

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



“Impacto del Aislamiento Insular en la Genética Evolutiva de Serpientes de cascabel de Isla Tortuga, Baja California Sur”

Por:

MVZ. Lisa Fernanda Guerra Herrera

Como requisito para obtener el grado de Maestría en Conservación, Fauna Silvestre y Sustentabilidad.

Cd Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. 2025

**“Impacto del Aislamiento Insular en la Genética Evolutiva de Serpientes
de cascabel de Isla Tortuga, Baja California Sur”**

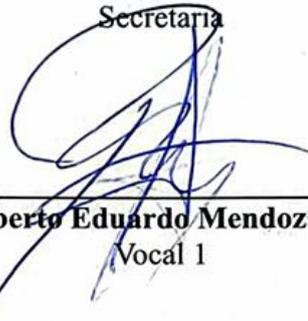
Comité de Tesis



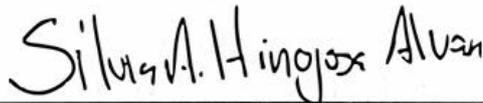
Dr. Alejandro Carbajal-Saucedo
Director de Tesis



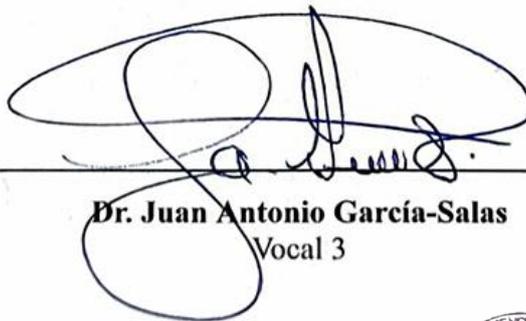
Dra. Susana Favela-Lara
Secretaria



Dr. Roberto Eduardo Mendoza-Alfaro
Vocal 1



Dra. Silvia Alejandra Hinojosa-Álvarez
Vocal 2



Dr. Juan Antonio García-Salas
Vocal 3



Dra. Katiushka Arévato-Nino
Subdirectora de Posgrado



DIRECCIÓN
DE POSGRADO

**“Impacto del Aislamiento Insular en la Genética Evolutiva de
Serpientes Cascabel de Isla Tortuga, Baja California Sur”**

Dirección de Tesis



Dr. Alejandro Carbajal-Saucedo
Director de Tesis



Dr. Gustavo Alberto Arnaud Franco
Director Externo

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

“No es el crítico el que cuenta, ni el que señala con el dedo al hombre fuerte cuando tropieza o el que indica en qué cuestiones quien hace las cosas podría haberlas hecho mejor. El mérito recae exclusivamente en el hombre que se halla en la arena, aquel cuyo rostro está manchado de polvo, sudor y sangre, el que lucha con valentía, el que se equivoca y falla el golpe una y otra vez, porque no hay esfuerzo sin error y sin limitaciones. El que cuenta es el que, de hecho, lucha por llevar a cabo las acciones, el que conoce los grandes entusiasmos, las grandes devociones, el que agota sus fuerzas en defensa de una causa noble, el que, si tiene suerte, saborea el triunfo de los grandes logros y si no la tiene y falla, fracasa al menos atreviéndose al mayor riesgo, de modo que nunca ocupará el lugar reservado a esas almas frías y tímidas que ignoran tanto la victoria como la derrota.”

— Theodore Roosevelt

Esta cita ha resonado profundamente en mi camino de maestría, recordándome que fallar y equivocarse no es más que parte esencial del proceso de aprendizaje. Agradezco a todas aquellas personas que formaron parte de mis derrotas y caídas, porque gracias a ellas aprendí a levantarme, a crecer y a entender que el error es la semilla del crecimiento.

A mis asesores, por su guía y paciencia, especialmente al Dr. Carbajal, quien me ofreció su hombro cuando más lo necesité, siendo una luz de guía que aprendí a recibir con humildad y gratitud; a la Dra. Silvia, por todas sus enseñanzas que me impulsaron a superarme cada día; a la Dra. Favela, por tenderme su mano justo cuando pensaba rendirme y por recordarme el valor de seguir adelante; y al Dr. Jesús, cuya orientación y enseñanzas en el trabajo de laboratorio me mostraron la importancia del orden, la paciencia y la capacidad de maravillarse ante la ciencia. A todos y cada uno de ustedes, les expreso mi profunda admiración y gratitud. Aprecio enormemente todo lo que dejaron en mí, y sus enseñanzas ahora forman parte de mi esencia y de mi manera de ver el mundo.

A mis amigas, por su escucha, palabras de aliento y risas compartidas, imprescindibles para sobrellevar las presiones y exigencias de esta etapa. A mi pareja, por creer en mí y sostenerme en los momentos más inciertos.

Y por supuesto, a Frida, quien no solo estuvo presente en las largas horas de estudio, sino que también se convirtió en una compañera de vida; su compañía me enseñó el valor de la constancia, la paciencia y la ternura.

Cada uno de ustedes ha sido parte fundamental de este logro, por lo cual los llevo conmigo en cada meta alcanzada y en cada proyecto que emprendo. Gracias, de corazón, por acompañarme y creer en mí cuando yo misma dudaba.

DEDICATORIAS

A la naturaleza, por recordarme siempre que la vida es un ciclo de cambio, resistencia y renovación. En ella encontré inspiración, refugio y la certeza de que todo esfuerzo tiene su recompensa.

A Frida, mi fiel compañera de siete años, quien estuvo a mi lado en cada etapa de este camino. En las madrugadas interminables de estudio, en los momentos de desvelo y agotamiento, en cada paseo en el que parecía que ya no sabía si era ella quien me sacaba a mí o yo a ella. Su compañía fue un consuelo constante, un recordatorio silencioso de que incluso en los días más difíciles, nunca estuve sola.

A Jonás, por su paciencia, su amor y su apoyo inquebrantable. Por compartir conmigo no solo este proceso, sino también la vida, con todas sus complejidades, retos y alegrías.

A mis amigas íntimas, quienes con su cariño y compañía hicieron de este camino algo más llevadero y por confiar en mí. Y de manera especial a Paola, por escucharme en los momentos de mayor frustración, por ser un refugio cuando más lo necesité y por recordarme, con su apoyo incondicional, que no tenía que atravesar este proceso sola.

A todos y cada una de las personas que formaron parte de este logro, quienes con su apoyo, enseñanzas y compañía me ayudaron a construir el camino hasta aquí. A quienes creyeron en mí cuando más lo necesitaba, a quienes me sostuvieron en los momentos difíciles y a quienes celebraron conmigo cada pequeño avance. Este trabajo no es solo el reflejo de mi esfuerzo, sino también del amor, la paciencia y el apoyo incondicional que recibí a lo largo del camino.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	5
DEDICATORIAS	6
ÍNDICE	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	14
1. RESUMEN	16
1. ABSTRACT	17
2. INTRODUCCIÓN	18
3. ANTECEDENTES	20
3.1 Relaciones evolutivas de las serpientes de cascabel	20
3.2 Marcadores moleculares	23
3.3 Análisis filogenéticos con las serpientes de cascabeles de Isla Tortuga	24
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVO DEL TRABAJO	30
6.1 Objetivo General.....	30
6.2 Objetivos Particulares	30
7. MATERIAL Y MÉTODOS	31
7.1 Área de estudio	31
7.2 Recolecta de Muestras	32
7.3 Extracción de DNA total	33
7.4 Amplificación y purificación de DNA	34
7.5 Secuenciación	37
7.6 Obtención y alineamiento de secuencias	37

7.7 Inferencia filogenética	39
8. RESULTADOS	41
8.1 Obtención y cuantificación de DNA.....	41
8.2 Estandarización de la amplificación de microsatélites.	43
8.2 Inferencia filogenética	45
8.2.2 Alineamiento.....	45
8.2.2 Modelos de sustitución	46
8.2.3 Máxima Verosimilitud de cada gen.....	49
8.2.4 Inferencias con diferentes concatenaciones.....	56
9. DISCUSIÓN	59
9.1 Estandarización de Microsatélites	59
9.2 Inferencia Filogenética	60
10. CONCLUSIONES	62
11. PERSPECTIVAS.....	63
12. BIBLIOGRAFÍA	64
13. ANEXOS	70
Protocolo extracción de DNA de Riera et al., (2010) (100 µL)	70
Protocolo de extracción de DNA de Miller et al., (1988) modificado	72
Protocolo de purificación con perlas paramagnéticas	74

ÍNDICE DE TABLAS

- Figura 1.** Iniciadores y temperaturas de alineamiento de cada uno de los locus de microsatélites y los dos genes nucleares (RAG1 y cmos). Los iniciadores marcados con un asterisco (*) fueron tomados de Pozarowski et al. 2012, los marcados con dos asteriscos (**) de Lawson et al. 2005 y los marcados con tres asteriscos (***) de Wiens et al. 2008.
- Figura 2.** Relación de especies y genes utilizados para realizar las hipótesis filogenéticas. Las claves representan el código de acceso de cada secuencia dentro de la base de datos del GenBank. Las secuencias fueron obtenidas del sitio http://www.ncbi_nih.nlm.gov ID de los genes incluidos por cada especie, revisada entre agosto y octubre del 2024.
- Tabla 3.** Concentraciones de DNA obtenidas de 30 muestras de diferentes especies, utilizando dos protocolos de extracción diferentes, Miller et al. (1988) y Riera et al. (2010). Las primeras ocho muestras se emplearon para seleccionar el protocolo más eficiente, siendo el método de Miller et al. (1988) el de mejor rendimiento. La concentración de DNA fue determinada por medio de fluorómetro (Qubit 4, Thermo Scientific)
- Tabla 4.** Resumen de la optimización de las condiciones de amplificación para microsatélites en *Crotalus tortugensis*. La tabla incluye los reportes de electroforesis capilares con las temperaturas de alineamiento que obtuvimos inespecificidad o productos ausentes (Condiciones iniciales). Asimismo, se muestran las temperaturas de alineamiento reportadas por Pozarowski et al. (2012) para cada locus. Además, se presentan las condiciones finales optimizadas, obtenidas tras ajustar las temperaturas de alineamiento para cada locus. La longitud esperada de los fragmentos amplificados, medida en pares de bases (pb), también se reporta, confirmando que las condiciones finales permitieron amplificaciones específicas dentro de los rangos establecidos para cada microsatélite.
- Tabla 5.** Cantidad de secuencias incluidas, así como la longitud de las secuencias y los sitios constantes e informativos.
- Tabla 6.** Parámetros de sustitución para los genes analizados bajo sus respectivos modelos de sustitución.

Tabla 7. Parámetros de sustitución para cada una de las particiones que se consideraron en el análisis filogenético con los genes concatenados. Para el presente proyecto se consideró particionar el alineamiento por cada uno de los genes.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Relaciones evolutivas entre las especies de serpientes de cascabel. Los recuadros en líneas punteadas señalan la composición de complejos de especies sugeridos con base en la similitud de características. Tomado sin autorización de Klauber (1972).
- Figura 2.** Hipótesis filogenética de diversas especies de cascabel propuesta por Murphy y colaboradores (2002) utilizando cinco genes mitocondriales. Los cuadros de colores señalan la composición de diversos grupos de especies; en azul se muestra el complejo *C. atrox*. Tomado sin autorización de Murphy et al., (2002).
- Figura 3.** Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *C. atrox* propuesta por Castoe et al.,(2007). A) Hipótesis filogenética con el método de inferencia bayesiana. B) Filogenia de consenso estricto con el método máxima parsimonia. El recuadro azul muestra el anidamiento de las serpientes insulares de ISC e IT, junto con las poblaciones continentales de Sonora, Nuevo México y Arizona. Tomado sin autorización de Castoe et al.,(2007).
- Figura 4.** Hipótesis filogenética utilizando análisis de inferencia bayesiana de los genes 12S y 16S. El recuadro azul muestra el complejo de especies *C. atrox*. Tomado sin autorización de Ruiz-Sánchez et al. (2019).
- Figura 5.** Mapa de ubicación de Isla Tortuga, Baja California Sur.
- Figura 6.** Visión panorámica de Isla Tortuga, visualiza la vegetación compuesta principalmente por matorral sarcocauléscente.
- Figura 7.** Obtención de muestras sanguíneas por medio de venopunción de la vena caudal. La sangre fue colectada en ausencia de anticoagulante e inmediatamente suspendida en etanol 96%. Los ejemplares fueron liberados en el mismo punto de colecta.
- Figura 8.** Integridad de DNA obtenido por los protocolos de Riera y colaboradores (2011) y Miller y colaboradores (1988) en geles de agarosa 0.7%. Se cargaron 10µl de cada muestra por carril junto con 2µl del buffer de carga XXX. Además se agregó 5µl del marcador de peso molecular (MPM).
- Figura 9.** Reportes de electroforesis capilar del locus Ca238. Los marcadores de

peso molecular están señalados de color rosa y la longitud de las amplificaciones, de color azul. Inicialmente, se observó que la reacción presentó alta inespecificidad (9A), posteriormente se obtuvo una alta concentración dentro de los rangos esperados: 315-411 (9B).

Figura 10. Resultados de la electroforesis capilar para los loci Ca122 (10A) y Ca120 (10B) correspondientes a la muestra 23 de *Crotalus tortugensis*. En la figura 10A se observan los resultados del locus Ca122, cuya longitud de fragmentos esperada se encuentra en el rango de 187-225 pb. Las condiciones iniciales de amplificación, basadas en la temperatura reportada por Pozarowski et al. (2012), generaron amplificaciones inespecíficas, evidenciadas por picos fuera del rango esperado, lo que dificultó la estandarización de las condiciones para este locus. La figura 10B muestra los resultados obtenidos para el locus Ca120 después de la optimización de las condiciones de amplificación. Los picos específicos, representados en azul, se encuentran dentro del rango esperado de 232-339 pb, mientras que los números en verde indican la longitud en pares de bases (pb) de cada fragmento amplificado. Los marcadores de peso molecular se ubican en los extremos: a la izquierda, el marcador de 20 pb, y a la derecha, el marcador de 5,000 pb, ambos representados en color rosa. La temperatura de alineamiento estandarizada fue de 58 °C, lo que permitió eliminar las amplificaciones inespecíficas previamente observadas, logrando resultados específicos y reproducibles.

Figura 11. Árbol filogenético inferido mediante el método de máxima verosimilitud para el gen ND4. En la figura 11A, el recuadro azul destaca la ubicación del complejo de especies correspondiente a *Crotalus atrox*. La figura 11B presenta la división en dos clados principales de *Crotalus atrox* y las áreas geográficas asociadas a las especies incluidas. Finalmente, la figura 11C muestra la posición relativa de las muestras insulares de Tortuga y Santa Cruz en comparación con las poblaciones continentales de *C. atrox*.

- Figura 12.** Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen ND5. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 13.** Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen CytB. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 14.** Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen 16S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 15.** Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen 12S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 16.** Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen RAG1. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 17.** Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen CMOS. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 18.** Inferencia filogenética con los genes 12S + 16S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 19.** Inferencia filogenética con los genes CytB + ND5. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.
- Figura 20.** Inferencia filogenética con los genes CytB + ND5 + 12S + 16S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

μL	Microlitro(s)
12S	ARN ribosomal 12S
16S	ARN ribosomal 16S
BI	Bayesian Inference (Inferencia Bayesiana)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos)
bp	Base pairs (Pares de bases)
CMOS	Oocyte Maturation Factor (Factor de maduración de ovocitos)
CYTB	Citocromo b
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates (Trifosfatos de desoxinucleótidos)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetraacético)
g	Gramo(s)
IC	Isla Cedros
ISC	Isla Santa Cruz
ISCa	Isla Santa Catalana
IT	Isla Tortuga
ma	Millones de años
MAFFT	Multiple Alignment using Fast Fourier Transform (Alineamiento múltiple utilizando transformada rápida de Fourier)
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Análisis genético de evolución molecular)
mg	Miligramo(s)
min	Minutos
mL	Mililitro(s)
ML	Maximum Likelihood (Máxima verosimilitud)
MP	Maximum Parsimony (Máxima parsimonia)
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)
ND4	Subunidad 4 de NADH deshidrogenasa
ND5	Subunidad 5 de NADH deshidrogenasa

NFW	Nuclease-Free Water (Agua libre de nucleasas)
PBC	Península de Baja California
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
RAG1	Recombination Activating Gene 1 (Gen activador de la recombinación 1)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecilsulfato de sodio)
SnGR	Solución de lisis de glóbulos rojos
Tris-HCl	Tris-hidrocloruro

1. RESUMEN

Las relaciones evolutivas de las serpientes de cascabel han sido ampliamente analizadas, identificando a México como centro de origen. La Península de Baja California con su compleja historia geológica, ha aislado organismos en condiciones únicas, generando un alto grado de diversidad y endemismo. En esta región, se han identificado varias especies dentro del complejo *Crotalus atrox*, como *C. catalinensis* en Isla Santa Catalina, *C. lorenzoensis* en Isla San Lorenzo, ambas reconocidas como especies diferenciadas. Sin embargo, las serpientes de cascabel de Isla Tortuga *C. tortugensis* (= *C. atrox*) aún se considera un linaje no diferenciado. Por lo tanto, el presente proyecto tiene como objetivo evaluar el impacto del aislamiento insular en las relaciones evolutivas de las serpientes de cascabel de Isla Tortuga con el complejo *Crotalus atrox*. Además, se busca optimizar las condiciones de amplificación de microsatélites para su aplicación en estudios poblacionales de las serpientes de cascabel de esta Isla.

1. ABSTRACT

The evolutionary relationships of rattlesnakes have been extensively analyzed, identifying Mexico as their center of origin. The Baja California Peninsula, with its complex geological history, has isolated organisms under unique conditions, resulting in a high degree of diversity and endemism. In this region, several species within the *Crotalus atrox* complex have been identified, such as *C. catalinensis* on Santa Catalina Island and *C. lorenzoensis* on San Lorenzo Island, both recognized as distinct species. However, the rattlesnakes of Tortuga Island (*C. tortugensis* = *C. atrox*) are still considered an undifferentiated lineage. Therefore, this project aims to assess the impact of island isolation on the evolutionary relationships of *C. tortugensis* with the *Crotalus atrox* complex. Additionally, this study seeks to optimize microsatellite amplification conditions for their application in population studies of rattlesnakes from this island.

2. INTRODUCCIÓN

Las serpientes de cascabel, pertenecientes a los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*, comprenden aproximadamente 55 especies de *Crotalus* y 3 de *Sistrurus* (Uetz et al., 2025). Estos organismos, caracterizados por su cuerpo alargado, la ausencia de extremidades y la presencia de fosetas termosensibles, utilizan estas últimas para detectar el calor de sus presas (Klauber, 1972). También presentan el órgano de Jacobson, junto con una lengua bífida, lo que les permite detectar olores específicos. Una de sus características distintivas es el "sonajero" en la región caudal, compuesto de queratina, que emplean como mecanismo de defensa para advertir a depredadores, mientras que su dentición solenoglifa les permite inocular veneno de manera eficiente, actuando como una herramienta clave para la defensa y la captura de presas.

