivariada) de cada grupo de individuos asignados a *B. atrox* y *B. asper* (prueba Welch-anova; hembras: $F = 23.569$, $P < 0.001$; machos: $F = 50.296$, $P < 0.001$) (figuras 2A, 2B).

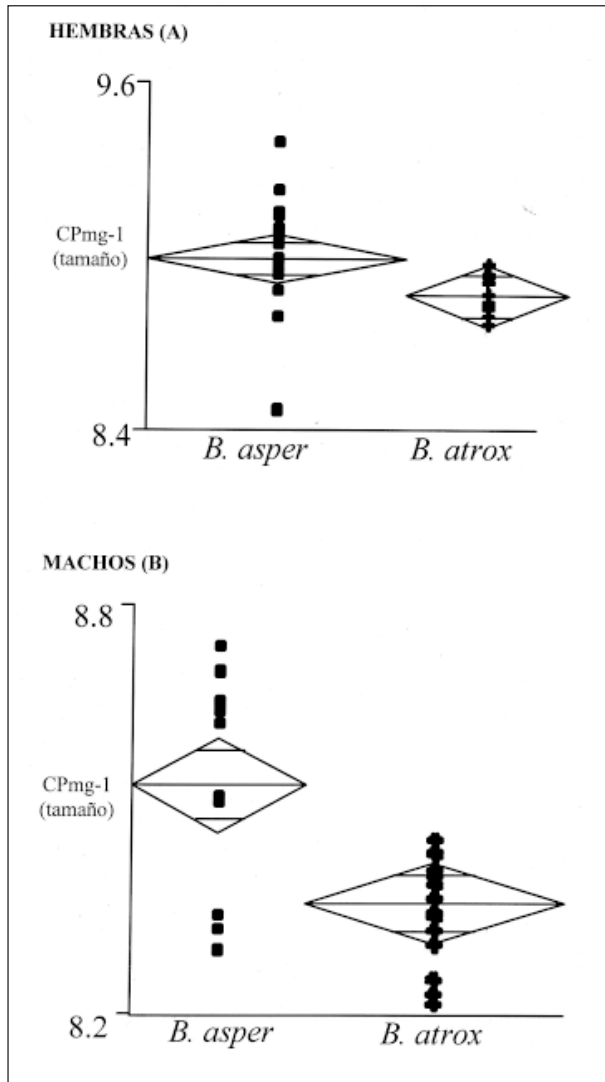


Figura 1. Diferencias de tamaño promedio entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper*, en hembras (A) y machos (B). Se observa la media aritmética como una línea dividiendo los rombos. Los vértices corresponden a los intervalos de confianza del 95% y las barras en la parte superior e inferior de los rombos representan el error estándar de la variación. CPmg-1: primer componente principal multigrupo (estimador del tamaño)

El análisis discriminante permitió reclasificar correctamente 84.21% (16/19) de las hembras asignadas convencionalmente a *B. asier*, y 91.67% (11/12) de la hembras de *B. atrox* (Kappa = 0.74). En los machos, 90.91% (10/11) de los individuos *B. asper* y 87.50% (14/16) de *B. atrox* se reclasificaron correctamente (Kappa = 0.77).

