



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Biología

“Análisis de la estructura y diversidad
genética de cuatro poblaciones de
Crotalus molossus nigrescens”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

JOSÉ AVILA CERVANTES

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. VICTOR HUGO REYNOSO
ROSALES

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
DR. MARK EARL OLSON

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de mayo de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL)** del alumno **AVILA CERVANTES JOSE** con número de cuenta 400048093 con la tesis titulada "**Análisis de la estructura y diversidad genética de cuatro poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens***", realizada bajo la dirección del **DR. VICTOR HUGO REYNOSO ROSALES**:

Presidente: DR. JUAN NUÑEZ FARFAN
Vocal: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
Secretario: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Suplente: DR. OSCAR ALBERTO FLORES VILLELA
Suplente: DR. MARK EARL OLSON

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de agosto de 2011.

María del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó durante mi estudios de maestría.

Al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato (clave del registro FONINV GTO-04-C02-112; Convenio 04-07-A-052) “Estudio de los patrones básicos de la biología de la serpiente de cascabel (*Crotalus*) para la optimización de su reproducción y desarrollo en cautiverio, con miras a su explotación sustentable para fines peleteros.”

Al proyecto PAPIIT, UNAM, IN06911-3. Las iguanas del Golfo de California y sus islas fase 1, filogeografía y genética de poblaciones de los géneros *Ctenosaura* y *Sauromalus* por el apoyo con la compra de algunos reactivos.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología.

Al comité Tutorial integrado por:

Dr. Victor Hugo Reynoso Rosales

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Dr. Mark Earl Olson

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. José Ávila y a la Dra. Gloria Cervantes por el apoyo para la compra de ganchos y sacos herpetológicos, GPS y sueros anitviperinos, sin ustedes este proyecto no habría sido posible.

A Aldo e Israel por su apoyo en el campo.

A Eric por su gran apoyo en el campo y por enseñarme todo lo que sabe.

A la dirección de la Reserva del Pedregal de San Ángel por permitirme entrar y muestrear en la reserva.

A Guillermo por su ayuda con las muestras del Pedregal de San Ángel y por capacitarme en caso de un accidente ofídico.

A los biólogos Mónica Salmerón Estrada y Roberto Romero Ramírez del herpetario de la facultad de Ciencias por las muestras proporcionadas.

Al señor Andrés Quintana por las muestras de Llanos de Santa Ana.

A Jaime Gasca por su paciencia y dedicación para enseñarme a analizar mis datos.

Al Dr. Luis Eguiarte por las críticas constructivas y buenos comentarios para mejorar este trabajo.

A Laura Márquez por su apoyo en el laboratorio.

A mis padres Gloria y José,
a mis hermanos Héctor y Rodrigo
con mucho cariño y amor.

INDICE

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Genética de la conservación

1.2 Conservación de serpientes de cascabel

1.3 Diversidad de serpientes de cascabel en México

1.4 Estudios genéticos en serpientes

1.5 Estudios genéticos en serpientes de cascabel

1.6 Género *Crotalus*

1.7 Especie de estudio

1.7.1 Identificación

1.7.2 Distribución

1.7.3 Ecología

1.8 Microsatélites

2. JUSTIFICACIÓN

3. HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

4.2 Objetivos particulares

5. MÉTODO

5.1 Trabajo de campo

5.2 Trabajo de laboratorio

5.2.1 Extracción de DNA

5.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar
microsatélites

5.3 Análisis de datos

5.3.1 Análisis de fragmentos

5.3.2 Análisis estadísticos

5.3.2.1 Identificación de alelos nulos

5.3.2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

5.3.2.3 Desequilibrio del ligamiento

5.3.2.4 Variación genética

5.3.2.5 Estructuración genética

5.3.2.6 Flujo genético

5.3.2.7 Análisis de varianza molecular

6. RESULTADOS

6.1 Alelos nulos

6.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

6.3 Desequilibrio del ligamiento

6.4 Variación genética

6.5 Estructuración genética

6.6 Flujo genético

6.7 Análisis de varianza molecular

6.8 Estructura genética

7. DISCUSIÓN

7.1 Amplificación cruzada de microsatelites

7.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

7.3 Variación genética

7.4 Estructura Genética

7.5 Flujo genético

7.6 Implicaciones en la conservación

8. CONCLUSIONES

9. LITERATURA CITADA

10. APÉNDICE

RESUMEN

“Análisis de la estructura y diversidad genética de cuatro poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens*.”

México tiene la mayor diversidad de serpientes de cascabel en el mundo. Cuenta con más del 80% de las especies dentro de los géneros *Crotalus* y *Sistrurus* y de estas el 40% son especies endémicas. Todos los estudios genéticos en serpientes de cascabel se han realizado en especies que se distribuyen en Estados Unidos de América. Este trabajo se realizó en *Crotalus molossus nigrescens* que se distribuye desde Sonora al este de Chihuahua hacia la Meseta Mexicana. Se encuentra protegida por la Norma Oficial Mexicana 059 ECOL 2011 bajo la categoría “Sujeta a protección especial” (Pr). La especie en su distribución sufre de destrucción y fragmentación de hábitat causada por desarrollo agrícola y urbano. Adicionalmente es cazada de manera ilegal para su uso en la industria peletera. Se analizó la estructura y diversidad genética de cuatro poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens*, mediante seis microsatélites diseñados para otras especies de serpientes de cascabel que amplificaron correctamente en nuestra especie. De las poblaciones tres se encuentran en Guanajuato y una el Distrito Federal. Los seis loci utilizados fueron polimorfos. Las cuatro poblaciones analizadas tienen déficit de heterocigotos y sufren procesos de endogamia. Determinamos tres poblaciones o demes genéticos mediante el programa STRUCTURE. Una de las poblaciones de Guanajuato, Las Palomas, parece tener un origen híbrido de las otras dos poblaciones de Guanajuato. Esto por el desequilibrio del ligamiento presente en dos locos y las altas tasas de migración entre las poblaciones. También se encontró poca estructuración genética entre las poblaciones en comparación con otros estudios realizados en serpientes de cascabel. Finalmente se recomienda que las cuatro poblaciones se sujeten a planes de manejo y conservación, pero la población que más atención debe tener es la del Pedregal de San Ángel por su fragmentación, pérdida de hábitat y aislamiento acelerado.

ABSTRACT

“Analysis of the structure and genetic diversity of four populations of *Crotalus molossus nigrescens*.”

Mexico has the greatest diversity of rattlesnakes in the genus *Crotalus* y *Sistrurus*, with over 80% of the species found in the country and of these 45% are endemic. All genetic studies on rattlesnakes have been done on species distributed in the United States. This study was performed on *Crotalus molossus nigrescens* which is distributed from Sonora to the east of Chihuahua and south Coahuila to the Mexican Plateau. This species is under special protection by Mexican laws. This species suffers habitat fragmentation and destruction by agriculture and urban development, as well as hunting for skin trade. We analyzed the diversity and genetic structure of four populations of *Crotalus molossus nigrescens* in three localities of Guanajuato and one in Mexico City. We used primers of microsatellites designed for other species of rattlesnakes that successfully amplified in our species. The six loci used in this study were polymorphic. The four populations have heterozygote deficiencies and suffer of inbreeding processes. We identified three genetic populations or demes: The population of Pedregal de San Angel, the population Llanos de Santa Ana, and a third population consisting of Las Palomas and Quinta Caliman. The population of Las Palomas seems to have a hybrid origin from the populations of Llanos de Santa Ana and Quinta Caliman because of the linkage disequilibrium present in two loci and the high rates of migration between the two populations. Furthermore, we found little genetic structure between the populations despite their geographic distance, compared with other studies realized in the genus. We recommend the four populations to be protected and managed under a conservation program, but the one that requires the most attention is the population of Pedregal de San Angel because of its accelerated reduction of habitat, fragmentation and isolation.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Genética de la conservación

La biología de la conservación es la aplicación de la ciencia dedicada a tratar las especies, comunidades y ecosistemas perjudicados directa o indirectamente por el hombre u otros agentes. Su meta es proporcionar principios y herramientas para preservar la diversidad biológica (Soulé, 1985). La conservación se puede entender como un intento de proteger la diversidad genética producida por la evolución en la Tierra en 3500 millones de años (Eisner, *et al.*, 1995).

El mundo ahora es muy distinto a como era hace unos 10,000 años, incluso es distinto a como era hace 100 años. Todos los ecosistemas naturales del planeta han sido alterados por el hombre. Muchas especies han sufrido extinciones prematuras, los ciclos químicos e hidrológicos se han interrumpido, la diversidad biológica se ha mermado, todo a causa de 6.4 mil millones de personas (Meffe *et al.*, 2006). Las principales amenazas para la biodiversidad según Groom (2006) son:

- Degradación del hábitat: contaminación, transformación, fragmentación.
- Sobreexplotación: cacería, colecta, tráfico.
- Especies invasoras: depredación, parasitismo, enfermedades, competencia, hibridización.
- Cambio Climático: ocasionado por la actividad antropogénica.

La diversidad genética es uno de los tres tipos de biodiversidad reconocidos por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) que debe ser conservado, junto con la diversidad de especies y ecosistemas. La implicación de la relación conservación-diversidad genética puede considerarse desde distintos niveles: genes, individuos, poblaciones, especies y géneros (Allendorf y Luikart, 2007). Existe una gran diversidad de trabajos de genética de la conservación, pero se pueden clasificar en 5 categorías principales (Randall *et al.*, 2008):

1. Manejo y reintroducción de poblaciones de cautiverio.
2. Descripción e identificación de individuos, estructura poblacional, relaciones de parentesco y relaciones taxonómicas.
3. Detección y predicción de los efectos de la pérdida de hábitat, fragmentación y aislamiento.
4. Detección y predicción de los efectos de hibridación
5. Entender la relación de la adecuación y/o adaptación con los caracteres genéticos.

La genética contribuye a la conservación al minimizar los efectos de la endogamia y la pérdida de diversidad genética. Esto se logra mediante estudios que permiten identificar poblaciones amenazadas, determinando la estructura poblacional, resolviendo incertidumbres taxonómicas, definiendo unidades de manejo dentro de la especie, identificar poblaciones y sitios de reintroducción. Todo esto nos provee de herramientas para a un mejor entendimiento de la biología de la especie (Frankham *et al.*, 2009).

1.2 Conservación de serpientes de cascabel

Las principales amenazas para la supervivencia de las serpientes de cascabel están relacionadas con el hombre, y se pueden clasificar en dos según Timmerman y Martin (2003):

- Directas: Cacería por miedo y colecta con fines comerciales.
- Indirectas: Destrucción y fragmentación de hábitat

Las indirectas son la mayor amenaza para la supervivencia de las poblaciones, ya que las pone en mayor contacto con el hombre y las aísla genéticamente. Para su conservación, Brown (1993) propone que es necesario proteger las áreas donde se distribuyen, monitorear las poblaciones, hacer programas de investigación de las poblaciones, educación a las comunidades y legislar su protección.

Dodd (1987) sugiere que existen características que predisponen a una población o especie de serpiente a la extinción. Son de particular importancia las poblaciones con:

- 1) Poblaciones confinadas en áreas pequeñas o que viven en islas
- 2) Con hábitos especializados a su nicho ecológico
- 3) Sujetas a alta mortalidad, principalmente en crías
- 4) Con densidades poblacionales variables o bajas
- 5) Con bajas tasas intrínsecas de crecimiento poblacional
- 6) Gran tamaño corporal

Para los factores 4 y 5 se conoce poco sobre las serpientes mexicanas como para ser útiles en predecir su extinción.

Greene y Campbell (1992) realizaron un resumen de estudios de estos factores en especies de vipéridos y encontraron:

- 1) Especies de distribución restringida: 74 especies y subespecies de crotálicos tienen registros de una o pocas localidades, de las cuales se desconoce con certeza su distribución actual o que tienen rangos de distribución pequeños y/o fragmentados. Otras 38 subespecies de vipéridos tienen rangos de distribución pequeños y/o fragmentados.
- 2) Transformación de hábitat y hábitos especializados: La transformación del hábitat es la mayor amenaza para las poblaciones de vipéridos. La pérdida masiva de hábitat debida a la agricultura y la deforestación a ocurrido en todas las regiones que contienen la mayor diversidad de especies de vipéridos (Selva de Brasil, Valles y Bosques Inter-Andinos, Desiertos de Norte América, Praderas de Norte América, la vertiente costera y las Planicies de Centro América). De estas zonas se conoce que han sufrido declinación poblacional siete especies de vipéridos.
- 3) Mortalidad por causas no naturales: Los vipéridos son perseguidos de manera rutinaria por los humanos en todo el mundo. También se les mata con fines comerciales o por deporte. Los efectos por estas causas han sido poco estudiados y poco entendidos.

- 4) Tamaño corporal grande: Se conoce que para vipéridos de talla corporal grande puede llevar hasta 10 años llegar a la madurez sexual, y se reproducen una vez cada 3 o 4 años, lo que los pone necesariamente en alto riesgo.

1.3 Diversidad de serpientes de cascabel en México

México representa el segundo lugar en especies de reptiles del mundo. Cuenta con 804 especies (Flores-Villela y Canseco-Márquez, 2004) de un total mundial de 8285 especies (Uetz, 2010). Más del 80% de las especies dentro de los géneros *Crotalus* y *Sistrurus* se encuentra en México y del total más del 45% de las especies son endémicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de especies de serpientes de cascabel.

Autor	Año	Total de Especies	Especies Mexicanas	Especies Endémicas de México
Uetz Beaman y Hayes	2010	38	32(84.2%)	17(53.1%)
Campbell y Lamar	2008	37	31(83.7%)	16(43.2%)
	2004	33	30(90.9%)	15(45.5%)

La UICN tiene contemplados en su lista roja 1385 especies de reptiles a nivel mundial, de las cuales 22 están extintas, 423 están en peligro o son vulnerables y 937 no cuentan con datos suficientes o son de menor preocupación. De estas 95 se encuentran en México y 29 corresponden a serpientes del género *Crotalus*, pero todas se encuentran en la categoría “least concern”. Esta asignación se debe principalmente a la falta de datos.

Las serpientes de cascabel solían ser muy abundantes en muchas regiones de México, pero la mayoría de las poblaciones han declinado debido al desarrollo urbano, caza y destrucción de hábitat (Campbell y Lamar, 2004).

1.4 Estudios genéticos en serpientes

Los hábitos inconspicuos de la mayoría de las serpientes han derivado en falta de información completa de las características clave de la biología poblacional de éste grupo taxonómico (Parker y Plummer, 1987). Esto se traduce en la falta de información requerida para desarrollar estrategias apropiadas para la recuperación de especies y poblaciones de serpientes en peligro o amenazadas (Greene y Campbell, 1992).

Estudios en otros grupos de vertebrados, principalmente aves y mamíferos, han demostrado que los datos obtenidos a partir de mtDNA y DNA brindan información valiosa sobre patrones demográficos y de variación genética dentro y entre las poblaciones (Avice y Hamrick, 1996). Por el gran valor de estos datos, es necesario realizar mas estudios en serpientes para comprender mejor su biología, estructura y dinámica poblacional, comportamiento y reproducción.

Actualmente existen algunos estudios en serpientes realizados con marcadores basados en DNA y se enfocan en dos grupos principales: vipéridos y colúbridos. En los estudios se utilizaron marcadores moleculares tales como microsatélites y ADN mitocondrial. Dentro de estos estudios existen los que buscan la existencia o no de una estructura poblacional. Gibbs *et al.* (1997), encontró que las poblaciones *Sistrurus catenatus catenatus* están

genéticamente estructuradas a una escala fina, inclusive entre poblaciones continuas; Loughheed *et al.* (1999) descubrió que en *Elaphe obsoleta obsoleta* existe una relación entre distancia geográfica y distancia genética; Carlsson *et al.* (2004) reveló que las poblaciones de *Vipera berus* tienen altos niveles de entremezcla entre las dos zonas de contacto que se conocen de esta especie; Paquin *et al.* (2006) en su estudio de *Tamnophis gigas* evidenció la gran estructuración de este colubrido amenazado para proponer estrategias de conservación en las poblaciones; Clark *et al.* (2008) buscó la existencia de estructura poblacional en los hibernáculos de *Crotalus horridus* y encontró que hay una gran cantidad de flujo genético causado por movimientos de los machos en las temporadas de apareamiento. Estudios que quieren ver la diversidad genética para poder realizar acciones de conservación como el estudio de Dutra *et al.* (2008) en *Bothrops moojeni* en el que encontró que las poblaciones aisladas por urbanización y agricultura tienen una menor diversidad genética que las que no sufren este problema. Otra interrogante es saber cuál es la dinámica poblacional y Manier y Arnold (2005) estudiaron dos especies simpátricas de *Tamnophis* y encontraron que ambas tienen poblaciones fuente y poblaciones sumidero, que sugieren frecuentes eventos de extinción-recolonización; Holycross y Douglas (2007) descubrieron que las poblaciones de *Crotalus willardi obscurus* se encuentran en cuellos de botella y que las reducciones poblacionales se deben a eventos históricos y ambientales. Finalmente están los estudios que sólo diseñaron primers específicos para realizar estudios genéticos posteriores en distintas especies de serpientes (Villareal *et al.* 1996; Gibbs *et al.* 1998; Bushar *et al.* 2001;

Holycross *et al.* 2002; Goldberg *et al.* 2003; Oyler-McCance *et al.* 2005). La finalidad de todos estos estudios es evaluar el estado genético de las poblaciones y determinar si es necesario o no llevar a cabo acciones para su conservación.

