



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**FILOGENIA DE LAS SERPIENTES DE CASCABEL
ENDÉMICAS DE LAS ISLAS DEL GOLFO DE
CALIFORNIA, MÉXICO.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Ecología de Zonas Áridas)

Presenta

OSCAR ROBERTO CRUZ ANDRÉS

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2014.

COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

Director de Tesis

Dr. Gustavo Alberto Arnaud Franco
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Co-tutor

Dr. Francisco Javier García de León
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Co-tutor

Dr. Marcio Roberto Costa Martins
Instituto de Biociencias, Universidad de Sao Paulo.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dr. Gustavo Alberto Arnaud Franco
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Francisco Javier García de León
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Gopal Murugan
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

SUPLENTE

Dr. Pedro Peña Garcillán
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 29 del mes de agosto del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Filogenia de las serpientes de cascabel endémicas de las islas del Golfo de California, México"

Presentada por el alumno:

Oscar Roberto Cruz Andrés

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Ecología de Zonas Áridas**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



Dr. Gustavo Alberto Arnaud Franco
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Francisco Javier García de León
CO-TUTOR



Dr. Marcio Roberto Costa Martins
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS
DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

RESUMEN

Crotalus angelensis, *C. catalinensis*, *C. estebanensis*, *C. lorenzoensis*, *C. muertensis* y *C. tortugensis* son seis especies de serpientes de cascabel endémicas que habitan igual número de islas en el Golfo de California. De estas especies solo dos, *C. catalinensis* y *C. tortugensis*, han sido incluidas en los trabajos previos de reconstrucción de las relaciones filogenéticas de las especies que habitan la región de la península de Baja California y sus islas asociadas. Con la finalidad de conocer las relaciones filogenéticas de estas especies con las otras especies de serpientes de cascabel que habitan la región se llevó a cabo la reconstrucción de su filogenia a partir del análisis de las secuencias de dos genes mitocondriales, el 12S ADNr y el 16S ADNr, obtenidas a partir de la recolecta de tejidos de 20 localidades, y por medio de los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Los árboles filogenéticos obtenidos mostraron la relación entre *Crotalus angelensis* y *C. muertensis* con *C. mitchellii*, una especie peninsular. *Crotalus estebanensis* se agrupó en un clado con *C. molossus*, una especie de la porción continental de México, mientras que *C. lorenzoensis* resultó ser una especie parafilética con *C. ruber*, una especie de amplia distribución en la península de Baja California. Las relaciones filogenéticas de *Crotalus catalinensis* con *C. ruber* y de *C. tortugensis* con *C. atrox*, reportadas en trabajos previos fueron confirmadas por el presente trabajo. Como la especie ancestral de la región de estudio se ubicó a *C. cerastes* y se identificaron a dos especies con un posible patrón de distribución filogeográfico de sus haplotipos: *Crotalus ruber* y *C. enyo*.

Palabras clave: Filogenia, islas del Golfo de California, *Crotalus*, especies endémicas.

ABSTRACT

Crotalus angelensis, *C. catalinensis*, *C. estebanensis*, *C. lorenzoensis*, *C. muertensis* and *C. tortugensis* are six species of endemic rattlesnakes that inhabit the same number of islands in the Gulf of California. Of these, only two species *C. catalinensis* and *C. tortugensis* have been included in previous reconstruction studies of phylogenetic relationships of the species that inhabit the peninsular region of Baja California and its associated islands. To understand the phylogenetic relationships of these species with other species of rattlesnakes that inhabit the region, we performed their phylogeny reconstruction starting from sequence analysis of two mitochondrial genes, 12S rDNA and 16S rDNA obtained tissue collection from 20 locations, and by maximum parsimony, maximum likelihood, and bayesian inference methods. The phylogenetic trees obtained showed the relationship between *Crotalus angelensis* and *C. muertensis* with *C. mitchellii*, a peninsular species. *Crotalus estebanensis* was grouped in a clade with *C. molossus*, a continental species while *C. lorenzoensis* proved a paraphyletic species with *C. ruber*, a widely distributed species in the Baja California peninsula. In this work we confirm the phylogenetic relationships of *C. catalinensis* with *C. ruber*, and the relationship of *C. tortugensis* with *C. atrox*, reported in previous studies. The ancestral species of the study area is *C. cerastes* and two species, *C. ruber* and *C. enyo* with a possible pattern of phylogeographic haplotypes in the peninsula were identified..

Keywords: Phylogeny, islands of the Gulf of California, *Crotalus*, endemic species.

DEDICATORIA

A mis padres: Amador Cruz Morales y Petra Candelaria Andrés Gutiérrez, que siempre han sido mi ejemplo a seguir, quienes nunca se han dejado vencer ante ninguna adversidad y que siempre han apoyado todas y cada una de mis decisiones.

A mi maravillosa amiga y compañera de vida Rocío García Paz, gracias por ser, por estar, por nunca rendirte, por sonreír, por apoyarme siempre aun sabiendo que mis decisiones significaban que estuviéramos alejados por largos períodos de tiempo, y por creer que mi testarudez es una cualidad. Gracias por todo tu amor que siempre fue mi gran inspiración...

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. (CIBNOR), institución que me permitió llevar a cabo mi formación de posgrado en sus instalaciones. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 260590 que me otorgaron para efectuar mis estudios de posgrado y a la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el financiamiento otorgado para el proyecto HK051 “Vulnerabilidad de Crotálicos Microendémicos de las Islas del Golfo de California”.

A mi tutor y amigo, Dr. Gustavo Alberto Arnaud Franco, por todo su apoyo y enseñanzas durante estos cinco años en que he trabajado con él. Por permitirme trabajar en el Laboratorio de Ecología Animal y colaborar en los distintos trabajos que ahí desarrolla.

Al Dr. Francisco Javier García de León, por facilitarme el acceso para trabajar en el Laboratorio de Genética para la Conservación (GENCON) del CIBNOR, por sus enseñanzas y toda la paciencia que él tuvo conmigo.

Al Dr. Marcio Roberto Costa Martins, de la Universidad de Sao Paulo, por su apoyo, amistad y enseñanza.

A la Dra. Ana Gática Colima, de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, por proporcionarnos las muestras de sangre de *Crotalus molossus*, *C. atrox* y *C. tigris*, conservadas en tarjetas FTA.

Al Dr. Gorgonio Ruiz Campos, responsable de la Colección Herpetológica del Laboratorio de Vertebrados de la Universidad Autónoma de Baja California por proporcionarnos las muestras de tejidos de *C. oreganus* (UABC076, UABC124 y UABC144), *C. scutulatus* (UABC244) y *C. ruber* (UABC184), así como al M. en C. Jorge H. Valdez Villavivencio por gestionar la donación y el envío de dichas muestras.

A todos los que trabajan o trabajaron en el laboratorio de GENCON y que de una u otra manera contribuyeron a mi trabajo mediante enseñanzas, consejos y recomendaciones: Carolina, Saraí , Cristina, Paulina, Fausto, Carina, David, Emiliano, Quinatzin, Sofia, y particularmente a mi “sensei” Tania Valdivia Carrillo, porque sin su ayuda muy probablemente no habría podido llevar a buen término el trabajo de laboratorio.

Al personal del Laboratorio de Ecología Animal: Tec. José Abelino Cota Castro, Tec. Franco Cota Castro y al M. en C. Israel Guerrero Cárdenas, por su valiosa ayuda en el trabajo de campo, pero también por su invaluable apoyo y amistad durante todos estos años de mi estancia en la ciudad de La Paz.

Al Biol. José Sánchez, de la UABC, por su asesoramiento en la edición de las secuencias con el uso del programa CodonCode Aligner.

Al personal de la biblioteca, Ana María, Susana, Isabel y Esther. Gracias por facilitarme todo el material bibliográfico del acervo, por las buenas charlas y por los ánimos y consejos.

A la profesora Diana Dorantes, por sus clases, por la edición del resumen en inglés de este trabajo y por alentarme a no rendirme para aprobar mi examen CENLEX. A mi buen amigo Thomas Sean Thorogouth, por sus excelentes clases de inglés que me ayudaron a aprobar mi examen CENLEX.

A mis compañeros y amigos de generación de la maestría: Laura, Carlos, Fermín, Tania, Eliza, Pilar, Emmanuel, Karina, Flor, Mariana, Iara y a mi compa Martín León, orgulloso habitante “endémico” de la ciudad de La Paz y dueño del único coyote albino de la región.

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1 Taxonomía y distribución de las serpientes de cascabel.....	6
2.2 Filogenia y análisis filogenético.....	8
2.3 Trabajos previos de filogenia de las serpientes de cascabel del área de estudio..	10
2.4 Métodos de reconstrucción filogenética.....	21
2.4.1 Análisis con parsimonia.....	22
2.4.2 Análisis con máxima verosimilitud.....	22
2.4.3 Análisis con inferencia bayesiana.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	25
5. HIPÓTESIS.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 Área de estudio.....	27
6.2 Recolecta de muestras.....	30
6.3 Extracción de ADN total.....	32
6.4 Amplificación y secuenciación de ADN.....	33
6.5 Edición y alineamiento de secuencias.....	34
6.6 Prueba de homogeneidad de particiones.....	35

6.7 Selección de los modelos de sustitución nucleotídica.....	35
6.8 Métodos de reconstrucción filogenética.....	36
6.8.1 Análisis con máxima parsimonia.....	36
6.8.2 Análisis de máxima verosimilitud.....	36
6.8.3 Análisis de inferencia bayesiana.....	37
7. RESULTADOS.....	37
7.1 Secuencias obtenidas.....	37
7.2 Prueba de homogeneidad de particiones.....	42
7.3 Modelo de sustitución nucleotídica.....	42
7.4 Métodos de reconstrucción filogenética.....	42
7.4.1 Análisis con máxima parsimonia.....	43
7.4.2 Análisis de máxima verosimilitud.....	45
7.4.3 Análisis de inferencia bayesiana.....	47
8. DISCUSIÓN.....	49
9. CONCLUSIONES.....	52
10. LITERATURA CONSULTADA.....	54
ANEXO I. Versión modificada del protocolo de extracción con cloruro de sodio (Aljanabi y Martinez, 1997; Riera et al, 2010).....	63
ANEXO II. Visualización de ADN en geles de agarosa al 1%.....	65
ANEXO III. Topologías de los árboles obtenidos con cada uno de los genes por separado (12S ADNr y 16S ADNr) por los tres distintos métodos de reconstrucción filogenética.....	66

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árbol filogenético propuesto por Klauber (1972) para los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*..... 11
- Figura 2.** Árboles filogenéticos obtenidos por Ashton y de Queiroz (2003) al analizar el gen mitocondrial ND2 y la región D-loop. a) árbol, filogenético construido por parsimonia. b) árbol filogenético construido por máxima verosimilitud..... 15
- Figura 3.** Topología del árbol obtenido por Parkinson (2002) usando el método de máxima verosimilitud, combinando las secuencias de los genes 12S ADNr, 16S ADNr, ND4 y citocromo b..... 16
- Figura 4.** Comparación entre a) la topología del árbol filogenético propuesto por Klauber (1972) y b) la topología del árbol filogenético propuesto por Murphy et al., 2003. Ver texto para una mayor explicación..... 18
- Figura 5.** Relaciones filogenéticas inferidas a partir de secuencias de los genes NADH deshidrogenasa y ND4 de *Crotalus atrox* y *C. tortugensis* reportado en Castoe et al., 2007. A) Filogenia estimada usando el método de análisis filogenético bayesiano. B) Árbol de consenso estricto obtenido del análisis de máxima parsimonia. Se observa el anidamiento de *C. tortugensis* y *Crotalus sp* de Isla Santa Cruz, dentro de los linajes continentales de *C. atrox* (recuadros negros)..... 20
- Figura 6.** Mapa con las localidades donde se hicieron las recolectas de muestras de las diferentes especies de *Crotalus* a lo largo de la zona de estudio en el período 2004-2012..... 29
- Figura 7.** Método de obtención de las muestras de sangre y escamas ventrales en cada uno de los animales incluidos en este trabajo..... 30

Figura 8. Topología del árbol de consenso estricto para ambos genes concatenados (12S ADNr y 16S ADNr), obtenido por el método de máxima parsimonia, se muestran los valores de soporte estadístico de bootstrap (>50) arriba de cada rama. Abreviatura para las especies: (Ac) *Agkistrodon contortrix*, (Ap) *A. piscivorus*, (Sc) *Sistrurus catenatus*, (Sm) *S. miliarius*, (Ca) *Crotalus angelensis*, (Cm) *C. muertensis*, (Cat) *C. atrox*, (Ct) *C. tortugensis*, (Cc) *C. catalinensis*, (Cl) *C. lorenzoensis*, (Cca) *C. caliginis*, (Co) *C. oreganus*, (Cce) *C. cerastes*, (Ce) *C. enyo*, (Ces) *C. estebanensis*, (Cti) *C. tigris*, (Cmi) *C. mitchellii*; (Cmo) *C. molossus*, (Cr) *C. ruber*. Acrónimos de las localidades: (EU) No especificada en Estados Unidos, (CAN) Ontario, Canadá, (FLO) Florida, E.U., (IAG) Isla Ángel de la Guarda, B.C. (IM) Isla El Muerto, B.C.(CJ) Ciudad Juárez, Chih., (IT) Isla Tortuga, B.C.S., (ISC) Isla Santa Catalina, B.C.S., (ISL) Isla San Lorenzo, B.C., (ENS) Ensenada, B.C., (SF) San Francisquito, B.C., (ICS) Isla Coronados Sur, B. C., (EH) El Huerfanito, B.C., (POC) Las Pocitas, B.C.S., (BLA) Bahía de los Ángeles, B.C., (CZ) Cañón de la Zorra, B.C.S., (CSD) Cañón de San Dionisio, B.C.S., (ISE) Isla San Esteban, Sonora, (SONO) Sonoyta, Sonora, (SJ) Sierra Juárez, Chih., (SA) San Antonio, B.C.S., (COM) El Comitán, B.C.S..... 44

Figura 9. Topología del árbol obtenido para ambos genes concatenados (12S ADNr y 16S ADNr), obtenido con el modelo TPM3uf + I + G y con el método de máxima verosimilitud. Las abreviaturas para las especies, así como los acrónimos de las localidades son los mismos que en la figura 8..... 46

Figura 10. Topología del árbol obtenido para ambos genes concatenados (12S ADNr y 16S ADNr), obtenido con el modelo TPM3uf + I + G y con el método de inferencia bayesiana. Las probabilidades *a posteriori* (> 0.5) se encuentran en los nodos respectivos. Las abreviaturas para las especies, así como los acrónimos de las localidades son los mismos que en la figura 8..... 48

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Especies de serpientes de cascabel del género <i>Crotalus</i> y su distribución en la península de Baja California e islas asociadas (Grismer, 2002). E = Endémica; NE = No endémica.....	2
Tabla II. Número de muestras colectadas por cada una de las especies, localidades donde fueron recolectadas, acrónimos de las localidades, fechas de colecta y tipo de tejido colectado.....	31
Tabla III. Iniciadores, condiciones y programas de amplificación que fueron usados para cada uno de los dos loci mitocondriales.	33
Tabla IV. Números de acceso del GenBank para las secuencias de los individuos utilizados como grupo externo.....	34
Tabla V. Número de haplotipos y número de individuo por haplotipo para cada gen por separado y una vez concatenados. Las abreviaturas de las especies y los acrónimos de las localidades son los mismos de la tabla II.....	39
Tabla VI. Porcentajes de las bases obtenidas para las secuencias de los diferentes haplotipos obtenidos tras la concatenación de los genes 12S ADNr y 16S ADNr.....	40
Tabla VII. Distancias genéticas calculadas con Kimura 2-parámetros (abajo a la izquierda) y diferencias del número de bases (arriba a la derecha) entre los diferentes haplotipos obtenido al concatenar los dos genes (12S ADNr y 16S ADNr).....	41

1. INTRODUCCIÓN

Durante la época precolombina, las serpientes de cascabel tuvieron una gran importancia en el universo cultural de los principales pueblos mesoamericanos (Castellón-Huerta, 2001; Jáuregi, 2001; Rubio, 2003), en tanto que antes de los primeros viajes de Colón a América eran seres totalmente desconocidos para los habitantes del Viejo Mundo. De hecho, no fue sino hasta la primera mitad del siglo XVII que se publicó la primera ilustración de carácter científico de uno de estos organismos en el *Rerum medicarium Novae Hispanie thesaurus*, de Francisco Hernández, con lo cual poco a poco fueron capturando la atención de las personas, tanto por la singularidad de su morfología como por su amplia distribución geográfica y por la importancia médica que implica la toxicidad de su veneno, hasta volverse uno de los grupos de reptiles más estudiados hoy en día (Campbell y Lamar, 2004; Reyes-Velasco, 2013).

En México se han descrito 864 especies de reptiles y se considera como el segundo país con la diversidad más alta de este grupo a nivel mundial (Flores-Villela y García-Vázquez, 2013). Las serpientes de cascabel se encuentran bien representadas en nuestro país con dos especies del género *Sistrurus* y alrededor de 34 especies del género *Crotalus*, siendo 22 de estas últimas, endémicas de México (Campbell y Lamar, 2004; Paredes-García *et al.*, 2011; CONABIO, 2013).

La península de Baja California y sus islas asociadas, representan un mosaico de hábitats con una alta heterogeneidad de características, donde las interacciones entre los procesos geológicos y ecológicos han permitido la evolución de una flora y fauna particularmente adaptada a las condiciones de esta región. Y si a esto, le sumamos el aislamiento de algunos de sus ambientes, en específico las regiones montañosas de la península, los oasis y las propias islas, obtenemos uno de los pocos laboratorios naturales aún existentes en el mundo, disponibles y bien conservados para llevar a cabo investigaciones enfocadas en los procesos de extinción, colonización y aislamiento de poblaciones (MacArthur y Wilson, 1967; Murphy y Aguirre-León, 2002; Murphy y Méndez de la Cruz, 2012).

La península de Baja California comenzó a formarse hace unos 12.5 millones de años por el proceso de expansión entre las placas tectónicas Pacífico y Norteamericana, y progresivamente se fue formando hasta conformarse como la conocemos actualmente al final del Plioceno e inicios del Pleistoceno, hace aproximadamente unos 2.58 millones de años. (Smith, 1991; Riddle et al., 2000; Holt *et al.*, 2000; Oskin y Stock, 2003; Wood *et al.*, 2008; Murphy y Aguirre-León, 2002; Murphy y Méndez de la Cruz, 2010).

El origen de la herpetofauna que habita la península de Baja California está íntimamente ligada a los orígenes de esta y a los cambios medioambientales que ha tenido. Cuando la región del Cabo y las formaciones montañosas de la península se separaron de la porción continental de México algunas especies de reptiles quedaron aisladas del continente, otras incursionaron a la península desde el sur de lo que ahora es Estados Unidos. Por su parte, los orígenes de la herpetofauna que habita las islas del Golfo de California son tan variados como las distintas historias geológicas de las islas que habitan, pero en general la herpetofauna de las islas tiene un origen continental y/o peninsular (Murphy y Aguirre-León, 2002; Case, 2002).

En la península de Baja California y sus islas asociadas, habitan quince especies de serpientes de cascabel del género *Crotalus*. De estas, *C. enyo*, es endémica de la península, *C. caliginis* es endémica de una isla del Pacífico Occidental y seis más son endémicas de igual número de islas dentro del Golfo de California, (Tabla I).

Tabla I. Especies de serpientes de cascabel del género *Crotalus* y su distribución en la península de Baja California e islas asociadas (Grismer, 2002). E = Endémica; NE = No endémica

Especie	Distribución	
<i>Crotalus caliginis</i>	E	Isla Coronado Sur (Pacífico), Baja California.
<i>Crotalus atrox</i>	NE	Noreste de Baja California, Isla San Pedro Mártir, Isla Santa Cruz e Isla Tiburón (Golfo)
<i>Crotalus cerastes</i>	NE	Noreste de la península de Baja California e Isla Tiburón (Golfo)
<i>Crotalus muertensis</i>	E	Isla El Muerto (Golfo).
<i>Crotalus angelensis</i>	E	Isla Ángel de la Guarda (Golfo).
<i>Crotalus lorenzoensis</i>	E	Isla San Lorenzo Sur (Golfo).
<i>Crotalus estebanensis</i>	E	Isla San Esteban (Golfo).

Tabla I. Continuación.

<i>Crotalus oreganus</i>	NE	Por la vertiente del Pacífico, desde la frontera con Estados Unidos hasta el Vizcaíno en B. C. S.
<i>Crotalus tortugensis</i>	E	Isla Tortuga (Golfo).
<i>Crotalus catalinensis</i>	E	Isla Santa Catalina (Golfo).
<i>Crotalus ruber</i>	NE	A todo lo largo de la península de Baja California, Isla Danzante, Isla Dátil, Isla Monserrat, Isla Pond, Isla San José e Isla San Marcos (Golfo)
<i>Crotalus mitchellii</i>	NE	A todo lo largo de la península de Baja California, Isla Cabeza de Caballo, Isla Carmen, Isla Cerralvo, Isla Espíritu Santo, Isla Monserrat, Isla Partida Sur, Isla Piojo, Isla Salsipuedes, Isla San José e Isla Smith (Golfo)
<i>Crotalus enyo</i>	E	Desde Bahía de Los Angeles, B. C. hasta Los Cabos, B. C. S, Isla Carmen, Isla Cerralvo, Isla Coronados, Isla Espíritu Santo, Isla Pardo, Isla Partida Sur, Isla San Francisco, Isla San José e Isla San Marcos (Golfo).
<i>Crotalus tigris</i>	NE	Isla Tiburón (Golfo).
<i>Crotalus molossus</i>	NE	Isla Tiburón (Golfo).