En México, se distribuyen 37 especies del género *Crotalus*, de las cuales 29 son endémicas (Uetz et al., 2025). Este país es un centro evolutivo clave para las serpientes de cascabel, cuya diversificación principal ocurrió durante el Neogeno en los bosques montanos de pino-encino del occidente de México (Blair & Sánchez-Ramírez, 2016). Estos bosques establecido desde el Terciario Medio-Tardío constituyen un bioma exclusivo de las montañas mexicanas, respaldando la hipótesis de México como el área ancestral de las serpientes de cascabel (Klauber, 1972). Con la formación de cadenas montañosas como la Sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico, y su saturación ecológica, las serpientes de cascabel se expandieron hacia tierras bajas como desiertos y bosques tropicales, lo que impulsó su especiación y diversificación (Campbell y Lamar, 2004).

Una región de particular interés para el estudio de la evolución y diversificación de las serpientes de cascabel es la Península de Baja California (PBC), que comenzó a formarse hace 12.5 millones de años (ma) durante el Mioceno debido al movimiento de placas tectónicas, lo que propició su separación del México continental y la formación del Golfo de California. Cerca de seis millones de años después, con la separación del extremo sur de la península y la entrada de agua, se formó el "Proto-Golfo". Durante el Pleistoceno, los períodos interglaciares generaron diversos cambios en la temperatura y precipitación, lo que contribuyó al aislamiento de organismos en condiciones particulares, generando presiones evolutivas diversas y resultando en una región con alto grado de biodiversidad y endemismo (Dolby et al., 2015; Grismer, 2002). Dentro de este contexto geológico y climático, las serpientes de cascabel en

esta región han experimentado procesos de especiación y adaptación a distintos nichos ecológicos.

La evolución de las serpientes de cascabel ha sido ampliamente estudiada para dilucidar sus relaciones filogenéticas. Si bien los caracteres morfológicos, ecológicos y biogeográficos han sido fundamentales para su clasificación, presentan limitaciones debido a su plasticidad y la variabilidad entre poblaciones (Klauber, 1972). Para superar estas restricciones, se han integrado herramientas de genética molecular que utilizan marcadores informativos para analizar la variabilidad genética y las relaciones evolutivas. Para superar estas limitaciones, se han incorporado herramientas de genética molecular, como el uso de marcadores altamente informativos que permiten estudiar la variabilidad genética y las relaciones evolutivas. Un ejemplo clave es el “complejo *Crotalus atrox*”, un grupo cuya distribución abarca desde el sur de Estados Unidos hasta el norte, centro y sur de México, incluyendo la PBC y varias islas del Golfo de California. En estas áreas, el aislamiento insular ha funcionado como una barrera al flujo génico, promoviendo la diferenciación genética y fenotípica mediante procesos de especiación (Colvin, 2018; Gray & Cavers, 2014). Este fenómeno es evidente en *Crotalus catalinensis* en Isla Santa Catalina y *Crotalus lorenzoensis* en Isla San Lorenzo. No obstante, la posición taxonómica de la población de Isla Tortuga sigue siendo objeto de debate. Este estudio tiene como objetivo principal dilucidar la historia evolutiva de las serpientes de cascabel de esta isla, utilizando enfoques filogenéticos para comprender mejor su diversificación.

3. ANTECEDENTES

3.1 Relaciones evolutivas de las serpientes de cascabel

La especiación, o el proceso de origen de nuevas especies, surge a partir de la aparición de barreras del flujo genético, lo cual permite el mantenimiento de variabilidad genotípica y fenotípica (Colvin, 2018). Se ha identificado que diversos factores intervienen en este proceso, clasificados en intrínsecos y extrínsecos (Hillis et al., 2021; Marshall et al., 2018). Los factores intrínsecos están relacionados con el potencial genético del organismo para diversificarse, mientras que los factores extrínsecos dependen de las oportunidades que el ambiente ofrece. Por ejemplo, en los reptiles se ha observado una correlación de la riqueza de especies con la temperatura y la topografía (Qian, 2010; Shaffer et al., 2015).

Las filogenias, que representan hipótesis de las relaciones evolutivas entre los organismos, muestran en forma de diagrama cómo los ancestros y sus descendientes se diversificaron. Para estos análisis, se requieren características hereditarias bajo procesos evolutivos que reflejen la complejidad del proceso de especiación. Tradicionalmente, se han empleado características morfológicas para inferir filogenias. Por ejemplo, Klauber (1972) realizó un análisis filogenético de las serpientes de cascabel basado en caracteres osteológicos, desarrollo de los pulmones, la forma de los 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 escamas y patrones de coloración. A partir de estos caracteres, generó una hipótesis filogenética para las serpientes de cascabel (Figura 1) e incluso propuso diversos “complejos de especies”, en los cuales los taxa involucrados pueden ser reconocidos como especies válidas que comparten características únicas entre ellas.

Uno de estos grupos está conformado por *Crotalus adamanteus*, *C. atrox*, *C. tortugensis*, *C. ruber*, *C. lucasensis* y *C. exsul*. En este arreglo, Klauber (1972) planteó la hipótesis de que las serpientes de cascabel de Isla Tortuga (*Crotalus tortugensis*) constituyen una especie y están estrechamente relacionadas con *C. atrox*, formando un grupo cercano a *C. ruber*, *C. lucasensis* y *C. enyo*, con *C. adamanteus* como especie hermana de todas ellas (Figura 1).

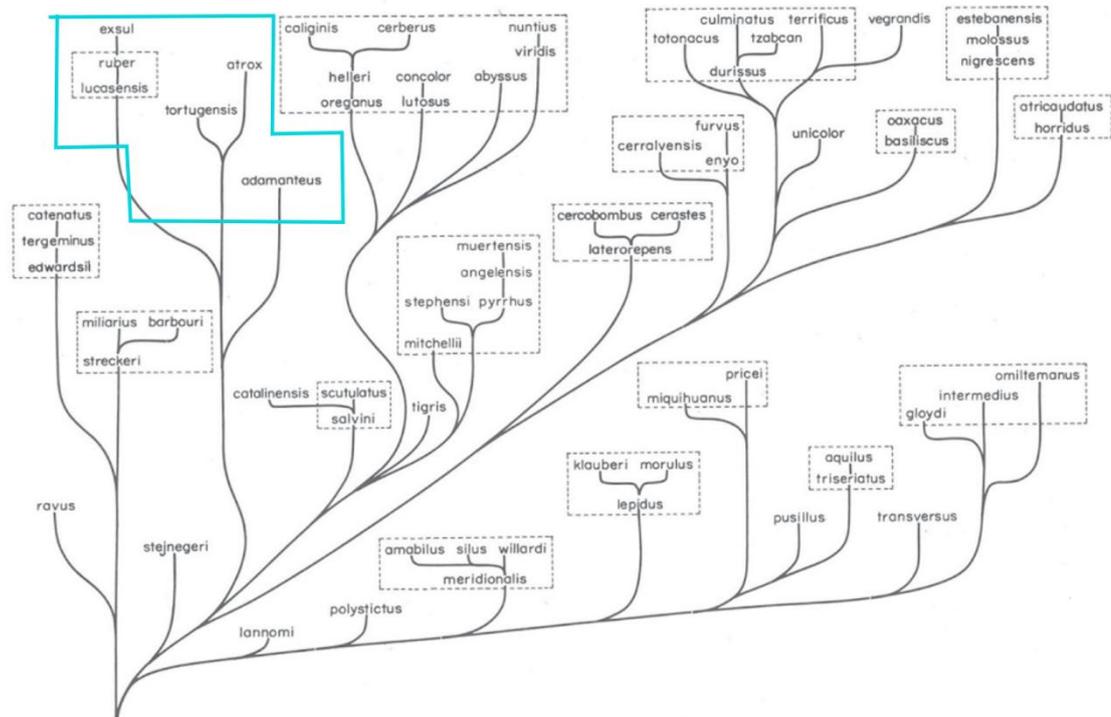


Figura 1. Relaciones evolutivas entre las especies de serpientes de cascabel. Los recuadros en líneas punteadas señalan la composición de complejos de especies sugeridos con base en la similitud de características. Tomado sin autorización de Klauber (1972).

En las últimas décadas, se han incorporado caracteres moleculares a los análisis filogenéticos, utilizando algunos genes altamente conservados, con bajas tasas de mutación y sustitución, útiles para inferir relaciones a nivel de órdenes o familias, mientras que otros con tasas más altas de mutación y sustitución, pueden emplearse para análisis entre especies o poblaciones. Blair & Sánchez-Ramírez (2016), utilizando siete genes mitocondriales y tres loci nucleares identificaron a México como el área ancestral de las serpientes de cascabel, particularmente las sierras madres y el eje neovolcánico. Su hipótesis señala que conforme las poblaciones ancestrales superaron la capacidad de carga de los bosques, las serpientes comenzaron a colonizar otros biomas, como desiertos y trópicos, lo que propició una rápida especiación. Posteriormente, los nichos ecológicos disponibles fueron ocupados y las tasas de especiación disminuyeron (Blair & Sánchez-Ramírez, 2016; Rundle & Nosil, 2005)

Se han realizado análisis filogenéticos específicos de clados de las serpientes de cascabel. El complejo de especies *Crotalus triseriatus* (Cascabel transvolcánica), serpientes relativamente pequeñas y habitantes de alta montaña, muestra patrones de diversificación vinculados a las formación de del Eje Neovolcánico Transmexicano y las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno (Blair et al., 2019; Bryson et al., 2011).

Durante este periodo, la expansión y contracción de los bosques de pino-encinos promovió el aislamiento de poblaciones en distintas regiones montañosas, favoreciendo eventos de especiación alopátrica y originando una diversidad críptica dentro del grupo (Blair et al., 2019). Por otro lado, el complejo de especies *Crotalus durissus* (cascabel tropical), se caracterizan por una adaptación a biomas cálidos y húmedos, y sus patrones evolutivos reflejan una dispersión a través de corredores tropicales durante períodos interglaciares (Carbajal-Márquez et al., 2020; Reyes-Velasco et al., 2022).

Asimismo, las serpientes pertenecientes al complejo *Crotalus molossus* (cascabel de cola negra) muestra una diversificación asociada a ventos geológicos y climáticos desde el Mioceno medio (~7.7 ma), con una radiación influenciada por la expansión de los ecosistemas áridos y semiáridos del Holoceno (Muñoz-Mora et al., 2022). Los análisis filogeográficos indican que el grupo *C. molossus* está compuesto por al menos seis linajes diferenciados, con una divergencia temprana en el centro de México, relacionada con la dinámica geológica del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Sur. Posteriormente el linaje ancestral se dispersó hacia el norte, adaptándose a una variedad de hábitats desde bosques de pinos-encinos hasta matorrales xerófilos y zonas desérticas (Muñoz-Mora et al., 2022). La expansión de *C. molossus* hacia el desierto de Sonora y el altiplano mexicano pudo haber estado impulsada por la fragmentación y la aridificación del paisaje en el Plioceno tardío y el pleistoceno temprano (Blair & Sánchez-Ramírez, 2016). Además, se ha propuesto que *C. totonacus* y *C. ornatus* tienen un origen común, con una divergencia en el desierto chihuahuense y las Sierras Madre Oriental y Occidental, respectivamente, probablemente influenciada por eventos de vicariancia durante el Pleistoceno (Muñoz-Mora et al., 2022). En contextos insulares, como el de *Crotalus mitchellii* en la Península de Baja California, el análisis evolutivo es más complejo debido a la desconexión entre la historia geológica de las islas y la historia evolutiva de las especies (Meik et al., 2018; Ruiz-Sánchez, 2019).

Se ha identificado que el empleo de diferentes marcadores con distintas tasas de mutación puede ser útil al inferir la historia evolutiva, ya que cada gen tiene características evolutivas particulares que representan una historia evolutiva única. La integración de estas historias permite representar mejor la complejidad del proceso de especiación (Hillis, 2019). Meik y colaboradores (2018) integraron marcadores moleculares y características morfológicas para resolver las relaciones evolutivas

dentro del complejo de cascabeles manchadas *Crotalus mitchellii* e identificaron que el uso de marcadores de una sola clase puede oscurecer los procesos de especiación, resultando en la clasificación incompleta de linaje, debido a diferentes factores importantes como la rápida adaptación evolutiva en las islas y el menor tamaño efectivo poblacional insular en comparación con el tamaño efectivo en el continente (Meik et al., 2018; Ruiz-Sanchez, 2019).

3.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas, como proteínas o regiones del genoma, que presentan variación genética heredable, permitiendo la detección de diferencias individuales a nivel de secuencias primarias. Esta variación genética surge a partir de mutaciones (silenciosas, deletéreas o beneficiosas) que generan diferentes versiones de un mismo gen, conocidas como alelos. Los procesos evolutivos determinan cómo estos alelos se distribuyen y fijan en las poblaciones, siendo esta dinámica clave para entender la diversidad genética (Ballard & Whitlock, 2004).

Dado que cada región del genoma presenta diferencias entre las tasas de mutación y sustitución, según diversos factores, como las especies, órdenes y contextos ecológicos (Amit Roy, 2014; Ballard & Whitlock, 2004). Esta variabilidad es fundamental para seleccionar marcadores moleculares adecuados según el tipo de estudio. Por ejemplo, regiones del genoma con altas tasas de mutación y sustitución, como los microsatélites, son particularmente útiles para inferir relaciones a nivel poblacional o en especies con divergencias recientes, mientras que regiones más conservadas pueden ser mejores para estudios filogenéticos de mayor escala (Selkoe & Toonen, 2006).

No obstante, uno de los principales desafíos en el uso de los microsatélites es la estandarización de las condiciones experimentales, que garantiza la reproducibilidad y precisión de los datos obtenidos (Doveri et al., 2008; Narina et al., 2011). La variabilidad en las condiciones de amplificación de microsatélites puede dar lugar a inconsistencias entre laboratorios o estudios, lo que dificulta la comparación de resultados (Putman & Carbone, 2014). Al establecer protocolos estandarizados, se busca reducir errores en la amplificación y asegurar que los datos generados sean fiables y comparables, contribuyendo así a un mejor entendimiento de la diversidad genética y la evolución de las poblaciones estudiadas.

3.3 Análisis filogenéticos con las serpientes de cascabeles de Isla Tortuga

Murphy y colaboradores (2002) llevaron a cabo una reconstrucción filogenética de 27 especies de *Crotalus*; incluyendo poblaciones insulares de Isla Tortuga (IT), Isla Santa Cruz (ISC), Isla Santa Catalina (ISCa) e Isla de Cedros (IC). Empleando secuencias Citocromo b, ND5, tRNA Val, 12S y 16S. Identificaron que el complejo *C. atrox*, se divide en dos grandes subgrupos: el primero conformado por *C. ruber*, *C. exsul* y *C. catalinensis* y el segundo formado por *C. atrox* (continental), como especie hermana de *C. tortugensis* y *C. atrox* de ISC (sin nombre). Similar a lo propuesto por Klauber (1972) *C. adamanteus* aparece como la especie hermana de las restantes especies del complejo (Figura 2).

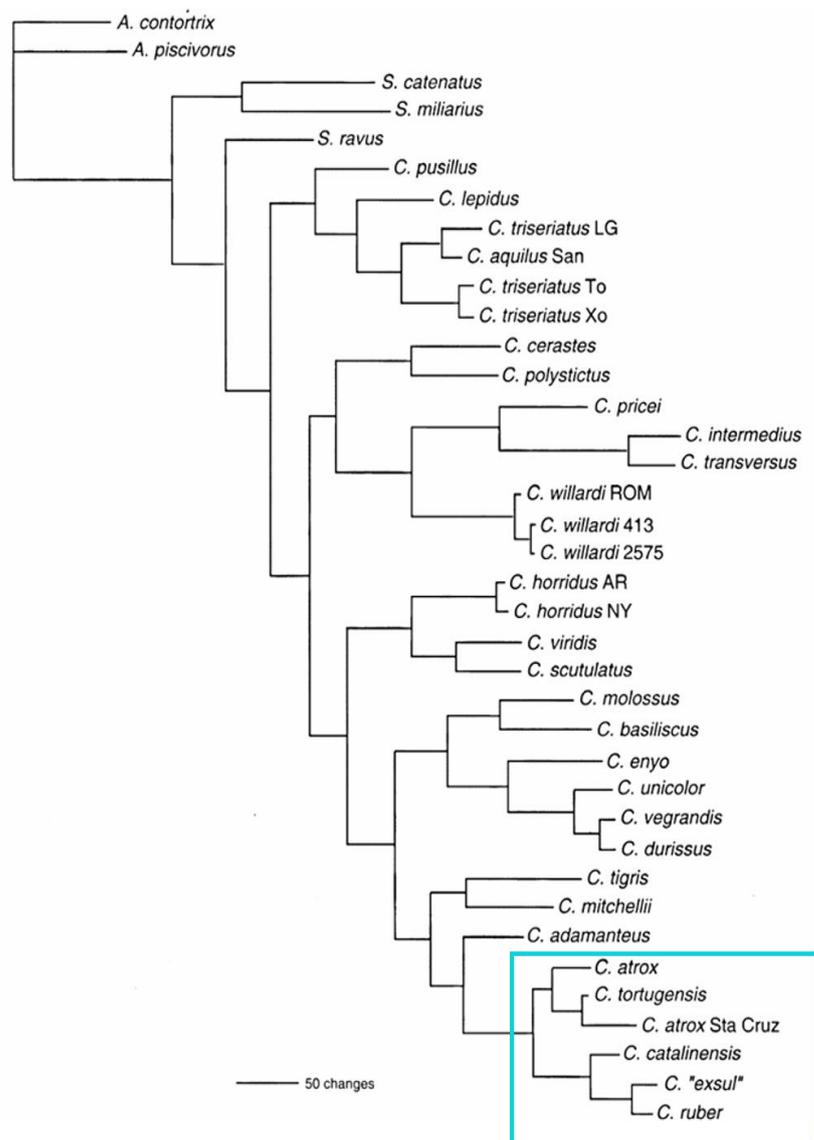


Figura 2. Hipótesis filogenética de diversas especies de cascabel propuesta por Murphy y colaboradores (2002) utilizando cinco genes mitocondriales. Los cuadros de colores señalan la composición de diversos grupos de especies; en azul se muestra el complejo *C. atrox*. Tomado sin autorización de Murphy et al., (2002).

Castoe y colaboradores (2007) analizaron la estructura filogeográfica de la especie *C. atrox* con individuos de cuatro regiones biogeográficas, incluyeron las poblaciones de IT e ISC como parte de las poblaciones continentales de *C. atrox*. Con el fin de inferir los patrones evolutivos de *C. atrox*. El uso de análisis anidado filogeográfico cladístico, mostró que los haplotipos de IT e ISC guardan una estrecha similitud con los haplotipos de las poblaciones orientales de *C. atrox* continental (Castoe et al., 2007).