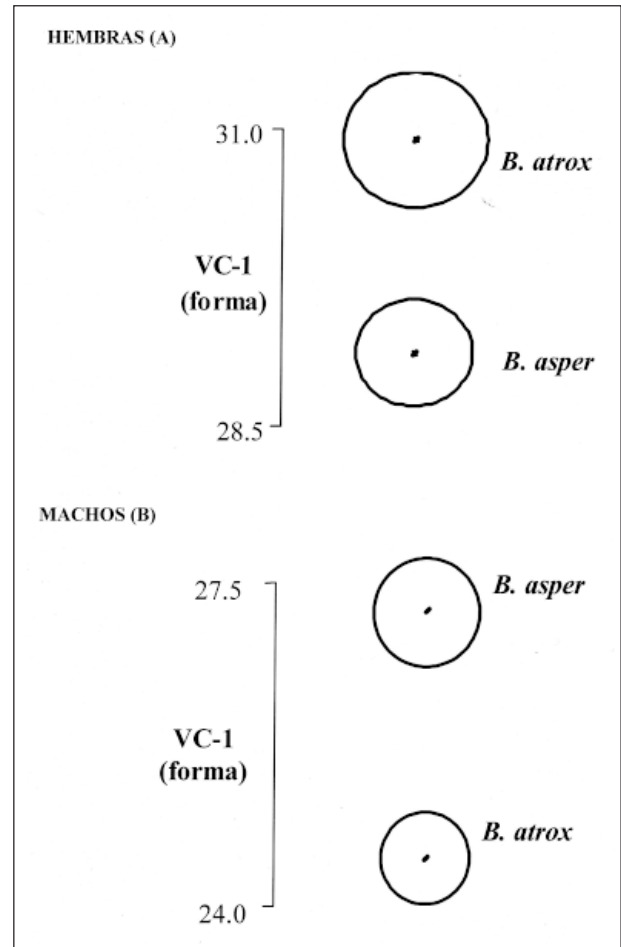


Figura 2. Diferencias de conformación libre de tamaño promedio entre *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* en hembras (A) y machos (B). Alrededor de cada centroide (media multivariada de cada grupo) son localizados con círculos los intervalos de confianza del 95%. VC-1: primera variable canónica (estimador de la conformación libre de tamaño)

Análisis de alometrías. Como se esperaba por la técnica utilizada (ACPmg), las diferencias en la variación de la conformación resultaron libres de la influencia del tamaño a nivel intragrupo en hembras y machos de *B. asper* y *B. atrox*. Pero en hembras de ambas especies la conformación también se encontró libre del efecto del tamaño a nivel intergrupos, lo que se verificó indirectamente mediante un análisis de regresión lineal de VC-1 sobre CPmg-1 ($P > 0.10$) (figura 3A). En los machos se observó lo contrario: a nivel intergrupos hubo una variación de la conformación ex-

plicada parcialmente por los efectos del tamaño ($P < 0.01$) (figura 3B).

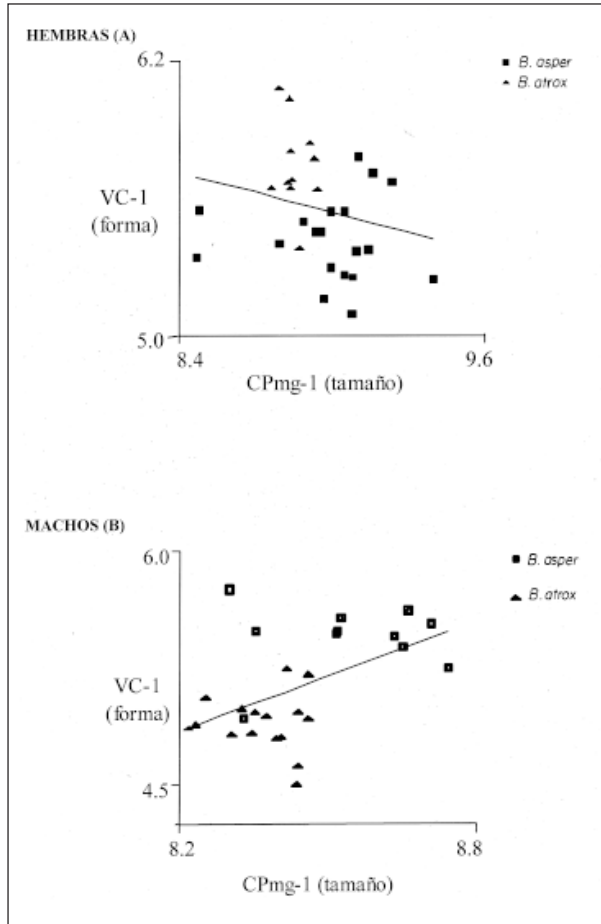


Figura 3. Ordenación de hembras (A) y machos (B) de *Bothrops atrox* y *Bothrops asper* sobre el eje que representa el tamaño (CPmg-1) y el eje que representa la conformación libre de tamaño (VC-1). En ambos sexos, *B. atrox* y *B. asper* se discriminan parcialmente sobre los ejes CPmg-1 y VC-1. En las hembras no existe una relación estadística entre las variables de tamaño y conformación libre de tamaño ($P = 0.2278$; $F = 1.5181$; $R^2 = 0.0497$), indicando que esta última variable es libre de alometría. Por el contrario, en los machos la conformación libre de tamaño intragrupo está relacionada estadísticamente con el tamaño ($P = 0.009$; $F = 8.0133$; $R^2 = 0.2427$), indicando que la variación se explica parcialmente por la alometría intergrupos