El género *Crotalus* es un grupo de gran interés ecológico, ya que son elementos activos e importantes de las tramas tróficas, sobre todo en los ambientes insulares, donde muchas veces se constituyen como uno de los principales depredadores que regulan los tamaños poblacionales de especies de roedores y lagartijas (Klauber, 1982; Campbell y Lamar, 2004). Asimismo, debido a su gran capacidad de adaptación a diferentes hábitats pueden establecer poblaciones viables en las islas, poblaciones que se encuentran aisladas reproductivamente de otras poblaciones tanto del continente como de la península y que por ello se constituyen como interesantes objetos de estudio para evaluar su historia evolutiva (Grismer, 1999; Murphy y Méndez de la Cruz, 2012).

El género *Crotalus*, al igual que todos los demás géneros de la familia Viperidae, está constituido por especies venenosas, potencialmente peligrosas y que son temidas debido a ello. Los estudios de la composición de los venenos de estas serpientes está arrojando nueva luz sobre los posibles usos biotecnológicos de algunos de sus componentes en la industria médica, particularmente las fosfolipasas A₂ (PLA₂), debido a su actividad contra células tumorales, contra protozoarios (como *Plasmodium*, *Tripanosoma* y *Leishmania*), al igual que por su actividad bactericida y antiviral (Zouari-Kessentini *et al.*, 2009; Quintana *et al.*, 2011; Passero *et al.*, 2006; Toyama *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2011; Quintana, 2013).

En el caso particular de las serpientes de cascabel se han utilizado de forma tradicional caracteres morfológicos y anatómicos, en combinación con métodos de reconstrucción filogenética para poder dilucidar las relaciones de ancestría-descendencia entre sus diferentes especies. Sin embargo, debido a la gran plasticidad de los caracteres morfológicos ha sido difícil la determinación de un número suficiente de caracteres de este tipo que hayan evolucionado hasta ser razonablemente informativos, y con ellos poder dilucidar las verdaderas relaciones filogenéticas entre los taxa (Klauber, 1936; Murphy y Doyle, 1998; Douglas et al., 2007). Por otro lado, en este tipo de estudios, además de características como los patrones de coloración, la talla, el número y distribución de escamas, se suelen utilizar análisis de la morfología de hemipenes, de dientes palatinos, de vertebras y de otras muchas estructuras esqueléticas (Dorcas, 1992; Reyes-Velasco et al., 2013), lo que implica sacrificar a los animales para dichos trabajos, en tanto que para obtener muestras de ADN (ácido desoxirribonucleico) solo basta con un poco de sangre o pequeños fragmentos de escamas ventrales e incluso fragmentos de exuvias desechadas por las serpientes (Douglas et al., 2007), sin que haya necesidad de sustraer organismos de poblaciones con un número ya de por sí escaso de individuos, como es el caso de las especies insulares.

Los marcadores moleculares han sido utilizados desde hace décadas para la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre especies. El ADN mitocondrial presenta una serie de características que han influido para que sea uno de los marcadores moleculares más utilizados en filogenia y sistemática molecular de reptiles a diferentes niveles taxonómicos (García-París y Jockusch, 1999; Zardoya y Meyer, 2001; Carranza, 2002; Godoy, 2009), entre las cuales se encuentran que el ADN mitocondrial de vertebrados evoluciona a una tasa más elevada, en algunos casos esta tasa de evolución puede ser entre 5 y 10 veces más rápida que la de genes nucleares de copia única (Avice, 1987), por lo que el ADN mitocondrial es muy útil para inferir relaciones filogenéticas a nivel de especie e incluso de poblaciones. Otra característica es que las mitocondrias suelen encontrarse en el citoplasma en gran número y excepto en casos muy concretos presentan exactamente la misma secuencia en todos los tejidos, por lo tanto, en una célula animal existen múltiples genomas

mitocondriales todos ellos iguales, por lo que es muy fácil obtener ADN a partir de cantidades muy pequeñas de tejido conservado en alcohol durante muchos años (Avisé, 1987, Carranza et al., 2001). Una tercera característica es que el ADN mitocondrial se hereda de forma uniparental a través de la línea materna (con muy escasas excepciones), y por tanto es haploide, debido a que en el momento de la fecundación las únicas mitocondrias que pasaran a formar parte del cigoto son las provenientes del óvulo (Dawid y Blackler, 1972; Avisé, 1987; Hebert et al., 2003) por lo que las diferencias encontradas entre individuos, utilizando este tipo de marcadores, se deberán exclusivamente a fenómenos de mutación y no son el resultado de recombinación.

Por ello, la amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial permite caracterizar los diferentes haplotipos (secuencias únicas y diferentes) de una población o especie y con ello poder reconstruir su filogenia, dado que las partes de esta molécula comparten el mismo patrón histórico de descendiente común (Avisé, 1987).

A la fecha se han llevado a cabo trabajos de reconstrucción de las relaciones filogenéticas de algunas de las especies de cascabel que habitan la península de Baja California y las islas del Golfo de California, para ellos han utilizado tanto caracteres morfológicos como moleculares. En el trabajo más extenso basado en datos morfológicos (Klauber, 1972) se incluyeron a dos de las especies endémicas de las islas del Golfo de California (*Crotalus catalinensis* y *C. tortugensis*), mientras que en los trabajos donde utilizan marcadores moleculares solo se incluyeron a dos de las especies endémicas de las islas del Golfo, *Crotalus catalinensis* y *C. tortugensis*, así como una especie del Pacífico (*C. caliginis*) (Murphy et al, 2002).

Por ello, la pretensión del presente estudio es reconstruir, mediante el uso de secuencias de ADN mitocondrial, la historia de las relaciones de ancestro-descendencia entre las seis especies de serpientes de cascabel endémicas de las islas del Golfo de California y las especies de serpientes de cascabel que habitan la península de Baja California.

2. ANTECEDENTES

2.1 Taxonomía y distribución de las serpientes de cascabel.

Las serpientes de cascabel se distribuyen exclusivamente en el continente americano, desde Canadá hasta Argentina, y gracias a su gran diversidad morfológica y fisiológica han podido adaptarse a la enorme diversidad de hábitats disponibles en este amplio rango de distribución. Por eso, se les puede encontrar desde el nivel del mar y hasta los 4,000 metros de altitud; desde los desiertos áridos, pasando por los pantanos, los bosques templados y hasta las selvas tropicales (Klauber, 1972; Rubio, 2003, Campbell y Lamar, 2004; Paredes-García *et al.*, 2011).

Los crotalinos o serpientes de cascabel se agrupan dentro de la subfamilia Crotalinae (Oppel, 1811), en la familia Viperidae (Oppel, 1811) y se dividen en dos géneros *Sistrurus* y *Crotalus*. El género *Sistrurus* (Garman, 1884) comprende solamente 2 especies, mientras que el género *Crotalus* (Linnaeus, 1758) se compone por alrededor de 34 especies (Campbell y Lamar, 2004; Paredes-García *et al.*, 2011; CONABIO, 2013). La cantidad de especies que comprende el género *Crotalus* varía un poco entre los trabajos de diferentes autores, por ejemplo, Campbell y Lamar (2004) reconocen a 30 especies del género *Crotalus*; por su parte, CONABIO (2013) enumera un total de 34 especies, mientras que en el Reptil Database (accesado el 3 de junio de 2014) se reconocen 36 especies.

Ambos géneros tienen características comunes, tales como una cabeza claramente diferenciada del tronco por un cuello marcado, pupilas verticales, escamas del dorso, fuertemente quilladas o carenadas y escamas de la porción ventrocaudal dispuestas en una sola fila; poseen una foseta loreal ubicada entre el ojo y la nariz, con una epidermis modificada en su interior y ampliamente inervada por ramificaciones del nervio trigémino, lo que la convierte en un órgano termosensible con el cual pueden apreciar diferencias de temperatura para poder ubicar a sus presas. El aparato venenoso es de los más avanzados entre los víperidos, está constituido por dientes curvos, acanalados interiormente e

implantados en la mandíbula superior, lo que permite a los dientes un movimiento de rotación de atrás hacia delante para proyectarlos hacia su presa durante la mordida, mientras que en su posición de reposo se mantienen planos a lo largo del paladar y cubiertos por una funda de tejido epitelial (dentición tipo solenoglifa). Cuando estos dientes se proyectan y quedan de manera perpendicular al paladar inyectan el veneno segregado por sus glándulas venenosas mediante la acción de compresión de un potente sistema muscular asociado a dichas glándulas (Klauber, 1982; Campbell y Lamar, 2004). Y como su característica más notable, y que hace que sean consideradas como un grupo monofilético, está la presencia de una notable y complicada estructura córnea en el extremo de su cola, que tiene una función defensiva y que no está presente en ningún otro grupo de serpientes: el crótalo o cascabel, y aunque algunas especies y poblaciones insulares no presentan un cascabel funcional (debido a que no pueden retener los segmentos del mismo durante los ciclos de muda) morfogenéticamente todas poseen primordios del cascabel (Parkinson, 1999; Beaman y Wong, 2001; Campbell y Lamar, 2004; Meik y Pires-daSilva, 2009).

El género *Sistrurus* es caracterizado por la presencia de nueve escamas grandes y dispuestas de manera simétrica en la parte dorsal de la cabeza, característica que comparte con otros grupos basal de los viperidos: la subfamilia Azemiopinae y con los Colubridae y Elapidae que son serpientes distantemente relacionadas a los vipéridos (Gloyd, 1940; Brattstrom, 1964; Klauber, 1972; Knight et al., 1993). Por su parte, en el género *Crotalus* solamente las escamas supraoculares son grandes y las demás escamas de la parte superior de la cabeza, especialmente en las regiones frontal y parietal, están divididas en múltiples escamas de pequeño tamaño (Klauber, 1956); la excepción a esta regla es *Crotalus ravus*, que anteriormente estaba clasificada dentro del género *Sistrurus* debido a las grandes escamas presentes en su cabeza, pero que debido a posteriores estudios moleculares y morfológicos se determinó que esta era una característica plesiomórfica (un estado ancestral o primitivo del carácter), por lo que finalmente *S. ravus* se cambió al género *Crotalus* (Knight et al., 1993; Murphy et al., 2003; Campbell y Lamar, 2004).

Nuestro país es considerado como el centro de diversificación evolutiva de las serpientes del género *Crotalus*, ya que cerca del 92% de las especies de dicho grupo se encuentran en nuestro territorio (Klauber, 1972; Armstrong y Murphy, 1979; Greene, 1997; Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004; Paredes-García et al., 2011) y muy probablemente el área ancestral de dicho género se haya encontrado en los bosques de pino-encino de La Sierra Madre Occidental (Place y Abramson, 2004) durante mediados del Mioceno, hace unos 13 a 15 millones de años (Lawing y Polly, 2011). Actualmente se estima que la diversidad más alta del género *Crotalus* está en el norte del país, en las cadenas montañosas de la sierra Madre Occidental y en el Altiplano Mexicano (Campbell y Lamar, 2004).

2.2 Filogenia y análisis filogenético

La filogenia es el estudio de la historia evolutiva de un grupo de organismos, y el objetivo primario de un análisis filogenético es la reconstrucción de dicha historia (Hillis, 1987; Baldauf, 2003; Harrison y Langdale, 2006). Un análisis filogenético debería indicar las relaciones evolutivas entre un grupo de especies (o taxa), es decir, cuáles descienden de ancestros comunes y cuáles son las distancias evolutivas que existen entre ellas.

El estudio de las relaciones evolutivas entre las especies ha formado implícitamente parte en los estudios de taxonomía clásica desde el siglo XVI, tal como puede inferirse de los trabajos de algunos autores como Cesalpino, Bauhin, Ray, Tournefort y, por supuesto, Linneo. Sin embargo, no fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando, tras el planteamiento de la Teoría de la Evolución, se formalizó el interés en esclarecer las relaciones entre las especies. Entonces, personas como el botánico Walter Zimmermann, en los años 30, y el zoólogo Willi Hennig, en la década de los 60's del siglo pasado, comenzaron a desarrollar las bases metodológicas para la reconstrucción de relaciones de parentesco entre las especies (Morrone, 2011).

Dichas relaciones comúnmente son representadas en forma de diagramas con bifurcaciones, también llamados árboles filogenéticos. Estos diagramas están compuestos por ramas y

nodos dispuestos de la siguiente manera: las ramas conectan a los nodos y un nodo es el punto en el cual dos o más ramas divergen. Las ramas y los nodos pueden ser internos o terminales. Un nodo interno corresponde al último ancestro común hipotético de todas aquellas especies que surgen a partir de él. Los nodos terminales corresponden a las secuencias o caracteres de los cuales se derivó el árbol (Baldauf, 2003).

Históricamente, las relaciones filogenéticas se inferían a partir del análisis de datos generalmente morfológicos y en menor medida, los caracteres anatómicos, químicos y cromosómicos. No fue sino hasta el desarrollo de la técnica molecular de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) cuando se pudo incorporar el estudio comparado de regiones de ADN al esclarecimiento de las relaciones evolutivas entre los organismos (Avice, 1989).

La obtención de filogenias moleculares se basa en la selección, amplificación y secuenciación de regiones de ADN nuclear, cloroplástico (en plantas) y mitocondrial (de uso frecuente en animales y esporádico en algunas familias de plantas). Dichas secuencias son revisadas, alineadas en función de sus homologías y posteriormente analizadas bajo las asunciones de los distintos métodos de reconstrucción filogenética. El resultado del análisis de dichas secuencias bajo los distintos métodos de inferencia, es uno o más árboles de genes que representan las relaciones evolutivas de las muestras analizadas. A partir de estos árboles, si el muestreo taxonómico y de regiones ha sido adecuado, se pueden realizar inferencias sobre las relaciones evolutivas de las especies (referencia).

La filogenia y el alineamiento de secuencias son campos íntimamente relacionados debido a su necesidad compartida de evaluar el parentesco entre secuencias. La filogenia hace un uso extensivo de los alineamientos de secuencias en la construcción e interpretación de árboles filogenéticos, que se usan para clasificar las relaciones evolutivas entre genes homólogos representados en el genoma de especies divergentes (genes ortólogos). Las secuencias de genes ortólogos son aquellas secuencias homólogas que se han separado por un evento de especiación. Es decir, cuando una especie diverge en dos especies separadas, las copias divergentes de un mismo gen en las especies resultantes se dice que

son ortólogas. En otras palabras, las secuencias ortólogas son las secuencias que se encuentran en diferentes especies y que son altamente similares debido a que se han originado en un ancestro común (Koonin, 2005).

El grado en el que las secuencias de un conjunto problema difieren está relacionado cualitativamente con la distancia evolutiva entre ellas. De forma simplificada, una alta identidad de secuencias sugiere que tienen un ancestro común más reciente, mientras que una baja identidad sugiere que la divergencia es más remota (Valcárcel, 2013).

2.3 Trabajos previos de filogenia de las serpientes de cascabel en el área de estudio.

Klaubert (1972) realizó una filogenia analizando los ejemplares de las serpientes de cascabel de que disponía y la resumió en un árbol filogenético (Figura 1). Él basó sus conclusiones en caracteres morfológicos que clasificó desde los más informativos o ‘estables’ a los menos informativos o ‘plásticos’ en el siguiente orden: osteológicos (usando datos del trabajo de Brattstron, 1964), desarrollo de los pulmones, hemipenes, tamaño proporcional de la cabeza con respecto al cuerpo, longitud proporcional de la cola con respecto al cuerpo, dimensiones del cascabel, forma y distribución de las escamas y los patrones de coloración. Asimismo, complementó estos datos morfológicos con referencia a los tipos de venenos, la ecología y la distribución geográfica de las diferentes especies.

En su trabajo, Klauber reconoce al género *Sistrurus* como el género basal de las serpientes de cascabel, esto en base a la disposición de las escamas de la cabeza, considerando a *S. ravus* como la especie ancestral de ese clado y a *S. miliarius* y *S. catenatus* como especies hermanas.

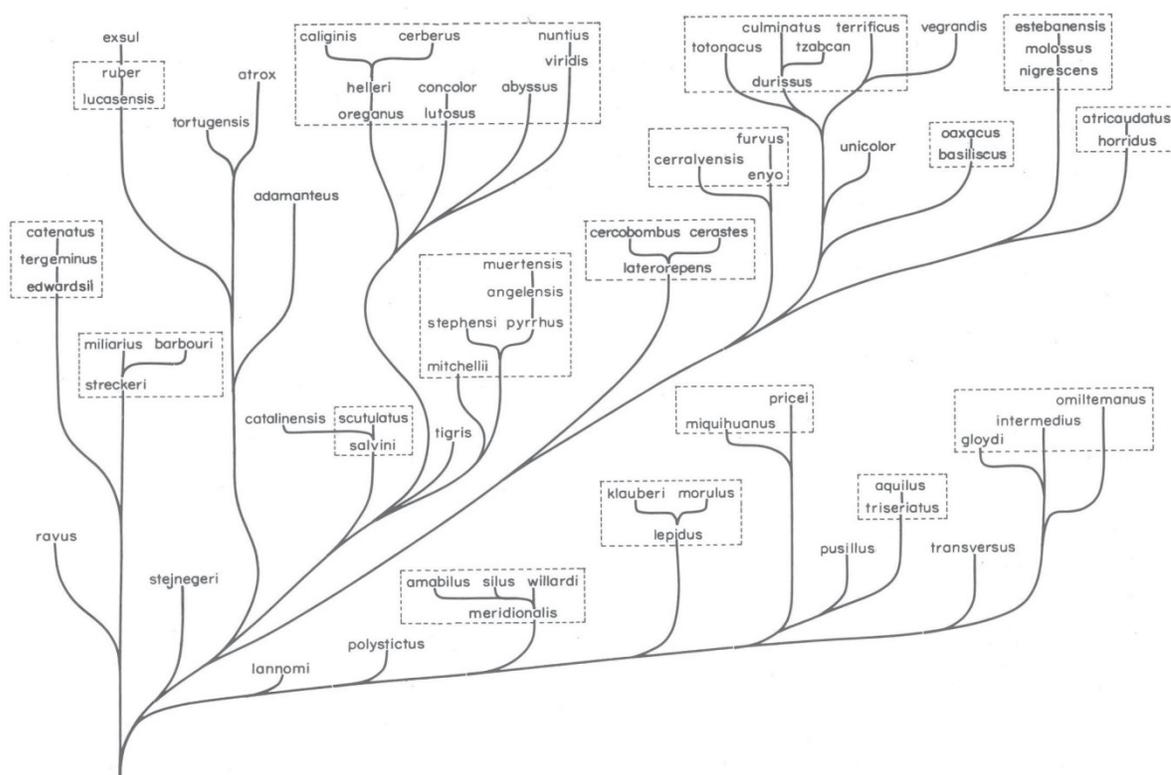


Figura 1. Árbol filogenético propuesto por Klauber (1972) para los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*.

En cuanto a las serpientes del género *Crotalus*, Klauber reconoce a un grupo con *Crotalus durissus*, *C. basiliscus*, *C. molossus* y *C. horridus*, todas las cuales tienen un pulmón izquierdo rudimentario. Dentro de este grupo sugiere una relación cercana entre *C. durissus* y *C. basiliscus* debido a la presencia de quillas tuberculadas en las escamas dorsales, presencia de una cresta vertebral y la presencia de rayas paravertebrales en el dorso del cuerpo. Asimismo, relacionó a *C. horridus* y *C. molossus* por la coloración negra en la parte distal de la cola y porque ambas comparten un patrón de bandas claras y oscuras alternadas en la parte dorsal anterior a la cola. Klauber (1972) sugiere una relación cercana entre *C. scutulatus* y *C. durissus* debido a características compartidas en la composición de sus venenos, pero en su árbol filogenético las coloca en grupos distintos, asociando a *C. scutulatus* con *C. catalinensis*.

En el mismo trabajo, Klauber reconoce a otro grupo con *Crotalus atrox*, *C. tortugensis*, *C. ruber*, *C. lucasensis*, *C. exsul* y *C. adamanteus*, citando similitudes en sus patrones de coloración. Además separa a *C. adamanteus* de *C. atrox* (esta última considerada subespecie de la otra) debido a diferencias en las espinas de sus hemipenes, por la división de escamas frontales y prefrontales, así como por el patrón de coloración de la cola. También Klauber (1972) relaciona cercanamente a *Crotalus scutulatus* y *C. catalinensis*, y las agrupa con *C. tigris*, *C. mitchelli* y *C. viridis*, formando otro gran clado. Los anteriores tres grupos, junto con *C. cerastes*, forman lo que Klauber llama el grupo de las especies que habitan la porción árida del suroeste de Estados Unidos.

Por otro lado, Klauber (1972) también consideró a las especies de pequeñas cascabeles que habitan las montañas de la parte central de México y el sur de Estados Unidos, en conjunto las llamo el grupo de serpientes de cascabel de montaña y consta de las especies *C. stejnegeri*, *C. lannomi*, *C. polystictus*, *C. triseriatus*, *C. intermedius*, *C. transversus*, *C. pussillus*, *C. lepidus*, *C. pricei* y *C. willardi*. En este grupo, considera a *C. stejnegeri*, *C. lannomi*, *C. polystictus* y *C. pusillus* como las más primitivas, pero finalmente esto no se ve reflejado en su árbol filogenético ya que terminó colocando a *C. stejnegeri* en la base de las cascabeles del suroeste árido.

Finalmente, Klauber (1972) incluyó en su arreglo filogenético a varias subespecies, por un lado reconoció a dos subespecies de *Crotalus mitchellii*: *Crotalus mitchellii muertensis* y *C. mitchellii angelensis*; a una subespecie de *C. molossus*; *C. molossus estebanensis* y una de *C. viridis*; *C. viridis caliginis*. Este autor no incluye *C. lorenzoensis* en su trabajo por no disponer de ejemplares de esa especie. Es interesante que muchas de las especies ahora reconocidas fueron una vez consideradas como subespecies por este autor.