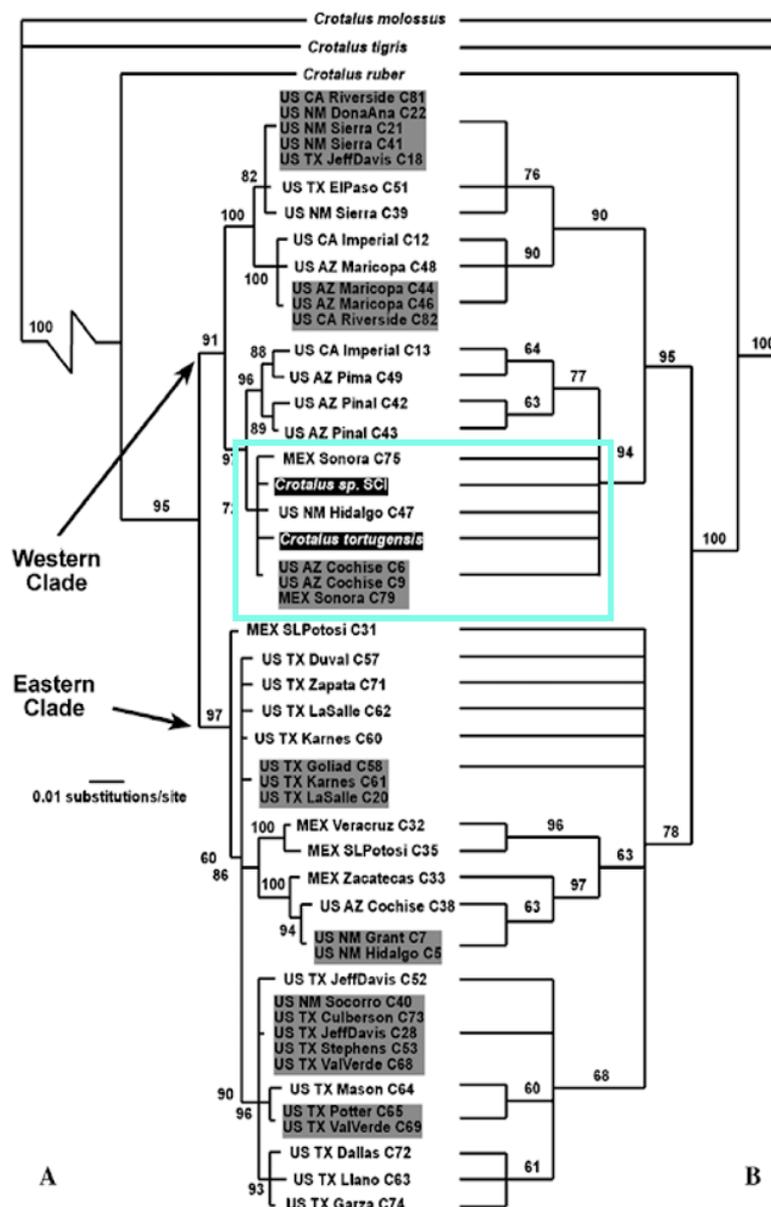


Figura 3. Relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *C. atrox* propuesta por Castoe et al.,(2007). A) Hipótesis filogenética con el método de inferencia bayesiana. B) Filogenia de consenso estricto con el método máxima parsimonia. El recuadro azul muestra el anidamiento de las serpientes insulares de ISC e IT, junto con las poblaciones continentales de Sonora, Nuevo México y Arizona. Tomado sin autorización de Castoe et al.,(2007).

Se identificó que *C. atrox* es una especie conformada por los clados oriental y occidental (incluidas las poblaciones de IT e ISC) y sugieren que estos clados divergieron hace 1.36 ma. Con base en la anidación de los haplotipos de IT e ISC dentro de los haplotipos continentales de Nuevo México, Sonora y Arizona, sugieren que las poblaciones insulares (*C. tortugensis* y la especie que habita en ISC) se conviertan en sinónimos de *C. atrox*.

Referente a las poblaciones serpientes de cascabel aisladas insularmente, Ruiz-Sanchez y colaboradores (2019) realizaron un análisis filogenético con el fin de identificar las relaciones evolutivas de las especies endémicas de las islas en el Golfo de California, además identificaron los tiempos de divergencia para asociar la diversificación con la formación de las islas de la PBC. El análisis se basó en 14 especies insulares y continentales, particularmente de *C. atrox* utilizaron individuos de Ciudad Juárez, Chihuahua, IT e ISC. Emplearon los genes que codifican para la subunidad ribosomal 12S y 16S.

En la reconstrucción filogenética identificaron el complejo *C. atrox* en donde se observa que las secuencias de *C. atrox* de Ciudad Juárez, Chihuahua e Isla Tortuga forman un grupo monofilético (Recuadro negro), hermano de *C. catalinensis*, *C. lorenzoensis*, *C. ruber* y *C. ruber exul* (Figura 4). Los autores sugieren un tiempo de divergencia de 4,16 millones de años para la separación del grupo. Además, identificaron que *C. atrox* llegó por primera vez a Isla Tortuga hace 1,91 ma, lo cual es consistente con la formación de la isla.

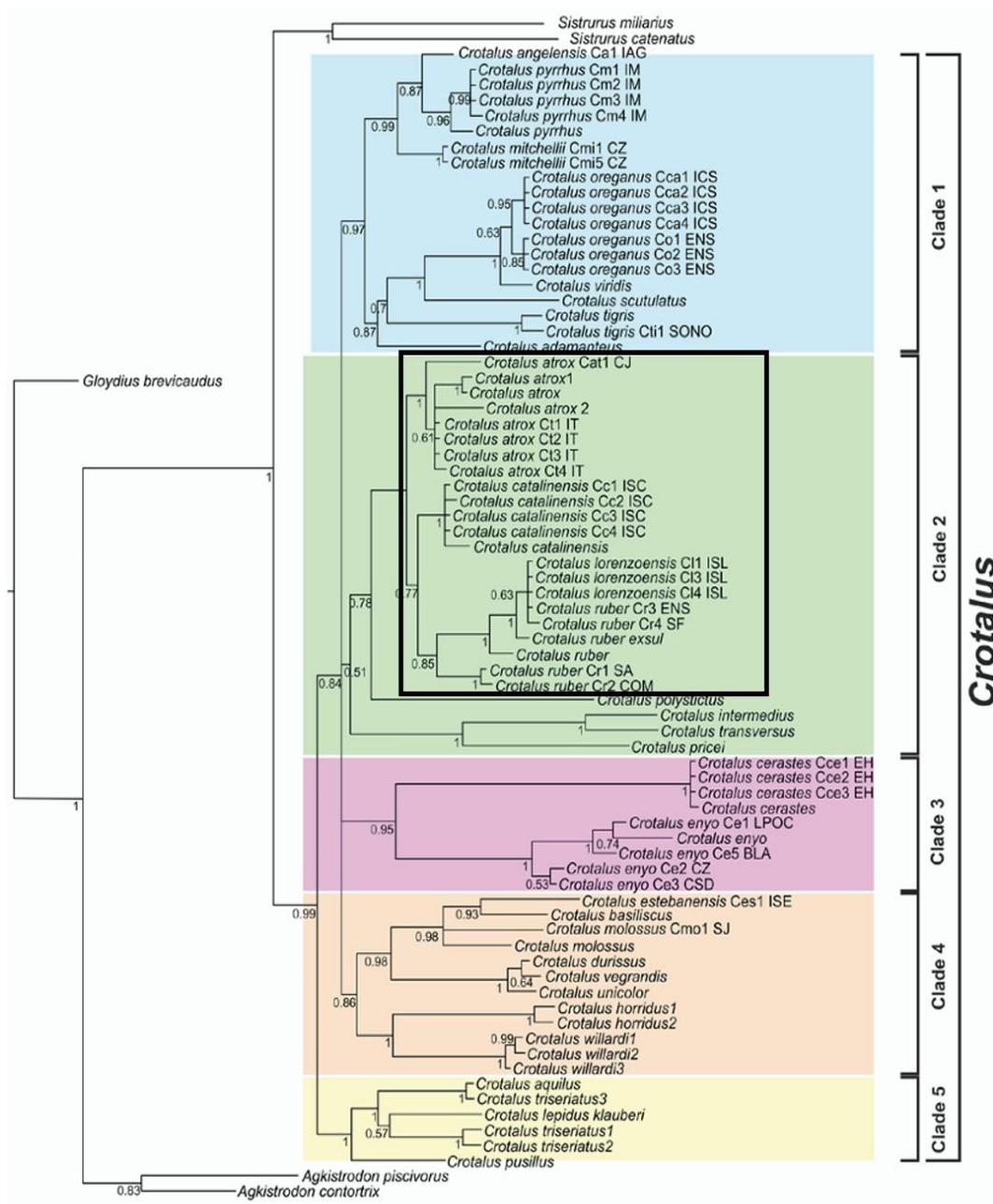


Figura 4. Hipótesis filogenética utilizando análisis de inferencia bayesiana de los genes 12S y 16S. El recuadro azul muestra el complejo de especies *C. atrox*. Tomado sin autorización de Ruiz-Sánchez et al. (2019).

4. JUSTIFICACIÓN

Las serpientes de cascabel desempeñan un papel fundamental en el equilibrio de los ecosistemas. Diversos estudios han analizado distintos clados del género *Crotalus* mediante características morfológicas y marcadores genéticos, principalmente mitocondriales. Aunque las hipótesis filogenéticas han revelado ciertas tendencias, persisten inconsistencias en la ubicación taxonómica de las serpientes de cascabel de la Isla Tortuga. Ante esta problemática, es necesario realizar un análisis filogenético que permita examinar sus patrones evolutivos y evaluar el impacto del aislamiento insular, con el fin de esclarecer su posición taxonómica.

5. HIPÓTESIS

El aislamiento insular de las serpientes de cascabel de Isla Tortuga ha promovido la acumulación de diferencias genéticas dentro de la población, lo que ha llevado a una divergencia significativa respecto a las poblaciones continentales de *Crotalus atrox* impactando su historia evolutiva y planteando la posibilidad de que se trate de un linaje diferenciado.

6. OBJETIVO DEL TRABAJO

6.1 Objetivo General

Evaluar el impacto del aislamiento insular en la diversidad genética y la relación evolutiva de serpientes de cascabel de Isla Tortuga, Baja California Sur.

6.2 Objetivos Particulares

1. Optimizar y estandarizar las condiciones de amplificación para microsátélites.
2. Identificar la relación evolutiva entre la población de serpientes de cascabel de Isla Tortuga y las especies relacionadas del complejo *Crotalus atrox*.
3. Integrar los datos genéticos para inferir la historia evolutiva de las de serpientes de cascabel de Isla Tortuga.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Área de estudio

Isla Tortuga es una isla oceánica ubicada en 27°26'00" N y 111°52'00" O en el Golfo de California (Figura 5). Esta isla oceánica se formó hace aproximadamente 1.7 millones de años debido a erupciones volcánicas ocurridas durante el Pleistoceno. Su superficie abarca aproximadamente 11.35 km² y está situada a 36.30 km de la península (Arnaud et al., 2019). El perímetro está constituido mayoritariamente por acantilados y carece de playas. La fisiografía de la isla está dominada por rocas volcánicas, resultado de su origen geológico (Batiza, 1978).

En cuanto a las condiciones climáticas, la isla presenta un nivel de humedad muy bajo, con precipitaciones que ocurren principalmente durante los meses de julio y agosto. La vegetación es limitada y está compuesta predominantemente por matorral sarcocauléscente (Arnaud et al., 2019) (Figura 6).

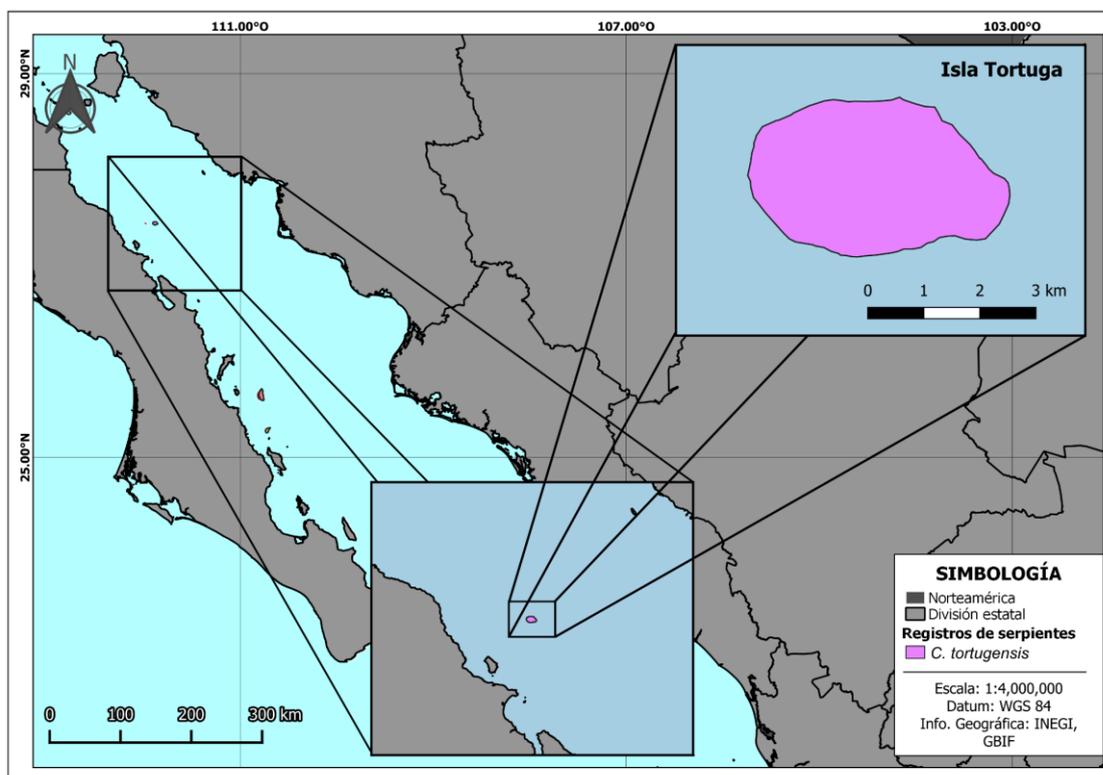


Figura 5. Mapa de ubicación de Isla Tortuga, Baja California Sur.



Figura 6. Visión panorámica de Isla Tortuga, visualiza la vegetación compuesta principalmente por matorral sarcocauléscente.

7.2 Recolección de Muestras

La recolección de muestras fue realizada en abril, junio y octubre de 2022, así como en julio de 2024, bajo el permiso de colecta DGVS/04420/21 otorgado a. Dr. Gustavo Arnaud Franco. Las actividades de búsqueda se llevaron a cabo durante la tarde y noche, entre las 19:30 y las 00:00 horas, mediante observación visual realizada por un equipo conformado por 3 a 5 personas que caminaban en paralelo con una distancia de 5-10 metros entre cada integrante. El manejo de los ejemplares se efectuó utilizando ganchos y tubos herpetológicos. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas mediante venopunción de la vena caudal y preservadas en tubos de 1.5 ml con etanol al 96% (Figura 7). Los ejemplares se liberaron en el mismo sitio donde fueron recolectados. En total, se logró la recolección de 36 muestras sanguíneas de *Crotalus tortugensis* (= *C. atrox*).



Figura 7. Obtención de muestras sanguíneas por medio de venopunción de la vena caudal. La sangre fue colectada en ausencia de anticoagulante e inmediatamente suspendida en etanol 96%. Los ejemplares se liberaron en el mismo sitio de colecta.

7.3 Extracción de DNA total

Se evaluaron dos protocolos para la extracción de DNA, basados en los métodos descritos por Riera et al. (2010) y Miller et al. (1988), implementando modificaciones en ambos procedimientos.

- A. Riera et al. (2010): Se procesaron alícuotas de 100 μ l de muestras sanguíneas, eliminando previamente el alcohol residual. Posteriormente, se añadieron 180 μ l de solución de lisis de glóbulos rojos (Tris-HCl 10 mM pH 8, Triton X-100 1%, Sacarosa 10%) y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos. Este procedimiento se repitió tres veces para asegurar la eliminación de glóbulos rojos. A continuación, se añadieron 60 μ l de buffer de glóbulos blancos (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 400 mM, EDTA 2 mM), 10 μ l de Proteinasa K (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-8, 3 mM CaCl) y 2 μ l de SDS al 20%. La mezcla fue incubada durante 1 hora a 24 °C con agitación a 1,000 rpm. Posteriormente, se incorporaron 30 μ l de acetato de sodio 3M, agitando suavemente por 1 minuto, y se centrifugó a 12,000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y se repitió el paso de acetato de sodio. Para precipitar el DNA, se añadieron 200 μ l de isopropanol y se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet se lavó con 200 μ l de etanol al 96%, centrifugándose durante 5 minutos a 12,000 rpm. Finalmente, el pellet se secó y se resuspendió en agua libre de nucleasas.
- B. Miller et al. (1988) con modificaciones: Se tomaron 50 μ l de las muestras sanguíneas y se eliminó el alcohol residual. Se añadieron 400 μ l de buffer de lisis (QIAGEN) y se incubaron a 70 °C durante 20 minutos. Posteriormente, se incorporaron 7 μ l de Proteinasa K (50 mM Tris-HCl, pH 7.5-8, 3 mM CaCl) y la mezcla se incubó toda la noche a 55 °C. Tras la incubación, se agitó la solución con un vortex durante 10 segundos, se añadieron 135 μ l de buffer de precipitación de proteínas (QIAGEN) y se agitó con vortex durante 40 segundos. La mezcla fue centrifugada a 13,000 rpm durante 10 minutos a 10 °C, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 400 μ l de isopropanol y se mantuvo en congelación hasta el día siguiente. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 10 minutos para formar el pellet. El sobrenadante fue eliminado, y el pellet se lavó con 200 μ l de etanol, centrifugándose durante 5 minutos a 12,000 rpm. Finalmente, el

DNA fue resuspendido en agua libre de nucleasas y cuantificado mediante espectrofotometría y fluorimetría.

La calidad del DNA obtenido se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.7% preparados en buffer TAE (Tris/HCl XX mM, Acetato XX mM, EDTA XX mM, pH XX). La concentración de DNA fue determinada utilizando un fluorómetro (Qubit 4, Thermo Scientific) y un espectrofotómetro (Nanodrop, Thermo Scientific). El protocolo modificado de Miller et al. (1988) mostró un mejor rendimiento en las extracciones realizadas (Figura 6).

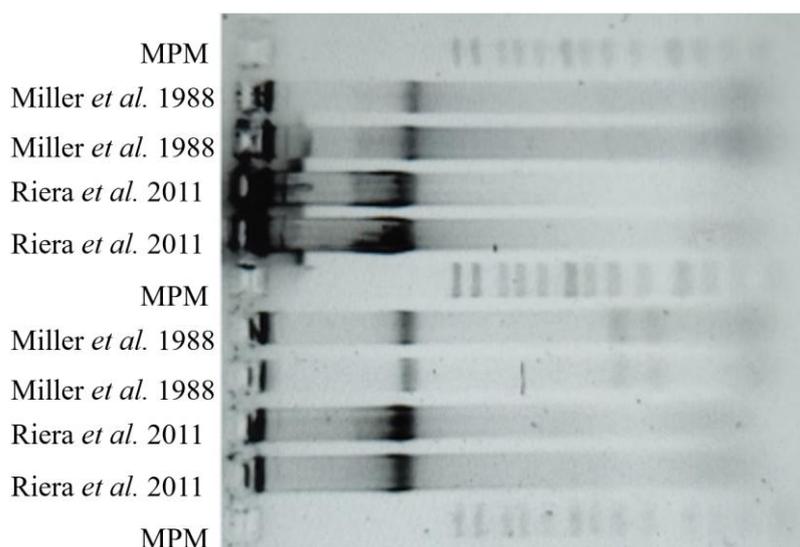


Figura 8. Integridad de DNA obtenido por los protocolos de Riera y colaboradores (2011) y Miller y colaboradores (1988) en geles de agarosa 0.7%. Se cargaron 10µl de cada muestra por carril junto con 2µl del buffer de carga XXX. Además se agregó 5µl del marcador de peso molecular (MPM).