1.5 Estudios genéticos en serpientes de cascabel

Todos los estudios realizados en serpientes de cascabel se han realizado en especies que se distribuyen en los Estados Unidos de America. De estos estudios, la mayoría han sido de diseño de primers específicos para poder utilizarlos en estudios poblacionales, sin embargo no todos los primers se han utilizado para llevar a cabo estudios en la especie para la que fueron diseñados. (Villareal *et al.* 1996; Gibbs *et al.* 1998; Bushar *et al.* 2001; Holycross *et al.* 2002; Goldberg *et al.* 2003; Oyler-McCance *et al.* 2005). Otros estudios han probado estos primers para su amplificación cruzada en otras especies (Bushar *et al.* 2001; Anderson, 2006).

Gibbs *et al.* (1997) estudiaron la estructura genética de *Sistrurus catenatus catenatus* en las poblaciones que quedan de esta especie en la región de los Grandes Lagos en los Estados Unidos de America. Utilizaron seis microsatélites y encontraron que las poblaciones de esta especie están genéticamente estructuradas a una escala muy fina, aún en poblaciones continuas, y que esto se puede deber a su baja capacidad de dispersión. Desde la perspectiva de la conservación ellos proponen que las poblaciones sean manejadas como unidades demográficamente independientes ya que

cada una tiene un valor de conservación alto porque contienen variación genética única.

Holycross y Douglas (2007) utilizaron microsatélites para estimar los parámetros demográficos y visualizar la conectividad histórica y contemporánea entre las poblaciones de *Crotalus willardi obscurus*, en una cadena montañosa aislada en las Rocallosas en Estados Unidos de America. Ellos encontraron que las poblaciones se encuentran relacionadas por polimorfismos ancestrales y todas se encuentran en un cuello de botella. Las reducciones poblacionales son históricas y ambientales, no contemporáneas y antropogénicas.

Clark *et al.* (2008) estudiaron la estructura genética de los hibernáculos en *Crotalus horridus*. Encontraron que los hibernáculos tienen baja diferenciación genética y que existe un flujo genético significativo entre ellos. Y que existen altos niveles de filopatría por parte de ambos sexos a los hibernáculos maternos. Concluyen que es importante integrar el comportamiento a nivel individual y las características del paisaje con estudios genéticos a una escala fina en especies con alta fidelidad a hábitats distribuidos en parches, para entender sus dinámicas poblacionales.

En el cuadro dos se pueden ver los resultados de otros estudios realizados con microsatélites en crotálidos, colúbridos y una lagartija.

Cuadro 2. Estudios realizados en reptiles con microsatélites.

Especie	No. Individuos	No. Poblaciones	No. Loci	Fst	Fis	H _o Promedio	Autor y Año
<i>Crotalus horridus</i>	85	6	8	0.029	-0.048	0.406	Anderson, 2010
<i>Crotalus horridus</i>	373	3	9	0.05		0.566	Clark <i>et al.</i> , 2008
<i>Crotalus w. obscurus</i>	101	4	6		0.067	0.690	Holycross y Douglas, 2007
<i>Sistrurus c. catenatus</i>	199	5	6	0.164	0.194	0.513	Gibbs <i>et al.</i> , 1997
<i>Vipera berus</i>	285	10	13	0.269	0.036	0.500	Ursenbacher <i>et al.</i> , 2009
<i>Vipera aspis</i>	114	7	7	0.042	0.256		Jaggi <i>et al.</i> , 2000
<i>Tamnophis elegans</i>	858	20	11	0.024		0.478	Manier y Arnold, 2005
<i>Tamnophis sirtalis</i>	433	13	11	0.035		0.534	Manier y Arnold, 2005
<i>Elaphe obsoleta</i>	378	5	6	0.168			Lougheed <i>et al.</i> , 1999
<i>Aipysurus laevis</i>	354	3	5	0.059	0.156	0.461	Lukoschek <i>et al.</i> , 2008
<i>Varanus komodensis</i>	111	4	10	0.320		0.312	Ciofi y Bruford, 1999

1.6 El género *Crotalus*

El origen de las serpientes parece haber sucedido en el Cretácico hace 144 millones de años. Los colúbridos modernos se originaron hace 58 millones de años en el Eoceno y tuvieron su radiación adaptativa hace 37 en el Oligoceno (Rage, 1987). Los vipéridos son un grupo monofilético que se encuentra en Eurasia y el nuevo mundo. Los estudios filogenéticos concluyen en un centro de origen en Eurasia y una migración única por el estrecho de Bering a América (Parkinson *et al.* 2002). El origen del género *Crotalus-Sistrurus* no es muy claro, Knight *et al.* (1993) sugieren que el origen de las cascabeles fué en el Oligoceno tardío al Mioceno temprano (20 a 28 millones de años).

Actualmente están reconocidas 37 especies y 80 formas taxonómicas (especies y subespecies) de los géneros *Crotalus* y *Sistrurus*. De éstas, 18 especies se distribuyen en Norte América y Norte de México, dos especies en Centro América y una especie en América del Sur. México tiene la mayor riqueza con 31 especies (Beaman y Hayes, 2008).

1.7 Especie de estudio, *Crotalus molossus* (Baird y Girard, 1853)

1.7.1 Identificación

Tiene la cola negra o café obscura. Presenta 4 escamas grandes y planas en el área internasal-prefrontal, por lo general con una línea divisoria recta entre las escamas internasales y prefrontales separando los miembros derecho e izquierdo de cada par. Tiene una escama cantal posterior grande que generalmente separa las prefrontales de las supraoculares de cada lado. En *Crotalus molossus nigrescens* las escamas ventrales son 164-186 en machos y 168-187 en hembras. Las escamas subcaudales son de 21-28 en machos y hembras. Las escamas supralabiales de 13-20 y las infralabiales de 14-21 (Lemos y Smith, 2007) (Fig. 1 y 2).

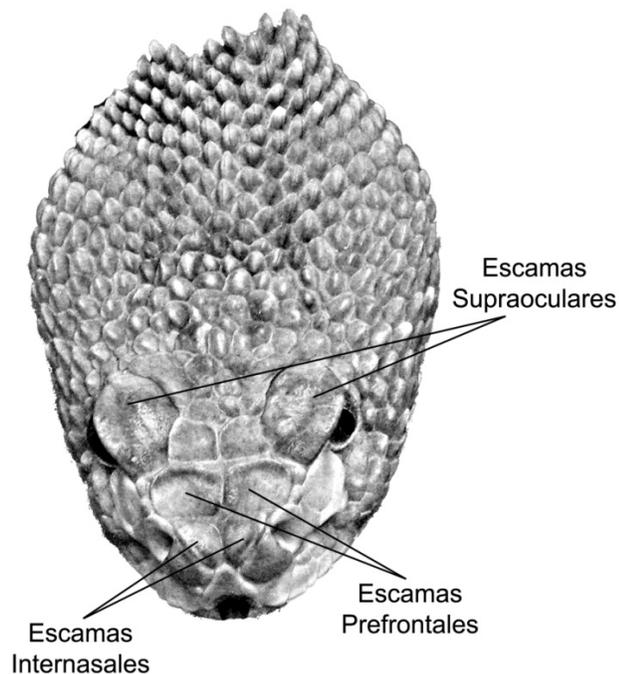


Figura 1. Vista Superior

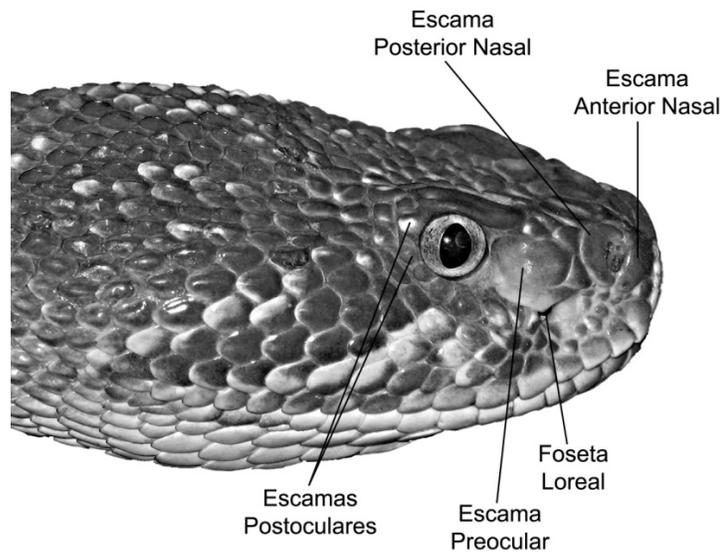


Figura 2. Vista Lateral

Existen 5 especies con las que se puede confundir, estas son: *C. basiliscus*, *C. scutulatus*, *C. tigris*, *C. totonacus*, *C. viridis*. Se puede distinguir de éstas especies mediante características físicas tales como: 1) Cola negra con anillos oscuros en la cola; 2) No más de 6 escamas en la zona internasal-prefrontal; 3) El interior de las manchas dorsales tiene escamas más claras; 4) Las escamas dorsales son más o menos monocromáticas; 5) Si tiene líneas parietales son oscuras e irregulares (Campbell y Lamar, 2004).

Un estudio realizado por Murphy *et al.* (2002) con secuencias ribosomales (12S y 16S) y mitocondriales (citocromo B y ND5) para determinar la filogenia del género *Crotalus* agrupa a las especies en seis grupos (Cuadro 3). *Crotalus molossus* se encuentra dentro del grupo *C. durissus*, y las especies que se consideran hermanas son *C. durissus*, *C. vegrandis*, *C. unicolor*, *C. enyo*, *C. basiliscus* y *C. estebanensis*.

Cuadro 3. Composición de los grupos de serpientes de cascabel del género *Crotalus* (Murphy et al. 2002)

<i>C. ravus</i>	<i>C. triseriatus</i>	<i>C. polystictus</i>	<i>C. durissus</i>	<i>C. viridis</i>	<i>C. mitchelli</i>	<i>C. atrox</i>
<i>C. ravus</i>	<i>C. triseriatus</i>	<i>C. polystictus</i>	<i>C. durissus</i>	<i>C. viridis</i>	<i>C. mitchelli</i>	<i>C. atrox</i>
	<i>C. Aquiles</i>	<i>C. cerastes</i>	<i>C. vegrandis</i>	<i>C. scutulatus</i>	<i>C. angelensis</i>	<i>C. adamanteus</i>
	<i>C. lepidus</i>	<i>C. willardi</i>	<i>C. unicolor</i>	<i>C. horridus</i>	<i>C. tigris</i>	<i>C. aatalinensis</i>
	<i>C. pusilus</i>	<i>C. pricei</i>	<i>C. enyo</i>			<i>C. azul</i>
		<i>C. intermedius</i>	<i>C. basiliscus</i>			<i>C. lorenzoensis</i>
		<i>C. transversus</i>	<i>C. estebanensis</i>			<i>C. ruber</i>
			<i>C. molossus</i>			<i>C. tortuguensis</i>

1.7.2 Distribución

Crotalus molossus se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos al sur de México (Fig. 3). Existen tres subespecies: *C. molossus molossus*, *C. molossus oaxacus* y *C. molossus nigrescens*. Las subespecies se determinaron por características morfológicas y de distribución. La distribución de *C. molossus nigrescens* es desde Sonora hacia el este de Chihuahua y sur de Coahuila hasta el sur de la Meseta Mexicana (Campbell y Lamar, 2004).

Esta especie se encuentra en la Norma Oficial Mexicana 059 ECOL 2011 bajo la categoría “Sujeta a protección especial” (Pr), en la Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestres (CITES) en el apéndice III y en la lista roja de la Unión internacional para la conservación de la naturaleza (UICN) en categoría “Least Concern”.

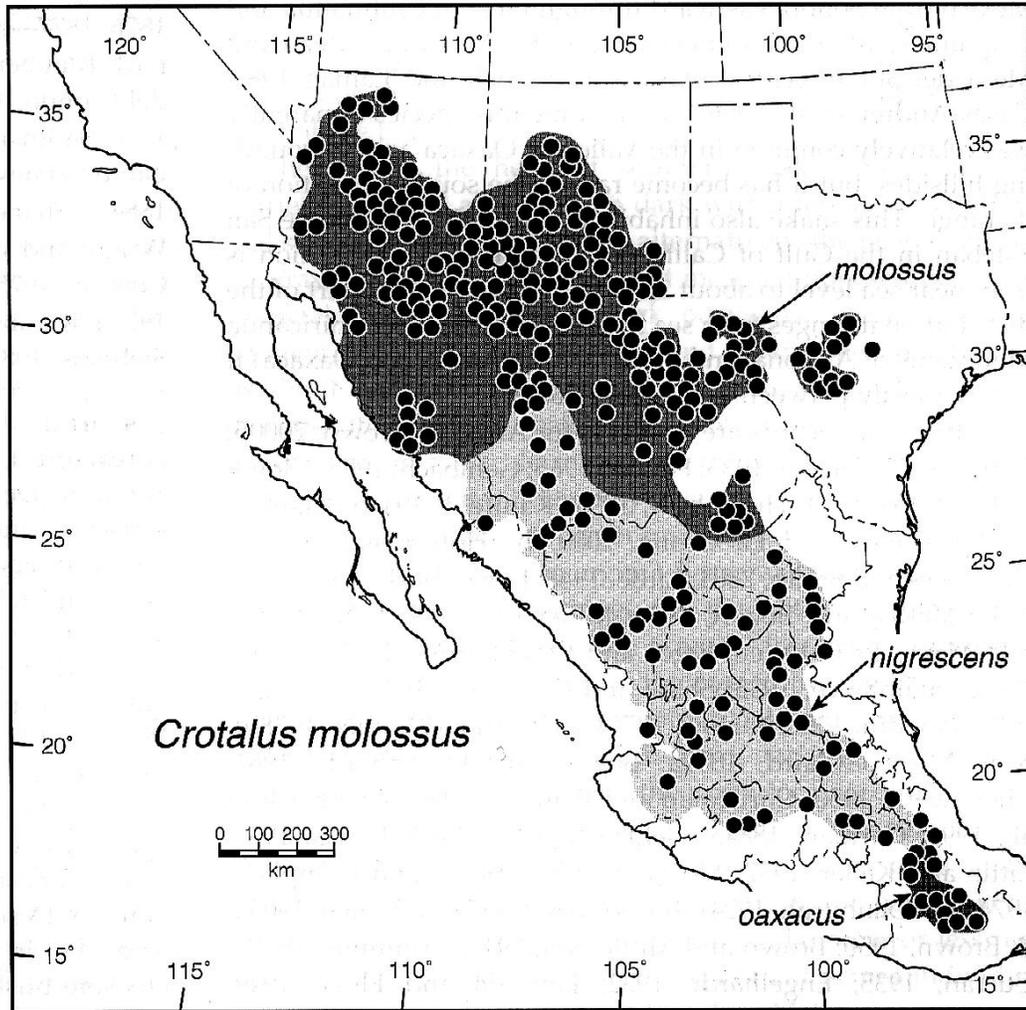


Figura 3. Distribución de *Crotalus molossus* (Campell y Lamar,2004).

1.7.3 Ecología

La edad aproximada a la primera reproducción es a los cinco años. El número máximo de reproducciones por año es una y su sistema de reproducción es poligínico (Klauber, 1997). El número de crías promedio por reproducción es de 10 (Campbell y Lamar, 2004). La mortalidad en los primeros cinco años es de 22.7% a 59.3% (Brown *et al.* 2007; Conner *et al.* 2003). *Crotalus molossus* habita principalmente en zonas rocosas con pendiente, tiene un ámbito hogareño de 3.49 ha, anualmente se desplaza en

promedio 14.99 kms y su mayor periodo de actividad es en la época lluviosa (Beck,1995).