Foote y MacMahon (1977) llevaron a cabo un estudio de comparación de las proteínas del veneno de 18 especies de serpientes de cascabel. Como resultado de este trabajo ellos definieron cinco grupos de especies. El grupo compuesto por *Sistrurus miliarius* y *S. catenatus*; el grupo de *Crotalus triseriatus*, *C. willardi*, *C. pricei*, *C. lepidus*, *C. cerastes* y

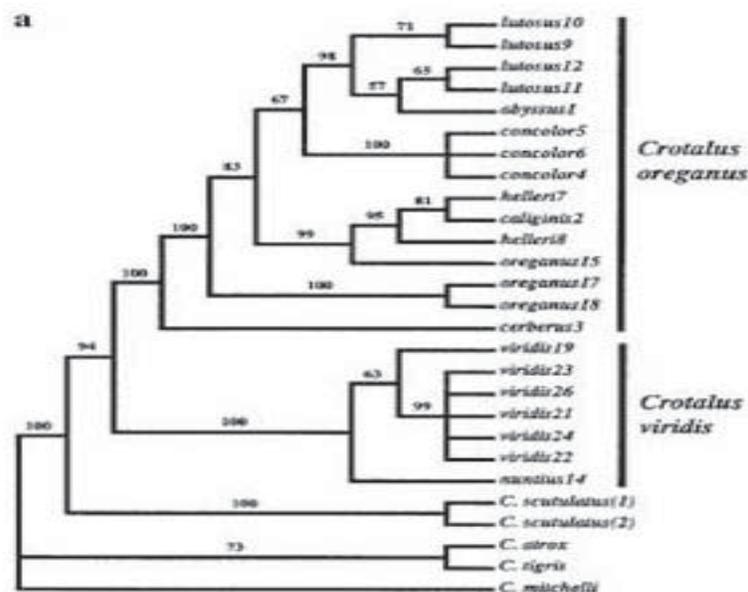
Sistrurus ravus: el grupo compuesto por *C. durissus*, *C. horridus*, *C. molossus*, *C. mitchellii*, *C. tigris* y *C. scutulatus*: el grupo de *C. atrox*, *C. adamanteus* y *C. ruber*, y finalmente un grupo donde únicamente se encuentra *C. viridis*. Sus resultados empezaron a llamar fuertemente la atención acerca de la posibilidad de que el género *Sistrurus* no fuera monofilético como se pensaba hasta entonces.

En 1985, Murphy y Carbtree, mediante el uso de aloenzimas encontraron que *C. catlinensis* está más cercanamente relacionada con *C. ruber* y no con *C. scutulatus* como sugirió Klauber en 1972.

Minton, en 1992, comparó 21 taxa de serpientes de cascabel: *Crotalus adamanteus*, *C. atrox*, *C. cerastes*, *C. durissus*, *C. enyo*, *C. exsul*, *C. horridus*, *C. lepidus*, *C. mitchellii*, *C. m. pyrrhus*, *C. molossus*, *C. polystictus*, *C. pusillus*, *C. scutulatus*, *C. tigris*, *C. viridis viridis*, *C. v. concolor*, *C. v. lutosus*, *Sistrurus catenatus*, *S. milliarius* y *S. ravus*. Mediante el uso de inmunodifusión radial pudo medir el índice de divergencia de la albúmina sérica entre las distintas especies en comparación con *Agkistrodon contortix* y *C. viridis viridis*, que fueron usadas como grupo externo. En este trabajo Minton concluye que todas las especies y subespecies de *Crotalus* forman un grupo “natural” bien definido, mientras que *Sistrurus* no, ya que las albuminas entre sus especies tuvieron un alto grado de divergencia.

En 2001, Ashton y de Queiroz, utilizaron secuencias de ADN mitocondrial de la región D-Loop y el gene ND2 para examinar las relaciones existentes entre 9 subespecies, divididas en 26 poblaciones de *Crotalus viridis*, esto para comprobar la monofilia de la especie. Entre las poblaciones incluidas en dicho estudio solo dos fueron insulares, una fue *C. v. caliginis*, de la Isla Coronados Sur, ubicada frente a las costas de Baja California en el Pacífico mexicano (con un individuo) y la otra fue *C. v. helleri*, de la Isla Santa Catalina, ubicada frente a la costa de California, en Estados Unidos (igualmente con un solo individuo). Las otras localidades fueron de Arizona, Wyoming, California, Utah, Nevada, Idaho, Nuevo México, Washington, Nebraska y Montana, todas en Estados Unidos. Como grupo externo

utilizaron secuencias de individuos de otras especies del mismo género *C. scutulatus* y *C. cerastes* de California, *C. tigris* de Arizona y *C. atrox* de una localidad desconocida de Estados Unidos; así como *C. enyo* y *C. mitchellii* de Baja California. Los datos que obtuvieron para ambos genes fueron analizados usando los métodos de máxima parsimonia (Figura 1A) y de máxima verosimilitud (Figura 1B). Con ambos métodos obtuvieron topologías prácticamente iguales, donde el grupo de todas las subespecies fue monofilético pero constaba de dos grandes clados fuertemente divergentes: el clado *C. viridis*, formado por las subespecies *C. v. viridis* y *C. v. nuntius* (con un fuerte soporte no paramétrico indicar el porcentaje); y el clado de *C. oreganus*, formado por el resto de las subespecies, *abyssus*, *caliginis*, *cerberus*, *concolor*, *helleri*, *lutosus* y *oreganus* (con un soporte de bootstrap de 100 y 94 por ciento). Al final sugieren que estos dos clados sean reconocidos como dos especies diferentes basándose en el concepto de especies o linajes filogenéticos desde el punto de vista evolutivo, quedando como *Crotalus viridis*, que se distribuye en Canadá y Estados Unidos y *Crotalus oreganus*, que se distribuye en Estados Unidos y México (Fig. 2).



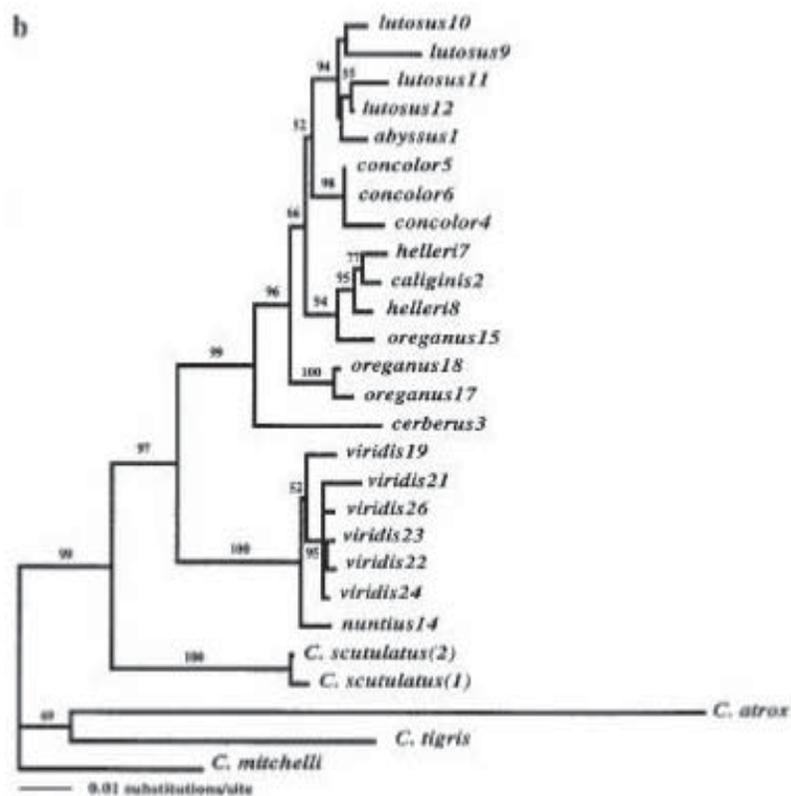


Figura 2. Árboles filogenéticos obtenidos por Ashton y de Queiroz (2003) al analizar el gen mitocondrial ND2 y la región D-loop. **a)** árbol filogenético construido por parsimonia. **b)** árbol filogenético construido por máxima verosimilitud.

En 2002, Parkinson y colaboradores llevaron a cabo un estudio para determinar las relaciones filogenéticas entre 61 especies de serpientes de la subfamilia Crotalinae utilizando cuatro genes mitocondriales (12S ADNr, 16S ADNr, ND4 y citocromo b) incluyeron a cuatro especies del género *Crotalus* y a las tres especies del género *Sistrurus*.

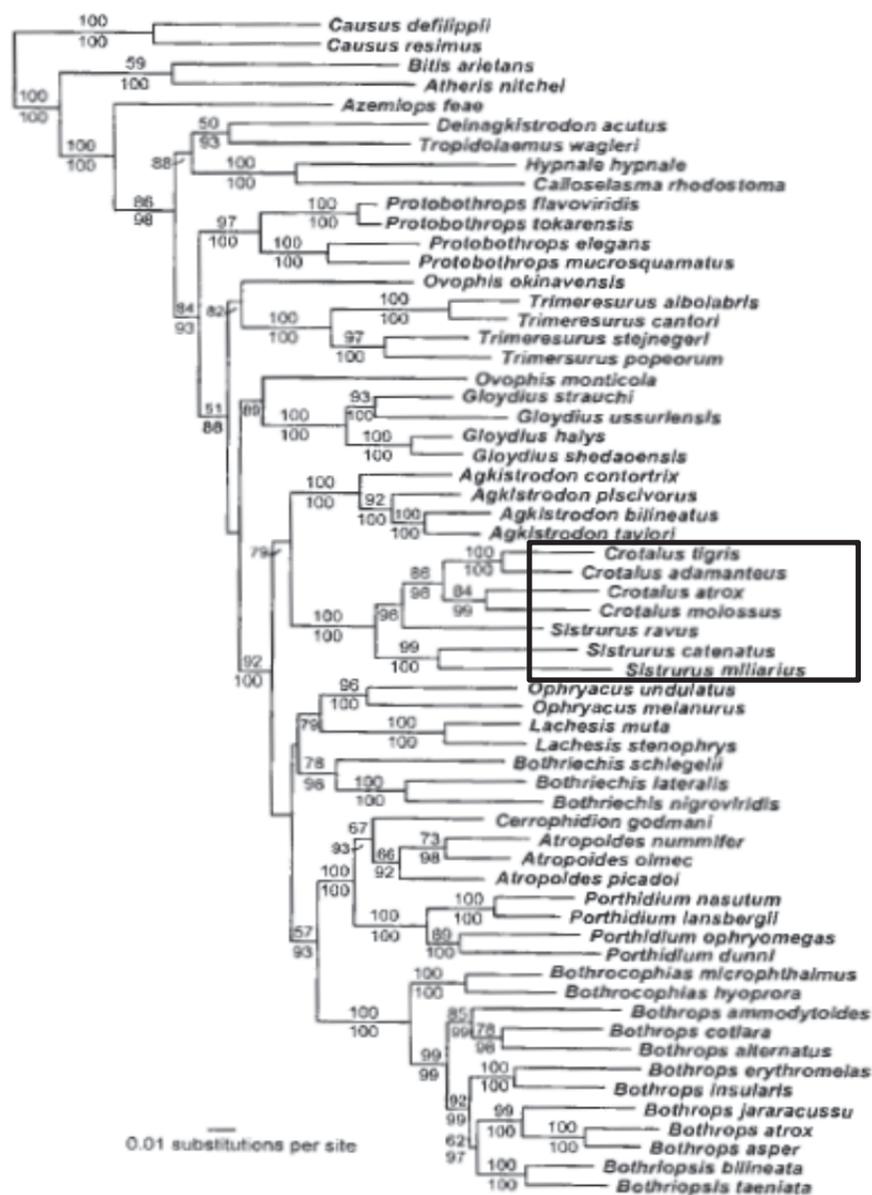


Figura 3. Topología del árbol obtenido por Parkinson (2002) usando el método de máxima verosimilitud, combinando las secuencias de los genes 12S ADN, 16S ADN, ND4 y citocromo b.

Estos autores confirman la monofilia de *Crotalus*; *C. tigris* se agrupó como especie hermana de *C. adamanteus* mientras que *C. atrox* se agrupó como especie hermana de *C. molossus*. *Sistrurus ravus* resultó no ser monofilético con las otras dos especies de *Sistrurus* y al contrario fue agrupada en la base del clado de las especies de *Crotalus* con un soporte de 98 para ese nodo (Figura 3, recuadro negro). Sin embargo, debido al reducido número de

especies de serpientes de cascabel que incluyeron en su trabajo, sugieren cautela al interpretar las relaciones filogenéticas que encontraron para este grupo.

Murphy y colaboradores, en 2002 utilizaron fragmentos de los genes 12S ADNr y 16S ADNr, citocromo b, ND5 y el ARN de transferencia que codifica para valina (ARNt^{val}) para reconstruir una filogenia de los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*. Para ello utilizaron 27 especies de *Crotalus* del sur, centro y la costa este de Estados Unidos; de la península de Baja California, de las islas del Golfo de California, del norte, sur y centro de México; de Venezuela y de Aruba en el Mar Caribe. De las localidades insulares del Golfo de California incluyeron a *C. catalinensis*, de Isla Santa Catalina, *C. tortugensis*, de Isla Tortuga y a *C. ruber* de Isla Santa Cruz. Mientras que del género *Sistrurus* usaron tres especies (entonces aún se consideraba a *C. ravus* como perteneciente al género *Sistrurus*): *Sistrurus catenatus* de Canadá, *Sistrurus ravus* del centro de México y *S. miliarius* de Estados Unidos. Como grupo externo incluyeron muestras de dos especies de la misma familia de los vipéridos, *Agkistrodon contortix* y *A. piscivorus* que se distribuyen en Estados Unidos y norte de México. Los datos que obtuvieron fueron analizados de manera combinada y utilizando el método de máxima parsimonia.

En este trabajo compararon el árbol filogenético más parsimonioso que obtuvieron (Figura 4b) contra el árbol filogenético hipotetizado previamente por Klauber, en 1972 (Figura 4a). Las principales diferencias que encontraron Murphy y colaboradores fue que los grupos de especies que obtuvieron para el género *Crotalus* no fueron consistentes con los grupos definidos e ilustrados por Klauber (1972). Para este género Murphy y colaboradores definieron seis grupos en lugar de los cuatro que propuso Klauber: El grupo compuesto por *C. triseriatus*, *C. aquilus*, *C. lepidus* y *C. pusillus* (Figura 4b, recuadro morado); el grupo que comprende a *C. durissus*, *C. basiliscus*, *C. enyo*, *C. unicolor*, *C. vegrandis* y *C. molossus* (Figura 4b, recuadro amarillo); el grupo con las especies *C. viridis*, *C. horridus* y *C. scutulatus* (Figura 4b, recuadro negro); el grupo que agrupa a *C. polistictus*, *C. cerastes*, *C. willardi*, *C. pricei*, *C. intermedius* y *C. transversus* (Figura 4b, recuadro azul); el grupo con las especies *C. mitchellii* y *C. tigris* (figura 4b, recuadro café), y el grupo compuesto

por *C. atrox*, *C. adamanteus*, *C. catalinensis*, *C. "exul"*, *C. ruber* y *C. tortugensis* (Figura 4b, recuadro rosa).

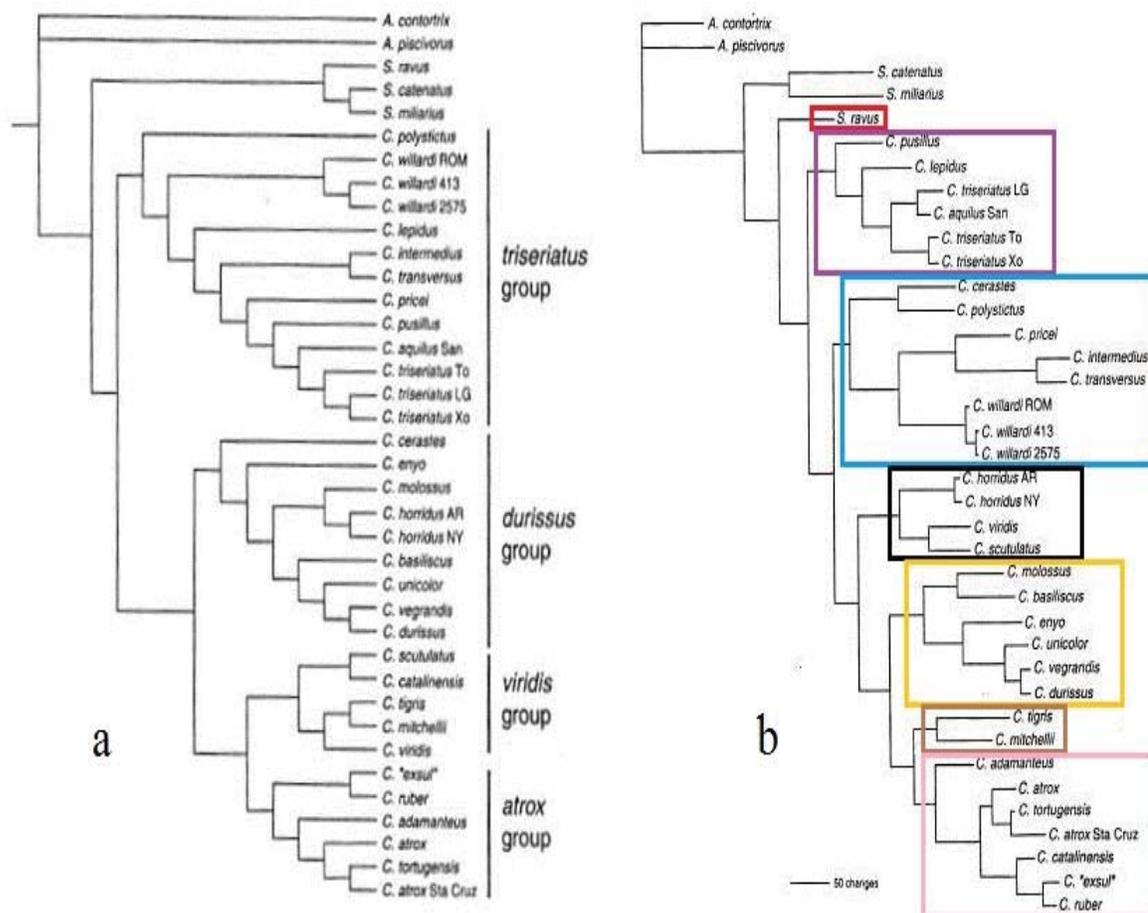


Figura 4. Comparación entre **a)** la topología del árbol filogenético propuesto por Klauber (1972) y **b)** la topología del árbol filogenético propuesto por Murphy et al., 2003. Ver texto para una mayor explicación.

Sistrurus ravus se agrupó en la base de todas las especies del género *Crotalus* (Figura 4b, recuadro rojo), y en base a ello y al considerar al número y tamaño de las escamas de la cabeza como una plesiomorfia, *S. ravus* fue considerada como otra especie del género *Crotalus*, refiriéndola como *Crotalus ravus* (Murphy et al., 2002)

Finalmente, y de interés para el presente estudio, Murphy y sus colaboradores mencionan a otras tres especies insulares, *C. estebanensis*, *C. angelensis* y *C. lorenzoensis*, que no

incluyeron en el análisis, pero suponen “especies hermanas” de algunas de las que si se incluyeron en el análisis, y por ello pudieron estar relacionadas con alguno de los grupos que reportaron. Por ejemplo *C. estebanensis* estaría incluida en el grupo que incluye a la especies *C. durissus*, *C. vegrandis*, *C. unicolor*, *C. enyo*, *C. basiliscus* y *C. molossus*; *Crotalus angelensis* en el grupo de *C. mitchellii* y *C. tigris*, mientras que *C. lorenzoensis* estaría en un grupo junto con *C. atrox*, *C. adamanteus*, *C. catalinensis*, *C. exsul*, *C. ruber* y *C. tortugensis*. El presente estudio pretende verificar la valides de ésta suposición.

Castoe et al. (2007), utilizaron las secuencias de un fragmento del ADN mitocondrial que codifica la cuarta subunidad de la NADH deshidrogenasa, más las porciones que codifican para los ARN de transferencia de serina, histidina y leucina (llamados en conjunto ND4). Con este marcador identificaron la estructura genética poblacional y los patrones históricos demográficos de *Crotalus atrox* de la porción continental de México (con muestras de San Luis Potosí, Sonora, Veracruz y Zacatecas) y Estados Unidos (Arizona, California, Nuevo México y Texas). Para evaluar la monofilia de *C. atrox* incluyeron dos especies cercanamente emparentadas: *Crotalus tortugensis* (de Isla Tortuga, en el Golfo de California) y *C. ruber* (de California), además de *Crotalus molossus* (Texas) y a *C. tigris* (Arizona). Adicionalmente incluyeron una muestra de *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz, B. C. S. (misma que en 2003, Murphy y colaboradores definieron como perteneciente a *C. atrox*). Con los resultados encuentran un aislamiento de poblaciones en múltiples refugios pleistocénicos en la porción continental de México, pero por el lado de las relaciones filogenéticas encuentran que *Crotalus tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz se anidan fuertemente dentro de los linajes continentales de *Crotalus atrox*, sugiriendo que ambos taxa insulares debe ser consideradas como sinónimos de *C. atrox* (Figura 5).