7.4 Amplificación y purificación de DNA

Se realizó una revisión bibliográfica con el objetivo de identificar estudios que emplearon microsatélites en el género *Crotalus* y genes relevantes para la delimitación de especies. Se seleccionaron iniciadores desarrollados previamente (Lawson et al., 2005; Pozarowski et al., 2012; Wiens et al., 2008) (Tabla 2). En total, se identificaron 14 microsatélites específicos para *Crotalus atrox* y dos genes nucleares: el gen activador de recombinación (RAG-1) y el gen mos del factor de maduración de ovocitos (c-mos).

La estandarización de las reacciones se efectuó utilizando los iniciadores mencionados en la Tabla 2. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µl, compuesto por 5 µl de Primer STAR Max DNA Polimerasa (Takara) (2 mM Mg²⁺, 0.4 mM de cada uno de los dNTP, PrimeStar Max Premix 2x 625 µl x4), 2.5

mM de cada uno de los iniciadores y 2-8 ng de DNA templado. El protocolo de termociclado incluyó una desnaturalización inicial a 98 °C durante 10 segundos, seguida de 35 ciclos que consistieron en desnaturalización a 98 °C por 10 segundos, alineamiento a temperaturas entre 52-62 °C según cada locus, y extensión a 72 °C por 30 segundos. La extensión final se realizó a 72 °C durante 5 minutos. Las temperaturas específicas de alineamiento para cada locus se detallan en la Tabla 2.

Para incrementar la pureza de los productos amplificados, se implementó un procedimiento de purificación utilizando perlas paramagnéticas (AxyGen Biosciences). Inicialmente, se añadieron 5 µl de perlas para eliminar fragmentos de DNA de gran longitud. Las muestras se colocaron en el magneto para recolectar el sobrenadante, al cual se añadieron 12 µl de perlas adicionales. Posteriormente, se incubaron durante 10 minutos a 1800 rpm en un Thermomixer (Thermo Fisher Scientific) para recolectar el DNA amplificado restante. Con las muestras aún en el magneto, se realizaron lavados con 180 µl de etanol al 80 % durante 30 segundos, descartando el etanol después de cada lavado. Este proceso se repitió dos veces más. Una vez completados los lavados, se permitió la evaporación completa del etanol residual. Los productos purificados se resuspendieron en 22.5 µl de agua libre de nucleasas y se incubaron durante 10 minutos a 1800 rpm en el Thermomixer. Finalmente, las muestras se colocaron nuevamente en el magneto para recolectar el sobrenadante que contenía los amplicones purificados, el cual se transfirió a un nuevo tubo. La concentración de DNA fue cuantificada mediante fluorimetría (Qubit 4, Thermo Scientific) y espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific).

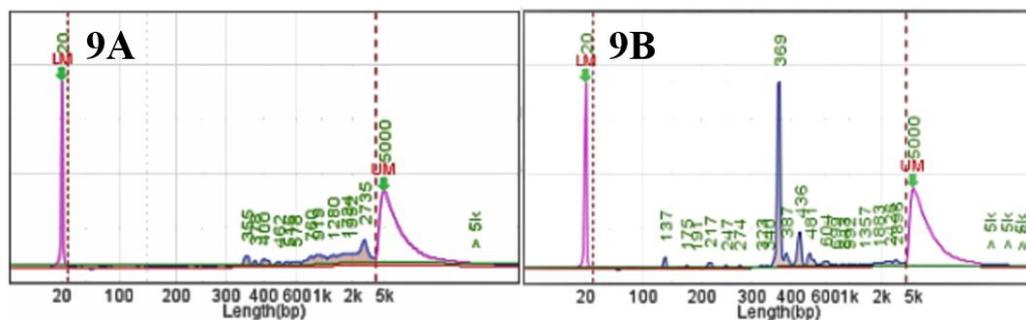


Figura 9. Reportes de electroforesis capilar del locus Ca238. Los marcadores de peso molecular están señalados de color rosa y la longitud de las amplificaciones, de color azul. Inicialmente, se observó que la reacción presentó alta inespecificidad (9A), posteriormente se obtuvo una alta concentración dentro de los rangos esperados: 315-411 (9B).

Tabla 1. Iniciadores y temperaturas de alineamiento de cada uno de los locus de microsatélites y los dos genes nucleares (RAG1 y cmos). Los iniciadores marcados con un asterísco (*) fueron tomados de Pozarowski et al. 2012, los marcados con dos asteriscos (**) de Lawson et al. 2005 y los marcados con tres asteriscos (***) de Wiens et al. 2008.

Locus	Motivo	Oligonucleótidos (5'-3')
<i>Ca114*</i>	(TCT)35	F:GATGCGACACCCAGAAAAAT R:CCAATAGATGGTTGGGGAAA
<i>Ca120*</i>	(AG)20...(AC)7	F:GAATCCTTCACCAAAGCTAGAAA R:TTGGGTGGCAATCAGTGTTA
<i>Ca122*</i>	(TG)15	F:CCCCCAGGAAAGAATATGTATG R:CACATCTTCAGGTTGCCAAA
<i>Ca131*</i>	(TC)19	F:GGGATTCAGGCCAATTTTTTA R:TGGTAATTTTGCATTTTCAGCA
<i>Ca139*</i>	(TTA)3CTA(TTA)4 (TTG)3 TCG(TTG)3 TTA(TTG)2 (TTA)2	F:AATCACAACCTTCATCAGTAACATCTA A R:AGGACAAGAAGCGATGGATG
<i>Ca143*</i>	(AC)41	F:TCAAAACAACCTGTGGCACT R:CCTGATCCTCTCAGGAAAGC
<i>Ca223*</i>	(GATA)15	F:TCTGTCCATGCAACATCCAT R:ATGCAAGCCGTTCTCAGTTT
<i>Ca227*</i>	(TCC)30TCTT(TTC)15	F:AATCCTTCCATCCTGCAATG R:ATCACTTTTGGGTGCAGAGC
<i>Ca238*</i>	(AGGC)11(AGGA)7	F:CTCTGCTCTGCCATTTCA R:GAGCCAGTGCTTTGTTTTCC
<i>Ca264*</i>	(AAAG)19	F:CCGGTTAATGAACCAAAAATG R:-AAGCAGAATTGGCTTGACCA
<i>Ca271*</i>	(GT)20	F:AGCCTGAAGATGACGAATGG R:CCAGCCTTTCCTTTTTCCTT
<i>Ca274*</i>	(GT)21	F:AGCCGCTTGTCTCAAATTGT R:GTCCTCTGATTTGCCATT
<i>Ca281*</i>	(GAAA)19TAAA (GAAA)	F:CCCAGCACACTCACAATGTC R:GCTCCTAGCCAGGAATGTCA
<i>Ca290*</i>	(TTTC)21	F:TTGCTGACTGAAGGAGCATTT R:AACCTGCAAGACCACAAAGG
CMOS**	F: CATGGACTGGGATCAGTTATG R:CCTTGGGTGTGATTTTCTCACCT	
RAG-1***	F: CAGCTGYAGCCARTACCATAAAAAT R:CTTTCTAGCAAAAATTTCCATTCAT	

7.5 Secuenciación

Los productos amplificados fueron secuenciados mediante el método de Sanger (Sanger et al., 1974) debido a su precisión y capacidad para detectar mutaciones puntuales, generando datos de alta calidad con bajas tasas de error. El procedimiento se realizó empleando el kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), que comprende dos etapas principales: ciclosecuenciación y electroforesis capilar. La ciclosecuenciación consistió en una reacción que incluyó sondas fluorescentes, compuestas por iniciadores (forward o reverse) a una concentración de 2.5 mM, BigDye Terminator 3.1 Mix (Thermo Fisher Scientific), BigDye Terminator 5x Sequencing Buffer (Thermo Fisher Scientific) y DNA templado. La cantidad de DNA templado requerida varió entre 3 y 10 ng, de acuerdo con las indicaciones del protocolo del kit empleado y dependiendo del número de pares de bases esperadas (200-500), correspondientes a la longitud reportada para los microsatélites, lo que garantiza que los valores estén dentro del rango adecuado. El protocolo de termociclado incluyó un paso inicial a 96 °C durante 1 minuto, seguido de 25 ciclos que comprendieron una desnaturalización a 96 °C durante 10 segundos, un alineamiento a 50 °C durante 5 segundos y una extensión a 60 °C durante 4 minutos.

Posteriormente, se llevó a cabo un paso de purificación utilizando las soluciones del kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems). Para un volumen de reacción de 10 µl, se añadieron 45 µl de la solución SAM y 10 µl de Big Dye XTerminator Bead Solution. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 1,800 rpm y 24 °C en un Thermomixer (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las reacciones purificadas fueron transferidas a tubos específicos para realizar la electroforesis capilar, la cual se efectuó en el SeqStudio Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)

7.6 Obtención y alineamiento de secuencias

Para incorporar otras especies y genes al análisis filogenético, se llevó a cabo una búsqueda en GenBank de secuencias de genes mitocondriales y nucleares (CMOS y RAG1), utilizando las mismas secuencias empleadas por Murphy en su estudio para asegurar que correspondieran a los mismos individuos y facilitar la concatenación (Tabla 2). Esta búsqueda utilizó palabras clave como: “*Crotalus atrox* ND5”, “*Crotalus tortugensis* CytB” y “*Crotalus catalinensis* 16S”. Se identificaron secuencias correspondientes a los géneros *Crotalus*, *Sistrurus* y *Agkistrodon*. Las

secuencias identificadas, junto con aquellas amplificadas en laboratorio, se integraron en bases de datos individuales para cada gen y se convirtieron al formato "FASTA" utilizando la plataforma Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el software MUSCLE (Edgar, 2004) para identificar sitios homólogos. Posteriormente, el programa Gblocks (Castresana, 2000) fue empleado para seleccionar bloques de sitios conservados y eliminar regiones con espacios o baja conservación, todo ello ejecutado mediante la plataforma Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008).

Tabla 2. Relación de especies y genes utilizados para realizar las hipótesis filogenéticas. Las claves representan el código de acceso de cada secuencia dentro de la base de datos del GenBank. Las secuencias fueron obtenidas del sitio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ID de los genes incluidos por cada especie, revisada entre agosto y octubre del 2024.

Especie	CytB	ND5	12S	16S
<i>Agkistrodon contortrix</i>	AF259154.1	AF259192.1	AF259224.1	AF259117.1
<i>Agkistrodon piscivorus</i>	AF259155.1	AF259193.1	AF259225.1	AF259118.1
<i>Sistrurus catenatus</i>	AF259156.1	AF259194.1	AF259226.1	AF259119.1
<i>Sistrurus miliarius</i>	AF259157.1	AF259195.1	AF259227.1	AF259120.1
<i>Crotalus ravus</i>	AF259158.1	AF259196.1	AF259228.1	AF259121.1
<i>Crotalus pusillus</i>	AF259159.1	AF259197.1	AF259229.1	AF259122.1
<i>Crotalus lepidus</i>	AF259160.1	AF259198.1	AF259230.1	AF259123.1
<i>Crotalus aquilus</i>	AF259162.1	AF259200.1	AF259232.1	AF259125.1
<i>Crotalus triseriatus</i>	AF259164.1	AF259202.1	AF259234.1	AF259127.1
<i>Crotalus cerastes</i>	AF259165.1	-	AF259235.1	AF259128.1
<i>Crotalus polystictus</i>	AF259166.1	AF259203.1	AF259236.1	AF259129.1
<i>Crotalus pricei</i>	AF259167.1	AF259204.1	AF259237.1	AF259130.1
<i>Crotalus intermedius</i>	AF259168.1	AF259205.1	AF259238.1	AF259131.1
<i>Crotalus transversus</i>	AF259169.1	AF259206.1	AF259239.1	-
<i>Crotalus willardi</i>	AF259170.1	AF259207.1	AF259240.1	AF259132.1
<i>Crotalus horridus</i>	AF259182.1	AF259215.1	AF259252.1	AF259144.1
<i>Crotalus viridis</i>	AF259183.1	AF259216.1	AF259253.1	AF259145.1
<i>Crotalus scutulatus</i>	AF259184.1	AF259217.1	AF259254.1	AF259146.1
<i>Crotalus molossus</i>	AF259173.1	AF259208.1	AF259243.1	AF259135.1
<i>Crotalus basiliscus</i>	AF259174.1	AF259209.1	AF259244.1	AF259136.1
<i>Crotalus enyo</i>	AF259175.1	-	AF259245.1	AF259137.1

<i>Crotalus unicolor</i>	AF259176.1	AF259210.1	AF259246.1	AF259138.1
<i>Crotalus vegrandis</i>	AF259178.1	AF259211.1	AF259247.1	AF259139.1
<i>Crotalus durissus</i>	AF259178.1	AF259212.1	AF259248.1	AF259140.1
<i>Crotalus tigris</i>	AF259179.1	AF259213.1	AF259249.1	AF259141.1
<i>Crotalus mitchellii</i>	AF259180.1	AF259214.1	AF259250.1	AF259142.1
<i>Crotalus adamanteus</i>	AF259185.1	AF259218.1	AF259255.1	AF259147.1
<i>Crotalus atrox</i>	AF259186.1	AF259219.1	AF259256.1	AF259148.1
<i>Crotalus tortugensis</i>	AF259187.1	AF259220.1	AF259257.1	AF259149.1
<i>Crotalus atrox</i> ISC	AF259188.1	AF259221.1	AF259258.1	AF259150.1
<i>Crotalus catalinensis</i>	AF259189.1	-	AF259259.1	AF259151.1
<i>Crotalus exsul</i>	AF259190.1	AF259222.1	AF259260.1	AF259152.1
<i>Crotalus ruber</i>	AF259191.1	AF259223.1	AF259261.1	AF259153.1

7.7 Inferencia filogenética

La inferencia filogenética se realizó de manera individual para cada gen y de forma concatenada para los genes mitocondriales, con el propósito de analizar las diferencias en la topología de los árboles filogenéticos obtenidos. Este análisis se llevó a cabo utilizando la interfaz de IQTREE (Trifinopoulos et al., 2016), la cual implementa un algoritmo eficiente de búsqueda estocástica para reconstruir árboles filogenéticos mediante el método de máxima verosimilitud. Este software ha demostrado un rendimiento competitivo en comparación con otros programas como RAxML y PhyML, manteniendo alta verosimilitud con tiempos de cómputo similares (Nguyen et al., 2015).

Para la inferencia filogenética de los genes concatenados, se empleó un modelo de particiones en el que cada subdivisión correspondió a uno de los genes incluidos en el análisis. Este enfoque permitió asignar modelos específicos a cada locus genómico, incorporar heterogeneidad de tasas entre particiones y decidir si las longitudes de las ramas debían estar vinculadas entre ellas. Estas características aseguraron un análisis más detallado y adecuado a las particularidades evolutivas de cada gen.

La selección del modelo de sustitución fue un paso crucial, ya que este define las probabilidades de ocurrencia de mutaciones en las secuencias de DNA, siendo fundamental para generar representaciones precisas y robustas de las relaciones evolutivas. (Bos & Posada, 2005). Los modelos evaluados consideraron frecuencias

de bases (+F), la proporción de sitios invariables (+I), y heterogeneidad de tasas de sustitución entre sitios, utilizando distribuciones gamma discretas (+G). La selección del mejor modelo de sustitución se realizó mediante ModelFinder (Kalyaanamoorthy et al., 2017).

El soporte de los clados en los árboles filogenéticos se evaluó utilizando el método Ultrafast Approximation (UFBoot), el cual es entre 10 y 40 veces más rápido que el bootstrap rápido de RAxML y reduce significativamente el sesgo en los valores de soporte (Minh et al., 2013). Para este análisis, se generaron 1,000 réplicas de bootstrap, lo que permitió construir un árbol de consenso. Adicionalmente, se realizaron pruebas complementarias de soporte como SH-aLRT y aBayes (Anisimova et al., 2011; Guindon et al., 2010). Los árboles resultantes fueron editados posteriormente en ITOL v6 (Letunic & Bork, 2024).

8. RESULTADOS

8.1 Obtención y cuantificación de DNA

Se trabajó con un total de 30 muestras biológicas procesadas para la extracción y cuantificación de DNA. Ocho de estas muestras correspondieron a diversas especies del género *Crotalus spp.*, empleadas como referencia para evaluar y seleccionar el protocolo de extracción más eficiente. Dos métodos fueron comparados: el protocolo de Miller et al. (1988) y el de Riera et al. (2010). Los resultados obtenidos mediante cuantificación con Qubit por fluorimetría indicaron que el protocolo de Miller et al. (1988) presentó un mayor rendimiento en términos de concentración de DNA, alcanzando valores de hasta 67.4 ng/μL, mientras que el protocolo de Riera et al. (2010) produjo concentraciones significativamente más bajas, inferiores a 12 ng/μL. En función de estos resultados, se seleccionó el protocolo de Miller et al. (1988) para el procesamiento del resto de las muestras.

Las 22 muestras restantes correspondieron a individuos de *Crotalus tortugensis* recolectados en distintos puntos de Isla Tortuga. Las concentraciones de ADN obtenidas mostraron variabilidad, oscilando entre 3.52 ng/μL y 312 ng/μL, con un promedio general de 66.5 ng/μL. Este rango reflejó tanto la calidad inicial del material biológico como la eficacia del protocolo de extracción seleccionado. Las muestras con concentraciones más altas (por ejemplo, 128 ng/μL en la muestra 10, 312 ng/μL en la muestra 11 y 208 ng/μL en la muestra 23) se emplearon para la estandarización de las condiciones de amplificación de los diferentes microsatélites. Por otro lado, algunas muestras presentaron concentraciones bajas (por ejemplo, 3.52 ng/μL en la muestra 20 y 6.58 ng/μL en la muestra 21). Sin embargo, estas muestras se mantuvieron en el análisis, ya que el protocolo permitió recuperar ADN suficiente para los estudios moleculares planificados.

En conclusión, la aplicación del protocolo de Miller et al. (1988) permitió obtener ADN de alta calidad y cantidad adecuada para las muestras analizadas. La cuantificación mediante Qubit por fluorimetría confirmó la efectividad del protocolo y proporcionó datos precisos para seleccionar las mejores muestras para los análisis genéticos posteriores.