1.8 Microsatélites

Los microsatélites se han convertido en el marcador más usado en genética de poblaciones para mapear genomas, ecología molecular y estudios de conservación. Los primers son desarrollados para regiones en el DNA que flanquean la región del microsatélite, y la amplificación por PCR con estos primer flanqueantes da como resultado productos de DNA que difieren en tamaño en función al número de repeticiones (Templeton, 2006). Los productos de PCR oscilan entre 70 y 300 pares de bases, dependiendo del locus. La gran ventaja de estos marcadores es que usualmente son altamente polimórficos, incluso en poblaciones pequeñas y especies amenazadas. El alto grado de polimorfismo se debe a su alta tasa de mutación (10^{-3} y 10^{-4}). Los primers creados para una especie pueden ser usados en especies cercanamente relacionadas filogenéticamente porque los sitios del primer están altamente conservados (Allendorf y Luikart, 2007).

Sin embargo el uso de estos marcadores tiene sus problemas:

- 1) Errores de genotipificación causados por bajas concentraciones de DNA, que resultan en alelos que no amplifican (Wandeler *et al.* 2003)
- 2) Marginación de alelos grandes (*Large Allele Drop Out*) que da lugar a amplificación preferencial de alelos pequeños, y perdida de amplificación de alelos grandes (Hedrick, 2005).

- 3) Alelos Nulos: Mutaciones en el sitio del primer que provocan que ciertos alelos no amplifiquen, esto da lugar a falsos homocigotos (Hedrick, 2005).

La homoplasia es el hecho de que un caracter presente en dos especies no deriva del mismo caracter presente en la especie ancestral, si no de factores como convergencia, paralelismo y reversión (Scotland, 1992). En microsatelites esto sucede cuando copias diferentes de un locus son identicas en estado (mismo tamaño) pero no identicas por descendencia (Estoup *et al.* 2002). La homoplasia en microsatelites se espera para los siguientes modelos de mutación:

- A) Modelo de mutación gradual (SMM) (Kimura y Ohta, 1978)
- B) Modelo de dos fases (TPM)(Di Rienzo et al., 1994)
- C) Modelo generalizado de mutación gradual (GSM)
- D) Modelo de K alelos (KAM) (Crow y Kimura, 1970)

Para todos estos modelos los alelos pueden mutar a un estado alelico presente en la población y por lo tanto generar homoplasia. El unico modelo en el que no sucede esto es el de alelos infinitos (IAM) (Kimura y Crow, 1964).

2. Justificación

El trabajo surge a partir del interés del gobierno del estado de Guanajuato, México, y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para estudiar los patrones básicos de la biología de la serpiente de Cascabel (*Crotalus*).

Existen varias amenazas para las poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens*:

- Explotación de la piel para hacer botas, billeteras, llaveros, y un sin número de artículos, para los cuales no existe una fuente de suministro legal de pieles.
- Cacería por miedo.
- Fragmentación y destrucción acelerada del hábitat por desarrollo urbano y desarrollo agrícola

Todos estos factores han provocado declinación en sus poblaciones, por ello para su conservación es indispensable obtener información sobre la estructura genética y la variación genética de esta especie.

Se estudió la población del Pedregal de San Ángel con la finalidad de ver los efectos del aislamiento, fragmentación y pérdida de hábitat en la diversidad genética de ésta población y proponer estrategias para su conservación en caso de ser necesario.

3. Hipótesis

- Las cuatro poblaciones estudiadas se encuentran bajo presiones de destrucción y fragmentación de hábitat, cacería y comercio ilegal por lo que se espera que haya una baja heterocigosis, pocos alelos y alta estructuración.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Analizar la diversidad y estructura genética de cuatro poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens* en las localidades de Llanos de Santa Ana, las Palomas y la Quinta Calimán en Guanajuato y el Pedregal de San Ángel en el Distrito Federal con base en microsatélites.

4.2 Objetivos Particulares

- 1) Examinar las frecuencias alélicas de los microsatélites y la distribución de estos marcadores en las poblaciones.
- 2) Comparar las frecuencias alélicas, número de alelos, alelos privados y heterocigosis de las poblaciones.
- 3) Determinar si existe una estructura genética clara entre las poblaciones.
- 4) Determinar si existe endogamia causada por el asilamiento en las poblaciones.

- 5) Analizar el patrón y la cantidad de flujo genético entre las poblaciones.
- 6) Discutir el uso de los datos obtenidos para la conservación de las poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens*.

5. Método

5.1 Trabajo de Campo

Se recolectaron muestras de sangre utilizando el método descrito por Reinert y Bushar (1991), el cuál consiste en colocar a la serpiente en un tubo y dejando la cola fuera de este tubo. Se limpia la cola de la serpiente con alcohol al 70% y se inserta la aguja en la zona ventral entre el primero y segundo segmento proximal del cascabel. Se succiona de manera gentil con la jeringa; en ocasiones es necesario reposicionar la aguja ligeramente girándola un poco o aumentando o disminuyendo la penetración. Para obtener un mayor flujo de sangre se realizaron las punciones cuando la temperatura de la serpiente estaba entre 25 y 35 °C y con la cola colocada en una posición más baja que el resto del cuerpo. Este método es simple, seguro (para la serpiente y el investigador) y menos traumático que una punción cardiaca (Reinart y Bushar, 1991). También se obtuvo tejido de ejemplares muertos de la especie. Se realizaron dos salidas de campo, durante el verano, que es el periodo de mayor actividad de la especie. Se muestrearon dos localidades en el municipio de San Luis de la Paz, Guanajuato: las Palomas (21°31'20'' N, 100°37'05'' O) donde se recolectaron 10 muestras y la Quinta Calimán (21°21'24'' N, 100°34'26'' O) con 16 muestras recolectadas. También se recolectaron muestras de sangre de 15 ejemplares de la comunidad del Mineral de Llanos de Santa Ana, Guanajuato (21° 03'25'' N, 101°16'27'' O) y 16 muestras de sangre de la población de la Reserva del Pedregal de San Ángel (19°18'57'' N,

99°11'30" O) (Fig 4 y Cuadro 4). Todas las muestras se colocaron en tubos de 1.5 ml con etanol al 96% y se guardaron en el refrigerador a menos 4 °C.

Cuadro 4. Muestras colectadas por localidad

Localidad	No. Muestras	Sangre	Tejido (ejemplares muertos)
Las Palomas	10	10	
Quinta Calimán	16	12	4
Llanos de Santa Ana	15	15	
Pedregal de San Ángel	16	13	3

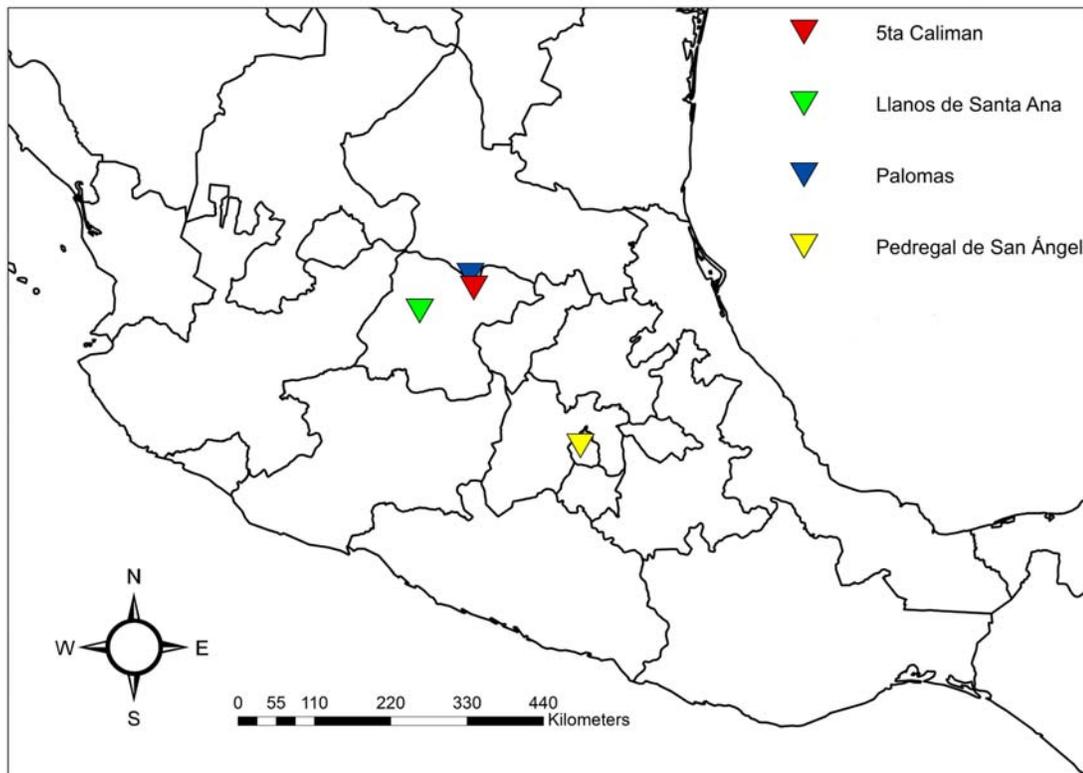


Figura 4. Localidades de Colecta

5.1 Trabajo de Laboratorio

5.1.1 Extracción de DNA

Para aislar el DNA geonómico se llevó a cabo extracción por precipitación por sales (Aljanabi y Martinez 1997) (Apéndice I). Para las muestras de las cuáles no se pudo extraer DNA con ésta técnica, se utilizó la técnica de fenol-

cloroformo modificado de Sambrook y Russell (2001) (Apéndice II). Después de realizar las extracciones se corrieron geles de agarosa al 1%(Sambrook y Russell, 2001) (Apéndice III) para comprobar la presencia de DNA. Para verificar que no hubiera contaminación en éstas muestras se utilizó un control negativo.

5.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar microsatélites

El DNA extraído fue amplificado por medio de PCR usando los primers descritos para *Crotalus horridus* (Villareal *et al.* 1996), *Sistrurus catenatus* (Gibbs *et al.* 1998), *Crotalus willardi obscurus* (Holycross *et al.* 2002), *Crotalus tigris* (Goldberg *et al.* 2003) y *Crotalus viridis concolor* (Oyler-McCance *et al.* 2005) (Apéndice IV) debido a que no existen primers específicos para *Crotalus molossus nigrescens*. Los primeros primers que se probaron fueron los de las especies más cercanas filogenéticamente con base en la filogenia propuesta por Murphy *et al.* (2002) (Fig. 5).

Para comprobar la presencia del DNA amplificado por PCR se utilizaron geles de agarosa al 2% teñidos con 0.5µg/ml de bromuro de etidio y un marcador de peso molecular de 100pb para estimar el tamaño de los fragmentos de DNA. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis por 25 min y se leyeron en luz ultravioleta.

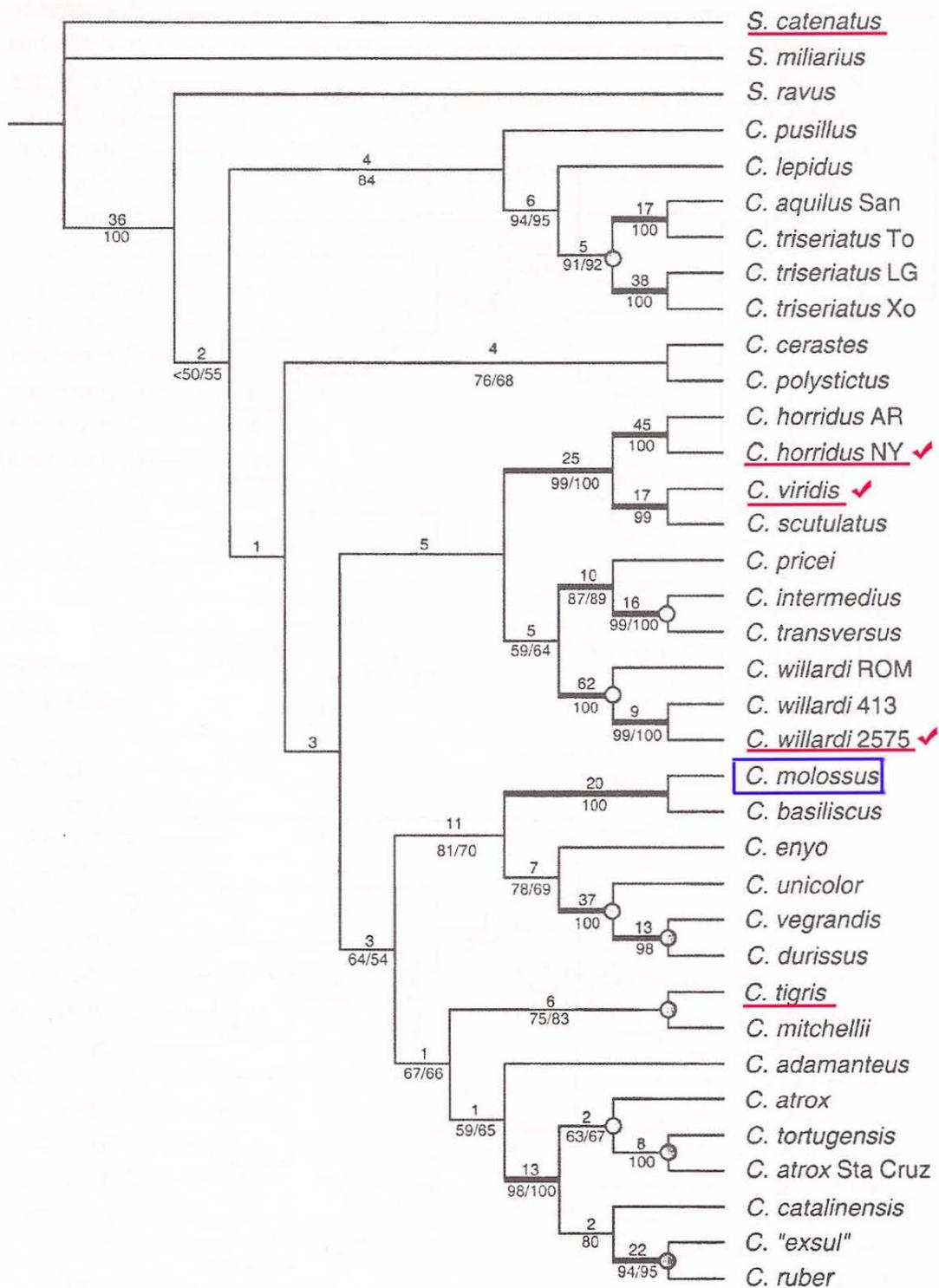


Figura 5. Filogenia propuesta por Murphy et. al (2002).

Se estandarizaron 6 de los 29 microsatélites diseñados para otras especies del género *Crotalus* ya que estos fueron los que produjeron mejores productos de DNA para analizarse. Estos primers no son de especies hermanas a *Crotalus molossus nigrescens* (Figura. 5). Las concentraciones de buffer 10X, DNTP's, primer y Taq variaron para cada microsatélite. Adicionalmente se probaron distintas temperaturas en el programa del termociclador APPLIED BIOSYSTEMS 2720 THERMAL CYCLER para estandarizar el óptimo para cada microsatélite (Apéndice V). Los primers que amplificaron de acuerdo a los tamaños reportados en los microsatelites en *Crotalus molossus nigrescens*, se mandaron a marcar con fluorescencia en la cadena Forward para su genotipificación en el secuenciador automático APPLIED BIOSYSTEMS 3100 GENETIC ANALYZER (Cuadro 5).

Cuadro 5. Primers Marcados con Fluorescencia

Especie	Locus	Tipo de Repetición	Rango Alélico	Fluorescencia
<i>Crotalus horridus</i>	Ch7-87	Dinucleótido	145-159	Azul (Fam)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch5A	Dinucleótido	142-164	Azul (Fam)
<i>Crotalus w. Obscurus</i>	CwA29	Dinucleótido	160-190	Azul (Fam)
<i>Crotalus w. Obscurus</i>	CwB6	Dinucleótido	122-130	Verde (Hex)
<i>Crotalus v. Concolor</i>	Mfr15	Dinucleótido	164-182	Verde (Hex)
<i>Crotalus v. Concolor</i>	MfrD5	Dinucleótido	172-194	Verde (Hex)

5.2 Análisis de Datos

5.2.1 Análisis de fragmentos

Para determinar el tamaño de los fragmentos, se leyeron los cromatogramas obtenidos en el secuenciador automático con el programa PeakScanner v1.0 de Applied Biosystems. Este programa permite realizar el análisis de fragmentos de DNA de hasta 1200 pb, separar una mezcla de

fragmentos de DNA de acuerdo a su tamaño y calcular con precisión el tamaño de los fragmentos.