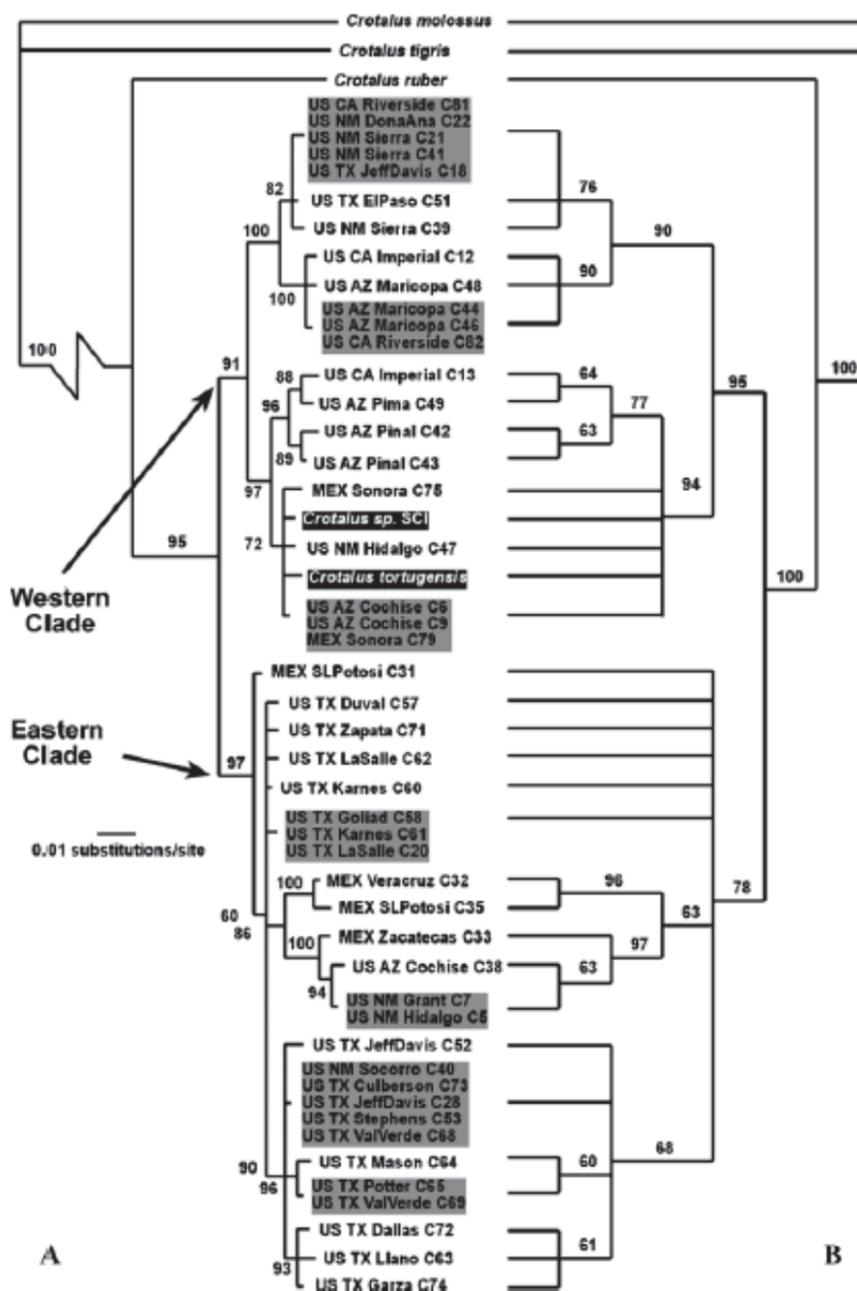


Figura 5. Relaciones filogenéticas inferidas a partir de secuencias de los genes NADH deshidrogenasa y ND4 de *Crotalus atrox* y *C. tortugensis* reportado en Castoe et al., 2007. **A)** Filogenia estimada usando el método de análisis filogenético bayesiano. **B)** Árbol de consenso estricto obtenido del análisis de máxima parsimonia. Se observa el anidamiento de *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz, dentro de los linajes continentales de *C. atrox* (recuadros negros).

El trabajo de Murphy y sus colaboradores (2002) es el estudio más extensivo que existe acerca de las relaciones filogenéticas de las serpientes de cascabel que habitan la región de la península de Baja California y sus islas asociadas.

Existen otros estudios en los que utilizan secuencias de ADN mitocondrial para resolver cuestiones de taxonomía alfa entre subespecies o poblaciones de alguna de las especies del género *Crotalus* que habitan la península de Baja California. Por ejemplo, en 2007, Douglas y sus colaboradores llevan a cabo un trabajo con dos genes mitocondriales (ATPasa 6 y 8) más dos intrones del ADN nuclear (intrones 5 y 6 de la proteína ribosómica RP40) en conjunto con caracteres morfológicos para proponer la elevación a nivel de especie de *Crotalus mitchelli stephensi*, una de las cinco subespecies de *C. mitchelli*.

En ningún otro de los trabajos anteriormente citados donde se utilizan marcadores moleculares, se incluyen muestras de individuos de todas las especies insulares endémicas que habitan las islas del Golfo de California, en específico: *C. angelensis*, *C. muertensis*, *C. lorenzoensis*, *C. estebanensis*, *C. tortugensis* y *C. catalinensis* para poder llevar a cabo una reconstrucción de su filogenia y poder determinar sus relaciones filogenéticas con las demás especies que habitan la región.

2.4 Métodos de reconstrucción filogenética

Los modelos evolutivos en filogenias moleculares describen el modo y la probabilidad de que una secuencia de nucleótidos cambie a otra secuencia de nucleótidos homóloga a lo largo del tiempo. Es decir, los modelos van a describir la probabilidad de que se produzca el cambio de un nucleótido a otro a lo largo de las ramas de un árbol filogenético y por lo tanto es una hipótesis de trabajo que tendrá que ser rechazada o aceptada de acuerdo a la mejor topología del árbol con un muy buen soporte de los nodos. Por ello es necesario especificar un modelo de sustitución o evolución nucleotídica para la secuencia de ADN bajo estudio (Varcárcel, 2013).

Existen diversos métodos de análisis para estimar reconstrucciones filogenéticas a partir de datos moleculares. Dichos métodos se pueden dividir en dos grandes grupos según el procedimiento seguido, los métodos de distancia o “puramente algorítmicos” como UPGMA y Neighbour-Joining (NJ); estos incluyen en el proceso de obtención del árbol el criterio de selección y no hacen búsqueda de árboles, por lo tanto no realizan de manera explícita una optimización de una función de selección con base en un criterio establecido. El otro grupo son los métodos de búsquedas de árboles basados en criterios de optimización como Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI), estos realizan búsquedas de árboles sobre los que se optimiza una función según el criterio bajo el que son evaluados: mínimo número de cambios evolutivos en MP, máxima verosimilitud en ML y máxima probabilidad *a posteriori* en BI (Varcárcel, 2013).

2.4.1 Análisis con parsimonia

El método de máxima parsimonia (MP) realiza búsquedas de árboles usando como criterio de optimización la parsimonia, es decir, intenta seleccionar el árbol más corto (o más parsimonioso), el cual será el que requiera menos pasos para explicar la matriz de datos y por lo tanto el menos homoplásico. Este método optimiza la longitud del árbol calculada como el total de los cambios evolutivos (número de transformaciones de un estado de carácter a otro) necesarios para explicar un árbol a partir de los datos. Un punto crítico de este método es la subestimación de la cantidad de cambio evolutivo. Al asumir la explicación más sencilla, la MP no tiene en cuenta la posibilidad de que para una misma secuencia y en una misma posición se hayan producido varios cambios a lo largo del tiempo (p. ejem. $t_0 = A$, $t_1 = T$, $t_2 = A$) (Farris, 1983; Felsenstein, 1985; Varcárcel, 2011).

2.4.2 Análisis de máxima verosimilitud

El método de máxima verosimilitud (ML) intenta estimar la cantidad de cambio real de acuerdo con un modelo establecido. Este método evalúa la hipótesis (el árbol) mediante una función (verosimilitud) que maximiza la probabilidad de obtener los datos –matriz de

secuencias de ADN– dado el árbol y el modelo evolutivo. De esta forma, conforme al criterio de ML el mejor árbol de cuatro secuencias conectadas dos a dos es aquel que presenta el mayor valor de verosimilitud, independientemente del número de transformaciones de estados de carácter que necesite (Varcárcel, 2013).

2.4.3 Análisis de inferencia bayesiana

El método de inferencia bayesiana (BI) se basa en la búsqueda de árboles que maximicen la probabilidad a posteriori de los árboles, dados los datos (matriz de secuencias de ADN) y el modelo evolutivo. Este método utiliza el Teorema de Bayes que calcula la probabilidad a posteriori a partir de los valores de probabilidad a priori y verosimilitud. La probabilidad *a priori* de los árboles representa la probabilidad de cada uno de los árboles posibles previa a cualquier observación (datos y modelo). Esto es, si por ejemplo, tenemos tres especies, sólo hay tres árboles posibles que las conecten dos a dos, la probabilidad *a priori* de cada uno de estos tres árboles sería la misma para cada uno. En cambio, la verosimilitud de cada uno de estos tres árboles será distinta al considerar las observaciones (datos y el modelo). Así, la verosimilitud de cada árbol sería proporcional a la probabilidad de los datos dado el árbol y el modelo. Por último, la probabilidad *a posteriori* es proporcional a la probabilidad del árbol, dados los datos y el modelo y se calcula combinando la probabilidad *a priori* y la verosimilitud (Varcárcel, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Las serpientes de cascabel endémicas de las islas del Golfo de California son importantes elementos ecológicos en las islas que habitan y son especies que han quedado geográfica y reproductivamente aisladas de las demás especies de serpientes de cascabel que habitan la península de Baja California y la parte continental de México, lo que las podría constituir como importantes objetos en el estudio de la historia evolutiva de dicho grupo. Ante la falta de trabajos que analicen de manera conjunta, en base al uso de secuencias de ADN mitocondrial, las relaciones filogenéticas de las seis especies de serpientes de cascabel endémicas de las islas del Golfo de California: *Crotalus angelensis*, *Crotalus catalinensis*, *Crotalus estebanensis*, *Crotalus lorenzoensis*, *Crotalus muertensis* y *Crotalus tortugensis*, con respecto a las demás especies del género que habitan la región, se hace evidente la necesidad de llevar a cabo el presente trabajo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Reconstruir la filogenia de las serpientes de cascabeles del género *Crotalus* endémicas de las Islas del Golfo de California mediante el uso de secuencias de ADN mitocondrial.

4.2 Objetivos particulares

Definir las relaciones de ancestría-descendencia entre las distintas especies de serpientes de cascabel del género *Crotalus* que habitan la península de Baja California y sus islas asociadas, utilizando para ello secuencias de los genes mitocondriales 12S ADNr y 16S ADNr.

A partir de secuencias de fragmentos de los genes mitocondriales 12S ADNr y 16S ADNr reconstruir las relaciones filogenéticas de las distintas especies de serpientes de cascabel que habitan la región de estudio por medio de tres métodos de reconstrucción filogenética: máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana.

Comparar los resultados obtenidos a partir de este trabajo con los obtenidos previamente por otros investigadores acerca de las relaciones filogenéticas de las especies de cascabel que habitan la región que comprende la península de Baja California y sus islas asociadas.

5. HIPÓTESIS

Dado las tasas de mutación de las secuencias de dos genes del ADN mitocondrial (12S ADN_r y 16S ADN_r), la capacidad de los métodos de reconstrucción filogenética y al presunto origen ya sea insular o continental de las especies de serpientes de cascabel del género *Crotalus* que habitan seis de las islas del Golfo de California, la mayoría de las cuales nunca han sido estudiadas, se espera reconstruir las relaciones filogenéticas con respecto a otras serpientes de cascabel y por lo tanto predecir sus respectivos orígenes.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

La península de Baja California se localiza al noroeste del macizo continental de México, colindando con el océano Pacífico en su costa occidental y con el Golfo de California o también llamado Mar de Cortés en su costa oriental. Esta península abarca los estados de Baja California y Baja California Sur y se extiende por cerca de 1,250 kilómetros, constituyéndose así como la segunda península más larga del planeta (Meik, et al., 2010; Murphy y Méndez de la Cruz; 2010; INEGI, 2012).

Dentro del Golfo de California existen cerca de 900 cuerpos insulares, que van desde pequeños islotes hasta grandes islas como Isla Tiburón e Isla Ángel de la Guarda (Peña-Jiménez, et al., 1998; Rodríguez, et. al., 2006). Algunas de estas islas tienen un origen continental mientras que otras son de origen volcánico y las restantes fueron formadas por elevaciones de sedimentos del lecho marino (Murphy y Méndez de la Cruz, 2010). La mayoría de las islas del Golfo de California estuvieron conectadas a la península o a la porción continental de México durante los periodos glaciares máximos del Pleistoceno, cuando el nivel del mar descendió hasta 120 metros por debajo de su nivel actual (Van Devender y Burgess, 1985).

Por su parte, las islas del Pacífico asociadas a la península tienen una diversidad de orígenes similares a las del Golfo. Sin embargo, su número es mucho más pequeño y nunca han estado conectadas a tierra firme (Muphy et al., 2002).

El área de estudio del presente trabajo comprende los estados de Baja California, Baja California sur, seis islas del Golfo de California y una isla del Pacífico oriental, así como dos localidades de la porción continental de Sonora y dos localidades de Chihuahua.

Las 20 localidades donde se colectaron muestras de un total de 42 individuos de 16 distintas especies de serpientes de cascabel del género *Crotalus* fueron las siguientes: Ensenada, El Huerfanito, Bahía de los Ángeles, Punta San Francisquito, Las Pocitas, El

Comitán, San Antonio, El Cañón de la Zorra, El Cañón de San Dionisio, Isla El Muerto, Isla Ángel de la Guarda, Isla San Lorenzo, Isla San Esteban, Isla Tortuga, Isla Santa Catalina, Isla Coronados Sur, Puerto Peñasco, Sonoyta, Ciudad Juárez y Sierra Juárez (Figura 6).

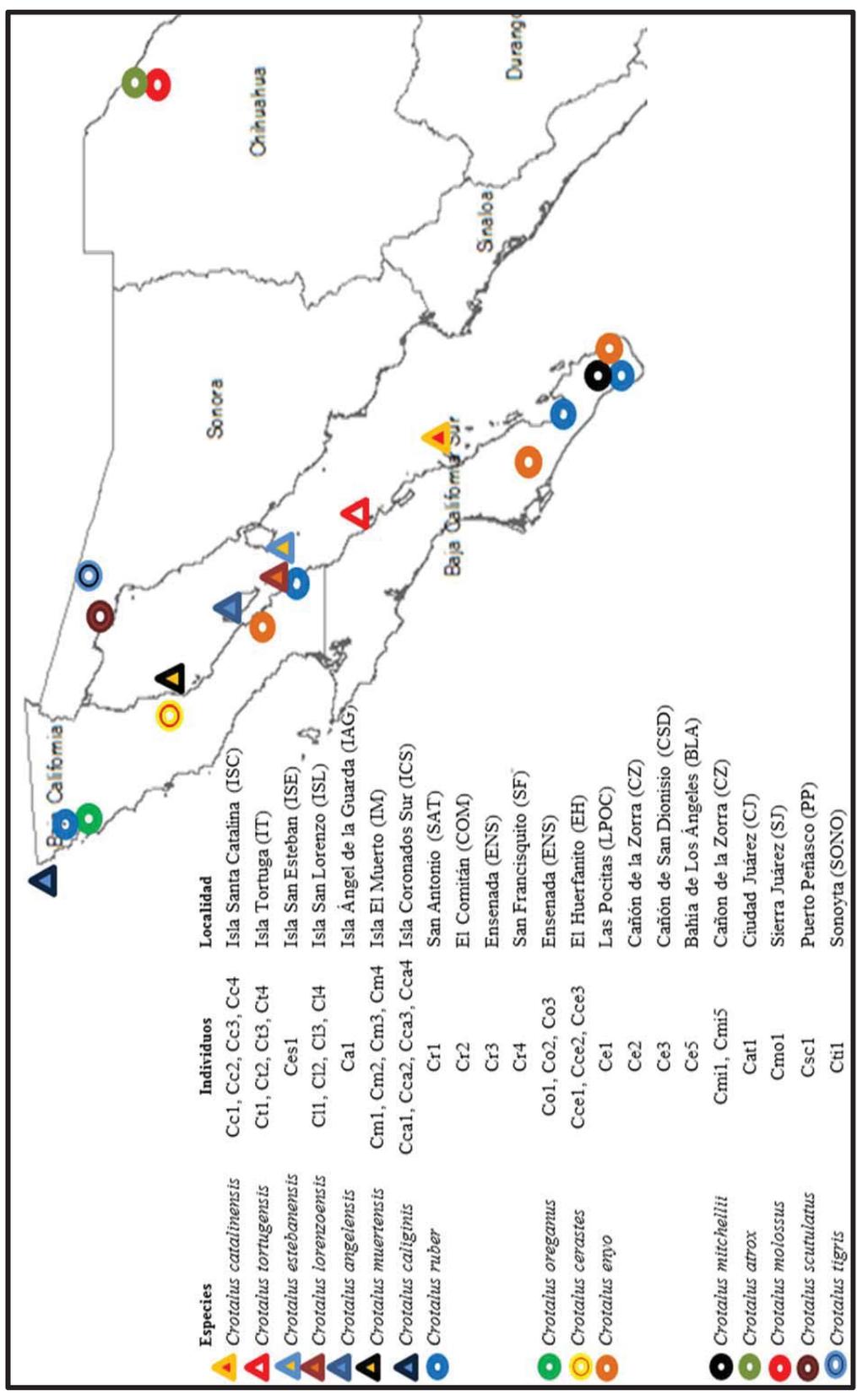


Figura 6. Mapa con las localidades donde se hicieron las recolectas de muestras de las diferentes especies de *Crotalus* a lo largo de la zona de estudio en el periodo 2004-2012.

6.2 Recolección de muestras.

La recolección de muestras para este trabajo se llevó a cabo entre 2008 y 2012. Dichas muestras consistieron de pequeños volúmenes de sangre, aproximadamente 0.1 ml, tomados directamente de la vena caudal de los individuos capturados y que inmediatamente tras su extracción fueron vaciados en tubos de 1.5 ml llenos con 1 ml de alcohol etílico al 96% para su conservación y etiquetados con los datos de identificación correspondientes a cada organismo. De igual manera se tomaron de tres a cinco fragmentos de las escamas ventrales de cada animal, estos fragmentos eran de forma alargada de unos 5 mm de largo y se conservaron en tubos de 1.5 ml con suficiente etanol al 96% para cubrirlos por completo (Figura 7).



Figura 7. Método de obtención de las muestras de sangre y escamas ventrales en cada uno de los animales incluidos en este trabajo.

La obtención de las muestras de sangre y escamas no implicó ningún daño para los animales capturados, en tanto que las muestras de músculo se obtuvieron únicamente de animales que se encontraron muertos por atropellamiento en las carreteras.

La mayor parte de las muestras fueron obtenidas directamente en campo como parte del proyecto “Vulnerabilidad de Crotálicos Microendémicos de las Islas del Golfo de

California” (Proyecto CONABIO HK051). Las excepciones fueron las muestras de *C. atrox* (Cat D2jul2011), *C. molossus* (Cmo SJ90411) y *C. tigris* (Cti 1jul2011) que fueron proporcionadas por la Dra. Ana Gatica Colima, de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Dichas muestras consistieron de gotas de sangre conservadas en tarjetas FTA™ (Laboratorios VWM International). Las muestras de *C. oreganus* (Co UABC076, Co UABC124 y Co UABC144), *C. scutulatus* (Csc UABC244) y *C. ruber* (Cr UABC184) fueron proporcionadas por el Dr. Gorgonio Ruiz Campos, responsable de la Colección Herpetológica del Laboratorio de Vertebrados de la Universidad Autónoma de Baja California. Estas muestras consistieron de fragmentos de piel e hígado preservados en alcohol etílico al 96% (Tabla II).

Tabla II. Número de muestras recolectadas por cada una de las especies, localidades donde fueron recolectadas, acrónimos de las localidades, fechas de colecta y tipo de tejido colectado.