DISCUSIÓN

La variación fenotípica de hembras y machos de *B. atrox* y *B. asper*, revelados por los análisis morfométricos multivariados, se pudo descom-

poner en una variación de tamaño y una variación libre de alometría intragrupo, llamada “conformación libre de tamaño”. Tales componentes de la varianza total se pudieron examinar por separado mediante análisis ACPmg.

B. asper y *B. atrox* mostraron tamaños promedio disímiles (figura 1), siendo la primera especie de mayor tamaño promedio que la segunda; resultado que estuvo acorde con lo informado por la literatura. Según Campbell y Lamar (1989), el tamaño promedio adulto de *B. asper* oscila alrededor de 1.200 a 1.800 mm, mayor que el de *B. atrox* que se ubica entre 750 y 1.000 mm. Por tanto, las diferencias de tamaño aquí observadas reflejan una característica genética propia de cada entidad biológica. La influencia de los diferentes ambientes y los efectos maternos experimentados por las serpientes durante su desarrollo también pudieron haber contribuido a las diferencias de tamaño, aunque en menor grado porque no alcanzaron a ocultar las diferencias particulares entre ambas taxa. Sin embargo, a causa de la estructura de la muestra estudiada (todas la *B. atrox* descienden de una sola madre y se desarrollaron en el laboratorio, mientras que las *B. asper*, en su mayoría, se desarrollaron en el campo y probablemente descienden de diferentes madres), no fue posible cuantificar la influencia de la variación no-genética en la variación total de tamaño.

También se manifestaron diferencias significativas de conformación libre de tamaño entre *B. asper* y *B. atrox* (figura 2), lo que sugiere nuevamente la existencia de divergencia genética. La reasignación correcta de los individuos en sus grupos, luego del análisis discriminante, fue considerable (figura 3), demostrando que las diferencias morfométricas entre las dos entidades biológicas son importantes y sugiriendo divergencia genética de cada grupo. Un porcentaje muy pequeño de los individuos no se reclasificaron correctamente, lo cual demuestra la gran variabilidad individual intragrupos y señala quizás su proximidad evolutiva.

La relación de tamaño y conformación libre de tamaño entre individuos de la misma especie y

grupo etario se conoce como alometría estática, mientras que esta relación entre especies se refiere a la alometría evolutiva (Klingenberg, 1996). Al remover mediante el ACPmg la influencia de la variación de crecimiento individual intragrupo, representada por los coeficientes del CPmg-1, se está eliminando en consecuencia la alometría estática. Pero este procedimiento no necesariamente remueve las diferencias de tamaño intergrupos, las cuales probablemente tienen causas microevolutivas (Klingenberg y Zimmermann, 1992; Dujardin, 2001) y dan cuenta de la alometría evolutiva. En los machos se detectó una covariación significativa entre los estimadores de tamaño y de conformación (libre de tamaño a nivel intragrupos) (figura 3B), lo que sugiere que esta última variación intergrupos es explicada por diferencias de tamaño de origen probablemente genético (Jaramillo y Dujardin, 2002). En hembras no se demostró una relación entre estos dos componentes de la variación morfológica indicando en este caso que las diferencias de conformación libre de tamaño son libres de alometría intra e intergrupos.

En resumen, las diferencias significativas de tamaño y conformación libre de tamaño entre *B. atrox* y *B. asper* señalan, con mucha probabilidad, una divergencia genética importante entre estas dos entidades biológicas. Pero, ¿son tales diferencias suficientes para mantener su estatus taxonómico de especies distintas?