5.2.2 Análisis estadísticos

5.2.2.1 Identificación de alelos nulos

La degradación del DNA, bajas concentraciones de DNA y mutaciones en el sitio del primer pueden dar como resultado una asignación incorrecta de los genotipos de los microsatélites, sesgando los análisis genéticos de las poblaciones (Oosterhout, *et al.*, 2004). Para detectar los errores de genotipificación se utilizó el programa MICRO-CHECKER que indica la presencia de alelos nulos si las pruebas combinadas de probabilidad muestran que existe un exceso global significativo de homocigotos y cuando éste se distribuye de manera uniforme en las clases de homocigotos. El programa calcula la frecuencia de los alelos nulos (r) usando los métodos de Chakraborty *et al.* (2002) y Brookfield(1996) (Oosterhout *et al.*, 2004).

5.2.2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

El modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg asume que una población con apareamientos al azar en la que no hay factores que causen cambios genéticos de una generación a otra las frecuencias alélicas se mantienen en equilibrio. Este modelo se basa en el marco de la segregación mendeliana para organismos diploides que se reproducen de manera sexual. El modelo asume que en una población grande, con apareamientos al azar, sin mutación, sin

selección natural, sin inmigración, no hay evolución y las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes de generación a generación. El principio de Hardy-Weinberg simplifica la tarea de describir las características genéticas de una población y permite describir a la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos en un locus, en lugar de por los muchos diferentes genotipos que pueden presentarse en un locus diploide único (Allendorf y Liukart, 2007). Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg se calcularon con el programa GENEPOP v4.0 (Raymond y Rousset, 1995) mediante la prueba exacta, que da la probabilidad de error cuando se rechaza la H_0 y el error estándar de los estimados. Se utilizó el método de cadenas de Markov Monte Carlo con 10,000 desmemorizaciones, 20 lotes (batches) y 5,000 iteraciones por lote.

5.2.2.3 Desequilibrio del ligamiento

El desequilibrio del ligamiento se utiliza para describir la asociación no aleatoria entre alelos en dos loci (Lewontin y Kojima, 1960). Nos brinda información sobre la historia de la actual variación genética de la población y los factores que lo ocasionan, como la mutación, apareamientos no azarosos, flujo génico, selección natural, tamaño poblacional finito, etc. (Templeton, 2006). Para evaluar el desequilibrio del ligamiento entre todos los loci se utilizó el programa ARLEQUIN v. 3.11 (Excoffier *et al.* 2005) que utiliza una prueba de verosimilitud en cuya distribución empírica se obtiene por un proceso de permutaciones. La verosimilitud de los datos asumiendo desequilibrio del

ligamiento (L_{H+}) se computa con el hecho de que las frecuencias haplotípicas se obtienen como el producto de las frecuencias alélicas. La verosimilitud de los datos en los que no se asume desequilibrio del ligamiento (L_H) se obtiene aplicando el algoritmo de maximización de las expectativas (EM) para estimar las frecuencias haplotípicas. La verosimilitud global se obtiene por $S = -2\log(L_{H+}/L_h)$ que en principio sigue una distribución de χ^2 , pero esto no sucede en muestras pequeñas con un gran número de alelos por locus. Para mejorar la aproximación de la verosimilitud estadística bajo el supuesto de desequilibrio de ligamiento, el programa hace un proceso de permutaciones que consiste en: 1) Permutar los alelos entre los individuos en un locus único; 2) Re-estimar las verosimilitud de los datos de L_H usando el algoritmo EM; 3) Repetir los pasos 1 y 2 muchas veces para encontrar la distribución nula de L_H y por lo tanto la de S . Esta prueba asume proporciones de Hardy-Weinberg en los genotipos (Excoffier *et al.*, 2005).

5.2.2.4 Variación genética

Las medidas de variación genética utilizadas son la heterocigosis esperada (H_e) promedio en n loci dentro de una población, la riqueza alélica (A) y la proporción de loci polimórficos (P). Las medidas de variación genética fueron obtenidas usando los programas GENEPOP v. 4.0 (Raymond y Rousset, 1995) y GENALEX v. 6.4 (Peakall y Smouse, 2006)

5.2.2.5 Estructuración genética

Los parámetros clásicos para diferenciar poblaciones son los estadísticos F de Wright (1951). Se calculó la estructuración poblacional y total con el programa FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 1995) que utiliza el método propuesto por Weir y Cockerham (1984). Este método depende del tamaño poblacional y la historia de la población, pero son poco afectados por el muestreo, número de alelos observados por locus, tamaño de muestra poblacional y número de poblaciones muestreadas (Weir y Cockerham, 1984). Los parámetros de Weir y Cockerham son equivalentes a los de Wright donde: $F=F_{it}$ siendo esta la correlación de los genes dentro de los individuos, $\theta=F_{ST}$ la correlación de los genes de diferentes individuos en la misma población y $f=F_{is}$ la correlación de los genes dentro de los individuos dentro de las poblaciones. Con los valores de F_{ST} y distancias de Nei (1978) pareadas se hizo un árbol de vecino mas cercano (*Neighbor-Joining*) con el programa PHYLIP v.3.69 (Felsenstein, 2009)

5.2.2.6 Flujo génico

El flujo génico es la fuerza que mantiene unidas a las poblaciones separadas geográficamente en una sola unidad evolutiva (especie). Los efectos del flujo génico son:

- reducción de las diferencias genéticas entre las poblaciones
- aumento de la variación genética dentro de las poblaciones

En ausencia de otras fuerzas evolutivas el flujo génico entre poblaciones lleva a la homogeneidad genética. Sin embargo, las diferencias entre las poblaciones son un balance entre la homogeneidad causada por flujo génico y la divergencia causada por la deriva génica (Allendorf y Liukart, 2007).

El flujo génico se puede estimar de manera indirecta (a partir de frecuencias alélicas, alelos privados y análisis de similitud basados en las dos anteriores) o directa (captura recaptura). Se calculó el número de migrantes por generación (Nm) a partir de F_{ST} con base en la formula $Nm=1-F_{ST}/4F_{ST}$. También se calculó usando el método de alelos privados propuesto por Slatkin (1985) con el programa GENEPOP v. 4.0 (Raymond y Rousset, 1995). Este método asume que existe una relación lineal entre el número de migrantes y la frecuencia de alelos privados. Si la migración es baja las poblaciones tienden a tener una gran cantidad de alelos privados debido a la mutación. El tiempo en que un alelo se mantiene privado depende de las tasas de migración, por lo que la proporción de alelos privados en una población disminuye cuando la tasa de migración aumenta (Allendorf y Luikart, 2007).

5.2.2.7 Análisis de Varianza Molecular

Para determinar cómo se encuentra distribuida la variación genética dentro de las poblaciones se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992) utilizando el programa GENALEX v. 6.4 (Peakall y Smouse, 2006). Es un análisis jerárquico que se basa en el numero de diferencias encontradas entre alelos. Este análisis jerárquico divide la varianza

total en diferentes componentes: 1) entre poblaciones, 2) entre individuos y 3) dentro de los individuos. Se estimó la variación basado en el modelo de alelos infinitos (F_{ST}) y el modelo de mutación paso a paso (*stepwise*) (R_{ST}).

5.2.2.8 Estructura genética

Se utilizó el programa STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000) que usa un modelo basado en un método de agrupamiento para usar datos genotípicos de múltiples loci para inferir estructura poblacional y asignar individuos a poblaciones. El modelo asume que hay K poblaciones, donde se desconoce el valor de K , en la que cada población está determinada por una serie de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos son asignados de manera probabilística a las poblaciones, o de manera conjunta a 1 o más poblaciones si el genotipo muestra que están mezclados. Los parámetros utilizados para esta prueba fueron el modelo de mezcla (*admixture*) porque suponemos que puede haber entrecruzamiento entre los individuos de las poblaciones, de 1 a 6 poblaciones (K), evaluadas en 10 iteraciones independientes cada una con 500,000 iteraciones en el periodo de calentamiento (*Burn-in*), seguido de 500,000 cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Estas cadenas son simulaciones estocásticas intensivas para resolver la integración matemática necesaria para calcular la distribución.

Finalmente a los resultados del modelo se les hizo la prueba de Evanno *et al.* (2005), esta es un prueba estadística que consiste en obtener el valor de ΔK

basado en la tasa de cambio de la probabilidad logarítmica de los datos entre valores sucesivos de K .

6. RESULTADOS

6.1 Alelos nulos

El análisis de alelos nulos por colonia y por locus mostró que sólo existen alelos nulos para el alelo Ch7-87 en la población del Pedregal $P > 0.05$ (Cuadro 6). Para corregir las frecuencias alélicas de estos alelos nulos en la población se utilizó el programa ML-Null, que es un método de máxima verosimilitud con menor error que otros estimadores (Kalinowski y Taper, 2006). Las frecuencias alélicas corregidas se pueden observar en el Apéndice VI.

Cuadro 6. Alelos nulos por locus y por población. Alelos nulos presentes (\checkmark), ausencia de alelos nulos (\times).

	CwA29	CwB6	Ch5A	Ch7-87	MfrD5	Mfr15
Cal	\times	\times	\times	\times	\times	\times
LSA	\times	\times	\times	\times	\times	\times
Pal	\times	\times	\times	\times	\times	\times
Ped	\times	\times	\times	\checkmark	\times	\times

Cal: Quinta Calimán, LSA: Mineral Llanos de Santa Ana, Pal: Las Palomas, Ped: Reserva del Pedregal de San Angel.

6.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La prueba exacta global para todos los loci por poblaciones resultó ser no significativa para la población de Llanos de Santa Ana ($P < 0.05$) (Cuadro 8). La prueba para todas las poblaciones por locus fue no significativa para el locus Mfr15 ($P < 0.05$). Esto indica que la población de Llanos de Santa Ana y el locus Mfr15 no se encuentran desviados del equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para el 41.67% (significativa en 10 de los 24 casos) de las pruebas para cada locus en cada población se detectaron desviaciones del equilibrio de

Hardy-Weinberg. Esto quiere decir que en general hay una deficiencia de heterocigotos por locus y por población (Cuadro 9).

6.3 Desequilibrio del ligamiento

Se encontró desequilibrio del ligamiento en todas las poblaciones ($P < 0.05$) (Cuadro 7). Sin embargo, no es consistente para un único locus en todas las poblaciones, por lo que las relaciones de alelos entre los loci son azarosas.

La hibridación entre poblaciones, subespecies o especies da como resultado desequilibrio del ligamiento (Allendorf y Luikart, 2007), por lo que el desequilibrio del ligamiento encontrado en los loci CwB6-Ch5A en las poblaciones de Quinta Caliman y las Palomas y CwB6-Ch7-87 en las poblaciones de Llanos de Santa Ana y Las Palomas, sugieren que las Palomas tiene un origen híbrido de las otras dos poblaciones.

Cuadro 7. Desequilibrio del ligamiento.

Población	Locus 1	Locus 2
Quinta Calimán	CwA29	Ch7-87
	CwB6	Ch5A
Llanos de Santa Ana	CwB6	Ch7-87
	CwB6	Ch5A
Las Palomas	CwB6	Ch7-87
	CwB6	MfrD5
Pedregal de San Ángel	Ch5A	MfrD5
	Ch5A	MfrD5
	Ch7-87	Mfr15

6.4 Variación genética

El número de alelos promedio (N_A) por población tiene un rango de 5.5 a 6.7 alelos. La población con el mayor número de alelos es la de la Quinta Caliman (Cal) y la que tiene el menor número de alelos el Pedregal (Ped). A

nivel de locus, 100% de los loci fueron polimorficos; sin embargo, a nivel poblacional, la población Llanos de Santa Ana (LSA) presentó un locus monomorfo, el CwB6. La heterocigosis esperada (H_o) observada promedio en las poblaciones tiene un rango de 0.451 a 0.621, siendo la más alta la de la población de Llanos de Santa Ana y la más baja la del Pedregal. Las H_o son menores a las H_e en todas las poblaciones (Cuadro 8).

Cuadro 8. Diversidad genética encontrada en todos los microsatélites por población. H_o = heterocigosis promedio observada; H_e = heterocigosis promedio esperada; N_A = Número promedio de alelos; El asterisco (*) indica diferencias significativas.

	Población			
	Cal	LSA	Pal	Ped
H_o	0.605	0.517	0.565	0.451
H_e	0.744	0.596	0.69	0.645
H-W (P)	0.000*	0.142	0.014*	0.000*
N_A	6.7	5.5	6.5	5.5
Loci Polimorficos	100%	83.33%	100%	100%

Las frecuencias alélicas para todos los loci en todas las poblaciones se muestran en el Apéndice VI y en la Figura 6. El locus CwA29 presenta las mayores frecuencias en todas las poblaciones para los alelos 160 y 158. El locus CwB6 tiene un alelo (99) que se encuentra fijado en la población de Llanos de Santa Ana y que además tiene una frecuencia mayor al 75% en las otras poblaciones. Para los otros loci no existe este patrón; sin embargo, todas tienen uno o más alelos que se presentan con mayor frecuencia y que comparten con las otras poblaciones.

El mayor número de alelos privados se encuentra en la población de las Palomas (6), le sigue el Pedregal de San Ángel (5), Llanos de Santa Ana (4) y finalmente la Quinta Caliman(2).

El número de alelos (N_A) tiene un rango de 1 a 10. El menor número de alelos es en el locus CwB6 en la población de Llanos de Santa Ana, debido a que es monomórfico. La población con el mayor número de alelos es la Quinta Calimán (40), le sigue las Palomas (39) y las que menos tienen son Llanos de Santa Ana y el Pedregal de San Angel (33). El rango alelico (R_A) es de 4 a 28 pares de bases.

La heterocigosis observada (H_o) por loci tiene un rango de 0.062 a 0.875. Los valores más bajos de heterocigosis son para los loci CwB6 y CwA29. La mayoría de las H_o son menores a las heterocigosis esperadas (H_e), excepto para el locus CwA29 en la población del Pedregal y el locus MfrD5 en Llanos de Santa Ana. Basado en el número de alelos, nivel de heterocigocidad y frecuencias alélicas los loci Ch5A, Ch7-87, MfrD5 y Mfr15 son más variables que Cw A29 y CwB6 (Cuadro 9).

La mayoría de los valores de F_{IS} por locus y por población son positivos indicando un déficit de heterocigotos, excepto para el locus Cwa29 en la población del Pedregal (Ped), CwB6 en la población de las Palomas (Pal) y el locus MfrD5 población Llanos de Santa Ana.

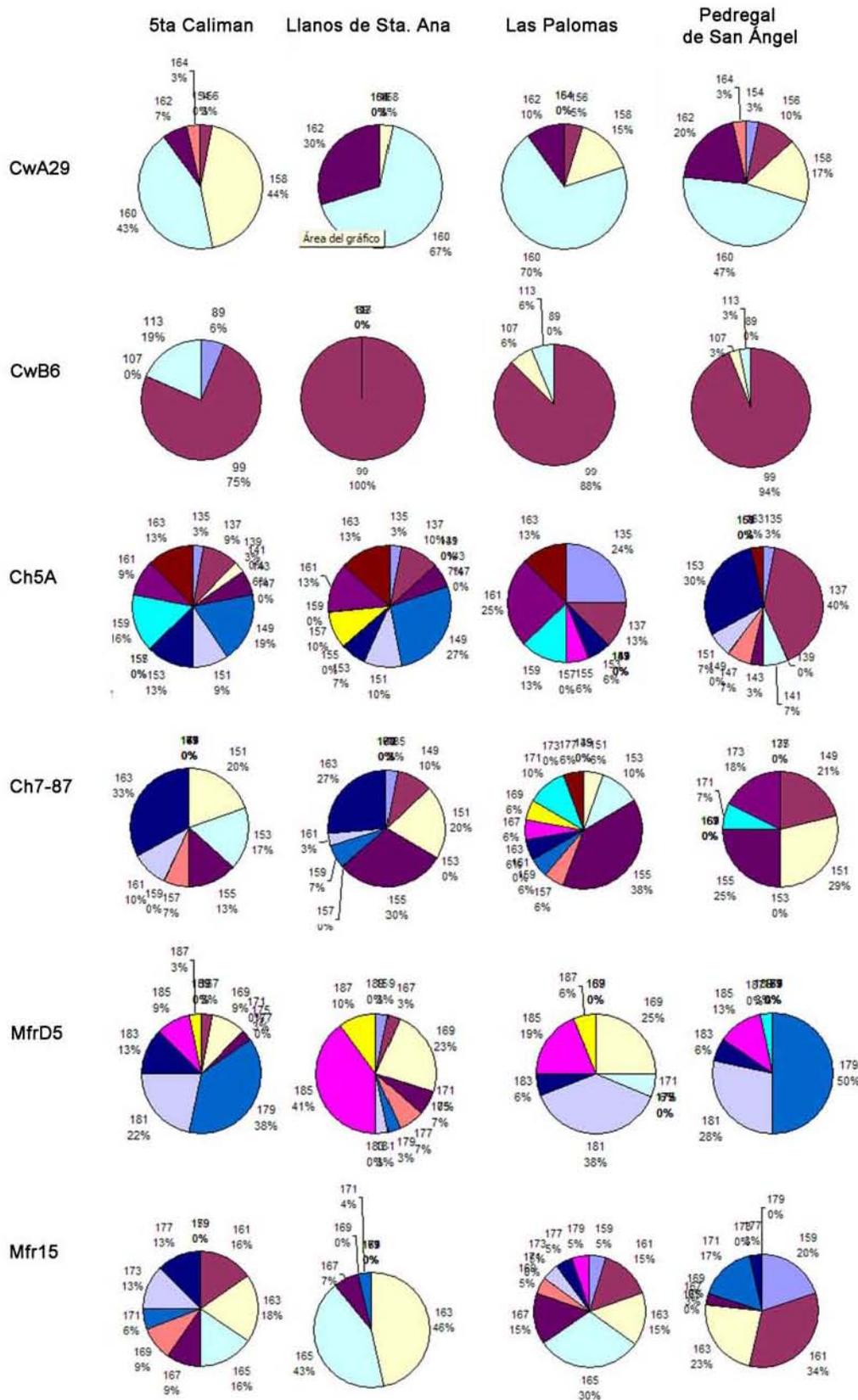


Figura 6. Frecuencias alélicas por población y por locus.