Especies	Individuos	Clave en bitácoras	Localidad	Acrónimo	Fecha de colecta	Tejido
<i>Crotalus angelensis</i>	Ca1	Ca 01	Isla Ángel de la Guarda, B. C.	IAG	abr, 2011	sangre
<i>Crotalus atrox</i>	Cat1	Cat D2jul2011	Ciudad Juárez, Chihuahua.	CJ	jul, 2011	sangre
<i>Crotalus catalinensis</i>	Ce1	Cc 11sep08	Isla Santa Catalina, B. C. S.	ISC	sep, 2008	sangre
	Ce2	Cc 04012011	Isla Santa Catalina, B. C. S.	ISC	abr, 2011	sangre
	Ce3	Cc 04032011	Isla Santa Catalina, B. C. S.	ISC	abr, 2011	sangre
	Ce4	Cc 04092011	Isla Santa Catalina, B. C. S.	ISC	abr, 2011	sangre
<i>Crotalus caliginis</i>	Cca1	Cca 060610	Isla Coronados Sur, B. C.	ICS	jun, 2010	sangre
	Cca2	Cca 010610	Isla Coronados Sur, B. C.	ICS	jun, 2010	sangre
	Cca3	Cca 030610	Isla Coronados Sur, B. C.	ICS	jun, 2010	sangre
	Cca4	Cca 040610	Isla Coronados Sur, B. C.	ICS	jun, 2010	sangre
<i>Crotalus cerastes</i>	Cce1	Cce 09209	El Huerfanito, B. C.	EH	sep, 2009	sangre
	Cce2	Cce 050109	El Huerfanito, B. C.	EH	may, 2009	sangre
	Cce3	Cce 09109	El Huerfanito, B. C.	EH	sep, 2009	sangre
<i>Crotalus enyo</i>	Ce1	Ce pocitas	Las Pocitas, B. C. S.	POC	sep, 2012	músculo
	Ce2	Ce2 0211	Cañon de la Zorra, B. C. S.	CZ	feb, 2011	sangre
	Ce3	Ce 3	Cañon de San Dionisio, B. C. S.	CSD	ene, 2011	sangre
	Ce5	Ce Ba01	Bahía de Los Angeles, B. C.	BLA	sep, 2012	músculo
<i>Crotalus estebanensis</i>	Ces1	Ces 09022012	Isla San Esteban, Sonora.	ISE	sep, 2012	sangre
<i>Crotalus lorenzoensis</i>	Cl1	Cl 09042012	Isla San Lorenzo, B. C.	ISL	sep, 2012	sangre
	Cl2	Cl 04012011	Isla San Lorenzo, B. C.	ISL	abr, 2011	sangre
	Cl3	Cl 09032012	Isla San Lorenzo, B. C.	ISL	sep, 2012	sangre
	Cl4	Cl 09052012	Isla San Lorenzo, B. C.	ISL	sep, 2012	sangre
<i>Crotalus muertensis</i>	Cm1	Cm 03062010	Isla El Muerto, B. C.	IM	mar, 2010	sangre
	Cm2	Cm 03032010	Isla El Muerto, B. C.	IM	mar, 2010	sangre
	Cm3	Cm 051109	Isla El Muerto, B. C.	IM	may, 2009	sangre
	Cm4	Cm 05409	Isla El Muerto, B. C.	IM	may, 2009	sangre
<i>Crotalus mitchellii</i>	Cmi1	Cmi 9	Cañon de la Zorra, B. C. S.	CZ	ene, 2011	sangre
	Cmi5	Cmi 22jun10	Cañon de la Zorra, B. C. S.	CZ	jun, 2010	sangre
<i>Crotalus molossus</i>	Cmo1	Cmo SJ90411	Sierra Juárez, Chihuahua.	SJ	sep, 2011	sangre
<i>Crotalus oreganus</i>	Co1	Co UABC144	Ensenada, B. C.	ENS	may, 2005	piel

Tabla II. Continuación

	Co2	Co UABC124	Ensenada, B. C.	ENS	abr, 2005	músculo
	Co3	Co UABC076	Ensenada, B. C.	ENS	sep, 2004	músculo
<i>Crotalus ruber</i>	Cr1	Cr n=2	San Antonio, B. C. S.	SA	dic, 2011	músculo
	Cr2	Cr Ab22013	El Comitán, B. C. S.	COM	abr, 2013	sangre
	Cr3	Cr UABC184	Ensenada, B. C.	ENS	mar, 2005	piel
	Cr4	Cr 09012012	San Francisquito, B. C. S.	SF	sep, 2012	sangre
<i>Crotalus scutulatus</i>	Csc1	Csc UABC244	Puerto Peñasco, Sonora.	PP	jul, 2006	hígado
<i>Crotalus tortugensis</i>	Ct1	Ct1 2011	Isla Tortuga, B. C. S.	IT	sep, 2011	sangre
	Ct2	Ct2 2011	Isla Tortuga, B. C. S.	IT	sep, 2011	sangre
	Ct3	Ct3 2011	Isla Tortuga, B. C. S.	IT	sep, 2011	sangre
	Ct4	Ct 040110	Isla Tortuga, B. C. S.	IT	abr, 2010	sangre
<i>Crotalus tigris</i>	Cti1	Cti 1jul2011	Sonoyta, Sonora.	SONO	jul, 2011	sangre

La búsqueda de serpientes de cascabel en las diferentes localidades se llevó a cabo en dos horarios, por las mañanas de las 07:30 a las 11:30 hora, y por las tardes y noches, desde una hora antes de oscurecer y hasta las 24:00 h. La búsqueda de los animales en cada una de las localidades se realizó de manera visual por un equipo de tres a cinco personas caminando en paralelo a una distancia de 10 metros entre uno y otro, a manera de cubrir todo el terreno posible durante los horarios de búsqueda.

Los muestreos se realizaron en los diferentes hábitats de las localidades, se buscaron serpientes tanto activas (desplazándose o al acecho) como inactivas (escondidas debajo de la vegetación muerta, entre las grietas de las rocas o bajo la cobertura vegetal). Al encontrar a cada individuo se procedió a su captura e inmovilización mediante el uso de ganchos, pinzas y tubos herpetológicos. Después de la obtención de las muestras de sangre y la toma de datos, tales como su longitud hocico-cloaca (LHC), longitud cola-cloaca (LCC), peso y sexo. Se georreferenciaron los sitios de captura (GPS Garmin 12) y cada organismo fue liberado en el mismo sitio en que se encontró.

Para la determinación a nivel de especie se utilizaron los caracteres morfológicos descritos en las claves de Grismer (2002) para la herpetofauna de la región de estudio.

6.3 Extracción de ADN total.

Para la extracción de ADN total se ensayaron tres protocolos distintos: el de extracción con fenol-cloroformo (Sambrook et al, 1989); utilizando el kit DNeasy™ de Quia-Gen,

siguiendo las instrucciones del fabricante, y el protocolo de extracción con cloruro de sodio o *salting out* (Aljanabi y Martinez, 1997; Riera et al., 2010) modificado (Anexo I).

Se verificó la calidad del ADN total obtenido con cada protocolo por vía electroforesis y en geles de agarosa al 1% (TAE 1x) teñidos con Gel Red, y su posterior documentación con un biofotometro marca Eppendorf. Finalmente se decidió utilizar el protocolo de extracción con cloruro de sodio para obtener el ADN total de todas las muestras, debido a que este fue el que mostró los mejores resultados (Anexo II).

6.4 Amplificación y secuenciación de ADN

Después de hacer la búsqueda bibliográfica y revisar los trabajos realizados previamente en la zona de estudio, decidimos trabajar con los iniciadores reportados para los genes 12S ADN_r y 16S ADN_r en el trabajo de Murphy y sus colaboradores de 2003 (Tabla III). Dichos iniciadores fueron sintetizados por los laboratorios SIGMA-ALDRICH.

La estandarización de las condiciones de PCR para amplificar ambos genes antes mencionados se muestran en la Tabla II. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen total de 15 µl por reacción en un termociclador modelo MyCycler®, marca Bio-Rad® de 96 plazas.

Tabla III. Iniciadores, condiciones y programas de amplificación que fueron usados para cada uno de los dos loci mitocondriales.

Locus	Oligonucleótidos (5'-3')	Condiciones de amplificación	Programa de amplificación
12S ADN _r	F-AGGGTGACGGGCGGTGTGT R-CAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT	Buffer 1.0x	95°C / 5 min
		MgCl ₂ 2.0 mM	94°C / 30 s
		dNTP's 0.4 mM	30 c 52°C / 1 min
		Iniciadores 0.4 µM c/u	72°C / 1 min
		Taq Pol 1.0 U	72°C / 5 min
16S ADN _r	F-CCGGATCCCCGGCCGGTCTGAACTCAGATCACG R-CCGACTGTTTACCAAAAACAT	Buffer 1.0x	95°C / 5 min
		MgCl ₂ 2.0 mM	94°C / 30 s
		dNTP's 0.4 mM	30 c 50°C / 1 min
		Iniciadores 0.3 µM c/u	72°C / 1 min
		Taq Pol 1.0 U	72°C / 5 min

Los productos amplificados fueron enviados para su secuenciación bidireccional (forward-reverse) a los laboratorio de GENEWIZ en Nueva Jersey, Estados Unidos, quienes utilizan el protocolo de secuenciación de Sanger y secuenciadores automáticos ABI 3730xl para electroforesis capilar.

6.5 Edición y alineamiento de secuencias.

Una vez obtenidas las secuencias para ambos genes, estas se revisaron y editaron de manera manual con el programa CodonCode Aligner (versión 5.0.2. Codon Code Corporation).

Para los grupos externos en este trabajo se utilizaron las mismas especies usadas por Murphy y colaboradores en 2003, cuyas secuencias se descargaron de la base de datos de secuencias genéticas del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (GenBank®). Las especies, los números de accesos de las secuencias y las localidades de donde provienen las muestras se enlistan en la tabla IV.

Tabla IV. Números de acceso del GenBank para las secuencias de los individuos utilizados como grupo externo.

Especie	Individuo	12S ADNr	16S ADNr	Localidad	Acrónimo
<i>Agkistrodon contortix</i>	Ac1	AF259224.1	AF259117.1	Estados Unidos	EU
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	Ap1	AF259225.1	AF259118.1	Estados Unidos	EU
<i>Sistrurus catenatus</i>	Sc1	AF259226.1	AF259119.1	Ontario, Canadá	CAN
<i>Sistrurus miliarius</i>	Sm1	AF259227.1	AF259120.1	Florida, Estados Unidos	FLO

Se incluyeron como grupo externo a las dos especies de *Sistrurus* debido a que representan al otro género de serpientes de cascabel, mientras que las dos especies del género *Agkistrodon* se incluyeron por ser miembros de la misma subfamilia (Crotalinae), pero que no comparten la presencia del crótalo con *Crotalus* y *Sistrurus*. Se decidió no incluir grupos externos más lejanos del grupo interno debido a que podrían alterar la longitud relativa de las ramas y con ello generar topologías desequilibradas y alterar la topología interna del grupo de estudio debido al fenómeno de atracción de ramas largas (Felsenstein 1978; Wheeler, 1990), disminuyendo la probabilidad de obtener el árbol correcto.

El alineamiento de las secuencias de cada conjunto de datos (12S ADNr y 16S ADNr) se realizó con ClustalX v2.1 (University College Dublin).

Los porcentajes de cada una de las bases nitrogenadas obtenidas en las secuenciaciones, así como las distancias genéticas entre los distintos haplotipos (calculadas mediante el método de Kimura 2 parámetros) (Kimura, 1981) se obtuvieron con el programa MEGA versión 6 (Tamura et al., 2013).

6.6 Prueba de homogeneidad de particiones.

Para comprobar si las particiones provenientes tanto del gene 12S ADNr como del gene 16S ADNr son homogéneas y por lo tanto combinables entre sí, se llevó a cabo una prueba estadística de incongruencia en las diferencias de longitud (ILD por sus siglas en inglés) (Farris et al., 1995) que viene implementada como prueba de homogeneidad de particiones en el programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002).

La prueba ILD evalúa la diferencia entre el número de pasos requeridos para el análisis individual y el combinado. Cuando el valor de $p < 0.05$ indica la pérdida de incongruencia en los datos y por tanto las matrices evaluadas pueden ser combinadas (Díaz, 2008). Se utilizaron las opciones de inserciones-delecciones tratadas como datos ausentes y los caracteres sin asignarle peso, ni orden, con 1000 réplicas.

6.7 Selección de los modelos de sustitución.

Con el programa JModeltest versión 2.1.3 (Darriba et al., 2012) se evaluaron 88 modelos candidatos para encontrar el mejor modelo que se ajustara a la evolución nucleotídica de cada conjunto de datos (tanto las secuencias de los genes 12S ADNr y 16S ADNr, y las secuencias de ambos genes una vez concatenados) con el criterio de información de Akaike (AIC).

6.8 Métodos de reconstrucción filogenética

En el presente trabajo se utilizaron los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB) para realizar las reconstrucciones de las relaciones filogenéticas de las especies de estudio, incluyendo a las especies del grupo externo.

6.8.1 Máxima parsimonia.

Para este análisis se utilizó el programa PAUP* versión 4.0 b10 (Swofford, 2002), se estableció el tipo de búsqueda heurística con un intercambio de ramas del tipo “*árbol de bisección-reconexión*” (TBR), con adición aleatoria de secuencias, un número de réplicas de 10,000, retención de un número máximo de árboles a 100,000 y se obtuvo una topología de inicio por medio de la opción de “*adiciones paso a paso*”. Posteriormente se obtuvo el soporte de la señal de clados por medio de la prueba de “*Bootstrap*” con 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) y se obtuvo un árbol de consenso de mayoría (50%) con soporte nodal a partir de las topologías obtenidas en el análisis.

6.8.2 Máxima verosimilitud.

Para este análisis se utilizaron los modelos evolutivos obtenidos con JModeltest para cada conjunto de datos, tanto por separado como concatenados con el programa PAUP* versión 4.0 b10 (Swofford, 2002). Se llevó a cabo una búsqueda heurística con el algoritmo de *stepwise* usando una adición de secuencias aleatoria con 1000 repeticiones y re-arreglos del tipo *Bisection-Reconnection*. Para el soporte estadístico de las ramas se hizo una prueba de *bootstrap* con 1000 repeticiones.

6.8.3 Inferencia bayesiana.

El análisis de BI de cada secuencia de ADN mitocondrial, tanto por separado como una vez concatenados, se realizó utilizando los modelos de sustitución nucleotídica obtenidos con JModeltes y con el programa MrBayes versión 2.0 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), con dicho programa se calcularon las probabilidades usando la Cadena de Monte Carlo de Markov (MCMC). Se corrió el análisis a un millón de generaciones por medio de dos corridas independientes con cuatro cadenas cada una. Los árboles obtenidos fueron muestreados cada 1000 generaciones después de un calentamiento o “*burn-in*” inicial del 25% a fin de eliminar aquellos árboles obtenidos antes de la estabilización de la varianza por debajo de un valor de 0.01 (Draper, 2011); para el soporte estadístico de nodos se calcularon las probabilidades a posteriori (pp).

7. RESULTADOS

7.1 Secuencias obtenidas

Del gen 16S ADN_r se obtuvieron secuencias de 42 individuos, mientras que del gen 12S ADN_r solo se obtuvieron secuencias de 40 individuos, debido a que para el individuo de *C. scutulatus* (Csc1) y uno de los individuos de *C. lorenzoensis* (Cl2) se obtuvieron amplificaciones de mala calidad. Las secuencias de este gen, para dichos individuos, presentaron demasiados huecos (gaps) y al revisar los electroferogramas de ambas secuencias no se podía distinguir de manera confiable entre los picos de la señal de las bases nitrogenadas de la secuencia y la señal de fondo, por lo tanto se decidió eliminarlas del análisis.

Tras la edición se obtuvieron fragmentos homogéneos para todas las especies de 358 pb, con 77 sitios variables, 46 de ellos informativos, para el gen 12S ADN_r; y fragmentos de 488 pb, con 75 sitios variables, 45 de ellos informativos, para el gen 16S ADN_r.

Algunas de las secuencias obtenidas de los diferentes individuos tuvieron secuencias idénticas, dichas secuencias o haplotipos idénticos podía ser representados por una sola secuencia en los análisis filogenéticos a fin de simplificar las topologías de los árboles obtenidos con los diferentes métodos.

Con el programa DAMBE (versión 5.3.70) (Xia X., 2013) se identificaron esas secuencias idénticas y se editaron los nombres para identificarlas, compilando los nombres de las muestras (y el acrónimo de sus localidades respectivas) para identificar esas secuencias idénticas pero que provenían de diferentes individuos. De esta forma se obtuvieron 23 distintos haplotipos para el gen 12S ADN_r12S ADN_r, 26 haplotipos para el gen 16S ADN_r16S ADN_r y 27 haplotipos para ambos genes una vez concatenados.

Los diferentes haplotipos obtenidos para cada uno de los genes, tanto por separado como una vez concatenados, y el número de individuos para cada haplotipo se presentan en la tabla V. En ella se puede observar que una vez concatenados ambos genes *Crotalus angelensis*, *C. mitchellii*, *C. estebanensis*, *C. molossus*, *C. atrox*, *C. lorenzoensis*, *C. caliginis*, *C. oreganus*, *C. cerastes*, *Sistrurus catenatus*, *S. miliarius*, *Agkistrodon contortix* y *A. piscivorus* presentaron un solo haplotipo. Por su parte, *C. muertensis*, *C. tortugensis* y *C. catalinensis* presentaron dos haplotipos, mientras que *C. ruber* y *C. enyo* presentaron cuatro distintos haplotipos.

Tabla V. Número de haplotipos y número de individuo por haplotipo para cada gen por separado y una vez concatenados. Las abreviaturas de las especies y los acrónimos de las localidades son los mismos de la tabla II.

12S ADN	12S ADN	16S ADN	16S ADN	Concatenados (12S ADN + 16S ADN)
Ca1 (IAG)		Ca1 (IAG)		Ca1 (IAG)
Cm1, Cm2, Cm3, Cm4 (IM)		Cm1, Cm2, Cm3 (IM) Cm4 (IM)		Cm1, Cm2, Cm3 (IM) Cm4 (IM)
Cmi1, Cmi5 (CZ)		Cmi1, Cmi5 (CZ)		Cmi1, Cmi5 (CZ)
Ces1 (ISE)		Ces1 (ISE)		Ces1 (ISE)
Cmo1 (SJ)		Cmo1 (SJ)		Cmo1 (SJ)
Cti1 (SONO)		Cti1 (SONO)		Cti1 (SONO)
Cat1 (CJ)		Cat1 (CJ)		Cat1 (CJ)
Ct1, Ct2, Ct3, Ct4 (IT)		Ct1, Ct2, Ct3 (IT) Ct4 (IT)		Ct1, Ct2, Ct3 (IT) Ct4 (IT)
Cc1, Cc2, Cc3, Cc4 (ISC)		Cc1, Cc3, Cc4 (ISC) Cc2 (ISC)		Cc1, Cc3, Cc4 (ISC) Cc2 (ISC)
Cl1, Cl3, Cl4 (ISL) Cr3 (ENS) Cr4 (SF)		Cl1, Cl2, Cl3, Cl4 (ISL) Cr3 (ENS) Cr4 (SF)		Cl1, Cl3, Cl4 (ISL) Cr3 (ENS) Cr4 (SF)
Cr1 (SA) Cr2 (COM)		Cr1 (SA) Cr2 (COM)		Cr1 (SA) Cr2 (COM)
Cca1, Cca2, Cca3, Cca4 (ICS)		Cca1, Cca2, Cca3, Cca4 (ICS)		Cca1, Cca2, Cca3, Cca4 (ICS)
Co1, Co2, Co3 (ENS)		Co1, Co2, Co3 (ENS)		Co1, Co2, Co3 (ENS)
Cce1, Cce2, Cce3 (EH)		Cce1, Cce2, Cce3 (EH)		Cce1, Cce2, Cce3 (EH)
Ce1 (POC)		Ce1 (POC)		Ce1 (POC)
Ce2 (CZ)		Ce2 (CZ) Ce3 (CSD)		Ce2 (CZ)
Ce3 (CSD)		Ce5 (BLA)		Ce3 (CSD)
Ce5 (BLA)				Ce5 (BLA)
		Csc1 (PP)		
Sc1 (CAN)		Sc1 (CAN)		Sc1 (CAN)
Sm1 (FLO)		Sm1 (FLO)		Sm1 (FLO)
Ac1 (EU)		Ac1 (EU)		Ac1 (EU)
Ap1 (EU)		Ap1 (EU)		Ap1 (EU)
23 haplotipos		26 haplotipos		27 haplotipos

Los porcentajes de las bases en los diferentes haplotipos obtenidos con el análisis de ambos genes concatenados se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Porcentajes de las bases obtenidas para las secuencias de los diferentes haplotipos obtenidos tras la concatenación de los genes 12S ADNr12S ADNr y 16S ADNr16S ADNr.

Haplotipos	T	C	A	G	No. de bases
Ca1	30.0	20.7	28.5	20.8	840
Cat1	30.4	20.1	28.4	21.0	841
Cc1 Cc3 Cc4	30.8	20.2	28.3	20.8	842
Cc2 ISC	30.9	20.1	28.3	20.8	842
Cca1 Cca2 Cca3 Cca4	29.6	21.2	28.5	20.7	841
Cce1 Cce2 Cce3	29.9	20.8	28.5	20.8	842
Ce1	30.4	20.5	28.4	20.8	843
Ce2	30.4	20.4	28.2	21.0	843
Ce3	30.4	20.4	28.0	21.2	843
Ce5	30.2	20.5	28.5	20.8	843
Ces1	30.3	20.4	29.3	20.0	842
Cl1 Cl3 Cl4 Cr3	30.3	20.7	28.4	20.6	841
Cm1 Cm2 Cm3	30.7	20.2	28.3	20.7	840
Cm4	30.8	20.2	28.2	20.7	840
Cmi1 Cmi5	30.6	20.2	28.3	20.8	840
Cmo1	30.2	20.4	29.1	20.3	842
Co1 Co2 Co3	29.8	21.0	28.4	20.7	841
Cr1	30.5	20.3	28.3	20.9	842
Cr2	30.5	20.3	28.1	21.0	842
Cr4	30.3	20.7	28.3	20.7	841
Ct1 Ct2 Ct3	30.6	20.1	28.3	21.0	841
Ct4	30.6	20.1	28.2	21.2	841
Cti1	31.0	20.4	28.9	19.7	842
Ac1	31.0	19.4	30.1	19.5	835
Ap1	30.2	20.0	29.9	19.9	840
Sc1	30.9	19.5	29.4	20.2	841
Sm1	30.8	20.0	28.8	20.4	839
Promedio	30.4	20.3	28.6	20.6	841

Las distancias genéticas calculadas con el método de Kimura 2-parámetros y las diferencias en el número de bases entre cada uno de los haplotipos obtenidos con los dos genes concatenados se muestra en la tabla VII.