Tabla 3. Concentraciones de DNA obtenidas de 30 muestras de diferentes especies, utilizando dos protocolos de extracción diferentes, Miller et al. (1988) y Riera et al. (2010). Las primeras ocho muestras se emplearon para seleccionar el protocolo más eficiente, siendo el método de Miller et al. (1988) el de mejor rendimiento. La concentración de DNA fue determinada por medio de fluorómetro (Qubit 4, Thermo Scientific)

Muestra	Especie	Código de identificación de laboratorio	Concentración de DNA (ng/μL)	Protocolo de Extracción de DNA
1	<i>C. mictlantecuiti</i>	HK550	4.84	Miller et al. 1988
2	<i>C. tzcaban</i>	HK966	4.14	Miller et al. 1988
3	<i>C. atrox</i>	HK976	Muy Bajo	Riera et al. 2010
4	<i>C. atrox</i>	HK976	Muy Bajo	Riera et al. 2010
5	<i>C. atrox</i>	HK965	67.4	Miller et al. 1988
6	<i>C. atrox</i>	HK965	52.8	Miller et al. 1988
7	<i>C. atrox</i>	HK965	11.3	Riera et al. 2010
8	<i>C. atrox</i>	HK965	8.41	Riera et al. 2010
9	<i>C. tortugensis</i>	Ca-06.16.2022	66.6	Miller et al. 1988
10	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.15.2022	128	Miller et al. 1988
11	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.01.2022	312	Miller et al. 1988
12	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.19.2022	20.2	Miller et al. 1988
13	<i>C. tortugensis</i>	Ca-06.04.2022	28.6	Miller et al. 1988
14	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.14.2022	88	Miller et al. 1988
15	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.08.2022	59	Miller et al. 1988
16	<i>C. tortugensis</i>	Ca-06.14.2022	Muy Bajo	Miller et al. 1988
17	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.01.2022	41.4	Miller et al. 1988
18	<i>C. tortugensis</i>	Ca-06.12.2022	32.2	Miller et al. 1988
19	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.17.2022	204	Miller et al. 1988
20	<i>C. tortugensis</i>	Ca-06.03.2022	3.52	Miller et al. 1988
21	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.06.2022	6.58	Miller et al. 1988
22	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.05.2022	66.4	Miller et al. 1988
23	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.07.2022	208	Miller et al. 1988
24	<i>C. tortugensis</i>	Ca-04.18.2022	138	Miller et al. 1988

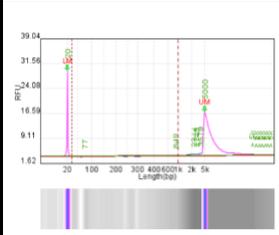
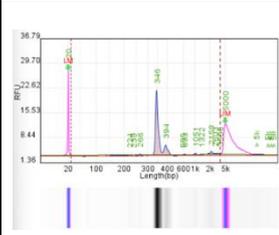
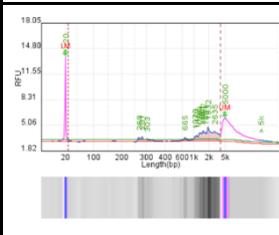
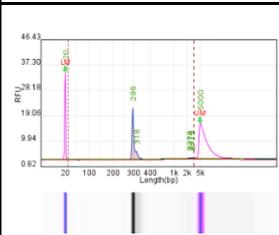
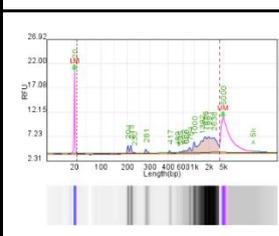
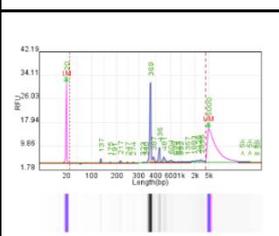
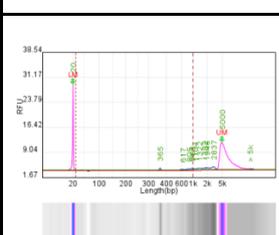
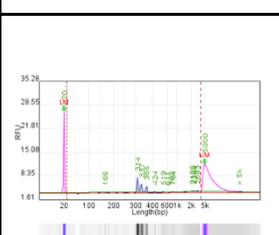
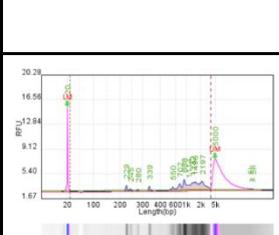
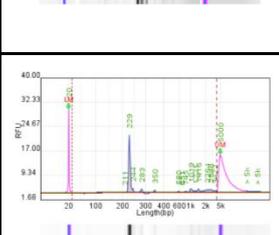
Muestra	Especie	Código de identificación de laboratorio	Concentración de DNA (ng/μL)	Protocolo de Extracción de DNA
1	<i>C. miclantecuiti</i>	HK550	4.84	Miller et al. 1988
2	<i>C. tzcaban</i>	HK966	4.14	Miller et al. 1988
25	<i>C. tortugensis</i>	Ca-10.02.2022	31.8	Miller et al. 1988
26	<i>C. tortugensis</i>	Ca-10.05.2022	23.1	Miller et al. 1988
27	<i>C. tortugensis</i>	Ca-10.09.2022	28.6	Miller et al. 1988
28	<i>C. tortugensis</i>	Ca-10.01.2022	23.8	Miller et al. 1988
29	<i>C. tortugensis</i>	Ca-10.03.2022	30	Miller et al. 1988
30	<i>C. tortugensis</i>	Ca-10.08.2022	25.6	Miller et al. 1988

8.2 Estandarización de la amplificación de microsatélites.

Se evaluaron de manera exploratoria las temperaturas de alineamiento recomendadas en el instructivo del kit (55 °C) y las reportadas por Pozarowski et al. (2012). Sin embargo, estas condiciones generaron amplificaciones inespecíficas o la ausencia de producto amplificado en algunos loci (Tabla 3). Las inespecificidades se identificaron mediante picos observados en rangos fuera de los esperados para los microsatélites, específicamente entre 600 y 2,500 pb (Figura 10A). Para solucionar estos problemas, se optimizaron las condiciones de amplificación ajustando la temperatura de alineamiento y las condiciones de reacción para cada locus. Este proceso permitió mejorar la especificidad de los productos amplificados, reduciendo la aparición de fragmentos no deseados y asegurando la reproducibilidad de los resultados.

La Tabla 4 muestra un resumen de las condiciones iniciales y finales utilizadas, así como las longitudes de los fragmentos amplificados, lo que refleja el éxito de la estandarización. Los ajustes realizados permitieron obtener productos específicos en los rangos esperados para cada microsatélite, eliminando las amplificaciones inespecíficas (Figura 10B).

Tabla 4. Resumen de la optimización de las condiciones de amplificación para microsatélites en *Crotalus tortugensis*. La tabla incluye los reportes de electroforesis capilares con las temperaturas de alineamiento que obtuvimos inespecificidad o productos ausentes (Condiciones iniciales). Asimismo, se muestran las temperaturas de alineamiento reportadas por Pozarowski et al. (2012) para cada locus. Además, se presentan las condiciones finales optimizadas, obtenidas tras ajustar las temperaturas de alineamiento para cada locus. La longitud esperada de los fragmentos amplificados, medida en pares de bases (pb), también se reporta, confirmando que las condiciones finales permitieron amplificaciones específicas dentro de los rangos establecidos para cada microsatélite.

Locus	pb	Temperatura de alineamiento (°C)		Condiciones iniciales	Condiciones finales
		Reportadas	Optimizadas		
Ca120	232-339	53	58		
Ca131	187-340	57	60		
Ca223	250-452	53	52		
Ca238	315-411	55	58		
Ca290	218-329	59	58		

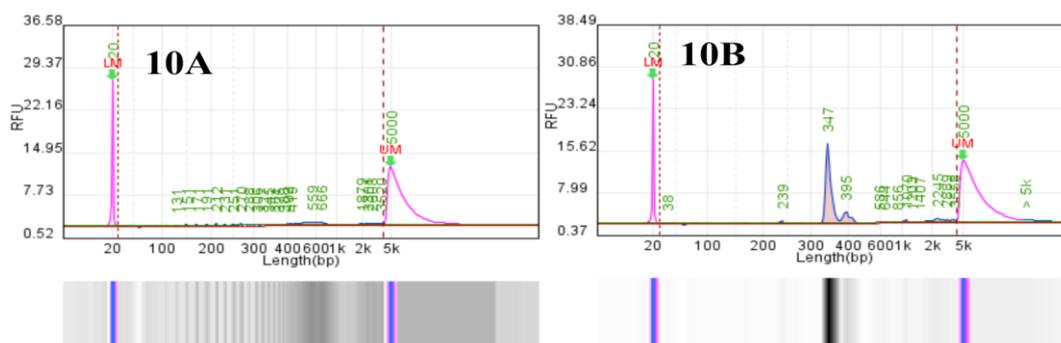


Figura 10. Resultados de la electroforesis capilar para los loci Ca122 (10A) y Ca120 (10B) correspondientes a la muestra 23 de *Crotalus tortugensis*. En la figura 10A se observan los resultados del locus Ca122, cuya longitud de fragmentos esperada se encuentra en el rango de 187-225 pb. Las condiciones iniciales de amplificación, basadas en la temperatura reportada por Pozarowski et al. (2012), generaron amplificaciones inespecíficas, evidenciadas por picos fuera del rango esperado, lo que dificultó la estandarización de las condiciones para este locus. La figura 10B muestra los resultados obtenidos para el locus Ca120 después de la optimización de las condiciones de amplificación. Los picos específicos, representados en azul, se encuentran dentro del rango esperado de 232-339 pb, mientras que los números en verde indican la longitud en pares de bases (pb) de cada fragmento amplificado. Los marcadores de peso molecular se ubican en los extremos: a la izquierda, el marcador de 20 pb, y a la derecha, el marcador de 5,000 pb, ambos representados en color rosa. La temperatura de alineamiento estandarizada fue de 58 °C, lo que permitió eliminar las amplificaciones inespecíficas previamente observadas, logrando resultados específicos y reproducibles.

8.2 Inferencia filogenética

8.2.2 Alineamiento

Se realizó la identificación de sitios homólogos para cada uno de los genes analizados. El gen 16S presentó la mayor cantidad de nucleótidos (1072), mientras que tRNA-Val registró la menor cantidad (64), como se detalla en la Tabla 5. Asimismo, se determinó que los genes 16S y 12S presentaron el mayor porcentaje de sitios constantes, mientras que el gen citocromo B mostró el menor porcentaje. En cuanto a los sitios informativos, el gen ND4 destacó con la mayor cantidad, mientras que el gen RAG1 registró únicamente tres sitios informativos. Estos resultados evidencian las diferencias en la variabilidad y características evolutivas entre los genes analizados.

Tabla 5. Cantidad de secuencias incluidas, así como la longitud de las secuencias y los sitios constantes e informativos.

Gen	Secuencias	Nucleótidos Curados	Sitios Constantes	Sitios constantes (%)	Sitios Informativos
ND4	265	629	306	48.64	282
CytB	33	562	299	53.20	200

ND5	29	427	178	41.68	187
12s	33	411	306	74.45	59
16s	32	1072	800	74.62	155
RAG1	17	600	590	98.33	3
CMOS	28	552	519	94.02	18
12s +16s	32	1491	1118	74.98	211
CytB+ND5	33	1033	508	49.17	395
Todos concatenados	29	2529	1668	65.95	548

8.2.2 Modelos de sustitución

Se identificaron diferencias significativas en la proporción de sitios invariables, los valores del parámetro alfa de la distribución gamma y los modelos de heterogeneidad de tasas seleccionados. La Tabla 6 presenta los modelos de sustitución aplicados a los diferentes genes mitocondriales y nucleares, así como a sus combinaciones concatenadas.

Para el gen CytB, se seleccionó el modelo HKY+F+I+G4, que asume diferencias en las tasas de cambio entre transiciones (cambios entre purinas o entre pirimidinas) y transversiones (cambios entre purinas y pirimidinas). Este modelo incorpora frecuencias específicas de las bases observadas y clasifica un 40% de los sitios como invariables (I+), reflejando una alta conservación en ciertas regiones. Para los sitios variables, se utilizó una distribución gamma de cuatro categorías (+G4) que modela la variabilidad entre ellos.

El gen ND4 se modeló utilizando TN+F+I+G4, derivado de Tamura-Nei, que permite una diferenciación más detallada en las tasas de cambio entre purinas y pirimidinas. Este modelo identificó un 37% de sitios invariables, indicando una conservación moderada, mientras que la heterogeneidad en las tasas de sustitución fue representada mediante una distribución gamma de cuatro categorías.

En el caso del gen ND5, se aplicó el modelo TIM2+F+I+G4, que permite diferencias en las tasas de sustitución específicas para pares de bases. Este gen presentó un 29% de sitios invariables, lo que indica una mayor variabilidad en comparación con los otros genes mitocondriales. El parámetro alfa de 1.03 reflejó una heterogeneidad significativa en las tasas de evolución.

Los genes ribosomales mitocondriales 12S y 16S fueron modelados con TPM2u+F+I+G4 y TN+F+I+G4, respectivamente. Ambos presentaron proporciones significativas de sitios invariables (45% y 52%), pero también mostraron sitios variables que evolucionan a distintas velocidades, modelados mediante distribuciones gamma discretas. En particular, el gen 16S presentó un parámetro alfa de 0.691, lo que indicó una variabilidad moderada en las tasas de evolución.

Los genes nucleares, como RAG1 y CMOS, mostraron menor complejidad en los modelos seleccionados. RAG1 se ajustó al modelo K2P, que distingue entre transiciones y transversiones sin considerar frecuencias empíricas ni heterogeneidad de tasas. Por otro lado, CMOS utilizó HKY+F, que incorpora frecuencias empíricas pero no clasifica sitios invariables ni incluye heterogeneidad gamma, reflejando una evolución más uniforme.

En la concatenación de los genes CytB y ND5, se seleccionó el modelo HKY+F+I+G4, que considera diferencias en las tasas de cambio entre transiciones y transversiones, utiliza frecuencias empíricas de las bases y clasifica un 37% de los sitios como invariables. La heterogeneidad en las tasas de evolución entre los sitios variables fue representada mediante una distribución gamma discreta de cuatro categorías, lo que permitió modelar adecuadamente las características evolutivas de ambos genes.

Para la concatenación de los genes 12S y 16S, se aplicó el modelo TN+F+I+G4, que asume diferencias en las tasas de sustitución y utiliza frecuencias empíricas. Un 52% de los sitios en esta concatenación fueron clasificados como invariables, reflejando una alta conservación. Sin embargo, los sitios variables presentaron heterogeneidad en las tasas de evolución, modelada mediante una distribución gamma discreta, indicando que, aunque estas regiones son mayoritariamente conservadas, algunos sitios evolucionan a velocidades diferentes.

Tabla 6. Parámetros de sustitución para los genes analizados bajo sus respectivos modelos de sustitución.

Gen	Modelo de Sustitución	Sitios invariables (%)	Gamma Shape Alpha
ND4	TN+F+I+G4	37.9	0.9775
CytB	HKY+F+I+G4	40.8	0.8568
ND5	TIM2+F+I+G4	29	1.304

12s	TPM2u+F+I+G4	45.2	0.4952
16s	TN+F+I+G4	52.8	0.691
CytB+ND5	HKY+F+I+G4	37.1	0.9964
12s+16s	TN+F+I+G4	53.2	0.5789
RAG1	K2P	-	-
CMOS	HKY+F	-	-

Se realizó la concatenación de los genes CytB, 12S, 16S y ND5, particionando el alineamiento en subgrupos correspondientes a cada gen. Para cada subgrupo, se identificaron modelos de sustitución específicos, considerando valores gamma, proporciones de sitios invariables y las frecuencias empíricas de las bases nucleotídicas (+F). Estas frecuencias reflejan las proporciones específicas de adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) observadas en el alineamiento.

Los modelos de sustitución seleccionados incorporaron diferencias en las tasas de cambio entre transiciones (cambios entre purinas o entre pirimidinas) y transversiones (cambios entre purinas y pirimidinas). Se observó que los porcentajes de sitios invariables (+I) variaron entre los genes, indicando que algunos genes presentan una mayor conservación en sus secuencias. Además, se aplicó una distribución gamma discreta con cuatro categorías (+G4) para modelar la heterogeneidad en las tasas de evolución entre los sitios variables, lo que permitió capturar las diferencias evolutivas dentro de cada gen.

La metodología empleada asegura una representación precisa de las características evolutivas de los genes analizados, proporcionando un marco robusto para interpretar las relaciones filogenéticas. Este enfoque se basa en recomendaciones previas que resaltan la importancia de integrar modelos de heterogeneidad en estudios evolutivos (Soubrier et al., 2012; Yang, 1996).

Tabla 7. Parámetros de sustitución para cada una de las particiones que se consideraron en el análisis filogenético con los genes concatenados. Para el presente proyecto se consideró particionar el alineamiento por cada uno de los genes.

Gen	Modelo de Sustitución	Sitios invariables (%)	Gamma Shape Alpha
12S	TIM2+F+I+G4	38.4%	0.42
CytB	HKY+F+I+G4	42%	0.90

16S	TN+F+I+G4	55.2%	0.59
ND5	TIM+F+I+G4	29.8%	1.37

8.2.3 Máxima Verosimilitud de cada gen

El árbol filogenético del gen ND4 (Figura 8) representa a *Agkistrodon contortrix* y *A. piscivorus* como el grupo externo, lo que confirma su distancia evolutiva respecto al género *Crotalus*. Dentro del género *Crotalus*, se observa que las especies *C. molossus*, *C. totonacus* y *C. basiliscus* forman un grupo monofilético con un soporte de 83.3%.

El complejo de especies *C. atrox* presenta un soporte del 100% y está compuesto por dos clados principales. Uno de estos clados incluye a *C. catalinensis* y *C. ruber*, las cuales muestran una relación con un soporte de 31.5%. El otro clado agrupa a *C. atrox*, dividido en dos subgrupos bien diferenciados (Este y Oeste), con un soporte alto de 96%. Las poblaciones de Isla Tortuga e Isla Santa Cruz se agrupan dentro del clado Oeste. Según el análisis del gen ND4, no se identifica una divergencia genética significativa entre estas poblaciones en comparación con *C. atrox*.