Cuadro 9. Características genéticas de cuatro poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens* en 6 loci. Cal= Quinta Calimán; LSA= Llanos de Santa Ana; Pal= Las Palomas; Ped= Reserva del Pedregal de San Angel; N= número de individuos genotipificados; N_A= número de Alelos; H_O= heterocigosis observada; H_e= heterocigosis esperada; F_{is}= índice de fijación de Wright (1984); R_A= rango alélico en pares de bases; El asterisco(*) indica diferencias significativas P<0.05.

Locus	Población			
	Cal	LSA	Pal	Ped
CwA29				
N	15	15	10	15
N _A	5	3	4	6
H _O	0.4	0.2667	0.3	0.7333
H _e	0.6391	0.4805	0.5	0.7264
F _{is}	0.3824*	0.4537*	0.4130	-0.0098
R _A	8	4	6	10
CwB6				
N	16	14	8	16
N _A	3	1	3	3
H _O	0.25	-	0.25	0.0625
H _e	0.4113	-	0.2417	0.123
F _{is}	0.4000*	-	-0.0370	0.5*
R _A	24	-	14	14
Ch5A				
N	16	15	8	15
N _A	10	9	7	8
H _O	0.8125	0.8667	0.75	0.6
H _e	0.9052	0.8828	0.875	0.7586
F _{is}	0.1055*	0.0189	0.1515	0.2150*
R _A	28	28	28	28
Ch7-87				
N	15	15	9	14
N _A	6	7	10	5
H _O	0.666	0.6	0.6667	0.1429
H _e	0.8161	0.8092	0.8497	0.8016
F _{is}	0.1884*	0.2653	0.2258*	0.8272*
R _A	12	28	26	24
MfrD5				
N	16	15	8	16
N _A	8	9	6	5
H _O	0.625	0.8	0.625	0.5
H _e	0.8004	0.7885	0.8	0.6714
F _{is}	0.2248	-0.0151	0.2308	0.2651
R _A	20	28	18	10
Mfr15				
N	16	14	10	15
N _A	8	4	9	6
H _O	0.875	0.5714	0.8	0.6667
H _e	0.8911	0.6164	0.8737	0.7908
F _{is}	0.0187	0.0756	0.0886	0.1617*
R _A	16	8	20	18

6.5 Estructuración genética

Los valores de f son todos positivos, lo cuál indica un deficit de heterocigos para todos los loci. Este deficit puede ser ocasionado por endogamia. Los valores de θ son cercanos a cero, lo que indica que existe poca estructuración genética (Cuadro 10).

Cuadro 10. Estadísticos F locus por locus en todas las poblaciones y el total obtenidos con el programa Fstat. Entre paréntesis se muestran los resultados excluyendo el locus con alelos nulos de la población.

Locus	$F=F_{IT}$	$\theta=F_{ST}$	$f=F_{IS}$
CwA29	0.314*	0.055	0.274
CwB6	0.381*	0.061	0.341
Ch5A	0.167	0.059	0.115
Ch7-87	0.411*(0.248)	0.043(0.027*)	0.385(0.226*)
MfrD5	0.256	0.106	0.167
Mfr15	0.158	0.081	0.083
Total	0.263*(0.231*)	0.069*(0.066*)	0.208*(0.176*)

Los índices de fijación y distancia genética son medidas de diferenciación poblacional que incorporan información de la frecuencia y la identidad de los alelos. Los valores de F_{ST} tuvieron un rango de 0.035 entre las poblaciones de Quinta Caliman y Palomas que son las más cercanas geográficamente, que llega hasta a 0.12 entre las poblaciones de Llanos de Santa Ana y el Pedregal. Todos los valores de F_{ST} fueron significativos ($P < 0.05$) (Cuadro 11). Las distancias de Nei también fueron significativamente distintas a cero, los intervalos de confianza al 95% no se sobrelapan. La mayor distancia de Nei (0.269) fue entre las poblaciones de Pedregal y Llanos de Santa Ana y la menor (0.08) entre las poblaciones de las Palomas y Llanos de Santa Ana (Cuadro 11).

Cuadro 11. Medidas de diferenciación poblacional. Los valores de F_{ST} se encuentran debajo de la diagonal y las distancias de Nei por arriba de la diagonal (*=Significativo)

F_{ST} y Nei D	Cal	LSA	Pal	Ped
Cal	-	0.184	0.122	0.146
LSA	0.079*	-	0.080	0.269
Pal	0.035*	0.041*	-	0.195
Ped	0.053*	0.120*	0.072*	-

El árbol construido con las distancias genéticas de Nei (1978) muestra 3 grupos o poblaciones. El del Pedregal que se encuentra claramente separado de los otros dos. Otro grupo constituido por las Poblaciones de Llanos de Santa Ana y Las Palomas y un tercer grupo la Quinta Calimán (Fig. 7). Los mismos grupos se forman con el árbol construido con base en los valores de F_{ST} (Fig. 8).

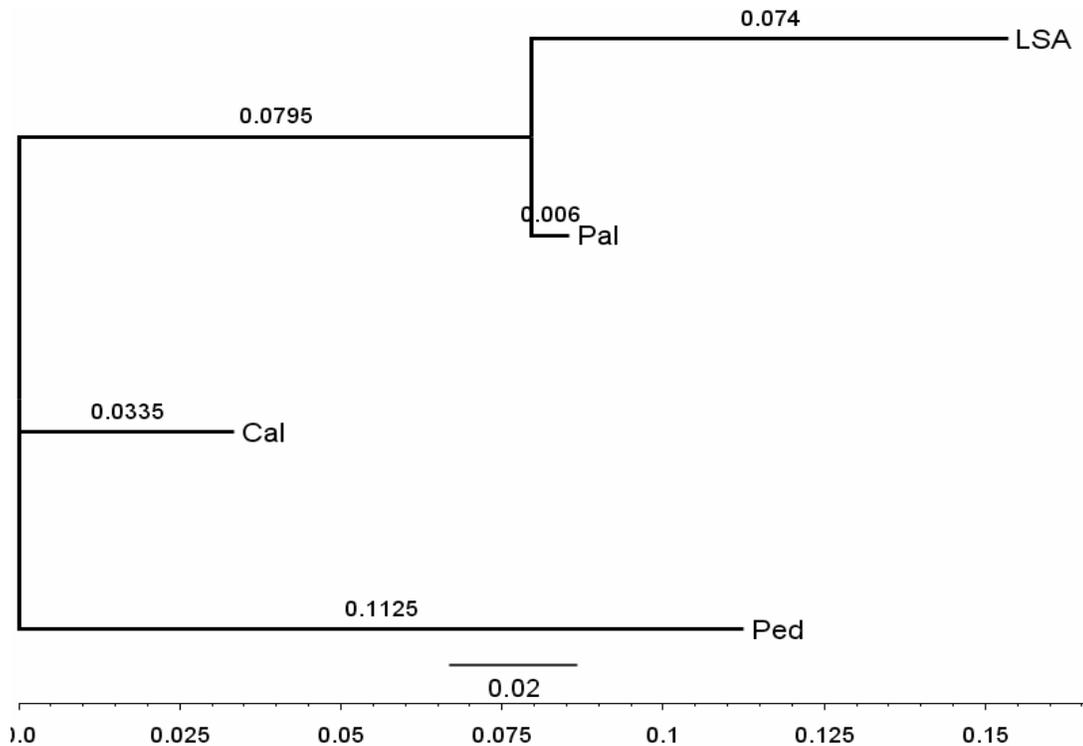


Figura 7. Árbol de distancias genéticas de Nei (1978) realizado con el método de Neighbor-Joining.

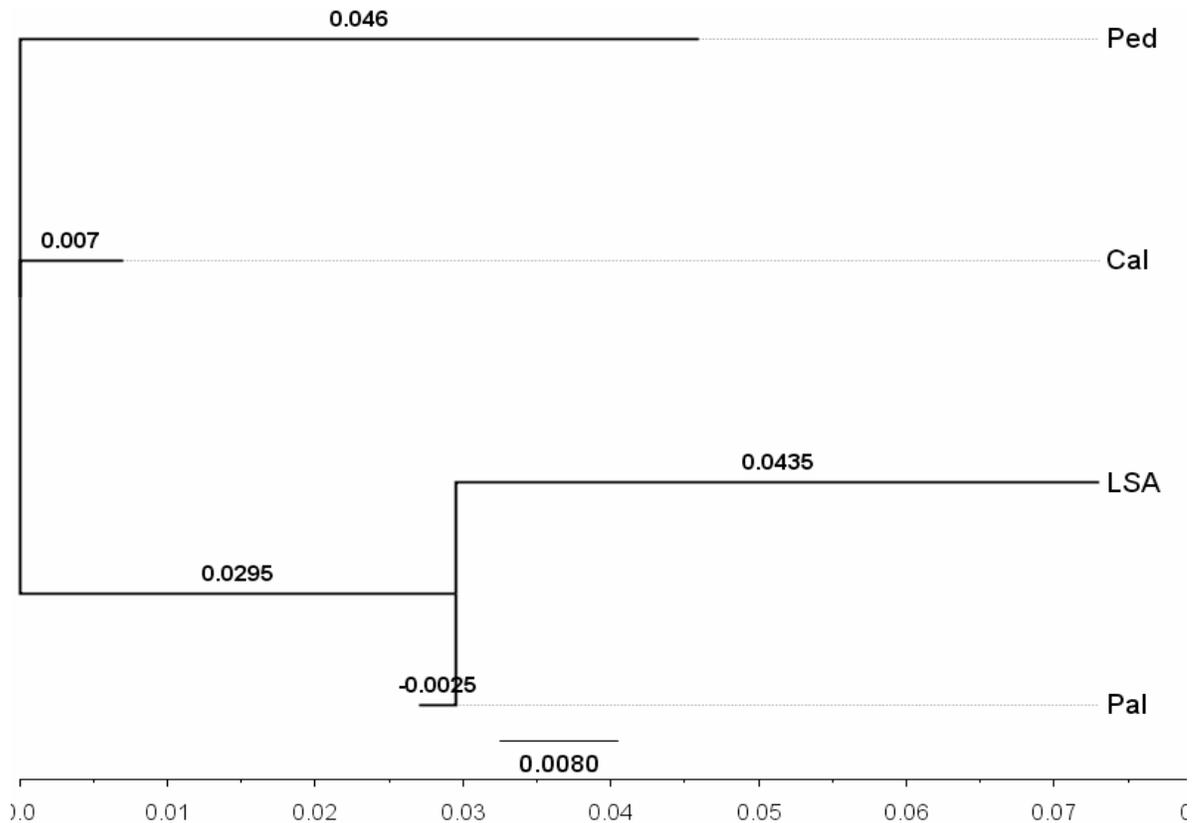


Figura 8. Árbol de distancias realizado con el método de *Neighbor-Joining* a partir de los valores de F_{ST} .

6.6 Flujo génético

El mayor número de migrantes se estima que es entre las poblaciones de Las Palomas y la Quinta Calimán que son las más cercanas geográficamente y el menor entre las poblaciones de Llanos de Santa Ana y el Pedregal de San Angel. La población de Llanos de Santa Ana presenta un mayor número de migrantes con la población de las Palomas que con la población de la Quinta Caliman, a pesar de que las distancias geográficas son casi iguales. El menor número de migrantes se da de la población de Pedregal de San Angel con la población de Llanos de Santa Ana (Cuadro 12 y 13). Los valores tienen un rango de 3.1 a 5.2 (Promedio=4.3) calculados a partir de F_{ST} y de 0.67 a 2.1 (Promedio=1.15) mediante el método de alelos privados.

Cuadro 12. Número de migrantes (Nm) entre las poblaciones. Debajo de la diagonal por medio de F_{ST} por arriba de la diagonal con el método de alelos privados.

Nm	Cal	LSA	Pal	Ped
Cal	-	0.968	1.56	0.723
LSA	2.915	-	2.104	0.67
Pal	6.893	5.847	-	0.854
Ped	4.467	1.833	3.222	-

Cuadro 13. Matriz de distancia geográfica entre las poblaciones (Km).

	Cal	LSA	Pal	Ped
Cal	0.0			
LSA	79.9	0.0		
Pal	18.9	85.4	0.0	
Ped	268.0	291.0	286.0	0.0

6.7 Análisis de varianza molecular

El análisis de varianza molecular (AMOVA) se realizó con la F_{ST} y con R_{ST} , que es el equivalente a la F_{ST} , bajo el modelo de step-wise. Los resultados de ambas pruebas fueron similares. El mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de los individuos y no entre los individuos o entre las poblaciones (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis de varianza molecular (AMOVA).

F_{ST}				
Fuente de Variación	Porcentaje de Variación	Coeficientes		P
Entre Poblaciones	0.070	F_{ST}	0.071	0.001
Entre Individuos	0.180	F_{IS}	0.197	0.001
Dentro de los Individuos	0.750	F_{IT}	0.254	0.001

R_{ST}				
Fuente de Variación	Porcentaje de Variación	Coeficientes		P
Entre Poblaciones	0.050	R_{ST}	0.053	0.004
Entre Individuos	0.160	R_{IS}	0.168	0.006
Dentro de los Individuos	0.790	R_{IT}	0.212	0.002

6.8 Estructura genética

Los resultados obtenidos mediante el análisis de asignación bayesiana realizados con el programa STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000) muestran la existencia de tres grupos o poblaciones ($K=3$). Los grupos son 1) Quinta Calimán (Cal) y Las Palomas (Pal) 2) Llanos de Santa Ana (LSA) y 3) El Pedregal de San Ángel (Ped) (Fig. 9 y 10). Se observa que los individuos no se asignan a un único grupo, los individuos de la población del Pedregal de San Ángel se asignan en una mayor proporción al Grupo tres (rojo), los de la población de Llanos de Santa Ana al grupo dos (azul), y los de la Quinta Calimán al grupo uno (verde). Sin embargo, los individuos de la población de las Palomas se asignan a los grupos uno y dos lo que sugiere un origen híbrido de esta población.

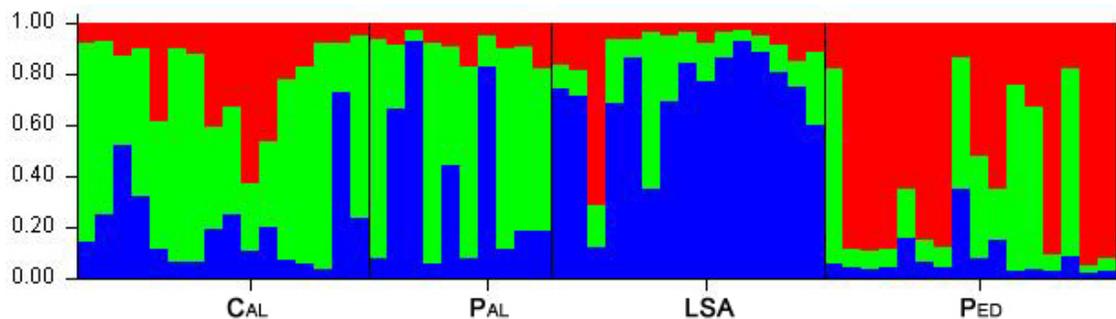


Figura 9. Estructura genética de las poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens*.