Tabla VII. Distancias genéticas calculadas con Kimura 2-parámetros (abajo a la izquierda) y diferencias del número de bases (arriba a la derecha) entre los diferentes haplotipos obtenidos al concatenar los dos genes (12S ADNr 12S ADNr y 16S ADNr 16S ADNr)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1 Cal (IAG)		24	20	19	22	32	25	22	22	24	30	27	8	10	11	33	22	24	23	26	18	17	31	38	49	55	60
2 Caf1 (CJ)	0.030		13	14	28	34	20	21	21	21	31	18	22	24	19	29	28	14	15	19	8	9	34	44	49	56	62
3 Cel, Cce3, Cce4 (ISC)	0.025	0.016		1	21	31	17	18	18	18	28	12	20	22	15	29	21	11	12	13	9	10	29	42	50	52	57
4 Ce2 (ISC)	0.024	0.017	0.001		20	30	16	17	17	17	27	13	19	21	14	28	20	12	13	14	10	11	28	41	49	51	56
5 Cca1, Cca2, Cca3, Cca4 (ICS)	0.028	0.036	0.026	0.026		34	28	25	25	27	35	25	22	24	20	36	2	23	22	26	22	23	32	43	48	50	53
6 Cce1, Cce2, Cce3 (EH)	0.041	0.043	0.039	0.038	0.043		31	33	31	31	36	36	31	33	26	38	34	35	34	35	30	31	40	46	52	53	56
7 Cel (POC)	0.031	0.025	0.021	0.020	0.036	0.040		7	7	5	27	22	23	25	22	30	28	21	22	23	16	17	30	39	45	48	55
8 Ce2 (CZ)	0.028	0.026	0.022	0.021	0.032	0.042	0.008		2	8	28	23	20	22	19	33	25	20	19	24	15	16	31	38	46	50	57
9 Ce3 (CSD)	0.028	0.026	0.022	0.021	0.032	0.040	0.008	0.002		8	30	23	20	22	19	33	25	20	19	24	15	16	33	38	46	50	57
10 Ce5 (BLA)	0.030	0.026	0.022	0.021	0.034	0.040	0.006	0.010	0.010		30	23	22	24	21	31	27	20	21	24	15	16	33	38	44	46	55
11 Ces1 (ISE)	0.038	0.040	0.036	0.034	0.045	0.046	0.034	0.036	0.038	0.038		31	28	29	27	28	35	30	29	30	29	30	32	51	53	60	60
12 Ctl, Cl3, Cl4 (ISL) Cr3 (ENS)	0.034	0.022	0.015	0.016	0.031	0.046	0.028	0.029	0.029	0.040		0.040	21	23	22	32	26	13	14	1	14	15	29	47	51	55	60
13 Cml1, Cml2, Cml3 (IM)	0.010	0.028	0.025	0.024	0.028	0.039	0.029	0.025	0.025	0.028	0.036	0.026		2	11	31	22	20	19	20	16	15	27	38	46	53	57
14 Cm4 (IM)	0.012	0.030	0.028	0.026	0.030	0.042	0.032	0.028	0.028	0.030	0.037	0.029	0.002		13	33	24	22	21	22	18	17	29	40	48	55	59
15 Cmi1, Cmi5 (CZ)	0.013	0.024	0.018	0.017	0.025	0.033	0.028	0.024	0.024	0.026	0.034	0.028	0.014	0.016		30	20	19	18	21	13	12	26	39	50	49	55
16 Cmol (SJ)	0.042	0.037	0.037	0.035	0.046	0.049	0.038	0.042	0.042	0.040	0.036	0.041	0.040	0.042	0.038		36	29	30	31	30	31	38	54	48	52	54
17 Col, Co2, Co3 (ENS)	0.028	0.036	0.026	0.025	0.002	0.043	0.036	0.032	0.032	0.034	0.045	0.033	0.028	0.030	0.025	0.046		23	22	27	22	23	32	43	46	50	53
18 Cr1 (SA)	0.030	0.017	0.013	0.015	0.029	0.045	0.026	0.025	0.025	0.025	0.038	0.016	0.025	0.028	0.024	0.037	0.029		1	14	11	12	33	44	52	49	53
19 Cr2 (COM)	0.029	0.018	0.015	0.016	0.028	0.044	0.028	0.024	0.024	0.026	0.037	0.017	0.024	0.026	0.022	0.038	0.028	0.001		15	12	13	32	43	51	50	54
20 Cr4 (SF)	0.033	0.024	0.016	0.017	0.033	0.045	0.029	0.030	0.030	0.030	0.038	0.001	0.025	0.028	0.026	0.040	0.034	0.017	0.019		15	16	30	46	50	54	59
21 Ctl, Ct2, Ct3 (IT)	0.022	0.010	0.011	0.012	0.028	0.038	0.020	0.019	0.019	0.019	0.037	0.017	0.020	0.022	0.016	0.038	0.028	0.013	0.015	0.018		1	31	39	50	54	58
22 Ctl4 (IT)	0.021	0.011	0.012	0.013	0.029	0.039	0.021	0.020	0.020	0.020	0.038	0.018	0.019	0.021	0.015	0.040	0.029	0.015	0.016	0.020	0.001		32	40	51	55	59
23 Ctl (SONO)	0.039	0.044	0.037	0.035	0.041	0.052	0.038	0.040	0.042	0.042	0.041	0.037	0.034	0.037	0.033	0.049	0.041	0.042	0.041	0.038	0.040	0.041		44	51	57	62
24 Scl (CAN)	0.049	0.057	0.054	0.053	0.056	0.060	0.050	0.049	0.049	0.049	0.067	0.062	0.049	0.052	0.050	0.072	0.056	0.057	0.056	0.060	0.050	0.052	0.057		44	52	61
25 Sm1 (FLO)	0.065	0.065	0.066	0.065	0.063	0.069	0.059	0.061	0.061	0.058	0.071	0.068	0.060	0.063	0.066	0.063	0.060	0.069	0.068	0.066	0.066	0.068	0.068	0.068		52	61
26 Acl (EU)	0.073	0.075	0.069	0.067	0.066	0.071	0.063	0.066	0.066	0.060	0.081	0.073	0.071	0.073	0.065	0.069	0.066	0.065	0.066	0.072	0.072	0.074	0.076	0.069		0.069	29
27 Apl (EU)	0.080	0.084	0.076	0.074	0.070	0.074	0.073	0.076	0.076	0.073	0.081	0.080	0.076	0.079	0.073	0.071	0.070	0.070	0.071	0.079	0.078	0.079	0.083	0.082		0.082	0.037

Abreviatura para las especies: (Ac) *Akgistrodon contortix*, (Ap) *A. piscivorus*, (Sc) *Sistrurus catenatus*, (Sm) *S. miliarius*, (Ca) *Crotalus angelensis*, (Cm) *C. muertensis*, (Cat) *C. atrox*, (Ct) *C. tortugensis*, (Cc) *C. catalinensis*, (Cl) *C. lorenzopenis*, (Cca) *C. caliginis*, (Co) *C. oreganus*, (Cce) *C. cerastes*, (Cce) *C. enyo*, (Ces) *C. estebanensis*, (Cti) *C. tigris*, (Cmi) *C. michellii*; (Cmo) *C. molossus*, (Cr) *C. ruber*. **Acrónimos de las localidades:** (EU) No especificada en Estados Unidos, (CAN) Ontario, Canadá, (FLO) Florida, E.U., (IAG) Isla Ángel de la Guardia, B.C. (IM) Isla El Muerto, B.C. (CJ) Ciudad Juárez, Chih., (IT) Isla Tortuga, B.C.S., (ISC) Isla Santa Catalina, B.C.S., (ISL) Isla San Lorenzo, B.C., (ENS) Ensenada, B.C., (SF) San Franciscoquito, B.C., (ICS) Isla Coronados Sur, B. C., (EH) El Huerfánto, B.C., (POC) Las Pocitas, B.C.S., (BLA) Bahía de los Angeles, B.C., (CZ) Cañón de la Zorra, B.C.S., (CSD) Cañón de San Dionisio, B.C.S., (ISE) Isla San Esteban, Sonora, (SONO) Sonoyta, Sonora, (SI) Sierra Juárez, Chih., (SA) San Antonio, B.C.S., (COM) El Comitán, B.C.S.

7.2 Prueba de homogeneidad de particiones.

El resultado de la prueba de homogeneidad de particiones mostro que las matrices individuales para el gen 12S ADN_r12S ADN_r y para el gen 16S ADN_r16S ADN_r presentan una señal filogenética similar ($p = 0.034$), y por lo tanto, realizar un análisis combinando de dichas particiones para tratar de obtener una filogenia más resuelta, era adecuado.

7.3 Modelo de sustitución nucleotídica.

Una vez comprobada la homogeneidad de las particiones de ambos genes, se procedió a concatenar las secuencias de ambos marcadores para cada individuos con el programa BioEdit versión 7.2.3 (Hall, 1999). Después de que ambos genes fueron concatenados la longitud total de bases alineadas fue de 846 pb para cada individuo y se procedió nuevamente a evaluar los 88 modelos candidatos para la evolución nucleotídica de ambos conjuntos concatenados, con el criterio de información de Akaike (AIC).

Con el criterio AIC se obtuvo el modelo TPM3uf (Kimura, 1981) con proporción de sitios invariables y distribución gamma (TPM3uf + I + G), con los siguientes parámetros: frecuencias de bases variables (A=0.3087, C=0.1907, G=0.1902, T=0.3104), asumiendo una matriz de 6 tasas como parámetros de intercambio (nst=6); tasas de transición y transversión Ra [AC]= 0.5738, Rb [AG]= 7.1497, Rc [AT]= 1.0000, Rd [CG]= 0.5738, Re [CT]= 7.1497, Rf [GT]= 1.0000; con una distribución gamma de tasas entre los sitios con $\alpha = 0.5470$ y una proporción de sitios invariantes igual a 0.6440.

Tras la prueba de homogeneidad de particiones y demostrar la factibilidad de unir las secuencias de ambos genes para la obtención de una filogenia mejor resuelta, se decidió llevar a cabo solo el análisis de las secuencias concatenadas a fin de simplificar la descripción y la discusión de los resultados. Sin embargo, los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias de los dos genes por separado y construidos mediante

cada uno de los tres métodos de reconstrucción (máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana) se pueden consultar en el apéndice III.

7.4 Métodos de reconstrucción filogenética.

En el árbol filogenético obtenido por los tres métodos de reconstrucción : máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI), se puede observar que ambas especies del género *Agkistrodon* (*A. piscovorus* y *A. contortix*) se agrupados como el grupo más externo, aunque en ramas largas no resueltas. Y el clado formado por las dos especies del género *Sistrurus* (*S. miliarius* y *S. catenatus*) se ubicó como el clado basal de las serpientes de cascabel con un alto soporte de bootstrap de 100% (en MP y ML) y $pp=1$ (en BI) (Figuras 8, 9 y 10, recuadros azules).

7.4.1 Análisis con máxima parsimonia.

En la topología del árbol obtenido por este método se puede observar que los tres individuos de *Crotalus cerastes*, con un único haplotipo, se ubicaron basalmente en un clado monofilético de todas las especies del género *Crotalus*, con un soporte de bootstrap del 100% (Figura 8, recuadro verde).

Después se puede ver un clado formado por *C. caliginis* (Cca) y *C. oreganus* (Co) con un soporte de bootstrap del 96% (Figura 8, recuadro amarillo). También se puede observar que los distintos haplotipos de todas las especies por arriba de este clado fueron resueltos de manera monofilética (aunque con una topología politómica), excepto *Crotalus ruber* que fue parafilético al agruparse dos de sus haplotipos con el haplotipo de *C. lorenzoensis* con un alto soporte de bootstrap de 100% (Figura 8, recuadro rojo).

Se obtuvieron algunos clados con buen soporte estadístico. El clado formado por *Crotalus angelensis*, *C. muertensis* y *C. mitchellii* con un soporte estadístico de 92 y 100% (Figura

8, recuadro negro). *Crotalus atrox* y *C. tortugensis* se agrupan en otro clado con un soporte de 100% de bootstrap (Figura 8, recuadro púrpura).

Los cuatro haplotipos de *Crotalus enyo* se agruparon en otro clado monofilético y polimórfico (Figura 8, recuadro naranja) con un soporte de 100% de bootstrap. *Crotalus estebanensis* y *C. molossus* se agruparon en otro clado, con un soporte de bootstrap de 89% (Figura 8, recuadro rosa).

Crotalus catalinensis con sus dos haplotipos se ubicó en un clado con soporte del 100% (Figura 8, elipse azul). Y finalmente, *Crotalus tigris* se ubicó sola en una rama con un soporte de bootstrap menor al 50% (Figura 8, flecha).

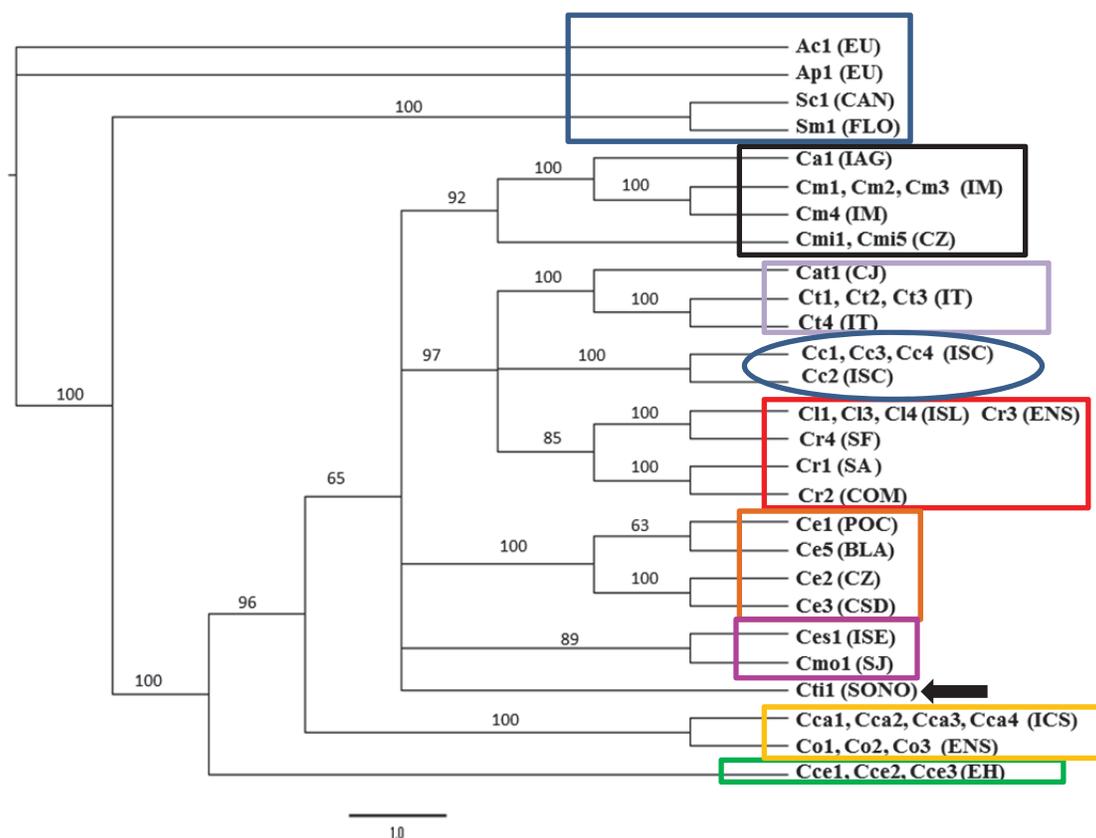


Figura 8. Topología del árbol de consenso estricto para ambos genes concatenados (12S ADNr12S ADNr y 16S ADNr16S ADNr), obtenido por el método de máxima parsimonia, se muestran los valores de soporte estadístico de bootstrap (>50) arriba de cada rama. Abreviatura para las especies: (Ac) *Agkistrodon contortrix*, (Ap) *A. piscivorus*, (Sc) *Sistrurus catenatus*, (Sm) *S. miliarius*, (Ca) *Crotalus angelensis*, (Cm) *C. muertensis*, (Cat) *C. atrox*, (Ct) *C. tortugensis*, (Cc) *C. catalinensis*, (Cl) *C. lorenzoensis*, (Cca) *C. caliginis*, (Co) *C. oreganus*, (Cce) *C. cerastes*, (Ce) *C. enyo*, (Ces) *C.*

estebanensis, (Cti) *C. tigris*, (Cmi) *C. mitchellii*; (Cmo) *C. molossus*, (Cr) *C. ruber*. Acrónimos de las localidades: (EU) No especificada en Estados Unidos, (CAN) Ontario, Canadá, (FLO) Florida, E.U., (IAG) Isla Ángel de la Guarda, B.C. (IM) Isla El Muerto, B.C.(CJ) Ciudad Juárez, Chih., (IT) Isla Tortuga, B.C.S., (ISC) Isla Santa Catalina, B.C.S., (ISL) Isla San Lorenzo, B.C., (ENS) Ensenada, B.C., (SF) San Francisquito, B.C., (ICS) Isla Coronados Sur, B. C., (EH) El Huerfanito, B.C., (POC) Las Pocitas, B.C.S., (BLA) Bahía de los Ángeles, B.C., (CZ) Cañón de la Zorra, B.C.S., (CSD) Cañón de San Dionisio, B.C.S., (ISE) Isla San Esteban, Sonora, (SONO) Sonoyta, Sonora, (SJ) Sierra Juárez, Chih., (SA) San Antonio, B.C.S., (COM) El Comitán, B.C.S.

7.4.2 Análisis de máxima verosimilitud

Con este métodos se obtuvo una filogenia más resuelta de las especies del género *Crotalus*, en comparación con el método de máxima parsimonia, con soportes que van de 60 al 100 % de bootstrap. En principio, *C. cerastes* reaparece en la rama basal del género *Crotalus* con un soporte nodal del 80% (Fig. 8, recuadro verde), mientras que *C. enyo*, con sus cuatro haplotipos, aparece como un clado bien resuelto con un soporte de 80% de bootstrap (Fig. 8, recuadro naranja).

Los clados después del grupo basal de *C. cerastes*, tienen un bajo soporte de 60% de bootstrap, al igual que el nodo de donde derivan los cinco grupos después de la bifurcación de *C. enyo*., también con un 60% de soporte.

Después se pueden observar los cinco grupos mencionados, todos muy bien soportados conformados de la siguiente manera: En uno están *Crotalus caliginis* y *C. oreganus* con un soporte de 100% (Fig. 8, recuadro amarillo); en otro clado se encuentran *C. catalinensis*, *C. lorenzoensis* y *C. ruber* con un bootstrap de 80%, en este clado se vuelve a observar que *C. ruber* es parafilético, ya que dos de sus haplotipos son monofiléticos con un 100% de soporte, otro de sus haplotipos (Cr3 ENS) es idéntico al haplotipo de *C. lorenzoensis* y otro (Cr4 SF) se relaciona cercanamente al haplotipo de *C. lorenzoensis* pero con un bootstrap menor a 50% (Fig. 8, recuadro rojo).

Crotalus atrox y *C. tortugensis* forman otro clado con un 100% de soporte (Fig. 8, recuadro púrpura), este clado se realciona con el clado de *C. catalinensis*, *C. lorenzoensis* y *C. ruber* y dicha relación tiene un soporte de 80%. Por su parte *Crotalus estebanensis*, *C. molossus* y

C. tigris forman otro clado con ramas largas y con valores de bootstrap de soporte en sus nodos menores a 50% (Fig. 8, recuadro rosa). Este clado se relaciona con el clado *C. angelensis*, *C. muertensis* y *C. mitchelli* pero sin un valor significativo de soporte (<50%).

Crotalus angelensis, *C. muertensis* y *C. mitchelli* forman un último clado, que aunque esta bien soportado (bootstrap = 100%) para la relación entre *C. angelensis* y *C. muertensis*, tiene un soporte menor al 50% para la relación de *C. mitchellii* con las otras dos especies (Fig 8, recuadro negro).

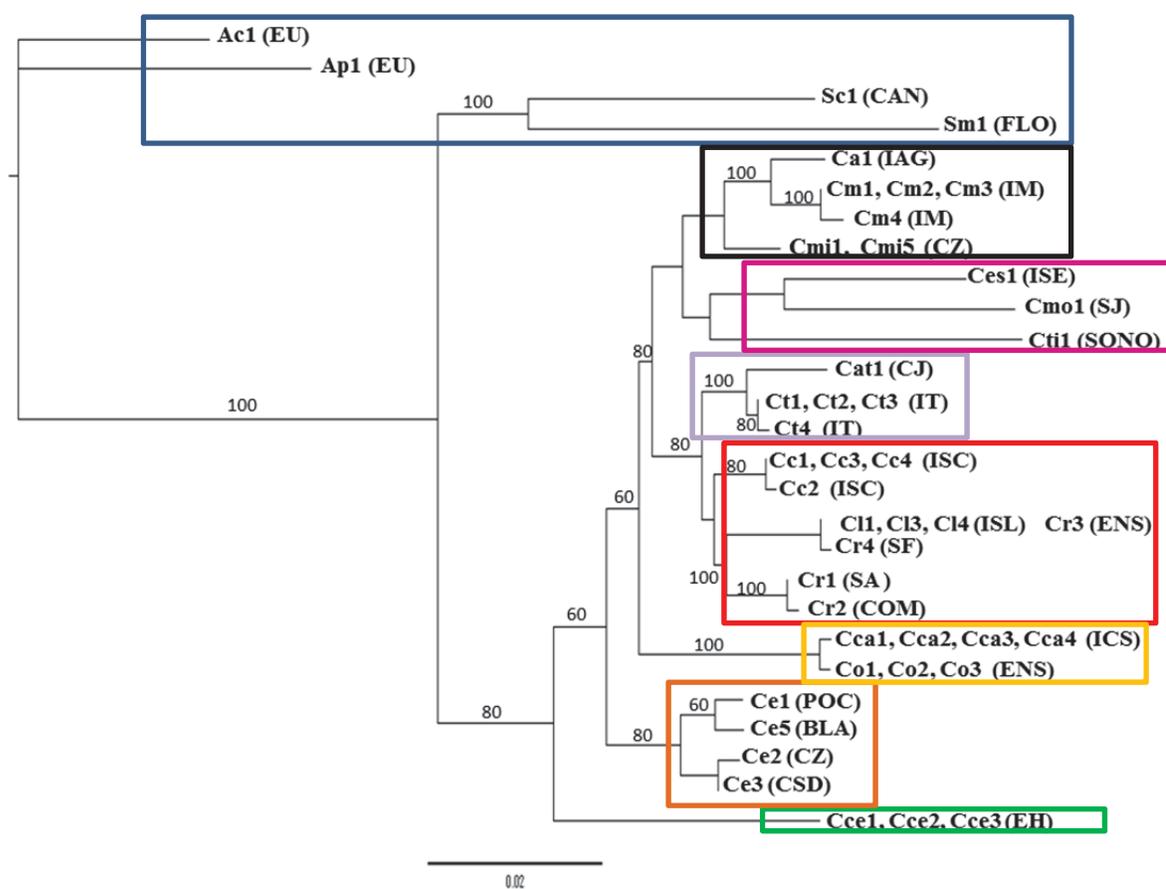


Figura 9. Topología del árbol obtenido para ambos genes concatenados (12S ADNr12S ADNr y 16S ADNr16S ADNr), obtenido con el modelo TPM3uf + I + G y con el método de máxima verosimilitud. Las abreviaturas para las especies, así como los acrónimos de las localidades son los mismos que en la figura 8.