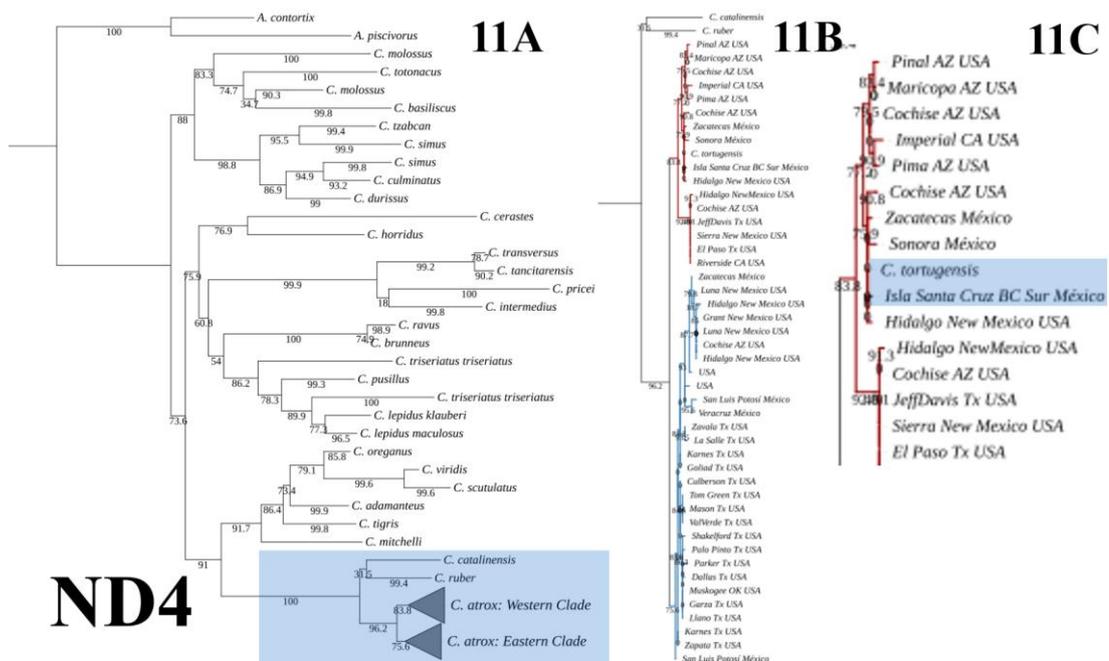


Figura 11. Árbol filogenético inferido mediante el método de máxima verosimilitud para el gen ND4. En la figura 11A, el recuadro azul destaca la ubicación del complejo de especies correspondiente a *Crotalus atrox*. La figura 11B presenta la división en dos clados principales de *Crotalus atrox* y las áreas geográficas asociadas a las especies incluidas. Finalmente, la figura 11C muestra la posición relativa de las muestras insulares de Tortuga y Santa Cruz en comparación con las poblaciones continentales de *C. atrox*.

El árbol filogenético del gen ND5 (Figura 12) posiciona a *Agkistrodon piscivorus* y *Agkistrodon contortrix* como grupo externo, lo que evidencia su separación temprana respecto al resto de las especies analizadas. Dentro del árbol, se identifican los géneros *Sistrurus* y *Crotalus*, con una estructura monofilética clara.

El grupo monofilético inicial incluye a *C. horridus*, *C. scutulatus* y *C. viridis*, siendo estas dos últimas especies consideradas hermanas y presentando un soporte elevado del 100%. Las especies del género *Sistrurus* se agrupan dentro del género *Crotalus*, con un soporte significativo del 95%. En los últimos dos clados, *C. mitchelli* y *C. tigris* aparecen como especies hermanas, con un soporte del 82%.

El recuadro azul destaca el complejo de especies de *C. atrox*, con un soporte del 91%. Este complejo está compuesto por dos clados principales: uno incluye a *C. ruber* y *C. exsul* como especies hermanas, con un soporte del 97%; el otro clado, con un soporte del 98%, agrupa a *C. atrox* y *C. adamanteus* como especies hermanas, con un soporte del 99%. Dentro de este último clado, *C. tortugensis* se agrupa como hermana de *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz, con un soporte del 88%.

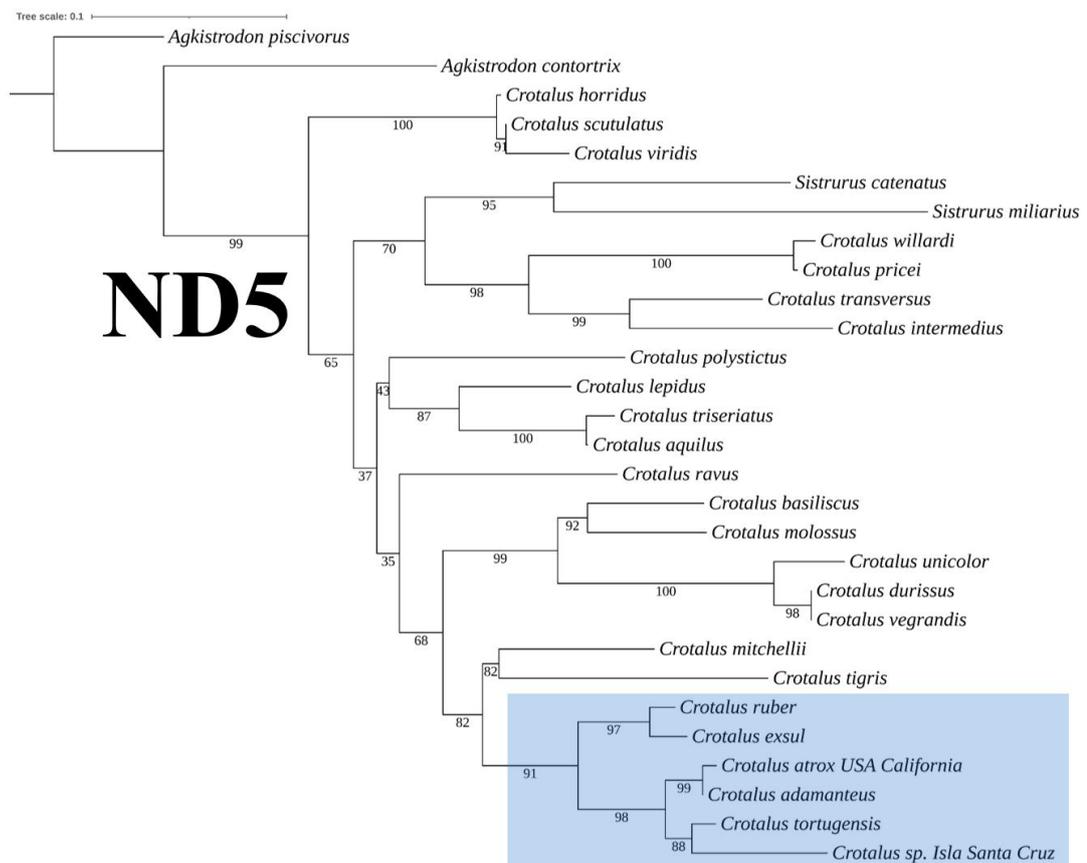


Figura 12. Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen ND5. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

El árbol filogenético del gen CytB (Figura 13) posiciona a *A. contortrix* y *A. piscivorus* como grupo externo, lo que evidencia su divergencia temprana respecto al resto de los géneros analizados. Se observan los géneros *Sistrurus* y *Crotalus*, con una divergencia inicial bien definida y un soporte del 100%. Dentro del género *Crotalus*, se identifica una agrupación con un soporte moderado del 57%, conformada por *C. mitchelli*, *C. adamanteus* y *C. tigris*. Entre estas, *C. adamanteus* y *C. tigris* se agrupan como especies hermanas. Además, *C. scutulatus* y *C. viridis* también se agrupan como especies hermanas con un alto soporte del 91%, mientras que este grupo presenta un soporte conjunto del 89%.

El grupo monofilético correspondiente a *C. atrox* cuenta con un soporte del 100% y se divide en dos clados principales. El primer clado está formado por *C. ruber* y *C. exsul* como especies hermanas, con un soporte del 92%, y *C. catalinensis* como hermana de este grupo, aunque esta relación presenta un soporte moderado del 59%. El segundo clado, con un soporte del 98%, incluye a las poblaciones continentales de *C. atrox*, así como a las especies insulares *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz. Estas últimas se agrupan como especies hermanas con un soporte del 76%.

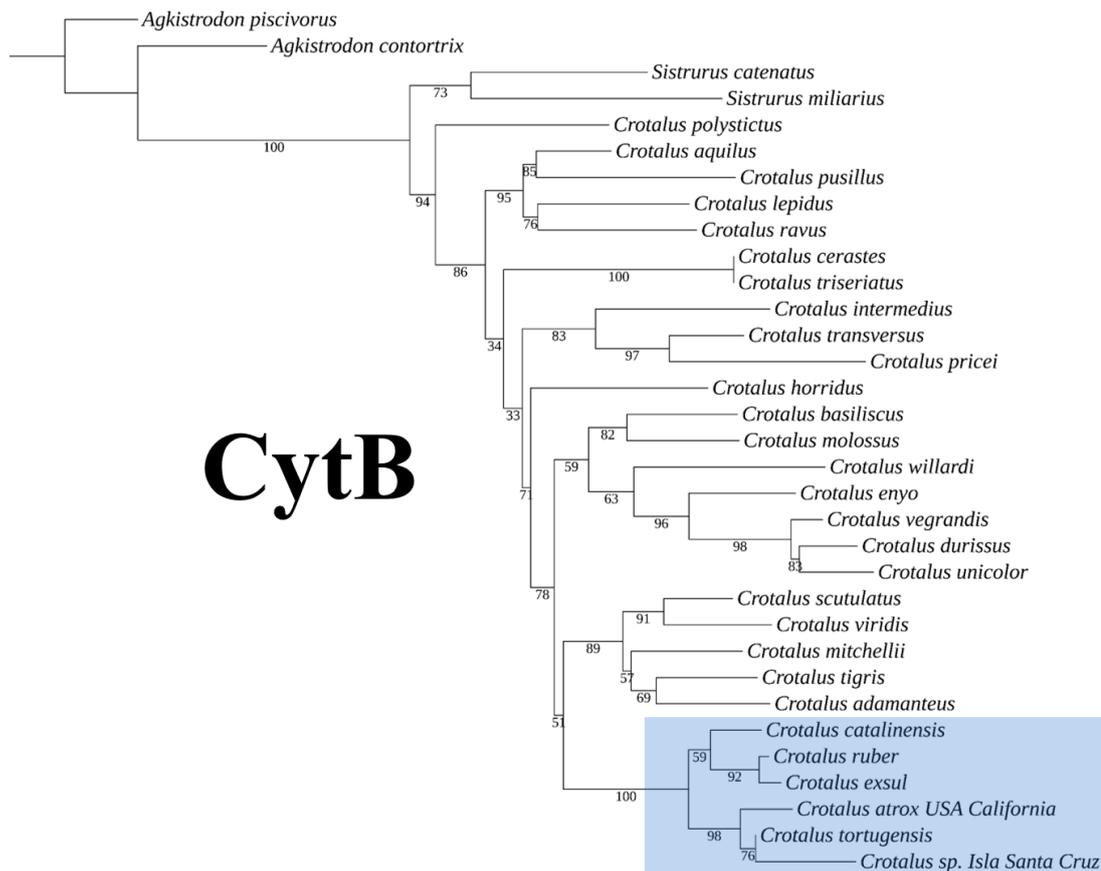


Figura 13. Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen CytB. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

El árbol filogenético correspondiente al gen 16S (Figura 14) ubica a *A. contortrix* y *A. piscivorus* como grupo externo, evidenciando su divergencia temprana respecto a las serpientes de cascabel de los géneros *Sistrurus* y *Crotalus*. Los géneros mencionados muestran una separación inicial clara, respaldada por un soporte del 100%. Dentro del género *Crotalus*, se identifica un grupo con soporte moderado del 45%, integrado por *C. mitchelli*, *C. adamanteus*, *C. tigris*, *C. viridis* y *C. scutulatus*. Estas últimas dos especies aparecen como hermanas, reflejando altos niveles de soporte en sus nodos internos, que oscilan entre 81% y 96%, y evidenciando una diversificación escalonada.

El grupo monofilético correspondiente a *C. atrox* se encuentra delimitado con un soporte del 100%. En este grupo, *C. catalinensis* es identificada como la primera especie en divergir. A continuación, se diferencian dos clados principales: el primero incluye a *C. ruber* y *C. exsul* como especies hermanas, con un soporte robusto del 100%. El segundo clado, con un soporte del 81%, agrupa a las poblaciones continentales de *C. atrox* junto con las especies insulares *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz, las cuales forman un grupo hermano con un soporte del 95%.

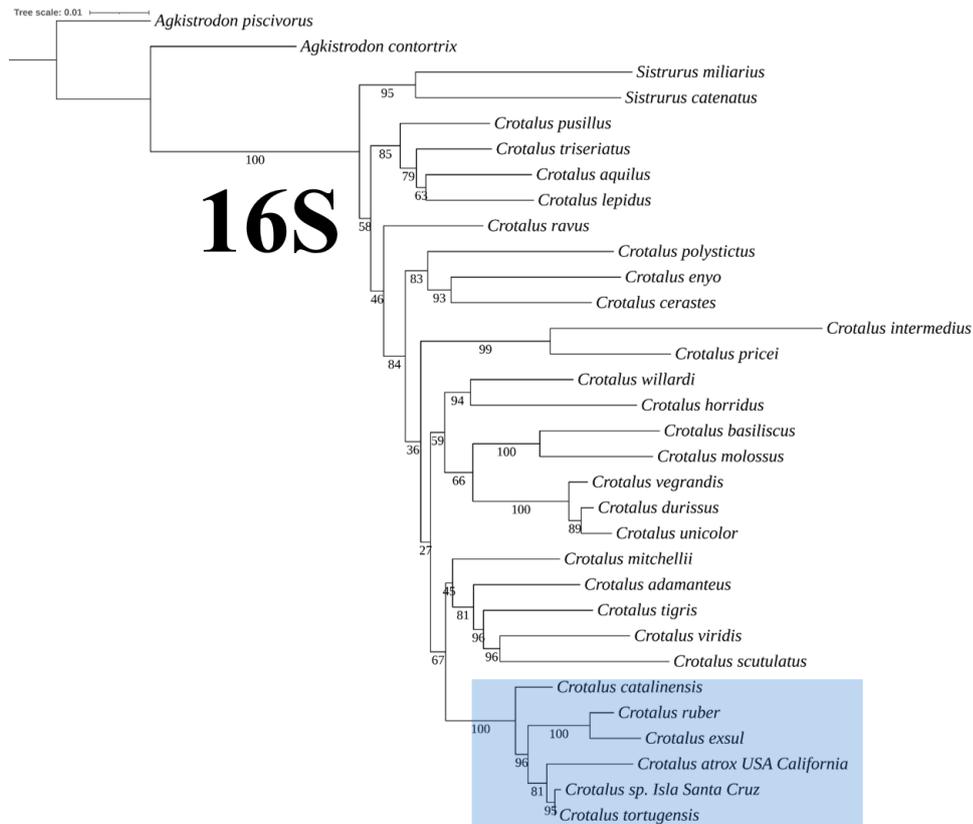


Figura 14. Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen 16S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

El árbol filogenético correspondiente al gen 12S (Figura 15) posiciona a *A. contortrix* y *A. piscivorus* como grupo externo, evidenciando su divergencia temprana respecto a los géneros *Sistrurus* y *Crotalus*. Estos géneros presentan una separación inicial bien definida, respaldada por un soporte del 100%. Dentro del árbol, se pueden identificar tres grupos diferenciados con niveles variables de soporte, lo que refleja una resolución limitada en ciertas relaciones evolutivas. El primer grupo incluye a *C. scutulatus* y *C. viridis*, las cuales se agrupan como especies hermanas con un soporte del 94%. El segundo grupo, con un soporte moderado del 46%, posiciona a *C. mitchelli* como la primera especie en divergir, seguida de *C. adamanteus* y *C. tigris*, que forman un grupo hermano con un soporte del 79%.

El recuadro azul resalta el grupo monofilético correspondiente a *C. atrox*, que cuenta con un soporte del 91%. Este grupo se subdivide en dos clados principales: el primero incluye a *C. ruber* y *C. exsul* como especies hermanas, con un soporte del 98%, y a *C. catalinensis* como una especie relacionada, pero más distante. El segundo clado, con un soporte del 96%, agrupa a las poblaciones continentales de *C. atrox* junto

con las especies insulares *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz. Estas últimas se agrupan como especies hermanas con un soporte robusto del 100%.

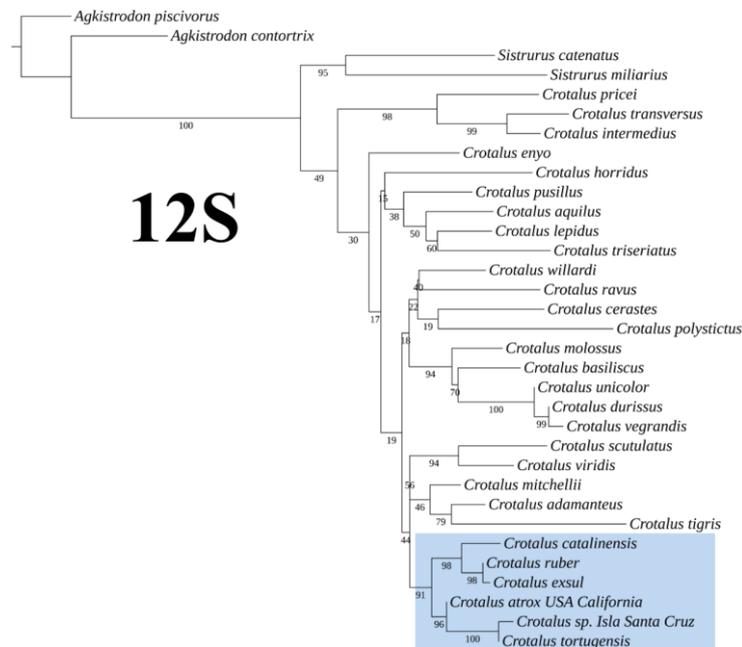


Figura 15. Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen 12S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

En el árbol filogenético del gen RAG1 (Figura 16), *A. contortrix* aparece como grupo externo, reafirmando su lejanía evolutiva con respecto al género *Crotalus*. Se observa que *C. viridis* y *C. tigris* forman un clado con un soporte del 57%, indicando una relación evolutiva cercana aunque no estadísticamente robusta.

C. tortugensis se agrupa con *C. atrox*, *C. lepidus*, *C. horridus*, *C. molossus* y *C. basiliscus*, con valores de soporte variables y cierta ambigüedad en las relaciones internas (soporte interno del 37%). Dentro de este clado, *C. molossus* aparece en un nodo propio, sugiriendo una diferenciación evolutiva particular en el contexto del gen RAG1. Por su parte, *C. mitchelli* se ubica en una posición basal dentro del género *Crotalus*, indicando un linaje divergente desde una etapa temprana.

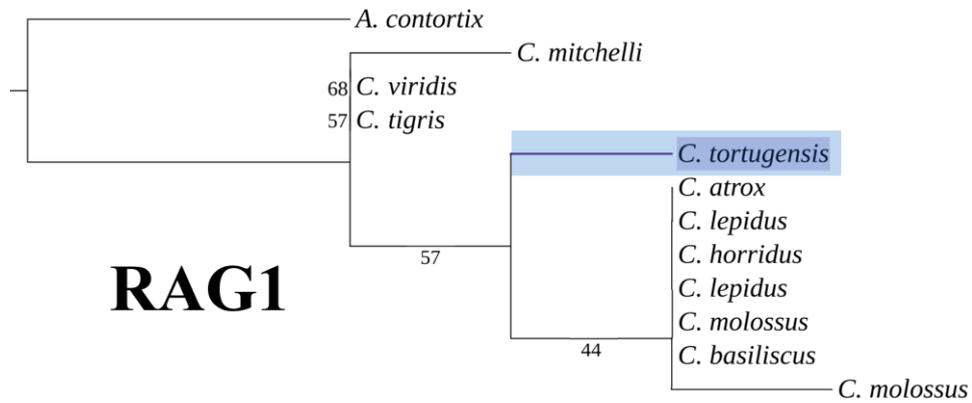


Figura 16. Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen RAG1. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

El árbol filogenético del gen CMOS (Figura 17) posiciona a *A. piscivorus* como grupo externo con un soporte elevado del 98%. *C. adamanteus* se identifica como un clado separado del resto de las especies de *Crotalus*, lo que sugiere una divergencia temprana en su evolución según este gen. *C. tigris*, *C. viridis* y *C. oreganus cerberus* forman un clado respaldado por un soporte del 83%, indicando una relación evolutiva estrecha entre estas especies. Por otro lado, se observa una politomía entre *Sistrurus catenatus*, *C. cerastes* y *C. mitchelli*, acompañada de valores de soporte bajos (10%-28%), lo que refleja ambigüedad en sus relaciones evolutivas.