Recientes análisis filogenéticos de secuencias del gen mitocondrial Citocromo-b incluyen a *B. atrox* en un grupo monofilético de especies denominado complejo *Bothrops atrox* (Puerto *et al.*, 2001; Salomão *et al.*, 1997; Wüster *et al.*, 1997, 1999 y 2002), que contiene especies nominales como *B. atrox*, *B. colombiensis*, *B. isabellae*, *B. leucurus*, *B. marajoensis*, *B. moojeni*, y *B. pradoi* (Salomão *et al.*, 1999). Sin embargo, los bajos niveles de diferenciación de mtDNA entre las especies, la incongruencia entre la variación morfológica (Wüster *et al.*, 1996) y la del mtDNA, la ausencia de grupos morfológicamente discretos y la asociación entre hábitat y fenotipo llevaron a Wüster *et al.* (1999) a proponer la hipótesis de que el

complejo es en realidad una única especie muy variable y no un grupo de especies muy relacionadas. Las variaciones de tal especie hipotética son atribuidas por Wüster *et al.* (1999) a la probable existencia de una extensiva variación clinal. *B. leucurus* se considera sinónimo de *B. pradoi*, precisamente porque estudios filogeográficos han demostrado que su amplia variabilidad corresponde a una variación clinal (Puerto *et al.*, 2001). Sin embargo, parece que no todas las especies dentro del complejo son sinónimas; tal es el caso de *B. moojeni*, cuya fisiología y ecología son únicas (doctora Maria de Graça Salomão, com. pers). *B. asper* se ha señalado como con-específica con *B. atrox* (Brattstrom, 1964), pero Hoge (1965) las separó basado en diferencias de la coloración del cuerpo y la composición del veneno. Aunque no hay evidencia filogenética que relacione las dos especies, existe la idea de que posiblemente algunas poblaciones de *B. asper* correspondan a una de las variantes clinales de *B. atrox* (doctora Maria de Graça Salomão, com. pers).

Aunque los resultados aquí presentados muestran que *B. atrox* y *B. asper* son entidades morfométricamente diferentes, no es posible apoyar la posición taxonómica de que son especies distintas. La proyección de los individuos sobre las variables que representan el tamaño y la conformación libre de tamaño (PCmg-1 y VC-1, respectivamente), no muestra la existencia de grupos separados, aunque sí un grado de discriminación importante (figura 3). Los resultados señalan una gran variación morfológica, la cual probablemente resultó de la interacción entre los componentes ambientales y genéticos. Sin embargo, a causa de la técnica estadística empleada (ACPmg), donde se obtiene un grupo de variables libres de alometría estática que demostraron estar estructuradas respecto a las dos taxa estudiadas, podemos inferir que la varianza genética probablemente tiene el peso más importante para describir la varianza fenotípica total. Además, el grado de superposición morfométrica encontrado (menor de 16%) sugiere la cercanía evolutiva entre ambos grupos.

La morfometría multivariada tradicional tiene limitaciones técnicas para extraer de las matrices

de distancias la información sobre la conformación biológica (Zelditch *et al.*, 1995). Por el contrario, una nueva metodología conocida como morfometría geométrica revolucionó el estudio de la variación de la conformación (Rohlf y Marcus, 1993). Esta metodología enfatiza en la geometría de las estructuras biológicas y captura la variación en todas las direcciones posibles del espacio de la figura, permitiendo que el cambio de conformación pueda ser visualizado relativo a otras estructuras (Monteiro *et al.*, 2002; Albertson y Kocher, 2001). Por tal razón, es importante considerar esta nueva metodología para explorar en mayor profundidad las relaciones evolutivas entre las diferentes entidades biológicas del complejo *B. atrox*, en particular para estudiar la posi-

bilidad de que *B. atrox* y *B. asper* sean variantes de una clina geográfica, utilizando datos de varias poblaciones de cada especie, particularmente de aquellas provenientes de áreas de simpatria.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Ricardo Callejas (Universidad de Antioquia, Colombia), a la doctora Maria de Graça Salomão (Instituto Butantán, Brasil) y a los evaluadores anónimos por sus comentarios constructivos a este manuscrito. Al personal del Serpentario de la Universidad de Antioquia, en especial a Jorge Asprilla por su cooperación. Este trabajo recibió financiación de la Universidad de Antioquia (U. de A.-CODI), Colombia.