7.4.3 Análisis de inferencia bayesiana.

En el árbol obtenido por este método se observa una buena resolución monofilética de los clados formados por las especies del género *Crotalus*, con buenos soportes de probabilidad a posterior (pp) en la mayoría de sus nodos, con valores que van de 0.6364 a 0.9994, con algunas ramas largas y politomias en la organización de los clados más externos. En su topología nuevamente vuelve a ser *Crotalus cerastes* el clado más basal del género, con un fuerte soporte de pp = 0.9973 (Fig. 9, recuadro verde). Los cuatro haplotipos de *C. enyo* aparecen en el siguiente clado basal monofilético, con una pp = 0.6364 (Fig. 9, recuadro naranja).

Por arriba de este último clado se observa un arreglo politómico de los clados, un primer clado está formado por *Crotalus estebanensis* y *C. molossus*, con una pp = 0.8761 (Fig. 8, recuadro rosa).

Un segundo clado que agrupa a *C. catalinensis*, *C. lorenzoensis* y *C. ruber* está fuertemente soportado con una pp = 0.8510, en este clado se puede observar nuevamente que *C. ruber* es parafilética al agruparse dos de sus haplotipos con el haplotipo de *C. lorenzoensis* (con una pp = 1), los otros dos haplotipos son monofiléticos entre si con una pp = 1 (Fig. 9, recuadro rojo). En otro clado están *Crotalus atrox* y *C. tortugensis* con un fuerte soporte de pp = 0.9981 (fig. 9, recuadro púrpura), este clado se agrupa como clado hermano del clado *C. catalinensis*, *C. lorenzoensis* y *C. ruber* con un alto valor de pp = 0.9837.

En otro clado están agrupadas *Crotalus angelensis* y *C. muertensis* con un fuerte valor de pp = 0.9495 y ambas se relacionan con *C. mitchellii*, con un valor de pp = 0.7962 en el nodo que soporta esta relación (Fig. 9, recuadro negro).

En un último clado están agrupadas *C. caliginis* y *C. oreganus* con un valor de pp = 1 (Fig. 9, recuadro amarillo), este clado se agrupa como clado hermano del clado formado

por *C. angelensis*, *C. muertensis* y *C. mitchellii*, pero el valor de pp que soporta el nodo de esta relación es de 0.6886.

Crotalus tigris aparece no resuelto en una rama larga, con una pp < 50 para el nodo que lo soporta.

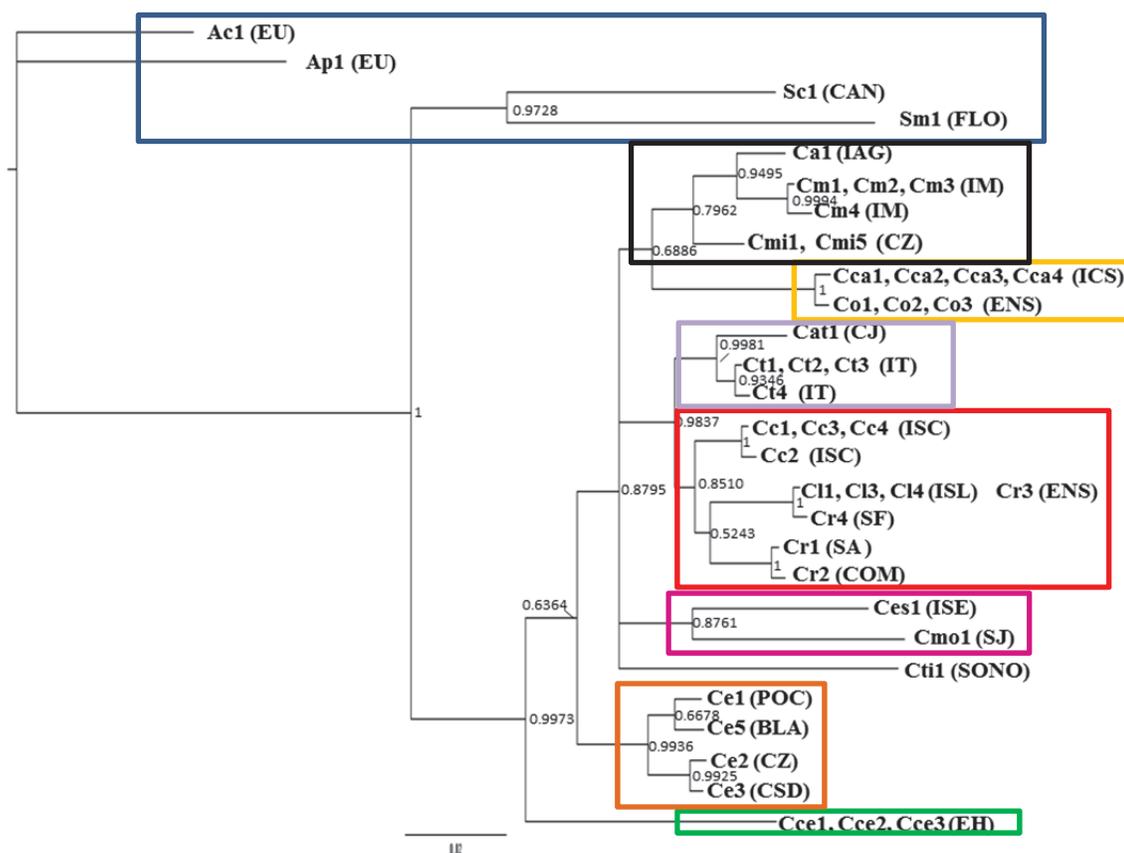


Figura 10. Topología del árbol obtenido para ambos genes concatenados (12S ADNr12S ADNr y 16S ADNr16S ADNr), obtenido con el modelo TPM3uf + I + G y con el método de inferencia bayesiana. Las probabilidades *a posteriori* (> 0.5) se encuentran en los nodos respectivos. Las abreviaturas para las especies, así como los acrónimos de las localidades son los mismos que en la figura 8.

8. DISCUSIÓN

La especie más ancestral en los tres árboles filogenéticos obtenidos en el presente trabajo es *Crotalus cerastes*, siendo una especie monomórfica, ya que los tres individuos presentaron un mismo haplotipo, y monofilética, ya que se ubicó siempre sola en un clado bien soportado por los tres métodos de reconstrucción filogenética. Su ubicación en la topología concuerda con lo referido por Murphy y colaboradores (2002), no así con lo referido por Klauber en 1972, quien la ubica como una especie hermana del clado donde se encuentran *Crotalus enyo* y *C. molossus* (las cascabeles neotropicales).

Crotalus enyo también resultó ser monofilética con un buen soporte en los tres métodos, pero fue polimórfica, ya que cada uno de los cuatro individuos incluidos en el trabajo presentaron un haplotipo distinto. Este resultado contrasta con lo que refieren Klauber (1972) y Murphy y colaboradores (2002), ya que ambos la ubican dentro del clado de las cascabeles neotropicales junto con *C. molossus* y *C. estebanensis* y ninguno de los tres árboles obtenidos en el presente trabajo la relaciona con ese clado. Además, *C. enyo* presenta un agrupamiento en dos subclados, uno que agrupó a las dos localidades por arriba del istmo de La Paz (Las Pocitas y Bahía de los Ángeles) y el otro que agrupó a las dos localidades de la Reserva de la Biosfera Sierra La Laguna (Cañón de la Zorra y Cañón de San Dionisio) en la región del Cabo, lo que hace pensar en un posible patrón filogeográfico de los haplotipos de esta especie.

El clado formado por *Crotalus angelensis*, *C. muertensis* y *C. mitchelli*, es bien soportados por inferencia bayesiana y máxima parsimonia pero no así por el método de máxima verosimilitud donde la relación de *C. mitchellii* con las otras dos especies no es bien soportada. La relación entre *C. mitchelli* y *C. angelensis* como especies hermanas es referida por Murphy y sus colaboradores (2002) pero hay que recordar que solo de manera intuitiva ya que no incluyeron secuencias de *C. angelensis* en su trabajo. Las distancias genéticas entre *C. angelensis* y *C. muertensis* va de 0.010 a 0.012, entre *C. muertensis* y *C. mitchellii* esta entre 0.014 y 0.016 y entre *C. angelensis* y *C. mitchellii* es de 0.013

El clado formado por *Crotalus caliginis* y *C. oreganus* está bien soportado en los tres métodos de reconstrucción filogenética y su distancia genética es de 0.002. Sin embargo, su posición dentro de la topología de las especies del género cambia ya que por inferencia bayesiana tienen un regular soporte de ser el clado hermano del clado formado por *C. angelensis*, *C. muertensis* y *C. mitchellii*, pero por máxima verosimilitud y máxima parsimonia tiene un fuerte soporte para considerarse un clado ubicado en una posición más ancestral dentro de la topología.

El clado formado por *Crotalus ruber* y *C. lorenzoensis* está fuertemente soportado por los métodos de inferencia bayesiana y de máxima verosimilitud, pero por el método de máxima parsimonia. En este clado se puede observar que *C. ruber* no se resuelve como una especie monofilética ya que dos de sus haplotipos se agrupan (y de hecho uno de ellos es idéntico) con el haplotipo de *C. lorenzoensis*, lo que está fuertemente soportado por máxima parsimonia e inferencia bayesiana. Esto hace pensar en la posibilidad de que los *C. lorenzoensis* en realidad no sea una especie distinta sino una población de *C. ruber* que habita la isla San Lorenzo y que *C. ruber* también presente un patrón filogeográfico de distribución de sus haplotipos al agruparse los haplotipos del sur (San Antonio y El Comitán) separados de los haplotipos del norte de la península (Ensenada y San Francisquito), con su interrupción probablemente en la parte media de la península.

El clado formado por *Crotalus atrox* y *C. tortugensis* está bien definido y soportado por los tres métodos. Sin embargo, hay diferencia en cuanto a su clado hermano, por los métodos de inferencia bayesiana y de máxima verosimilitud está altamente soportado como grupo hermano del clado formado por *C. ruber*, *C. lorenzoensis* y *C. ruber*; pero por el método de máxima parsimonia no se observa una relación entre estos dos clados.

El clado formado por *Crotalus estebanensis* y *C. molossus* es fuertemente soportado por los métodos de máxima parsimonia e inferencia bayesiana, no así por el método de máxima verosimilitud que aunque si los agrupa como especies hermanas tiene un soporte de

bootstrap <50%. La relación entre estas dos especies coincide con lo pronosticado por Murphy y colaboradores (2002), pues ellos no incluyeron muestras de este taxón en su trabajo. Su relación con los otros clados no es clara ya que por el método de máxima parsimonia e inferencia bayesiana se resuelve como un grupo aparte, sin relación con algún otro clado o especie, pero por el método de máxima verosimilitud se agrupa con *C. tigris* en un mismo clado y a su vez como el clado hermano del formado por *C. angelensis*, *C. muertensis* y *C. mitchellii*, pero con un soporte estadístico muy bajo (<50%), lo anterior hace pensar en la posibilidad de este clado (el formado por *C. estebanensis* y *C. molossus*) se trate de un grupo monofilético pero no resuelto en cuanto a sus relaciones filogenéticas con las otras especies del género incluidas en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

Este trabajo presenta las primeras secuencias de fragmentos de los genes mitocondriales 12S ADN_r12S ADN_r y 16S ADN_r16S ADN_r procedentes de las especies insulares *Crotalus angelensis*, *C. muertensis*, *C. estebanensis* y *C. lorenzoensis*.

El método de reconstrucción filogenética de inferencia bayesiana generó la mejor topología al tener una buena resolución en el agrupamiento de las especies y estar soportados la mayoría de sus nodos por altos valores de bootstrap.

Todas las especies del género *Crotalus* se agruparon como un grupo monofilético, con el género *Sistrurus* como el grupo ancestral de las serpientes de cascabel y parafilético con respecto al género *Crotalus*. *Crotalus cerastes* se ubicó como la especie ancestral de todas las serpientes de cascabel del género *Crotalus* que habitan la región de estudio.

Todas las especies de serpientes de cascabel del género *Crotalus* con diferentes haplotipos se resolvieron como especies monofiléticas, excepto *C. ruber* que resultó parafilética con *C. lorenzoensis*.

Se encontraron dos especies insulares con alto polimorfismo: *Crotalus ruber* y *C. enyo*. En *C. enyo* se puede observar un patrón de distribución filogeográfico de sus haplotipos, con lo que parece ser una disrupción en la región del istmo de La Paz, mientras que en *C. ruber* se aprecia un patrón filogeográfico con lo que parece ser un evento de vicarianza en la parte media de la península de Baja California.

Crotalus muertensis, endémica de la isla El Muerto, y *C. angelensis*, endémica de la isla Ángel de la Guarda, se agruparon como especies hermanas de *C. mitchellii*, de la región del Cabo, demostrando así su probable origen peninsular

Crotalus estebanensis, endémica de isla San Lorenzo, se agrupó como especie hermana de *C. molossus*, de Chihuahua, demostrando con ello su posible origen continental.

Crotalus lorenzoensis, endémica de la isla San Lorenzo Sur, resultó parafilética con *C. ruber*, y al ser el haplotipo de los tres individuos incluidos en este trabajo igual al haplotipo de una de las localidades del norte de la península probablemente *C. lorenzoensis* sea en realidad una población insular de *C. ruber*.

Crotalus tortugensis, endémica de isla Tortuga se agrupó como especie hermana de *C. atrox*, lo que apoya su probable origen continental, mientras que *C. catalinensis* se encontró como especie hermana de *C. ruber*, lo que apoya su origen peninsular. Ambas relaciones confirman lo referido en trabajos previos de filogenia donde se incluyeron a estas especies.

LITERATURA CITADA

Aljanabi, S. M. y I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22): 4692-4693.

Armstrong, B. L. y J. B. Murphy, J. B. 1979. The natural history of Mexican rattlesnakes. University of Kansas. Special Publication No. 5, 88 pp.

Ashton, K. G. y A. de Queiroz. 2001. Molecular Systematics of the Western Rattlesnake, *Crotalus viridis* (Viperidae), with Comments on the Utility of the D-Loop in Phylogenetic Studies of Snakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 21(2):176-189.

Avise, J. C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman y Hall, New, York, 511 pp.

Baldauf, S. L. 2003. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6): 345-351.

Beaman, K. R. y N. Wong. 2001. *Crotalus catalinensis*. *Cat. Amer. Amph. Rept.*, 733: 1-4.

Brattstrom, B. H. 1964. Evolution of the pitvipers. *Trans. San Diego Soc. Nat. Hist.* 13(11): 185-267.

Campbell, J. A., W. W. Lamar y E. D. Brodie. 2004. *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Ithaca, Comstock Pub. Associates.

Case, T. J. 2002. Reptiles. En: Case, T. J., M. L. Cody y E. Ezcurra (Eds.) *Island Biogeography in the Sea of Córtez*. University of California Press, Berkeley, pp. 221-270.

Carranza, S. 2002. Los métodos moleculares en el estudio de la sistemática y filogenia de los Anfibios y Reptiles ibéricos. Pp. 551-579. En: Pleguezuelos, J. M., R. Márquez y M. Lizana (eds.). Atlas y Libro Rojo de los Anfibios y Reptiles de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-Asociación Herpetológica Española, Madrid, 587 pp.

Castellón-Huerta, B. 2001. Cúmulo de símbolos. La serpiente emplumada. *Arqueología Mexicana* 53:28-35.

Castoe, T. A., C. L. Spencer y C. L. Parkinson. 2007. Phylogeographic structure and historical demography of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): A perspective of North American desert biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 193-212.

CONABIO (comp.). 2013. Catálogo de autoridades taxonómicas de los reptiles (Reptilia: Craniata) nativos de México. Base de datos SNIB-CONABIO. México. Incluye información del proyecto CS003.

Díaz L., J. 2008. Sistemática molecular del complejo *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) en el Caribe mexicano. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, 131 pp.

Dorcas, M. E. 1992. Relationships among montane populations of *Crotalus lepidus* and *Crotalus triseriatus*. Pp. 71–88 En J. A. Campbell and E. D. Brodie, Jr. (Eds.) *Biology of the Pitvipers*. Selva, Tyler, Texas.

Douglas, M. E., M. R. Douglas, G. W. Schuett, L. W. Porras y B. L. Thomason. 2007. Genealogical Concordance between Mitochondrial and Nuclear DNAs Supports Species Recognition of the Panamint Rattlesnake (*Crotalus mitchellii stephensi*). *Copeia*, (4):920-932.

Draper, I. 2013. Obtención de árboles mediante el método de inferencia bayesiana. En: Cómo construir una filogenia molecular paso a paso: manual de iniciación al análisis de secuencias de ADN. [curso en línea]: Universidad Autónoma de Madrid <http://ocw.uam.es/cursos/valcarcelfilogenia/1_W_Text_3.6.pdf> [Consultada: 28 de junio, 2014].

Farris, J. S., M. Källersjö, A. G. Kluge y C. Bult. 1995. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315-319.

Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates. 250 pp.

Flores-Villela, O. y L. Canseco-Márquez. 2004. Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zool. Mex.* 20(2):115-144.

Flores-Villela, O. y U. O. García-Vázquez. 2014. Biodiversidad de reptiles en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 467-475.

Foote, R. and J. A. MacMahon. 1977. Electrophoretic studies of rattlesnake (*Crotalus* and *Sistrurus*) venom: taxonomic implications. *Comp. Biochem. Physiol.*, 57: 235-241.

García-París, M. y E. L. Jockusch. 1999. A mitochondrial DNA perspective on the evolution of Iberian *Discoglossus* (Amphibia: Anura). *J. Zool.* 248: 209-218.

Greene, H. W. 1997. *Snakes: the evolution of mystery in nature*. University of California Press, 363 pp.

Grismer, L. L. 1999. An evolutionary classification of reptiles on Islands in the Gulf of California, México. *Herpetologica*, 55(4): 446-469.

Grismer, L. L. 2002. Amphibians and reptiles of Baja California, including its pacific islands and the islands in the Sea of Cortés. University of California Press, 409 pp.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment, editor and analysis program for Windows. Nucl. Acids. Symp. Ser., 41: 95-98.

Harrison, C. J. y J. A. Langdale. 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. The Plan Journal, 45: 561-572.

Hasegawa, M., H. Kishino y T. Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J. Mol. Evol., 22(2): 160-174.

Hillis, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematic. Ann. Rev. Ecol. Syst., 18: 23-42.

Holt, J.W., Holt, E.W., Stock, J.M., 2000. An age constraint on Gulf of California rifting from the Santa Rosalia Basin, Baja California Sur, Mexico. Geol. Soc. Am. Bull. 112, 540–549

INEGI. 2012. Extensión territorial: superficie continental e insular del territorio nacional. <http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/datosgeogra/extterri/frontera.cfm?c=920%20yi=e> , 2 de marzo, 2012.

Jáuregui, J. 2001. La serpiente emplumada entre los coras y huicholes. Arqueología Mexicana, 53:28-35.

Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences homologous. Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 454-458.

Klauber, L. M. 1936. *Crotalus mitchellii*, the speckled rattlesnake. Transactions of the San Diego Society of Natural History, 8: 149-184.

Klauber, L. M. 1972. Rattlesnakes: Their habits, life histories and influence on mankind. University of California Press. Berkeley. 350 pp.

Knight, A, D. Styer, S. Pelikan, J. A. Campbell, D. L. Densmore III y D. P. Mindell. 1993. Choosing among hypotheses of rattlesnake phylogeny: A best fit rate test for DNA sequence data. Systematic Biology, 42 (3): 356-367.

Lawing, A. M. y P. D. Polly. 2011. Pleistocene Climate, Phylogeny, and Climate Envelope Models: An Integrative Approach to Better Understand Species Response to Climate Change. PLoS ONE, 6(12): e28554.doi:10.1371/journal.pone.0028554

Meik, J. M., y A. Pires-daSilva. 2009. Evolutionary morphology of the rattlesnake style. BMC Evolutionary Biology, 9(1): 35.

Morrone, J. J. 2011. Sistemática, biogeografía, evolución: Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. Las Prensas de Ciencias, UNAM, México, 124 pp.

Muller, V.D., Russo, R.R., Oliveira Cintra, A.C., Sartim, M.A., De Melo Alves-Paiva, R., Figueiredo, L.T., Sampaio, S.V., Aquino, V.H., 2011. Crotoxin and phospholipases A(2) from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. Toxicon.

Murphy, R.W. y F.R. Méndez de la Cruz. 2010. The herpetofauna of Baja California and its associated islands: a conservation assessment and priorities. Pg. 238 – 273 In: L.D. Wilson, J. H. Townsend, and J.D. Johnson (eds). Conservation of Mesoamerican Amphibians and Reptiles. Eagle Mountain Publishing, LC, Eagle Mountain, Utah, 812 pp.

Murphy, R. W. y Doyle, K.D. 1998. Philophenetics: frecuencies and polymorphic characters in genealogical estimation. *Syst. Biol.* 47: 737-761

Murphy, R. W. y G. Aguirre L. 2002. Distributional checklist of nonavian reptiles and amphibians on the Islands in the Sea of Córtes. En: Case, T. J., M. L. Cody y E. Ezcurra (Eds.) *Island Biogeography in the Sea of Córtes*. University of California Press, Berkeley, pp. 580-585.

Murphy, R. W., J. Fu, A. Lathrop, J. V. Felthman y V. Kovac. 2002. Phylogeny of the rattlesnakes (*Crotalus* and *Sistrurus*) inferred from sequences of five mitochondrial DNA genes. En: Schwett, G. W., M. Hoggren, M. E. Douglas y H. W. Green (Eds.). *Biology of Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Utah, pp. 69-92.

Oskin, M., y Stock, J., 2003. Marine incursion synchronous with plateboundary localization in the Gulf of California. *Geology* 31, 23–26.