C. atrox y *C. tortugensis* se agrupan como especies cercanas con un soporte significativo del 91%. Adicionalmente, *C. molossus* forma un clado con *C. lannomi*, respaldado por un soporte del 78%, mientras que un subclado incluye a *C. ericsmithi*, *C. horridus* y *C. stejnegeri*, aunque con niveles de soporte bajos (28%-33%), lo que evidencia incertidumbre en estas relaciones específicas.

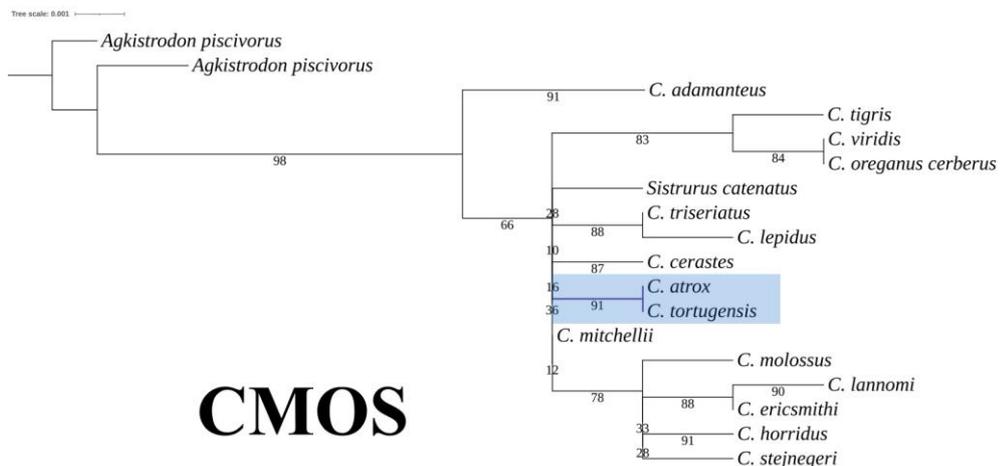


Figura 17. Inferencia filogenética con el enfoque de máxima verosimilitud del gen CMOS. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

8.2.4 Inferencias con diferentes concatenaciones

La filogenia obtenida mediante la concatenación de los genes 12S y 16S (Figura 18) posiciona a *A. contortrix* y *A. piscivorus* como grupo externo, evidenciando su separación temprana respecto a los géneros *Sistrurus* y *Crotalus*. Estos últimos presentan una diferenciación inicial bien respaldada por un soporte del 100%. Dentro del género *Crotalus*, se identifica un clado con un soporte del 61%, compuesto por *C. mitchelli*, *C. adamanteus*, *C. tigris*, *C. viridis* y *C. scutulatus*. Estas dos últimas especies se agrupan como hermanas y muestran una diversificación escalonada con soportes internos que varían entre el 61% y el 95%.

El grupo monofilético correspondiente a *C. atrox*, destacado en el recuadro azul, cuenta con un soporte del 100%. Dentro de este grupo, *C. catalinensis* se posiciona como especie hermana del resto. Este grupo se divide en dos clados principales: el primero, con un soporte del 100%, incluye a *C. ruber* y *C. exsul* como especies hermanas. El segundo clado, con un soporte del 82%, agrupa a las poblaciones continentales de *C. atrox* junto con las especies insulares *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz, estas últimas presentando un soporte del 100%.

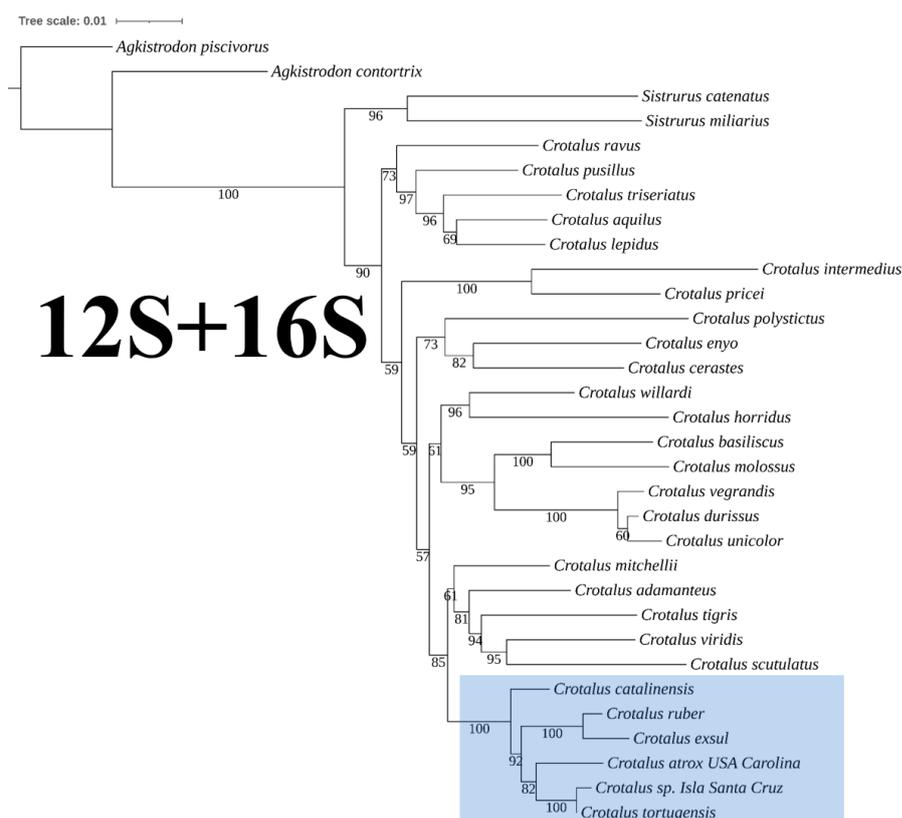


Figura 18. Inferencia filogenética con los genes 12S + 16S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

La filogenia obtenida mediante la concatenación de los genes ND5 y CytB (Figura 19) posiciona a *A. contortrix* y *A. piscivorus* como grupo externo, lo que confirma su divergencia temprana respecto a los géneros *Sistrurus* y *Crotalus*. Estos últimos muestran una separación bien definida con un soporte del 100%.

El complejo *C. atrox*, resaltado en el recuadro azul, presenta un soporte del 87% y se encuentra dividido en dos clados principales. El primer clado incluye a *C. ruber* y *C. exsul*, los cuales están relacionados como especies hermanas con un soporte del 94%. El segundo clado, con un soporte del 49%, agrupa a las poblaciones continentales de *C. atrox* junto con las especies insulares *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz. Dentro de este grupo, las especies insulares están respaldadas por un soporte del 90%. Este clado tiene como especie hermana a *C. adamanteus*, con un soporte del 77%. Adicionalmente, *C. mitchelli* y *C. tigris* forman un grupo hermano, respaldado por un soporte del 95%, lo que indica una relación evolutiva cercana entre estas especies.

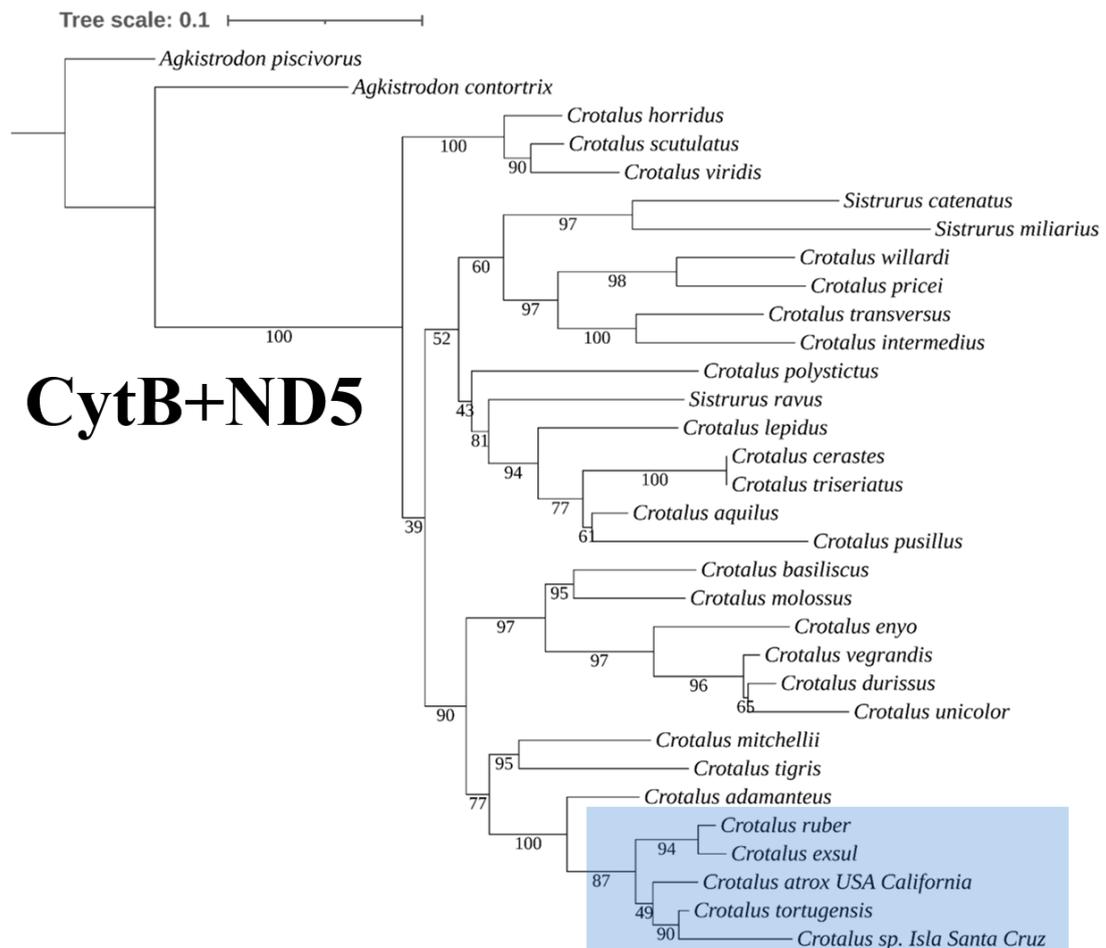


Figura 19. Inferencia filogenética con los genes CytB + ND5. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

La filogenia generada mediante la concatenación de los genes ND5, CytB, 12S y 16S (Figura 20) posiciona a *A. contortrix* y *A. piscivorus* como grupo externo, lo que confirma su divergencia temprana respecto a los géneros *Sistrurus* y *Crotalus*. Estos últimos presentan una separación clara y bien respaldada.

El grupo monofilético correspondiente a *C. atrox*, destacado en el recuadro azul, cuenta con un soporte elevado del 98%. Este grupo se subdivide en dos clados principales. El primer clado incluye a *C. ruber* y *C. exsul* como especies hermanas, con un soporte robusto del 100%. El segundo clado, respaldado por un soporte del 86%, agrupa a las poblaciones continentales de *C. atrox* junto con las especies insulares *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz. Dentro de este clado, las especies insulares presentan un soporte del 100%. *C. adamanteus* aparece como especie hermana de este grupo, con un soporte del 96%.

Por otra parte, se observa que *C. mitchelli* y *C. tigris* forman un grupo hermano, respaldado por un soporte del 92%, lo que indica una relación evolutiva cercana entre estas especies.

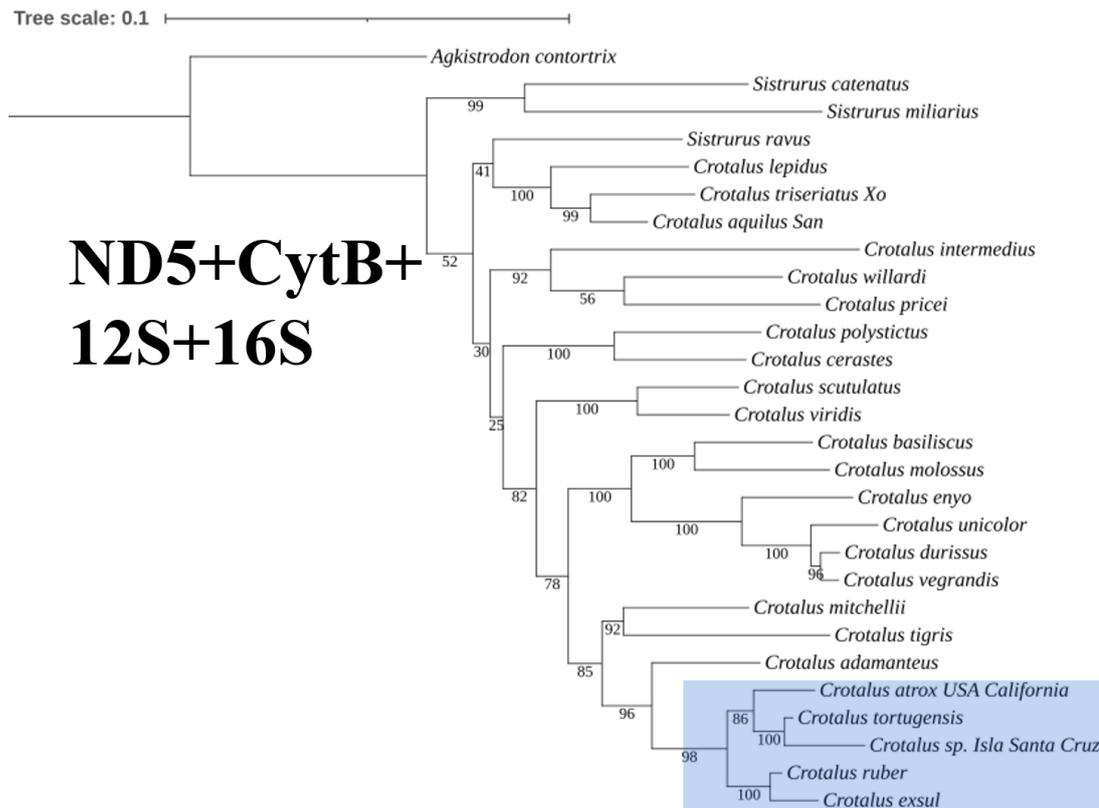


Figura 20. Inferencia filogenética con los genes CytB + ND5 + 12S + 16S. El recuadro azul muestra la ubicación del complejo de especies *Crotalus atrox*.

9. DISCUSIÓN

9.1 Estandarización de Microsatélites

Los microsatélites, secuencias repetitivas de DNA con alta tasa de mutación causada por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación, son herramientas fundamentales en estudios de genética poblacional debido a su elevado polimorfismo (Eckert & Hile, 2009; Ellegren, 2004; Selkoe & Toonen, 2006). La estandarización de las condiciones de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resulta esencial para garantizar la reproducibilidad y precisión de los datos obtenidos (Ellis et al., 2011).

En este sentido, se utilizaron primers propuestos por Pozarowski et al. (2012), estos primers fueron seleccionados debido a la cercanía evolutiva entre *Crotalus atrox* y las serpientes de cascabel de Isla Tortuga, lo que permitió aprovechar su cercanía para los análisis moleculares en este estudio (Narina et al., 2011). Para este trabajo, se implementó un protocolo con gradientes de temperatura y una mezcla maestra comercial (Takara), que incluye concentraciones estándar de magnesio y dNTP. El magnesio, cofactor esencial para la actividad de la ADN polimerasa, influye significativamente en la especificidad y eficiencia de la amplificación (Slack et al., 2011). Aunque no se evaluaron experimentalmente las concentraciones de magnesio, su inclusión en la mezcla maestra simplificó el proceso de optimización.

Las pruebas iniciales, realizadas a una temperatura de alineamiento de 55°C recomendada por el fabricante, resultaron en amplificaciones inespecíficas en algunos loci y en ausencia de producto amplificado en otros. Para superar estas limitaciones, se ajustaron las temperaturas de alineamiento. Por ejemplo, el locus Ca120 mostró mayor especificidad al incrementar la temperatura a 58°C, mientras que el locus Ca238 alcanzó condiciones óptimas bajo una temperatura similar, superando los valores previamente reportados de 55°C.

La literatura subraya que tanto la temperatura de alineamiento como la concentración de magnesio son factores clave para lograr amplificaciones específicas y reducir productos inespecíficos (Ely et al., 1998; Tian-tian et al., 2007). Concentraciones insuficientes de magnesio disminuyen la eficiencia de la amplificación, mientras que concentraciones excesivas incrementan el riesgo de artefactos (Slack et al., 2011; Tian-tian et al., 2007). Aunque este estudio no evaluó

directamente estas concentraciones, los ajustes en la temperatura de alineamiento fueron efectivos para mejorar la calidad de los productos amplificados.

Los resultados obtenidos resaltan la importancia de optimizar cuidadosamente las condiciones de PCR al trabajar con microsátélites. Este enfoque asegura resultados reproducibles y específicos, maximizando la utilidad de estos marcadores en estudios de conservación y genética poblacional. En particular, su aplicación en especies insulares como *Crotalus tortugensis*, que enfrentan desafíos genéticos asociados al aislamiento geográfico, enfatiza la necesidad de herramientas precisas para evaluar su diversidad genética y desarrollar estrategias de conservación adecuadas.

9.2 Inferencia Filogenética

El complejo de especies *Crotalus atrox* fue confirmado como un grupo monofilético con niveles altos de soporte estadístico (87%-100%), en concordancia con estudios previos (Castoe & Parkinson, 2006; Murphy et al., 2002; Ruiz-Sanchez, 2019). Este complejo se divide en dos clados principales: uno de afinidad peninsular, compuesto por *C. ruber*, *C. exsul* y *C. catalinensis*; y otro de afinidad continental, que incluye a *C. atrox*, *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz. La diferenciación observada refleja la historia geológica de la península de Baja California, particularmente la separación del continente y la formación del Golfo de California hace aproximadamente 5.5 millones de años (Dolby et al., 2015).

El análisis basado en Máxima Verosimilitud (ML) empleó modelos de sustitución avanzados (G+I) y pruebas de soporte estadístico como bootstrap, SH-aLRT y aproximación bayesiana rápida, lo que permitió obtener niveles de soporte entre 87% y 100% para los clados identificados (Eberle et al., 2019; Mulcahy & Macey, 2009; Shen et al., 2021). Aunque Castoe et al. (2007), utilizando exclusivamente ND4, no identificaron diferencias genéticas significativas entre *C. tortugensis* y *C. atrox*, el presente estudio integró otros genes mitocondriales como 12S, 16S, ND5 y CytB, los cuales mostraron diferenciaciones genéticas suficientes para separar estas especies. Este hallazgo subraya la importancia del enfoque multilocus para superar las limitaciones de marcadores individuales y abordar eventos de divergencia reciente (Hillis et al., 2021).