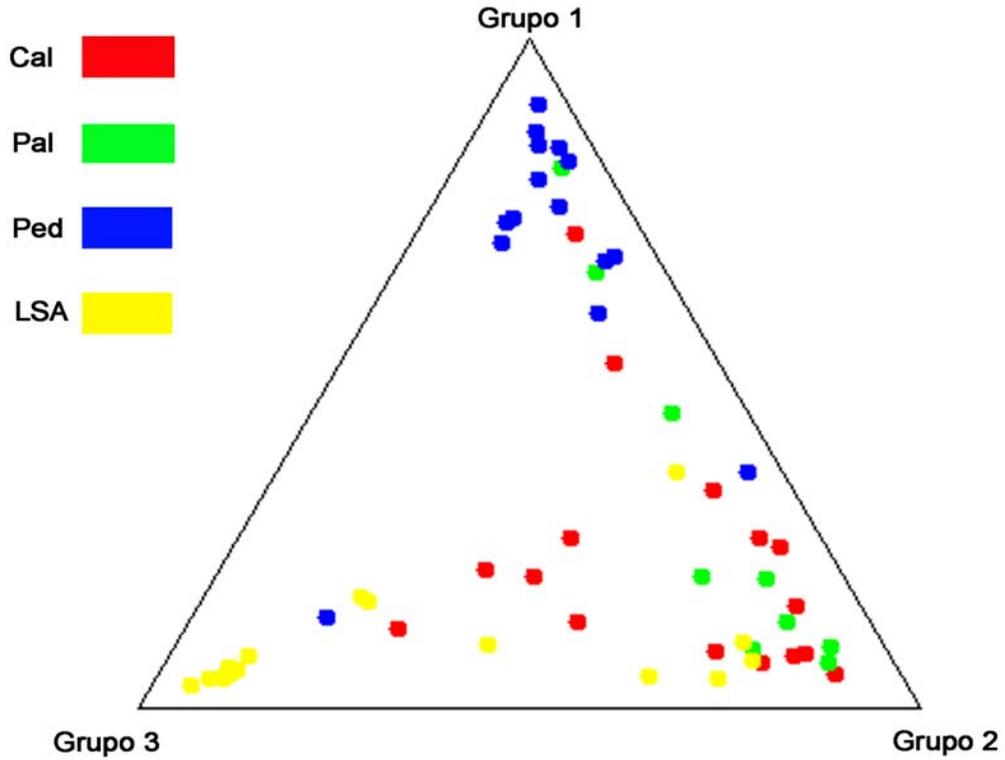


Figura 10. Grupos y asignación de los individuos de las poblaciones a los grupos.

La prueba de Evanno *et al.* (2005), muestra que existen 3 grupos o poblaciones ($K=3$), éste resultado es consistente con el resultado de programa STRUCTURE v.2.2 (Pritchard *et al.* 2000)(Fig. 11)

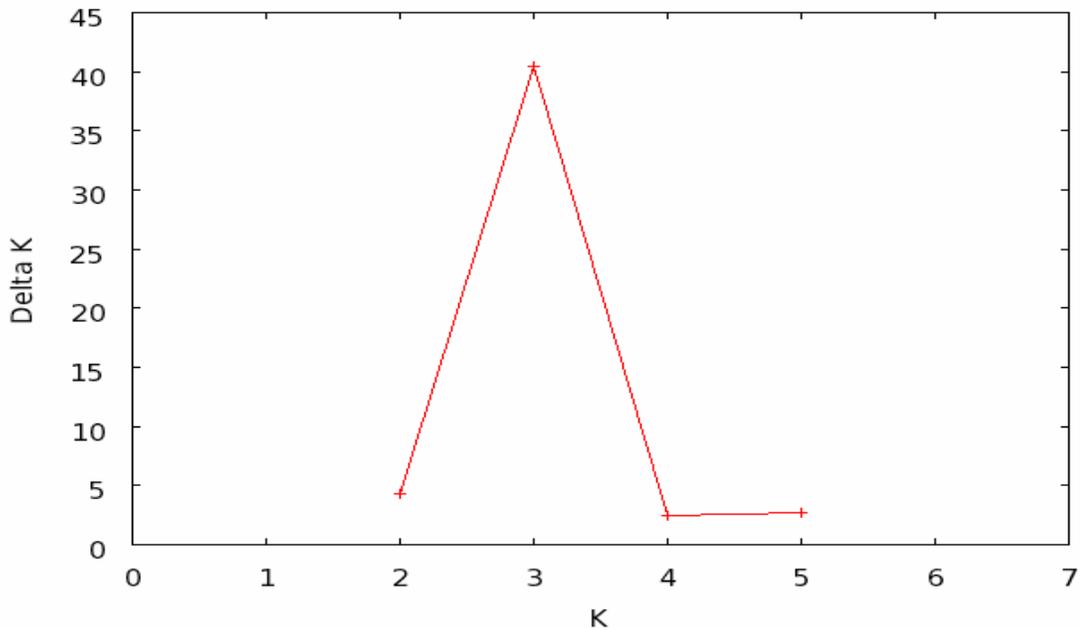


Figura 11. Prueba *ad hoc* de Evanno *et al.* (2005) de ΔK .

7. DISCUSIÓN

7.1 Amplificación cruzada de microsatélites

La amplificación cruzada es posible debido a que los *primers* de microsatélites desarrollados para una especie, pueden ser útiles en análisis de la estructura genética de otras especies cercanas genéticamente (Allendorf y Luikart, 2007). El género *Crotalus* es monofilético (Gloyd 1940; Klauber, 1972; Murphy *et al.* 2002) lo que facilita el uso de estos *primers* para microsatélites en *Crotalus molossus nigrescens*. La retención de los sitios del cebador (*primer*) y el número de alelos disminuyen a medida que la distancia evolutiva de la especie para la que fueron diseñados aumenta (Moore *et al.*, 1991; Primmer *et al.* 1996). Se desconoce por cuanto tiempo se conservan las regiones flanqueantes en el género *Crotalus* o en serpientes, pero se conoce que para tortugas es de 300 millones de años (Fitzsimmons *et al.*, 1995) y para peces de 470 millones de años (Rico *et al.*, 1996). La amplificación cruzada se ha realizado con éxito dentro del género *Crotalus* (Anderson, 2006; Bushar *et al.*, 2001).

Se utilizaron seis microsatélites diseñados para otras especies del género (*C. willardi*, *C. horridus* y *C. viridis*) y todos resultaron polimórficos. El número de alelos encontrado fue similar al registrado en los locus CwA29, CwB6 y Ch5A. Se encontró un mayor número de alelos en el locus Ch7-87. En los locus MfrD5 y Mfr15, se encontró un número menor de alelos al registrado (Cuadro 15). Estas diferencias en el número de alelos no son sólo por las diferencias en la poblaciones, también se deben a que estos microsatélites

fueron diseñados para otras especies de *Crotalus*. El polimorfismo encontrado en estos microsatélites sugiere que pueden ser usados en estudios de genética de poblaciones en *Crotalus molossus nigrescens*. Se encontraron alelos nulos únicamente para el locus Ch7-87 en la población del Pedregal de San Ángel y el desequilibrio del ligamiento no es consistente. Debido a la presencia de alelos nulos en el locus Ch7-87, recomendaría el uso de otro locus para estudios posteriores.

Cuadro 15. Número de alelos encontrado vs Número de alelos reportado.

Locus	N _A Reportado	N _A Encontrado
CwA29	5	4.5
CwB6	5	2.5
Ch5A	8	8.5
Ch7-87	3	7
MfrD5	9	6
Mfr15	8	6.75

7.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

La comparación entre el número de heterocigotos observados contra los esperados para cada locus bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg indican que la deficiencia de heterocigotos es una constante en las poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens* muestreadas en este estudio. También se calculó el coeficiente de endogamia F_{is} para cada locus. La mayoría de estos valores fueron mayores a cero (21 de 24 = 87%) lo que indica endogamia dentro de cada población (Cuadro 9).

Además de la endogamia existen dos posibles explicaciones para valores positivos de F_{is} :

- 1) Existencia de alelos nulos (Brookfield, 1996). Esta posibilidad queda descartada ya que no se encontraron al hacerse las pruebas de alelos nulos y de desequilibrio del ligamiento y no se encontraron. El valor alto de F_{IS} y baja heterocigosis en el locus Ch7-87 en la Población de las Palomas se debe a la presencia de alelos nulos.
- 2) Efecto Wahlund (Hartl, 2000). Para descartar este efecto en los valores de F_{IS} , se revisaron los datos en búsqueda de algún patrón. No existe un patrón de deficiencia de heterocigotos por locus o por población. Adicionalmente el tamaño de muestra es pequeño para observar este efecto.

Este fenómeno puede estar siendo ocasionado porque pocas hembras producen la mayor parte de la descendencia en un área particular (Gibbs *et al.*, 1997). Para explicar la deficiencia de heterocigotos se requeriría estudiar el éxito reproductivo de hembras y machos, patrones de dispersión y las tasas de supervivencia.

7.3 Variación genética

El mayor descubrimiento de este trabajo es que las poblaciones de Llanos de Santa Ana, las Palomas y Quinta Calimán son genéticamente similares. Aun cuando todas las poblaciones tienen alelos privados la frecuencia de estos alelos es baja (0.031-0.179). Este resultado es sorprendente, ya que las poblaciones se encuentran aisladas por barreras geográficas compuestas por

hábitats urbanos y agrícolas. Se encontró que la población del Pedregal de San Ángel difiere significativamente en las frecuencias alélicas en casi todos los loci (Fig. 6). También tiene distancias mayores de F_{ST} y Nei (Fig. 7 y 8) la explicación a esto es la gran distancia geográfica de la población del Pedregal de San Ángel a las otras poblaciones (Cuadro 13) y el aislamiento geográfico causado por la urbanización.

Los valores bajos de F_{ST} sugieren que existe o existió flujo génico entre todas las poblaciones de Guanajuato, y que existió flujo génico de la población del Pedregal de San Ángel en el pasado con las otras poblaciones.

7.4 Estructura y estructuración genética

Los valores de F_{ST} tienen un rango que va de cero, cuando todas las subpoblaciones tienen frecuencias alélicas iguales. Cuando todas las poblaciones están fijadas para diferentes alelos es igual a uno (Nei 1972). El valor obtenido para las poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens* es de 0.069 (Cuadro 10). El valor es similar al descrito en estudios de *Crotalus horridus* (Clark *et al.*, 2008 Anderson, 2008) en los que no encontraron una estructura genética clara (Cuadro 2). Si lo comparamos con el estudio realizado en *Sistrurus catenatus* (Gibbs *et al.*, 1997) en el que encontraron una estructuración genética en una escala muy fina y el estudio en *Vipera berus* (Ursenbacher *et al.*, 2009) en el que también encontraron mucha estructuración el valor es relativamente menor (Cuadro 2).

Los estudios de Gibbs *et al.* (1997) y Clark *et al.* (2008) fueron realizados en especies de crótalos que se agrupan en hibernáculos durante el invierno, y presentan fidelidad a un sitio de anidación (Cobb *et al.* 2005; Harvey y Weatherhead, 2006; Brown *et al.* 2007), lo que aumenta la probabilidad de que se fijen alelos en las poblaciones. Los estudios arrojaron resultados distintos, *Crotalus horridus* tiene poca estructuración genética comparado con *Sistrurus catenatus*. La diferencia entre las dos especies radica en que los machos de *Crotalus horridus* se desplazan mucho durante la época reproductiva (7 km) permitiendo así que haya flujo génico (Clark *et al.*, 2008). *C. molossus nigrescens* es una especie con un ámbito hogareño grande (3.49ha) y con desplazamientos promedio anuales de 14.99 kms (Beck, 1995) dos veces mas que *Crotalus horridus*. Estos grandes desplazamientos pueden ser los causante de la baja estructura en las poblaciones y las altas tasas de migración encontradas. Es importante recalcar que el estudio del ámbito hogareño y desplazamientos de *Crotalus molossus nigrescens* se realizó en el Desierto de Sonora, que es un hábitat distinto al de las poblaciones analizadas en este estudio.

El análisis bayesiano mostró la existencia de 3 grupos, sin embargo la asignación de los individuos a las poblaciones no es muy clara. Esto puede estar ocasionado por un origen híbrido de las poblaciones. El desequilibrio del ligamiento presente en 2 locus y las tasas altas de migración entre las poblaciones respaldan esta teoría.

El resultado del análisis de varianza molecular indica que la mayor fuente de variación genética es dentro de los individuos y no entre los individuos dentro

de las poblaciones (intrapoblacional) o entre las poblaciones (interpoblacional) (Cuadro 14). Este patrón también se encontró en *Elaphe o. obsoleta* (Prior *et al.* 1997) y en *Vipera aspis* (Jäggi *et al.* 2000). La variación genética sigue un patrón geográfico que sugiere flujo génico presente entre las poblaciones de Guanajuato o que no ha pasado suficiente tiempo para que las poblaciones lleguen al equilibrio. Sin embargo, el flujo génico puede reducirse o interrumpirse por la actividad agrícola y la construcción de caminos y carreteras (Jäggi *et al.* 2000; Clark *et al.* 2010), el proceso de aislamiento en las localidades es reciente y probablemente no ha pasado suficiente tiempo para que se establezca una estructura genética acorde con el aislamiento. Los estudios de Prior *et al.* (1997) y Jäggi *et al.* (2000) en colúbridos encontraron que no hay diferencias ni estructura poblacional en poblaciones fragmentadas y aisladas recientemente (50-100 años).

7.5 Flujo genético

Las medidas de flujo genético basadas en estimados de número de migrantes a partir de F_{ST} (Hartl, 2000) son relativamente grandes. Estos valores no deben interpretarse de manera literal, ya que este método asume:

1. Número infinito de poblaciones del mismo tamaño
2. Migración simétrica
3. Ausencia de mutación
4. Equilibrio entre deriva y migración

5. Igualdad demográfica de residentes y migrantes

La reducción del flujo génico en las poblaciones no se puede detectar por este método indirecto hasta después de muchas generaciones de aislamiento (Allendorf y Liukart, 2007).

Los valores obtenidos mediante el método de alelos privados (Slatkin, 1985), y por F_{ST} indican que las poblaciones de Guanajuato son las que tienen mayor flujo genético, especialmente de la población de las Palomas con las otras dos.

7.6 Implicaciones en la conservación

Encontramos que todas las poblaciones tienen un déficit de heterocigos (Cuadro 8 y 9) y que los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) son positivos y altos si se comparan con los obtenidos en otros estudios del género realizados por Anderson (2010), Holycross y Douglas (2007) y Gibbs *et al.* (1997). Los valores se muestran en el Cuadro 2. Estos valores indican que las poblaciones se encuentran en procesos de endogamia.

Los valores de Nm son mayores a 1 que indicaría la presencia de flujo genético suficiente para mantener las poblaciones; sin embargo este valor debe ser interpretado con cautela, ya que las poblaciones se encuentran aisladas actualmente, evitando que este flujo exista. Especialmente en la población del Pedregal de San Ángel.

Las distancias genéticas que existen entre las poblaciones muestran poca estructuración genética ($F_{ST}=0.069$) al compararse con el estudio de Gibbs *et al.* (1997) ($F_{ST}= 0.164$) aun cuando se encuentran separadas por grandes distancias geográficas. Sin embargo la presencia de alelos únicos en cada

población indica que el aislamiento ha ocurrido en una escala evolutiva, permitiendo que la mutación genere nuevos alelos dentro de cada población.

Lo anterior nos permite sugerir que todas las poblaciones se sujeten a algún plan de conservación. La población a la que debe dedicarse más atención es la del Pedregal de San Ángel por reducción acelerada de hábitat, fragmentación y aislamiento geográfico. La reserva del Pedregal de San Ángel solía tener un área de 40.45 kilómetros cuadrados antes de 1954 y para 1981, tenía un área de tan sólo 3 kilómetros cuadrados (Álvarez *et al.* 1994) lo que significa una gran pérdida de área en poco tiempo. Adicionalmente es un hábitat aislado por el desarrollo urbano. La fragmentación, pérdida de hábitat y aislamiento son factores que llevan a las poblaciones a perder su diversidad genética con el tiempo (Scribner *et al.* 2006)

Para todas las poblaciones de *Crotalus molossus nigrescens* en México es necesario mantener y aumentar donde sea posible las áreas con hábitat apropiado para la especie. Para disminuir los efectos adversos de las carreteras en la dispersión, conectividad y mortalidad de las serpientes, es necesario construir pasos subterráneos en las carreteras Clark *et al.* (2010), con líneas de desvío para dirigir a las serpientes a esos pasos (Aresco, 2005).