REFERENCIAS

- Applied Biostatistics Inc.** 1998. NTSYSpc version 2.02j. Website: <http://www.ExeterSoftware.com>.
- Albertson RC, Kocher TD.** 2001. Assessing morphological differences in an adaptive trait: a landmark-based morphometric approach. *J Exp Zool* 289:385-403.
- Bolaños R.** 1984. *Serpientes, venenos y ofidismo en Centroamérica*. Editorial Universidad de Costa Rica, San José.
- Bookstein FL.** 1996. Combining the tools of geometric morphometrics. In: Marcus LF, Conti M, Loy A, Naylor GJ, Slice DE (eds.). *Advances in morphometrics*. New York, Plenum Press, pp. 131-152.
- Brattstrom BH.** 1964. Evolution of the pit vipers. *Trans San Diego Soc Nat Hist* 13:185-268.
- Burger WL.** 1971. Genera of pitvipers (Serpentes: Crotalidae). Ph. D. thesis, University of Kansas. Kansas, USA.
- Burnaby TP.** 1966. Growth-invariant discriminant functions and generalized distances. *Biometrics* 22:96-110.
- Campbell JA, Lamar WW.** 1989. *The venomous reptiles of Latin America*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Dujardin JP.** 2001. *Introducción a la morfometría con énfasis en Triatominae y Phlebotominae*. Libro electrónico, ECLAT website: <http://www.eclat.fcien.edu.uy>.
- Futuyma DJ.** 1998. *Evolutionary biology*. 3.^a ed., Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, USA.
- García M.** 1998. Aspectos clínicos y epidemiológicos del accidente ofídico en Antioquia y Chocó. En: Otero R, Ángel R, García M (eds.). *Primer Simposio Colombiano de Toxinología*. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, pp. 109-119.
- Hoge AR.** 1965. Preliminary account on neotropical Crotalinae (Serpentes, Viperidae). *Mem Inst Butantan* 32:109-184.
- Hoge AR, Romano-Hoge SA.** 1980. Poisonous snakes of the New World. Part I. Checklist of the pit vipers Viperioidea, Viperidae, Crotalinae. *Mem Inst Butantan* 42/43:179-310.
- Jaramillo N.** 2000. Partición en tamaño y forma de los caracteres métricos y su interés en los estudios poblacionales aplicados a los Triatominae. Tesis de doctorado, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Jaramillo N, Dujardin JP.** 2002. Análisis morfométrico: significado biológico del tamaño y la conformación. En: Gulh F, Schofield CJ (eds.). *Cuarto Taller Internacional sobre Genética Poblacional y Control de Triatomíneos*. CIMPAT, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, pp. 151-166.
- Klingenberg CP.** 1996. Multivariate allometry. In: Marcus LF, Corti M, Loy A, Naylor GJP, Slice D (eds.). *Advances in morphometrics*. New York, Plenum Publications NATO ASI, pp. 23-49.
- Klingenberg CP, Zimmermann M.** 1992. Static, ontogenetic, and evolutionary allometry: a multivariate comparison in nine species of Water Striders. *Am Nat* 140:601-620.
- Landis JR, Koch GG.** 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174.
- Manly BFJ.** 1991. *Multivariate statistical methods: a primer*. Chapman & Hall, London, UK.
- Microsoft.** 2002. Microsoft Excel 2002. Microsoft Corp. USA.
- Monteiro LR, Diniz-Filho JAF, Dos Reis SF, Araujo ED.** 2002. Geometric estimates of heritability in biological shape. *Evolution* 56:563-572.
- Otero R, Tobón GS, Gómez LF, Osorio R, Valderrama R, Hoyos D, Urreta JE, Molina S, Arboleda JJ.** 1992. Accidente ofídico en Antioquia y Chocó. Aspectos clínicos y epidemiológicos. *Acta Med Col* 17:229-249.
- Pérez-Santos C, Moreno GA.** 1988. *Ofidios de Colombia*. Monografía. Museo Regionale di Scienze Naturali. Torino, Italia.
- Peters JA, Orejas-Miranda B.** 1970. *Catalogue of the Neotropical Squamata*. Part 1. Smithsonian Institution Press. Washington, USA.
- Puerto G, Salomão MG, Theakston RDG, Thorpe RS, Warrell DA, Wüster W.** 2001. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: phylogeography of lanceheaded pitvipers in the Brazilian Atlantic forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *J Evol Biol* 14:527-538.
- Rohlf FJ, Marcus FL.** 1993. A revolution in morphometrics. *Trends Ecol Evol* 8:129-133.