El marcador ND4 no mostró diferenciación genética significativa entre *C. tortugensis* y *C. atrox*, lo cual podría interpretarse en función de los resultados

obtenidos, considerando tanto la posibilidad de flujo génico histórico como las características intrínsecas del marcador. Este gen presentó un valor gamma de 0.97 y un 37% de sitios invariables, indicando una capacidad limitada para resolver eventos recientes de especiación (Castoe et al., 2007). En contraste, ND5, con un gamma de 1.3 y un 29% de sitios invariables, mostró mayor sensibilidad para detectar divergencias recientes, lo que evidencia la variabilidad entre marcadores y la necesidad de emplear múltiples genes para optimizar la resolución filogenética (Song et al., 2010; Soubrier et al., 2012).

El aislamiento prolongado en islas se ha documentado como un motor clave de especiación en cascabeles y en otras especies (Gray & Cavers, 2014; Meik et al., 2018; Ruiz-Sanchez, 2019; Sherpa et al., 2024). En *C. tortugensis*, la diferenciación genética parece estar vinculada al origen volcánico de Isla Tortuga hace aproximadamente 1.7 millones de años (Batiza, 1978), junto con fluctuaciones climáticas y cambios en los niveles del mar durante el Pleistoceno, que pudieron haber facilitado eventos de dispersión esporádica entre el continente y las islas, promoviendo la especiación peripátrica (Colvin, 2018; Leaché et al., 2016; Meik et al., 2018; Ramírez-Reyes et al., 2021). La integración de datos geológicos, genéticos y ecológicos permite una comprensión más profunda de los procesos evolutivos que moldearon estas poblaciones. Correlacionar los eventos de especiación con transformaciones tectónicas y climáticas en el Golfo de California durante el Cuaternario resulta clave para entender estos patrones (Schield et al., 2015, 2017). Asimismo, la diferenciación genética observada entre *C. tortugensis* y *C. atrox* confirma la influencia del aislamiento insular y la historia geológica en estos procesos, destacando la relevancia de integrar múltiples líneas de evidencia para comprender la diversificación en especies insulares (Castoe et al., 2007; Gray & Cavers, 2014; Meik et al., 2018; Sherpa et al., 2024).

Desde una perspectiva de conservación, *C. tortugensis* podría ser particularmente vulnerable a perturbaciones debido a su historia evolutiva aislada y su limitada conectividad genética. Estudios futuros que integren microsatélites y análisis genómicos de alta resolución podrían proporcionar información clave sobre la estructura genética poblacional y los niveles de variabilidad genética, contribuyendo a estrategias de conservación más efectivas.

10. CONCLUSIONES

A partir de este estudio se confirmó que el complejo de especies *Crotalus atrox* constituye un grupo monofilético integrado por dos clados principales: uno de afinidad peninsular, conformado por *C. ruber*, *C. exsul* y *C. catalinensis*, y otro de afinidad continental, que incluye a *C. atrox*, *C. tortugensis* y *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz. Asimismo, se determinó que las poblaciones insulares de Isla Tortuga e Isla Santa Cruz comparten un ancestro común reciente con las poblaciones continentales de *C. atrox*, lo que respalda la propuesta de reconocer tanto a *C. tortugensis* como a *Crotalus sp.* de Isla Santa Cruz como especies válidas. Por último, se logró optimizar las condiciones de PCR para los loci microsatélites Ca120, Ca131, Ca223, Ca238 y Ca290 en *Crotalus tortugensis*, lo que constituye un avance significativo en la caracterización genética de estas especies.

11. PERSPECTIVAS

Para que los microsatélites funcionen como marcadores precisos y comparables en diferentes estudios, es crucial estandarizar las condiciones de PCR, lo que garantiza la reproducibilidad y precisión de los datos obtenidos. En este proyecto, utilizamos iniciadores desarrollados inicialmente para *Crotalus atrox* (Pozarowski, 2012) debido a la falta de iniciadores específicos para *C. tortugensis*. Esta estrategia ha sido empleada en otros estudios, como en *Sceloporus slevini* (Narina et al., 2011), donde los microsatélites empleados fueron identificados en *Sceloporus undulatus* (Rosenblum et al., 2007). De manera similar, en *Crotalus horridus* (Anderson, 2006) se optimizaron condiciones de amplificación para microsatélites desarrollados originalmente para *Sistrurus catenatus* (Gibbs et al., 1998). La efectiva amplificación en estos estudios y el presente proyecto apoya la viabilidad del uso de los microsatélites desarrollados en especies relacionadas para estudios de diversidad genética y estructura genética poblacional en *C. tortugensis*. Esto también evidencia la alta conservación de las regiones flanqueantes de los microsatélites, algo que se ha observado en mamíferos como bovinos (Moore et al., 1991), ratas y ratones (Kondo et al., 1993)

La capacidad de amplificar los mismos microsatélites en distintas especies sugiere que estas secuencias podrían haberse originado antes de la divergencia de las especies actuales, lo que implica un origen en un ancestro común (Primmer et al., 1996). Este hallazgo es particularmente relevante al considerar el alcance de los microsatélites en la reconstrucción de relaciones evolutivas, incluso entre otras especies del complejo *C. atrox*, las cuales aún carecen de microsatélites específicos. A la fecha, no se ha realizado un análisis exhaustivo de la diversidad genética de las especies del complejo *C. atrox* en condiciones de aislamiento insular, lo cual ofrece un área de oportunidad importante para futuras investigaciones.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Amit Roy, S. R. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies-A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>
2. Anderson, C. D. (2006). Utility of a set of microsatellite primers developed for the massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus*) for population genetic studies of the timber rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 514-517. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01302.x>
3. Arnaud, G., Lazcano, D., & Wilson, L. D. (2019). *Notes on the Herpetofauna of Northwestern Mexico 2: Tortuga Island, Gulf of California, Mexico*.
4. Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), 729-744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
5. Batiza, R. (1978). Geology, petrology, and geochemistry of Isla Tortuga, a recently formed tholeiitic island in the Gulf of California. *Geological Society of America Bulletin*, 89(9), 1309. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(1978\)89<1309:GPAGOI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(1978)89<1309:GPAGOI>2.0.CO;2)
6. Blair, C., Bryson, R. W., Linkem, C. W., Lazcano, D., Klicka, J., & McCormack, J. E. (2019). Cryptic diversity in the Mexican highlands: Thousands of UCE loci help illuminate phylogenetic relationships, species limits and divergence times of montane rattlesnakes (Viperidae: *Crotalus*). *Molecular Ecology Resources*, 19(2), 349-365. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12970>
7. Blair, C., & Sánchez-Ramírez, S. (2016). Diversity-dependent cladogenesis throughout western Mexico: Evolutionary biogeography of rattlesnakes

- (Viperidae: Crotalinae: Crotalus and Sistrurus). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 97, 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.12.020>
8. Bryson, R. W., Murphy, R. W., Lathrop, A., & Lazcano-Villareal, D. (2011). Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: A case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes: Phylogeography of the *Crotalus triseriatus* group. *Journal of Biogeography*, 38(4), 697-710. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2010.02431.x>
 9. Carbajal-Márquez, R. A., Cedeño-Vázquez, J. R., Martínez-Arce, A., Neri-Castro, E., & Machkour- M'Rabet, S. C. (2020). Accessing cryptic diversity in Neotropical rattlesnakes (Serpentes: Viperidae: Crotalus) with the description of two new species. *Zootaxa*, 4729(4). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4729.4.1>
 10. Colvin, A. Z. (2018). Peripatric speciation. *WikiJournal of Science*, 1(2), 008. <https://doi.org/10.15347/wjs/2018.008>
 11. Dolby, G. A., Bennett, S. E. K., Lira-Noriega, A., Wilder, B. T., & Munguía-Vega, A. (2015). Assessing the Geological and Climatic Forcing of Biodiversity and Evolution Surrounding the Gulf of California. *Journal of the Southwest*, 57(2-3), 391-455. <https://doi.org/10.1353/jsw.2015.0005>
 12. Gibbs, H. L., Prior, K., & Parent, C. (1998). *Characterization of DNA Microsatellite Loci From a Threatened Snake: The Eastern Massasauga Rattlesnake (Sistrurus Catenatus) and Their Use in Population Studies*.
 13. Gray, A., & Cavers, S. (2014). Island Biogeography, the Effects of Taxonomic Effort and the Importance of Island Niche Diversity to Single-Island Endemic

- Species. *Systematic Biology*, 63(1), 55-65.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syt060>
14. 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.
15. Hillis, D. M., Chambers, E. A., & Devitt, T. J. (2021). Contemporary Methods and Evidence for Species Delimitation. *Ichthyology & Herpetology*, 109(3).
<https://doi.org/10.1643/h2021082>
16. Klauber, L. (1972). *Rattlesnakes, Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind*. University of California Press, Berkeley.
17. Kondo, Y., Mori, M., Kuramoto, T., Yamada, J., Beckmann, J. S., Simon-Chazottes, D., Montagutelli, X., Guinet, J.-L., & Serikawa, T. (1993). DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. *Mammalian Genome*, 4(10), 571-576.
<https://doi.org/10.1007/BF00361387>
18. Lawson, R., Slowinski, J. B., Crother, B. I., & Burbrink, F. T. (2005). Phylogeny of the Colubroidea (Serpentes): New evidence from mitochondrial and nuclear genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2), 581-601.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.07.016>
19. Marshall, J. C., Bastiaans, E., Caccone, A., Camargo, A., Morando, M., Niemiller, M. L., Pabijan, M., Russello, M. A., Sinervo, B., Sites, Jr., J. W., Vences, M., Werneck, F. P., Wollenberg Valero, K. C., & Steinfartz, S. (2018). *Mechanisms of speciation in reptiles and amphibians: A synopsis*. PeerJ Preprints. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.27279v1>

20. Meik, J. M., Schaack, S., Flores-Villela, O., & Streicher, J. W. (2018). Integrative taxonomy at the nexus of population divergence and speciation in insular speckled rattlesnakes. *Journal of Natural History*, 52(13-16), 989-1016. <https://doi.org/10.1080/00222933.2018.1429689>
21. Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215-1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
22. Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattick, J. S., Georges, M., & Hetzel, D. J. S. (1991). The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10(3), 654-660. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(91\)90448-N](https://doi.org/10.1016/0888-7543(91)90448-N)
23. Muñoz-Mora, V. H., Suárez-Atilano, M., Maltagliati, F., Ramírez-Corona, F., Carbajal-Saucedo, A., Percino-Daniel, R., Langeneck, J., D'Addario, M., & Sunny, A. (2022). A tale about vipers' tails: Phylogeography of black-tailed rattlesnakes. *Herpetozoa*, 35, 141-153. <https://doi.org/10.3897/herpetozoa.35.e84297>
24. Narina, S. S., d'Orgeix, C. A., & Sayre, B. L. (2011). Optimization of PCR conditions to amplify microsatellite loci in the bunchgrass lizard (*Sceloporus slevini*) genomic DNA. *BMC Research Notes*, 4(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-26>
25. Pozarowski, K., Bryan, D. S., Bosse, R., Watson, E., & Herrmann, H.-W. (2012). Development of polymorphic microsatellite loci for the rattlesnake species *Crotalus atrox*, *C. cerastes*, and *C. scutulatus* (Viperidae: Crotalinae) and cross-species amplification of microsatellite markers in *Crotalus* and

- Sistrurus species. *Conservation Genetics Resources*, 4(4), 955-961.
<https://doi.org/10.1007/s12686-012-9682-x>
26. Qian, H. (2010). Environment–richness relationships for mammals, birds, reptiles, and amphibians at global and regional scales. *Ecological Research*, 25(3), 629-637. <https://doi.org/10.1007/s11284-010-0695-1>
27. Reyes Velasco, J., Cox, C. L., Jones, J. M., Borja, M., & Campbell, J. A. (2022). HOW MANY SPECIES OF RATTLESNAKES ARE THERE IN THE *Crotalus durissus* SPECIES GROUP (SERPENTES: CROTALIDAE)? *Revista Latinoamericana de Herpetología*, 5(1), 43-55.
<https://doi.org/10.22201/fc.25942158e.2022.1.330>
28. Riera, M., Rojas, M., & Zapata, P. (2010). Protocolo de extracción deDNA por salting-out para pequeños volúmenes de sangre. *Rev. Cienc. Tecnol.*, 12(14).
29. Ruiz-Sanchez. (2019). Phylogenetic relationships and origin of the rattlesnakes of the Gulf of California islands (Viperidae: Crotalinae: Crotalus). *Herpetological Journal*, Volume 29, Number 3, 162-172.
<https://doi.org/10.33256/hj29.3.162172>
30. Rundle, H. D., & Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3), 336-352. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x>
31. Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615-629. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x>
32. Shaffer, H. B., Gidiş, M., McCartney-Melstad, E., Neal, K. M., Oyamaguchi, H. M., Tellez, M., & Toffelmier, E. M. (2015). Conservation Genetics and Genomics of Amphibians and Reptiles. *Annual Review of Animal Biosciences*, 3(1), 113-138. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110920>

33. Wiens, J. J., Kuczynski, C. A., Smith, S. A., Mulcahy, D. G., Sites, J. W., Townsend, T. M., & Reeder, T. W. (2008). Branch Lengths, Support, and Congruence: Testing the Phylogenomic Approach with 20 Nuclear Loci in Snakes. *Systematic Biology*, 57(3), 420-431. <https://doi.org/10.1080/10635150802166053>

13. ANEXOS

Protocolo extracción de DNA de Riera et al., (2010) (100 μ L)

Soluciones:

- Solución de lisis de glóbulos rojos
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 1% Tritón X-100
 - 11% Sacarosa
- Solución de lisis de glóbulos blancos
 - 10 mM Tris-HCl pH 8
 - 400 mM NaCl
 - 2 mM EDTA
- Proteinasa K
 - 1 mg/mL Proteinasa K
 - 1% SDS
 - 1 mM EDTA
- SDS 20%
- Acetato de Potasio 3M
- Isopropanol
- Etanol
- Agua Estéril (NFW - Nuclease Free Water)

Pasos:

1. Tomar una alícuota de 100 μ L de muestra en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Eliminar todo el alcohol/etanol presente en la muestra.
 - a. Si es necesario, centrifugar brevemente para facilitar la eliminación del etanol.
3. Añadir 180 μ L de solución de lisis de glóbulos rojos (SnGR).
4. Centrifugar a 12,000 rpm durante 3 minutos.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Repetir el proceso 3 veces.
7. Añadir:
 - a. 60 μ L de buffer de lisis GB.

- b. 10 μ L de proteinasa K.
 - c. 2 μ L de SDS al 20%.
- 8. Incubar durante 1 hora en el ThermoMixer a 1000 rpm.
- 9. Agregar 30 μ L de acetato de sodio 3M.
- 10. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- 11. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 12. En el tubo con el pellet, añadir 30 μ L de acetato de sodio 3M.
- 13. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- 14. Unificar los sobrenadantes en un solo tubo.
- 15. Añadir 200 μ L de isopropanol para precipitar el DNA.
- 16. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- 17. Realizar el lavado del pellet y descartar el sobrenadante.
 - a. El pellet corresponde al DNA precipitado.
- 18. Añadir 200 μ L de etanol para limpiar el pellet.
- 19. Vortexear para facilitar el lavado.
- 20. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 minutos.
- 21. Retirar cuidadosamente el alcohol sin afectar el pellet.
- 22. Dejar los tubos con las tapas abiertas hasta la evaporación completa del alcohol/etanol al 70%.
- 23. Resuspender en 35 μ L de agua libre de nucleasas (NFW)

Protocolo de extracción de DNA de Miller et al., (1988) modificado

Soluciones:

- Solución de lisis (QIAGEN)
- Proteinasa K
 - 50 mM Tris-HCl
 - pH 7.5-8
 - 3 mM CaCl
- Buffer de precipitación de proteínas (QIAGEN)
- Isopropanol
- Etanol
- Agua Estéril (NFW - Nuclease Free Water)

Pasos:

1. Pesar 50 mg de muestra.
2. Eliminar todo el alcohol/etanol presente en la muestra.
 - a. Si es necesario, centrifugar brevemente para facilitar la eliminación del etanol.
3. Añadir 400 μ L de buffer de lisis.
4. Incubar durante 20 minutos en baño maría o en el termomixer a 70°C.
5. Agregar 7 μ L proteinasa K.
6. Incubar durante toda la noche a 55°C - 56°C.
7. Vortexear antes y después del baño maría.
8. Agregar buffer de precipitación de proteínas 135 μ L.
9. Vortexear a máxima velocidad 30-40 segundos
10. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos a 10°C.
11. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
12. Añadir 400 μ L de isopropanol para precipitar el DNA.
13. Invertir el tubo unas 30 veces para facilitar la precipitación.
14. Dejar en congelación hasta el día siguiente.
15. Atemperar la muestra antes de continuar con el procedimiento.
16. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos.
17. Eliminar el sobrenadante con precaución, asegurándose de no perder el pellet.
18. Añadir 100 μ L de etanol.

19. Realizar 5 inversiones para lavar el pellet.
20. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos.
21. Descartar el sobrenadante.
22. Dejar las tapas abiertas para permitir la evaporación del alcohol.
23. Resuspender en RSP, NFW o agua inyectable en un volumen de 20-50 μL .
24. Cuantificar el DNA obtenido.

Protocolo de purificación con perlas paramagnéticas

Soluciones:

- Perlas paramagnéticas AxyGen Biosciences
- Etanol al 80%
- Agua Estéril (NFW - Nuclease Free Water)

Pasos:

1. Añadir 5 μ L de perlas magnéticas por cada muestra para eliminar fragmentos de DNA de gran longitud.
2. Mezclar mediante vortex.
3. Dejar reposar durante 10-15 minutos.
4. Aplicar un breve centrifugado (spin).
5. Colocar las muestras en el magneto.
 - a. El líquido debe ser trasladado a un nuevo tubo.
6. Añadir 12 μ L de perlas adicionales al sobrenadante recolectado.
7. Incubar durante 10 minutos a 1800 rpm en un Thermomixer (Thermo Fisher Scientific) para recolectar el DNA amplificado restante.
8. Colocar nuevamente en el magneto y eliminar el sobrenadante, asegurándose de que el DNA permanezca en las perlas.
9. Realizar dos lavados con 180 μ L de etanol al 80%, con un intervalo de 30 segundos entre cada lavado.
 - a. No exceder los 1:30 minutos en total.
 - b. El lavado debe realizarse en el momento de la adición del etanol.
10. Dejar evaporar el etanol sin permitir que el pellet se seque completamente.
11. Aplicar un spin con tapa para eliminar cualquier residuo de etanol.
12. Una vez seco el pellet, resuspender en RSPB o NFW.
13. Incubar y aplicar un breve centrifugado (spin).
14. Evitar la desecación del pellet para facilitar su disolución.
15. Una vez resuspendido, colocar nuevamente en el magneto y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo para su almacenamiento (DNA purificado).