Además de las acciones para conservar el hábitat y a los individuos de las poblaciones es muy importante involucrar a la gente que convive con ellas. La manera de hacerlo es mediante programas de educación ambiental con información biológica adecuada. La colocación de letreros en las zonas donde se pueden encontrar y trabajo local con los residentes para promover el

entendimiento de *Crotalus molossus* como una especie que beneficia a la comunidad por sus servicios en el ecosistema.

En el caso del Pedregal de San Ángel una estrategia podría ser la translocación de individuos de otras poblaciones a esta población para mantener la variabilidad genética. Esta estrategia tiene ciertas restricciones y/o complicaciones ya que puede llevar a la transmisión de patógenos, parásitos, e individuos o genes no adaptados localmente (Hodder y Bullock, 1997). Reinart y Rupert (1999), realizaron un estudio sobre los efectos de la translocación de *Crotalus horridus* adultos. Ellos no lo recomiendan como una práctica de conservación por las consecuencias negativas inmediatas en los individuos translocados (mayor mortalidad por depredación y enfermedades, menor capacidad de forrajeo, mayor actividad que los residentes). Otra estrategia sería la creación de un plan de manejo que consistiera en capturar individuos adultos de esta población, reproducirlos y reintroducir a las crías.

**Propuesta de un plan de conservación de serpientes de cascabel en México.
Modificado de The Timber Rattlesnake Conservation Action Plan (TRCAP)**

- Evaluar e Identificar los problemas a los que se enfrentan las serpientes de cascabel en México.
 - Requerimientos y características ecológicas y biológicas de las especies
 - Rango de distribución y estatus de las poblaciones de las especies
 - Mapas de distribución por estado con resumen de las amenazas y necesidades de conservación
- Identificar las acciones de conservación necesarias para cada especie
 - Protección de hábitat a largo plazo
 - Identificar y proteger los corredores de flujo génico en las especies, dentro de las poblaciones y en su rango de distribución
 - Evaluar las poblaciones aisladas
 - Educación ambiental en comunidades
- Mantener informada a las agencias estatales y federales encargadas de la toma de decisiones con respecto a las especies y su conservación.
 - Protección legal a nivel estatal dónde sea necesario

- Recalcar y encauzar la atención en problemas de conservación críticos por especie
- Desarrollar una red de conservación de especialistas de las serpientes de cascabel en México dedicados al estudio y divulgación de la ciencia.

8. CONCLUSIONES

Los seis loci utilizados para el trabajo son polimórficos, no existe desequilibrio del ligamiento consistente para un único loci en las poblaciones y solo el locus Ch7-87 en la población del Pedregal de San Ángel tiene alelos nulos. Por la presencia de alelos nulos en el locus Ch7-87 recomendaría usar otro locus para estudios posteriores.

Las cuatro poblaciones tienen deficiencias de heterocigotos y sufren procesos de endogamia. Para explicar la deficiencia de heterocigotos se requeriría estudiar el éxito reproductivo de hembras y machos, patrones de dispersión y las tasas de supervivencia.

Se determinaron tres poblaciones o demes genéticos por medio del análisis bayesiano: la población del Pedregal, la población de Llanos de Santa Ana y una tercera población constituida por las Palomas y la Quinta Calimán.

La población de las Palomas parece tener un origen híbrido con las poblaciones de Llanos de Santa Ana y la Quinta Caliman por su desequilibrio del ligamiento presente en dos locus y las tasas altas de migración entre las poblaciones.

Los grandes desplazamientos que presenta *Crotalus molossus nigrescens* y las altas tasas de migración encontradas pueden ser los causantes de la poca estructuración genética encontrada o bien el reciente aislamiento no permite ver los efectos genéticos.

Con base en los datos obtenidos recomendaría que en las cuatro poblaciones se realizaran planes para su conservación, pero la que más atención necesita es la del Pedregal de San Ángel.

Perspectivas

Para mejorar los resultados obtenidos en este trabajo yo propondría:

- Trabajar con un mayor número de loci
- Diseñar microsatélites específicos para la especie
- Aumentar el número de individuos analizados
- Aumentar el número de poblaciones analizadas
- Realizar un análisis de genes mitocondriales para reconstruir la filogeografía de la especie

Literatura Citada

ALJANABI, S.M. Y I. MARTINEZ. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25:4692-4693.

ALLEDNORF, F.W. Y G. LUIKART. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell publishings, E.U.A. 642pp.

ÁLVAREZ, F.J., J. CARABIAS, J. MEAVE, P. MORENO, D. NAVA, F. RODRIGUEZ, C. TOVAR Y A. VALINTE-BANUET. 1994. Proyecto para la creación de una reserva en el Pedregal de San Angel. Pags. 323- 342 en (A. Rojo ed.) en *Reserva ecológica "El Pedregal de San Angel: Ecología, Historia Natural y Manejo*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

ANDERSON, C.D. 2010. Effects of movement and mating patterns on gene flow among overwintering hibernacula of the Timber rattlesnake (*Crotalus horridus*). *Copeia* 1:54-61.

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* 6:514-517.

ARESCO, M.J. 2005. Mitigation measures to reduce highway mortality of turtles and other herpetofauna at a north Florida lake. *Journal of Wildlife Management* 69:549-560.

AVISE J.C Y J.L. HAMRICK. 1996. *Conservation genetics: Case histories from Nature*. Chapman and Hall, New York. 536pp.

BEAMAN, K.R. Y W.K. HAYES. 2008. Rattlesnakes: Research trends and annotated checklist. Págs. 5-16 en (Hayes, W.K., K.R. Beaman, M.D. Caldwell y S.P. Bush,

- eds) *The Biology of Rattlesnakes*. Loma Linda University Press. Loma Linda, California.
- BECK, D.D. 1995. Ecology and energetics of three sympatric rattlesnake species in the Sonoran desert. *Journal of Herpetology* 29(2):211-223.
- BROOKFIELD, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5:453-455.
- BUSHAR, L. M, M. MALIGA Y H. K. REINART. 2001. Cross-species amplification for *Crotalus horridus* microsatellites and their application in phylogenetic analysis. *Journal of Herpetology* 35(3): 537-537.
- BROWN, W.S. 1993. *Biology, status and management of the timber rattlesnake (Crotalus horridus): a guide for conservation*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Herpetological Circular 22, 78pp.
- BROWN, W.S., M. KERY Y J.E. HINES. 2007. Survival of Timber rattlesnakes (*Crotalus horridus*) Estimated by capture-recapture models in relation to age, sex, color morph, time and Birthplace. *Copeia* 3:656-671.
- CAMPBELL, A. J Y W. W. LAMAR. 2004. *The venomous reptiles of the western hemisphere*. Tomo 2. Cornell University Press, China. 870pp.
- CARLSSON, M., L. SODERBERG Y H. TEGELSTROM. 2004. The genetic structure of adders (*Vipera berus*) in Fennoscandia: congruence between different kinds of genetic markers. *Molecular Ecology* 13:3147-3152.
- CHKRABORTY, R., M. DE ANDRADE, S.P. DAIGER Y B. BUDOWLE. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic data. *Annals of Human Genetics* 67:727-736.

- CIOFI C. Y M.W. BRUFORD. 1999. Genetic structure and gene flow among Komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology* 8:S17-S30.
- CLARK, R.W, W.S. BROWN, R. STETCHERT Y K.R. ZAMUDIO. 2008. Integrating individual behavior and landscape genetics: the population structure of timber rattlesnake hibernacula. *Molecular Ecology* 17:719-730.
- CLARK, R.W., W.S. BROWN, R. STETCHERT Y K.R. ZAMUDIO. 2010. Roads, interrupted dispersal, and genetic diversity in timber Rattlesnakes. *Conservation Biology* 24(4):1059-1069.
- COBB V.A., J.J. GREEN, T. WORALL, J. PRUETT Y B. GLORIOSO. 2005. Initial den location behavior in a litter of neonate *Crotalus horridus* (timber rattlesnakes). *Southern Naturalist* 4:723-730.
- CONNER, R.N., D.C. RUDOLPH, D. SAENZ, R.R. SHAEFER Y S.J. BURGDORF. 2003. Growth rate and post release survival of captive neonate Timber rattlesnakes, *Crotalus horridus*. *Herpetological Review* 34(4):314-317.
- CROW, J.F. Y M. KIMURA. 1970. *An introduction to population genetics theory*. Harper Row eds. New York, USA. 591pp.
- DI RIENZO, A., A.C. PETERSON, J.C. GARZA, A.M. VALDES, M. SLATKIN Y N.B. FREIMER. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 91:3166-3170.
- DODD, C.K. 1987. Status Conservation and management. Pags. 478-513 en (Siegel, R.A., J.T. Collins y S.S. Novak, eds) *Snakes: Ecology and evolutionary biology*. Macmillan Publishing Co. New York.

- DUTRA, N.C.L., M.P.C. TELLES, D.L. DUTRA Y N.J. SILVA JUNIOR. 2008. Genetic Diversity of the viper *Bothrops moojeni* in Central Brazil using RAPD markers. *Genetics an Molecular Research* 7(3):603-613.
- EISNER, T., J. LUBCHENCO, E.O. WILSON, D.S. WILCOVE Y M.J. BEAN. 1995. Building a scientifically sound policy for protecting endangered species. *Science* 268:1231-1233.
- ESTOUP, A., P.JARNE Y J.M. CORNUET. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology* 11:1591-1604.
- EVANNO, G., S. REGNAUT Y J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620
- EXCOFFIER., L., G. LAVAL Y S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin v.3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Infomatics Online* 1:47-50.
- FELSENSTEIN, J. 2009. PHYLIP: Phylogeny Inference Package V. 3.6 9
- FITZSIMMONS, N.N., C. MORITZ Y S.S. MOORE. 1995. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12(3):432-440.
- FLORES-VILLELA, O. Y L. CANSECO-MÁRQUEZ. 2004. Nuevas especies y cambios taxonómicos para la herpetofauna de México. *Acta Zoológica Mexicana* 20(2):115-144.
- GIBBS, H.L., K. PRIOR, P.J. WEATHERHEAD Y G. JOHNSON.1997. Genetic populations of the threatened eastern massasauga rattlesnake, *Sistrurus c. catenatus*: evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 6:1123-1132.
- GIBBS, H. L., K. PRIOR Y C. PARENT. 1998. Characterization of DNA microsatellite loci from a threatened snake: The eastern Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus c. catenatus*) and their use in population studies. *Journal of Heredity* 89(2):169-173.
- GLOYD, H.K. 1940. *The rattlesnakes, Genera Sistrurus and Crotalus*. Special publication of the Chicago Academy of Sciences 4.

- GOLDBERG, C. S., T. EDWARDS, M. E. KAPLAN Y M. GOODE. 2003. PCR primers for microsatellite loci in the tiger rattlesnake (*Crotalus Tigris*, Viperidae). *Molecular ecology notes* 3:539-541.
- GOUDET, J. 1995. FSTAT(version1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of heredity* 86:485-486.
- GREENE, H.W. Y J.A. CAMPBELL. 1992. The future of the pitvipers. Pags. 421-427 en (Campbell, J.A y E.D. Brody, eds) *Biology of the Pitvipers*. Selva Publishing. E.U.A.
- GROOM, M.J. 2006. Threats to diversity. Págs 64-109 en (Groom, M.J, G.K. Meffe y C.R. Carroll, eds) *Principles of Conservation Biology* 3ed. Sinauer Associates, USA.
- HARTL, D.L. 2000. A primer of population genetics 3ed. Sinauer Associates, E.U.A.
- HARVEY, D.S. Y P.J. WEATHERHEAD. 2006. Hibernation site selection by eastern Massasuga rattlesnakes (*Sistrurus catenatus catenatus*) near their northern range limit. *Journal of Herpetology* 40(1):66-73.
- HEDRICK, P.W. 2005. *Genetics of populations*. 3ed. Jones and Bartlett publishers, USA.
- HODDER, K.H. Y J.M. BULLOCK. 1997. Translocation of native species in the UK: implications for biodiversity. *Journal of Applied Ecology* 34:547-565
- HOLYCROSS, A.T., M.E. DOUGLAS, J.R. HIGBEE Y R.H. BOGDEN. 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci from a threatened rattlesnake (New Mexico Ridge-nosed Rattlesnake, *Crotalus willardi obscurus*). *Molecular Ecology Notes* 2:537-539.
- HOLYCROSS, A.T Y M.E. DOUGLAS. 2007. Geographic isolation, genetic divergence, and ecological non-exchangeability define ESUs in a threatened sky-island rattlesnake. *Biological Conservation* 134:142-154.
- JÄGGI, C., T. WIRTH Y B. BAUR. 2000. Genetic variability of the asp viper (*Vipera aspis*) in the Swiss Jura mountains: implications for conservation strategy. *Biological Conservation* 94: 69-67.
- KALINOWSKI, S.T. Y M.L.TAPER. 2006. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics* 7:991-995

- KIMURA, M. Y J.F. CROW. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
- KIMURA, M. Y T. OHTA. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences* 75:2868-2872.
- KNIGHT, A., D. STYER, S.PELIKAN, J.A. CAMPBELL, L.D. DENSMORE Y D.P. MINDELL. 1993. Choosing among hypotheses of rattlesnake phylogeny: a best fit rate test for DNA sequence data. *Systematic Biology* 42:356-367.
- KLAUBER, L.M. 1972 *Rattlesnakes: Their habits, life histories, and influence on mankind*. 2a ed. University of California press, Berkeley.
- LANDE, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241(4872): 1455-1460.
- LEMONS, J. Y H. SMITH. 2007. *Anfibios y Reptiles del estado de Coahuila, México*. UNAM/CONABIO. México. 550pp.
- LEWONTIN, R.C. Y K. KOJIMA. 1960. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* 14:450-472.
- LOUGHEED, S.C., H.L. GIBBS, K.A. PRIOR Y P.J. WEATHERHEAD. 1999. Hierarchical patterns of genetic population structure in black rat snakes (*Elaphe obsoleta obsoleta*) as revealed by microsatellite DNA analysis. *Evolution* 53(6):1995-2001.
- LUKOSCHEK V., M. WAYCOTT Y J.S. KEOGH. 2008. Relative information content of polymorphic microsatellites and mitochondrial DNA for inferring dispersal and population genetic structure in the olive sea snake, *Aipysurus laevis*. *Molecular Ecology* 17:3062-3077.
- MANIER, M.K. Y S.J. ARNOLD. 2005. Population genetic analysis identifies source-sink dynamics for two sympatric garter snake species (*Tamnophis elegans* and *Tamnophis sirtalis*) *Molecular ecology* 14:3965-3976.
- MEFFE, G.K., CAROLL, C.R. Y M.J. GROOM. 2006. What is conservation Biology?. Págs 3-25 en (Groom, M.J, G.K. Meffe y C.R. Carroll, eds) *Principles of Conservation Biology* 3ed. Sinauer Associates, USA.

- MOORE, S., L.L. SARGEANT, T.J. KING, J.S. MATTICK, M. GEORGES Y D.J.S. HETZEL. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics* 10:654-660.
- MURPHY, R., FU, J., LATHROP, A., FELTHAM, J. Y V. KOVAC. 2002. Phylogeny of the rattlesnakes (*Crotalus* and *Sistrurus*) inferred from sequences of five mitochondrial DNA genes. Pags. 69-92 en (Schuett, G., Hogrgren, M., Douglas, M y H. Greene, eds) *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing. E.U.A.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106:183-292.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-ECOL-2001. 2001. Protección ambiental- Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio- Lista de especies en riesgo. SEMARNAT.
- OOSTERHOUT, C.V., W.F. HUTCHINSON, D.P.M. WILLS Y P. SHIPLEY. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.
- OYLER-MCCANCE, S.J., J.ST. JOHN, J.M. PARKER Y S.H. ANDERSON. 2005. Characterization of microsatellite loci isolated in midget faded rattlesnake (*Crotalus viridis concolor*). *Molecular Ecology Notes* 5:452-453.
- PAQUIN, M.M., G.D. WYLIE Y E.J. ROUTMAN. 2006. Population structure of the giant garter snake, *Tamnophis gigas*. *Conservation Genetics* 7:25-36.
- PARKER, W.S Y M.V. PLUMMER. 1987. Population ecology. Págs. 253-301 en (Siegel, R.A., Collins, J.T. y S.S. Novak, eds.) *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*, Macmillan. Toronto.
- PARKINSON, C.L., CAMPBELL, J.A. Y P.T. CHIPPINDALE. 2002. Págs. 93-110 en (Schuett, G., Hogrgren, M., Douglas, M y H. Greene, eds) *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing. E.U.A.