- Saldarriaga M.** 2000. Ontogenetic and geographic variability in the venom of the snake *Bothrops atrox* from Meta and Antioquia, Colombia. Tesis de maestría, Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Salomão MG, Wüster W, Thorpe RS, Touzet J-M, Butantan-British Bothrops Systematics Project.** 1997. DNA evolution of South American pit vipers of the genus *Bothrops*. In: Thorpe RS, Wüster W, Malhotra A (eds.). *Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite*. Symposia of the Zoological Society of London 70, pp. 89-98.
- Salomão MG, Wüster W, Thorpe RS, Butantan-British Bothrops Systematics Project.** 1999. mtDNA phylogeny of Neotropical Pitvipers of *Bothrops* (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia* 8:127-134.
- SAS Institute Inc.** 1999. JMP. Version 3.2.6. SAS Campus Drive, Cary, NC, USA. Website: <http://www.jmpdiscovery.com>.
- Silva JJ.** 1989. Las serpientes del género *Bothrops* en la Amazonia colombiana. *Acta Med Col* 14:148-165.
- Sokal R, Rohlf F.** 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. WH Freeman and Company, New York, USA.
- Solórzano A, Cerdas L.** 1989. Reproductive biology and distribution of the terciopelo *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae), in Costa Rica. *Herpetologica* 45:444-450.
- Thorpe RS.** 1988. Multiple group principal component analysis and population differentiation. *J Zool* 216:37-40.
- Thorpe RS.** 1989. Pattern and function of sexual dimorphism: A biometric study of character variation in the grass snake (*Natrix natrix*, Colubridae) due to sex and its interaction with geography. *Copeia* 1:53-63.
- Werman SD.** 1992. Phylogenetic relationships of Central and South American pitvipers of the genus *Bothrops* (*sensu lato*): cladistic analyses of biochemical and anatomical characters. In: Campbell JA, Broodie ED Jr. (eds.). *Biology of the pitvipers*. Texas, Selva Tyler, pp. 21-35.
- Wüster W, Thorpe R, Puerto G.** 1996. Systematics of the *Bothrops atrox* complex (Reptilia: Serpentes: Viperidae) in Brazil: A multivariate analysis. *Herpetologica* 52:263-271.
- Wüster W, Salomão MG, Thorpe R, Butantan-British Bothrops Systematics Project.** 1997. Systematic of the *Bothrops atrox* complex: new insights from multivariate analysis and mitochondrial DNA sequence information. In: Thorpe RS, Wüster W, Malhotra A (eds.). *Venomous snakes: ecology, evolution and snakebite*. Symposia of the Zoological Society of London 70, pp. 99-113.
- Wüster W, Salomão MG, Duckett GJ, Thorpe RS, Butantan-British Bothrops Systematics Project.** 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the *Bothrops atrox* species complex (Squamata: Serpentes: Viperidae). *Kaupia* 8:135-144.
- Wüster W, Salomão MG, Quijada-Mascareñas JA, Thorpe RS, Butantan-British Bothrops Systematics Project.** 2002. Origin and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In: Schuett GW, Höggren M, Douglas ME, Greene HW (eds.). *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, LC, Carmel, Indiana, pp. 111-128.
- Zelditch ML, Fink WL, Swiderski.** 1995. Morphometrics, homology, and phylogenetics: quantified characters as synapomorphies. *Syst Biol* 44:179-189.