Paredes-García, D. M., A. Ramírez-Bautista y M. A. Martínez-Morales. 2011. Distribución y representatividad de las especies del género *Crotalus* en las áreas naturales protegidas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82(2): 689-700.

Parkinson, C. L. 1999. Molecular systematics and biogeographical history of *Pitvipers* as determined by mitochondrial ribosomal DNA Sequences. *Copeia*, (3): 576-586.

Passero, L.F., Laurenti, M.D., Tomokane, T.Y., Corbett, C.E., Toyama, M.H., 2008. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitol. Res.* 102: 1025-1033.

Peña-Jiménez, A., L. Durand-Smith y C. Alvarez-Echegaray. 1998. Conservación. En: Comisión Nacional para el Concimiento y Uso de la Biodivresidad (Ed.) *La diversidad*

biológica de México: Estudio de País, Mexico, pp. 183-210 esta cita esta mal citada checa como debe ser

Place, A. J. y C. I. Abramson. 2004. A quantitative analysis of the ancestral area of rattlesnakes. *Journal of Herpetology*, 38(1): 151-156.

Posada D. 2003. Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. In: Baxevanis AD, Davison DB, Page RDM, Petsko GA, Stein LD, Stormo GD, editors. *Current Protocols in Bioinformatics*. New York: John Wiley y Sons. p. 6.5.1–6.5.14.

Quintana, J. C., A. M. Chacon, L. Vargas, C. Segura, J. M. Gutierrez y J. C. Alarcon. 2011. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. *Acta Tropica*, 35: 419-430.

Quintana, J. C. 2013. Aislamiento e identificación de fosfolipasas A2 de los venenos de *Crotalus durissus cumanensis* y *Bothrops asper*, y evaluación de su potencial actividad antimalárica. Tesis Doctoral, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, 180 pp.

Reyes-Velasco, J., J. M. Meik, E. N. Smith y T. A. Castoe. 2013. Phylogenetic relationships of the enigmatic longtailed rattlesnakes (*Crotalus ericsmithi*, *C. lannomi*, and *C. stejnegeri*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3): 524-534.

Riera, M. A., Rojas, M. E., y Zapata, P. D. 2010. Protocolo de extracción de DNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Revista de Ciencia y Tecnología*, (14), 4-7.

Rodríguez V., J. A., D. Crespo C. y M. A. Cisneros-Mata. 2006. Estableciendo prioridades de conservación en islas del Golfo de California: Un ejercicio con criterios múltiples. *World Wildlife Found*, 31 pp.

Rubio G., M. 2003. Cascabel: La Serpiente Divina. ¿Cómo ves?, Dirección General de Divulgación de la Ciencia, UNAM. 60: 10-14.

Swofford, D. L. 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), Version 4. Sinauer Associates, Massachusetts, USA,

Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10 (3): 512-526.

Toyama, M.H., de Oliveira, D.G., Beriam, L.O., Novello, J.C., Rodrigues-Simioni, L., Marangoni, S., 2003. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA(2) isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon* 41, 1033-1038.

Van Devender, T. R., y Burgess, T. L. 1985. Late Pleistocene woodlands in the Bolson de Mapimi: A refugium for the Chihuahuan Desert Biota?. *Quaternary Research*, 24(3), 346-353.

Varcárcel, V. 2013. Selección del modelo evolutivo que mejor se ajuste a nuestros datos. En: *Cómo construir una filogenia molecular paso a paso: manual de iniciación al análisis de secuencias de ADN*. [curso en línea]: Universidad Autónoma de Madrid <http://ocw.uam.es/cursos/valcarcelfilogenia/1_W_Text_3.4.pdf> [Consultada: 28 de junio, 2014].

Wood, D. A., R. N. Fisher y T. W. Reeder. 2008. Novel patterns of historical isolation, dispersal and secondary contact across Baja California in the Rosy Boa (*Lichanura trivirgata*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 484-502.

Zardoya, R., y A. Meyer. 2001. On the origin of and phylogenetic relationships among living amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13):7380-7383.

Xia, X. 2013. DAMBE 5: A comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (7): 1720-1728.

Zouari-Kessentini, R., J. Luis, A. Karray, O. Kallech-Ziri, N. Srairi-Abid, A. Bazaa, E. Loret, S. Bezzine, M. El Ayeb y N. Marrakchi. 2009. Two purified and characterized phospholipases A2 from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. *Toxicon* 53: 444-453.

ANEXOS

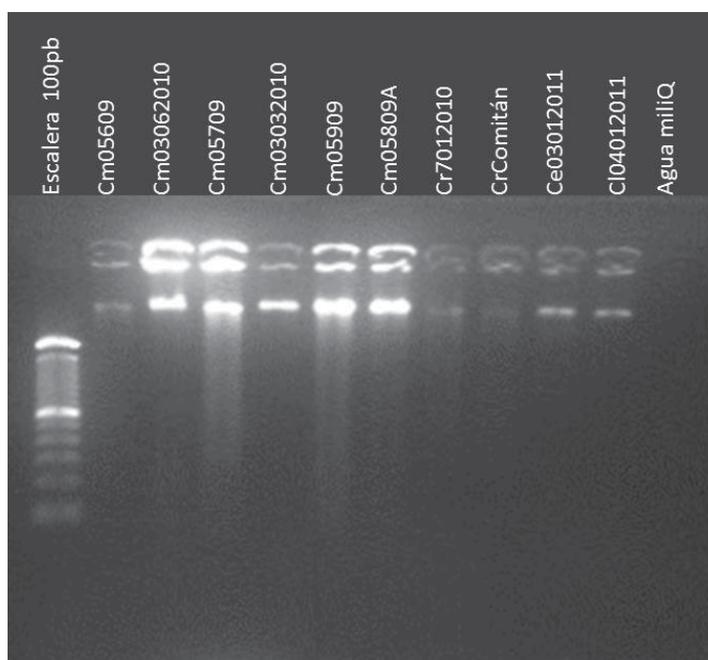
Anexo I. Versión modificada del protocolo de extracción con cloruro de sodio (Aljanabi y Martinez, 1997; Riera et al, 2010).

- Tomar el tubo con la muestra de sangre conservada en etanol al 96% y homogenizarla con la ayuda de un agitador vortex. Si se utilizan escamas, músculo o hígado se toman pequeños fragmentos de estos y se maceran sobre un cristal limpio con la ayuda de una hoja de bisturí antes de colocarlos dentro del tubo eppendorf. La sangre conservada en tarjetas FTA™ se trató igual que si fuera tejido muscular o hepático.
- Tomar una alícuota de 80 µl del homogenizado y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 ml, nuevo, estéril y rotularlo debidamente.
- Colocar el tubo por 10 minutos en el termoblock a 40°C para evaporar el etanol de la muestra.
- Agregar 410 µL de buffer de extracción + 80 µL de SDS al 20% + 15 µL de proteinasa K (a una concentración de 20 mg/ml).
- Cerrar el tubo, agitarlo con el vortex y regresarlo al termoblock para incubar a 50-55°C toda la noche.
- Centrifugar 10 minutos a 14 000 rpm.
- Decantar el sobrenadante a tubos eppendorf esterilizados, nuevos y rotulados debidamente. Desechar el tubo anterior con lo que se precipitó.
- Agregar 300 µL de cloruro de sodio 5M
- Mezclar con el agitador vortex durante 30 segundos e incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
- Centrifugar durante 20 minutos a 14 000 rpm.
- Transferir el sobrenadante a nuevos tubos eppendorf estériles y debidamente rotulados.
- Agregar 650 µL de isopropanol (2 propanol) frío. Mezclar ligeramente sin agitar el tubo.

- Incubar mínimo por una hora a -20°C , pudiéndose quedar la muestra toda la noche en el congelador.
- Centrifugar durante 10 minutos a 14 000 rpm
- Eliminar el sobrenadante y conservar el tubo con el precipitado.
- Adicionar 500 μL de etanol al 80% frío. No mezclar.
- Incubar a -20°C por una hora como mínimo.
- Centrifugar durante 5 minutos a 14 000 rpm.
- Desechar el sobrenadante.
- Precalentar el termoblock a 49°C y colocar las muestras hasta que se evapore el alcohol completamente (aproximadamente 20 minutos).
- Rehidratar el pellet resultante con 25 μL de agua ultrapura de grado molecular Tipo I (Milli-Q) y mantener en congelación a -20°C .
- Verificar la extracción de ADN en geles de agarosa al 1%

Anexo II. Visualización de ADN en geles de agarosa al 1%.

- Mezclar 0.4 g de agarosa + 40 mL de Buffer TBE 1x, verter dentro de la cámara y esperar a que gelifique.
- Aparte se mezclan 100 μ L de buffer de carga 2X + 0.3 μ L de Gel Red 10000x en DMSO (sulfóxido de dimetilo).
- En cada pozo se cargan 3 μ L de ADN + 2 μ L buffer de carga 2X preparado con Gel Red, y de escalera 1 μ L + 3 μ L de buffer de carga 2X preparado con Gel Red.
- Se dejan correr las muestras en el gel durante 20 minutos a a 70 voltios. Transcurrido el tiempo se apaga la cámara de electroforesis y se lleva el gel al fotodocumentador para observar las bandas con luz ultravioleta.



Visualización de extracciones de ADN total en gel de agarosa al 1%

Anexo III. Topologías de los árboles obtenidos con cada uno de los genes por separado (12S ADNr12S ADNr y 16S ADNr16S ADNr) por los tres distintos métodos de reconstrucción filogenética.

Máxima parsimonia.

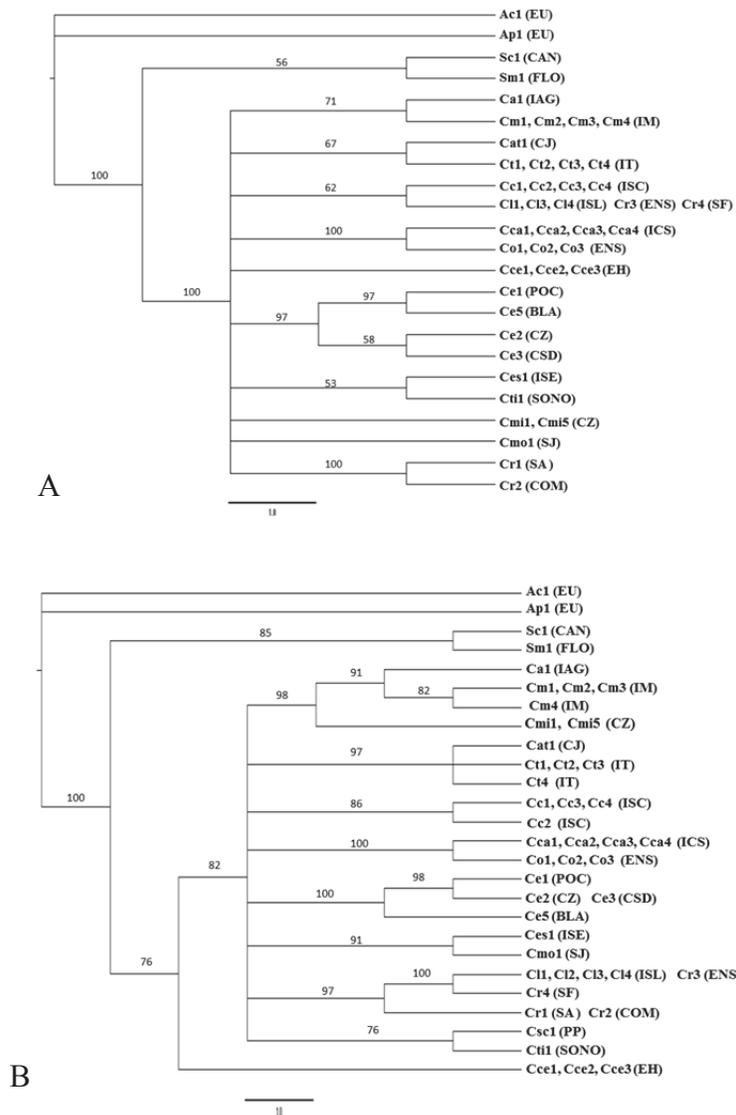


Figura 1. Topologías de los árboles de consenso estricto para los genes 12S ADNr12S ADNr (**A**) y 16S ADNr16S ADNr (**B**), ambos obtenido por el método de máxima parsimonia y con los valores de soporte estadístico de bootstrap (>50) encima de cada rama. Abreviatura para las especies: (Ac) *Agkistrodon contortix*, (Ap) *A. piscivorus*, (Sc) *Sistrurus catenatus*, (Sm) *S. miliarius*, (Ca) *Crotalus angelensis*, (Cm) *C. muertensis*, (Cat) *C. atrox*, (Ct) *C. tortugensis*, (Cc) *C. catalinensis*, (Cl) *C. lorenzoensis*, (Cca) *C. caliginis*, (Co) *C. oreganus*, (Cce) *C. cerastes*, (Ce) *C. enyo*, (Ces) *C. estebanensis*, (Cti) *C. tigris*, (Csc) *C. scutulatus*, (Cmi) *C. mitchellii*; (Cmo) *C. molossus*, (Cr) *C. ruber*. Acrónimos de las localidades: (EU) No especificada en Estados Unidos, (CAN) Ontario, Canadá, (FLO) Florida,

E.U., (IAG) Isla Ángel de la Guarda, B.C. (IM) Isla El Muerto, B.C.(CJ) Ciudad Juárez, Chih., (IT) Isla Tortuga, B.C.S., (ISC) Isla Santa Catalina, B.C.S., (ISL) Isla San Lorenzo, B.C., (ENS) Ensenada, B.C., (SF) San Francisquito, B.C., (ICS) Isla Coronados Sur, B. C., (EH) El Huerfanito, B.C., (POC) Las Pocitas, B.C.S., (BLA) Bahía de los Ángeles, B.C., (CZ) Cañón de la Zorra, B.C.S., (CSD) Cañón de San Dionisio, B.C.S., (ISE) Isla San Esteban, Sonora, (SONO) Sonoyta, Sonora, (PP) Puerto Peñasco, Sonora, (SJ) Sierra Juárez, Chih., (SA) San Antonio, B.C.S., (COM) El Comitán, B.C.S.

Máxima verosimilitud.

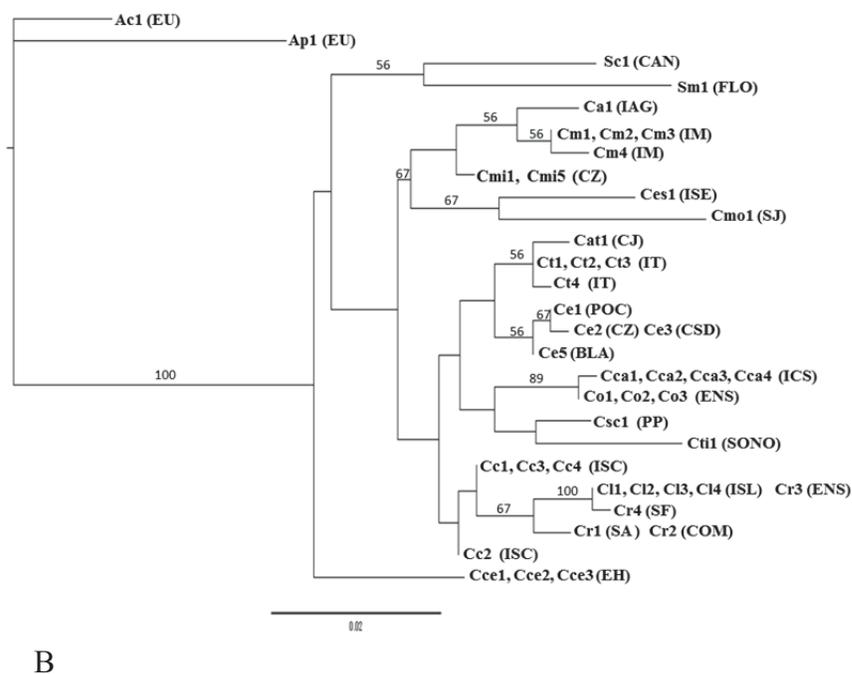
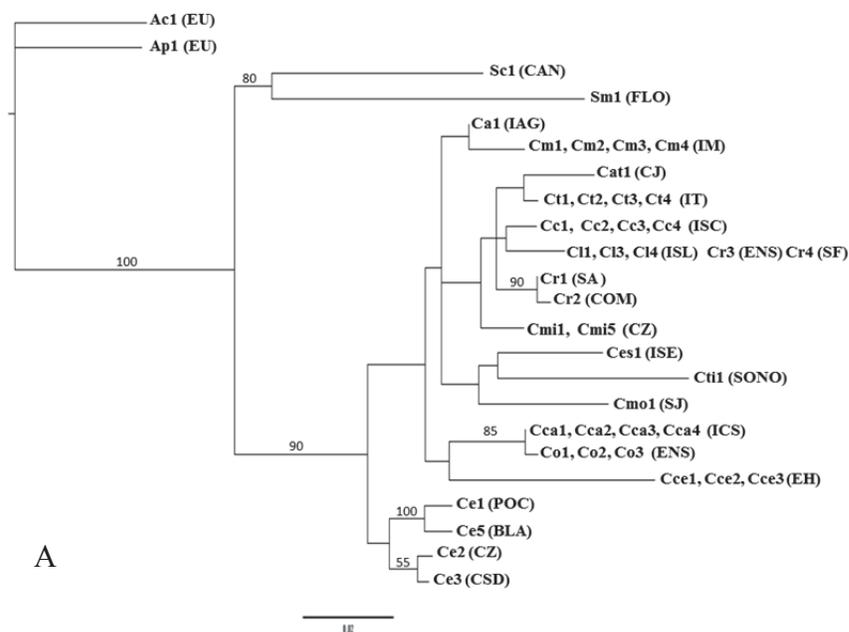


Figura 2. (A) Topología del árbol obtenido para el gen 12S ADNr12S ADNr a partir del modelo TIM2 + G, (B) Árbol para el gen 16S ADNr16S ADNr obtenido a partir del modelo GTR + I + G, ambos con el método de máxima verosimilitud. Las abreviaturas para las especies, así como los acrónimos de las localidades son los mismos que en la figura 1 de este anexo.

Inferencia bayesiana.

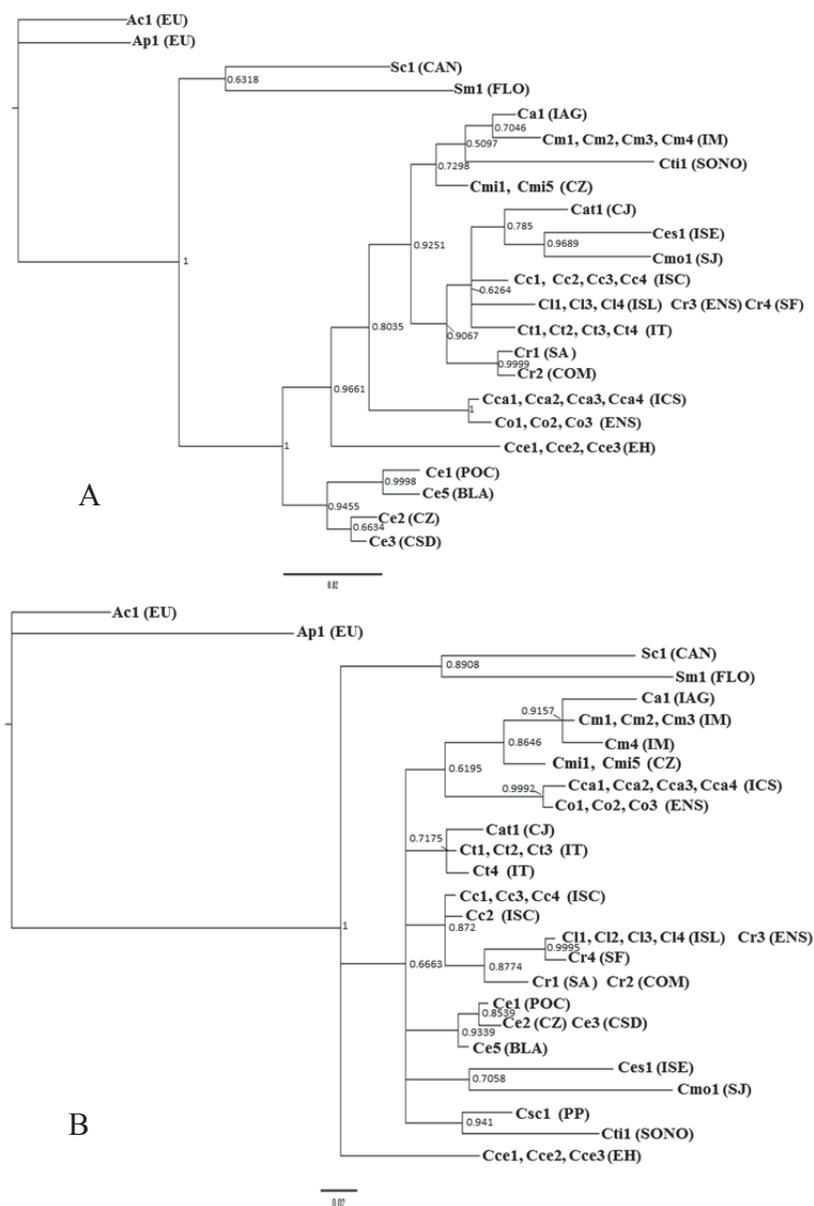


Figura 3. (A) Topología del árbol obtenido para el gen 12S ADNr12S ADNr a partir del modelo TIM2 + G, (B) Topología del árbol para el gen 16S ADNr16S ADNr obtenido a partir del modelo GTR + I + G, ambos con el método de inferencia bayesiana. Las probabilidades *a posteriori* (> 0.5) se encuentran en los nodos respectivos. Las abreviaturas para las especies, así como los acrónimos de las localidades son los mismos que en la figura 1 de este anexo.