- PEAKALL, R Y P.E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software fro teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- PRIMMER, C.R., A.P. MOLLER Y H. ELLEGREN. 1996. Wide-ranging survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5:365-378.
- PRIOR, K.A., GIBBS, H.L. Y WEATHERHEAD, P.J. 1997. Population genetic structure in the black rat snake: implications for management. *Conservation Biology* 11(5):1147-1158.
- PRITCHARD, J.K., M. STEPHENS Y P. DONELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- RAGE, J.C. 1987. Fossil History. Págs. 51-76 en (Siegel R.A., Collins, J.T. y S.S. Novak, eds.) *Snakes: Ecology and Evolutionary Biology*. Macmillan, New York.
- RANDALL, A., B.D. INOUYE, M.T.J. JOHNSON, N. UNDERWOOD Y M. VELLEND. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11:609-623.
- RAYMOND, M. Y F. ROUSSET. 1995. GENEPOP (Ver.1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- REINERT, H.K. Y L.M. BUSHAR. 1991. A safe and rapid method of blood collection from rattlesnakes. *Herpetological Review* 22(2):51-52.
- REINERT, H.K Y R.R. RUPERT. 1999. Impacts of translocation on behavior and survival of timber rattlesnakes, *Crotalus horridus*. *Journal of Herpetology* 33(1):45-61.
- RICO, C., I. RICO Y G. HEWITT. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings: Biological Sciences* 1370(263):549-557.

- SAMBROOK, J. Y D.W. RUSSELL. *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 3ra ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2344pp.
- SCOTLAND R.W. 1992. Cladistic theory. Págs. 3-13 en (Forey, P.L, Humphries, C.J., Kitching, I.J., Scotland, R.W., Siebert D.J. y D.I. Williams, eds) *Cladistics: a practical course in systematics*. Clarendon Press, Oxford.
- Scribner T.K., Meffe, G.K. y M.J. Groom. 2006. Conservation Genetics: The use and importance of genetic information. Págs 375-415 en (Groom, M.J, G.K. Meffe y C.R. Carroll, eds) *Principles of Conservation Biology* 3ed. Sinauer Associates, USA.
- SOULÉ, M.E.1985.What is conservation biology?. *Bioscience* 35(11):727-733.
- TEMPLETON, A.R. 2006. *Population genetics and microevolutionary theory*. John Wiley and Sons, Inc. E.U.A. 705pp.
- TIMMERMAN, W.W. Y W.H. MARTIN. 2003. *Conservation guide to the eastern diamondback rattlesnake Crotalus adamanteus*. Society for the study of Amphibians and Reptiles, Herpetological Circular 32, 55pp.
- UETZ, P. 2010. <http://www.reptile-database.org/>
- Ursenbacher S., J.C. Money y L. Fumagalli. 2009. Limited genetic diversity and high differentiation among the remnant adder (*Vipera berus*) populations in the Swiss and French Jura mountains. *Conservation Genetics* 10:301-315.
- VILLAREAL, X., J. BRICKER, H. K. REINERT, L. GELBERT Y L.M. BUSHAR. 1996. Isolation and characterization of microsatellite loci for use in population genetic analysis in the Timber rattlesnake, *Crotalus horridus*. *Journal of Heredity* 87(2):152-155.

- WANDELER, P., S. SMITH, P.A. MORIN, R.A. PETTITFOR Y S.M. FUNK. 2003. Patterns of nuclear DNA degeneration over time- a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology* 12:1087-1093.
- WEIR, B.S. Y C.C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of eugenics* 15:323-354.

APÉNDICE I

Extracción de DNA por precipitación por sales

1. Poner en un microtubo de 1.5 ml 100 μ l de sangre. Agregar 300 μ l de buffer TEN al 2% SDS. Agregar 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml).
2. Incubar a 56 °C por 3 horas (o toda la noche) hasta que el tejido esté completamente digerido y se tenga una mezcla homogénea.
3. Agregar 100 μ l de NaCl 5 M (saturado y filtrado).
4. Agitar por 30 segundos. Centrifugar por 7 min a 14.000 rpm.
5. Transferir el sobrenadante a un nuevo microtubo. Precipitar el DNA añadiendo 800 μ l de Ethanol frío al 100%. Voltar el tubo gentilmente varias veces (4 a 6 veces).
6. Poner el microtubo a -80°C por 20 min (o toda la noche a -20 °C).
7. Centrifugar por 20 min.
8. Decantar el exceso de alcohol and secar los tubos en un Kimwipe.
9. Lavar el DNA añadiendo 1 ml (1000 μ l) de etanol frío.
10. Centrifugar por 3 min a 14 000 rpm.
11. Decantar el exceso de alcohol otra vez y secarlo tubos en un Kimwipe. Repetir los pasos de lavado (**paso 9 – 11**).
12. Secar el DNA a 50 °C por 10 min (o en el ambiente, hasta que no quede alcohol).
13. Resuspender el pellet en 200 μ l de agua bisdestilada

APÉNDICE II

Extracción de DNA por Fenol/Cloroformo

1. Rotular 4 series de tubos de 1.5 mL.
2. En la primera serie de tubos poner 360 μ L de Buffer STE, agregar 150 μ L de sangre y 40 μ L de SDS al 10%. Agregar 5 μ L de Proteinasa K (10mg por mL). Aplicar agitación vertical e incubar a 60-65° C por 24hrs.
3. Agregar 400 μ L de fenol saturado. Aplicar agitación vertical durante 15 min. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min.
4. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a la segunda serie de tubos, agregar 400 μ L de cloroformo isoamílico (24:1). Centrifugar a 13000 rpm durante 15 min.
5. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a la tercera serie de tubos. Agregar 400 μ L de Cloroformo isoamílico (24:1). Aplicar agitación vertical por 15 minutos. Centrifugar a 13000 rpm por 15 min.
6. Recuperar el sobrenadante y pasarlo a la cuarta serie de tubos. Agregar 2 partes de etanol al 95% y -20° C por una de muestra. Agregar 36 μ L de NaCl 5 Molar.
7. Refrigerar a menos 20 °C durante 24 hrs. Centrifugar a 10000 rpm a 4 °C por 20 min.
8. Decantar con cuidado de no llevarse el pellet, agregar 1 mL de alcohol al 70% y -20 °C. Centrifugar durante 20 min a 4 °C y 10000 rpm.
9. Decantar con cuidado de no llevarse el pellet y dejar abierto para que se seque.
10. Resuspender en 100 μ L de agua bi-destilada estéril.

APÉNDICE III

Geles de Agarosa al 1%

1. Pesar 0.4 g de agarosa, vaciar en el matraz y agregar 40mL de TBE (buffer) 0.5X.
2. Calentar durante 40 seg en el microondas. Si hay grumos calentar por otros 10 seg.
3. Dejar enfriar, agregar una gota de Bromuro de Etidio y mezclar. Preparar la tina y los peines.
4. Vaciar en la tina y dejar cuajar por 25 min.
5. Retirar los peines.
6. En cada pocillo colocar la muestra que contiene 4 μ L de LB y 3 μ L de muestra.
7. Colocar 4 μ L de la escalera de 1 Kb.
8. Correr el gel a 100 mA por 25 minutos.
9. Colocar en la cámara de UV y tomar foto.

APÉNDICE IV

Primers diseñados para especies del género *Crotalus* y *Sistrurus*.

Especie	Primer	Secuencia	Motivo de repetición	Tamaño	Referencia
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFRD5F	TGCTGCCCTTTGAAAGAGAT	Dinucleótido	172-194	Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFRD5R	CTGCTTCCTCCTATGCCTTG	Dinucleótido		Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR12F	AAAGGGAAGAAAATGGCAGAA	Dinucleótido	205-223	Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR12R	GGAAAATTCACCCTGGAATG	Dinucleótido		Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR9F	CAGTCTTGGTGGGAGTGGTT	Dinucleótido	122-140	Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR9R	GATGGAACCTGCACCCAGAT	Dinucleótido		Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR23F	AGAGGGAGGGAGGGAGGA	Dinucleótido	175-181	Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR23R	TGCTTCTCTACCCTGTAACACAGA	Dinucleótido		Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR15F	CGCCAGGAGCTGAAAATAAC	Dinucleótido	164-182	Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus viridis concolor</i>	MFR15R	GTGCTCGTTCACAAGCTTCA	Dinucleótido		Oyler-McCance <i>et al.</i> (2005)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti05F	GTCCCCTCTATTCTTCC	Trinucleótido	140-266	Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti05R	CCAAGATCCCTTCCAACA	Trinucleótido		Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti06F	TAAGAAGAGTCTGGACAAC	Trinucleótido	121-136	Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti06R	ACACACCTTGATGATGATG	Trinucleótido		Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti08F	TGAAACTGTAAGGAAAATAAG	Trinucleótido	247-334	Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti08R	GGTAACATCATCAGAAAGG	Trinucleótido		Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti09F	TAGGAATAAGAAATGTCAGG	Trinucleótido	326-509	Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti09R	TAATGTAATGTGGTTCAGGA	Trinucleótido		Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti10F	ATGACCTGGATACTGTGTT	Trinucleótido	219-300	Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti10R	ACTGCTATACTTAGAGTGAA	Trinucleótido		Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus tigris</i>	Crti12F	AGGAGTTAGGTAAGGAGT	Dinucleótido	217-225	Goldberg <i>et al.</i> (2003)

<i>Crotalus tigris</i>	Crti12R	CAGATAGAAAGCCAGCAAA	Dinucleótido		Goldberg <i>et al.</i> (2003)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwA14F	GGGGAGGTAGGGAGGTCAG	Dinucleótido	147-175	Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwA14R	AGGGGAAAAGATGCTGTGAG	Dinucleótido		Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwA29F	TCCCCTTCCAACCCCCAGA	Dinucleótido	160-190	Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwA29R	CAGAGGAGACGAGACAGATAG	Dinucleótido		Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwB6F	CTCTTTTACGCCCACTTTTA	Dinucleótido	122-130	Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwB6R	CCCCGCTAACCTTTGCTCAG	Dinucleótido		Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwB23F	TGGTGTCATCTGGAGTTAAATC	Dinucleótido	225-271	Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwB23R	GCTTTTGTTTATATGGAGAGTCG	Dinucleótido		Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwB24F	ATTGGATAGAAGTAGTTTTGGTA	Trinucleótido	235-313	Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwB24R	CCCCCCTTTTTTATGGCAGC	Trinucleótido		Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwD15F	TAATGTTGTAAGCCACCTAGAAT	Trinucleótido	138-159	Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Crotalus willardi obscurus</i>	CwD15R	TTCTTCAAAGCACATAACACATC	Trinucleótido		Holycross <i>et al.</i> (2002)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu01F	GTCAACACTTGTGTTCTGC	Dinucleótido	149	Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu01R	CTGTATTAAGTTGTTTTGTTCA	Dinucleótido		Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu05F	GACATTGCTGAACAGACTAT	Dinucleótido	194	Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu05R	TTGTGTAGCATAGTGAAACA	Dinucleótido		Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu07F	CTTTGTGCTATTTTTCCACC	Dinucleótido	176	Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu07R	GCCAAAAAAGTAAAATATGAGC	Dinucleótido		Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu11F	AATCAGCATGTGGCTTAAATC	Dinucleótido	154	Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu11R	GCTGCTTGGCTACATATGC	Dinucleótido		Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu16F	TATGGGAATCTGGCTTTCTC	Dinucleótido	167	Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu16R	AACTGATTCATATCTGCACTGC	Dinucleótido		Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu26F	GAAATTGGTGAAGAGACCTG	Dinucleótido	173	Gibbs <i>et al.</i> (1998)

<i>Sistrurus catenatus</i>	Scu26R	GTCCAGGATATGAGGGATCTG	Dinucleótido		Gibbs <i>et al.</i> (1998)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch5AF	CCAGAGCCATCAAGGCCCTT	Dinucleótido	142-164	Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch5AR	TGCAGAGGCAGCACTTTGTTA	Dinucleótido		Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch7-150F	GTCACCAACCTTTCTCGGTTG	Dinucleótido	144-146	Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch7-150R	CATGCAGGCACTAACTCCACC	Dinucleótido		Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch5-183F	TTGTTGTAACCAGTGTGTGTGAT	Dinucleótido	124-136	Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch5-183R	CTGCAGACACTTATTATTATACC	Dinucleótido		Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch7-144F	CAGAGAAAAGGGAAGCATCAC	Dinucleótido	100-116	Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch7144R	GCATACATGTATGTTTGTGTGCA	Dinucleótido		Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch7-87F	AAGACGTGGTGCTGAAGCAGT	Dinucleótido	145-159	Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch7-87R	CCTATAGTGCAGCATATTAACAAG	Dinucleótido		Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch3-155F	AAAAGTTAACAACACTATGTAACCATT	Dinucleótido	122-146	Villareal <i>et al.</i> (1996)
<i>Crotalus horridus</i>	Ch3-155R	TACATCACTTGCTGCTTCCTG	Dinucleótido		Villareal <i>et al.</i> (1996)

APÉNDICE V

Programas de amplificación para los microsatelites.

Ch7-87				
Master Miix				
			Temperatura	Tiempo
ddH ₂ O	17			
Buffer 10x	2	Desnaturalización Inicial	94 °C	10min
MgCl ₂	3	Desnaturalización	94 °C	45seg
DNTP	0.4	Alineamiento	60 °C	45seg
Primer F	0.4	Extensión	72 °C	1min
Primer R	0.4	Extensión Final	72 °C	10min
Taq	0.15	Ciclos	35	
DNA	2			

Ch5A				
Master Miix				
			Temperatura	Tiempo
ddH ₂ O	16			
Buffer 10x	2.3	Desnaturalización Inicial	94 °C	7min
MgCl ₂	3	Desnaturalización	94 °C	30seg
DNTP	0.3	Alineamiento	59 °C	45seg
Primer F	0.4	Extensión	70 °C	30seg
Primer R	0.4	Extensión Final	72 °C	10min
Taq	0.15	Ciclos	35	
DNA	2			

CwA29				
Master Miix				
			Temperatura	Tiempo
ddH ₂ O	16.7			
Buffer 10x	2.5	Desnaturalización Inicial	94 °C	15min
MgCl ₂	3	Desnaturalización	94 °C	45seg
DNTP	0.2	Alineamiento	60 °C	45seg
Primer F	0.3	Extensión	72 °C	1min
Primer R	0.3	Extensión Final	72 °C	10min
Taq	0.15	Ciclos	35	
DNA	2			

CwB6**Master Miix**

			Temperatura	Tiempo
ddH ₂ O	16.15			
Buffer 10x	2.5	Desnaturalización Inicial	95 °C	5min
MgCl ₂	3	Desnaturalización	95 °C	45seg
DNTP	0.4	Alineamiento	60 °C	90seg
Primer F	0.4	Extensión	72 °C	20seg
Primer R	0.4	Extensión Final	72 °C	10min
Taq	0.15	Ciclos	35	
DNA	2			

Mfr15**Master Miix**

			Temperatura	Tiempo
ddH ₂ O	16.5			
Buffer 10x	2.5	Desnaturalización Inicial	94 °C	7min
MgCl ₂	3	Desnaturalización	94 °C	30seg
DNTP	0.2	Alineamiento	59 °C	1min
Primer F	0.4	Extensión	72 °C	30seg
Primer R	0.4	Extensión Final	72 °C	10min
Taq	0.15	Ciclos	35	
DNA	2			

MfrD5**Master Miix**

			Temperatura	Tiempo
ddH ₂ O	16.3			
Buffer 10x	2.5	Desnaturalización Inicial	94 °C	15min
MgCl ₂	3	Desnaturalización	94 °C	1min
DNTP	0.25	Alineamiento	57.5 °C	45seg
Primer F	0.4	Extensión	72 °C	1min
Primer R	0.4	Extensión Final	72 °C	10min
Taq	0.15	Ciclos	35	
DNA	2			

APÉNDICE VI

Frecuencias alélicas por locus y por población, alelos privados(*)

Locus	Población				
	Alelo	Cal	LSA	Pal	Ped
CwA29	N	15	15	10	15
	154	0.000	0.000	0.000	0.033*
	156	0.033	0.000	0.050	0.100
	158	0.433	0.033	0.150	0.167
	160	0.433	0.667	0.700	0.467
	162	0.067	0.300	0.100	0.200
	164	0.033	0.000	0.000	0.033
CwB6	N	16	14	8	16
	89	0.063*	0.000	0.000	0.000
	99	0.750	1.000	0.875	0.938
	107	0.000	0.000	0.063	0.031
	113	0.188	0.000	0.063	0.031
Ch5A	N	16	15	8	15
	135	0.031	0.033	0.250	0.033
	137	0.094	0.100	0.125	0.400
	139	0.031*	0.000	0.000	0.000
	141	0.000	0.000	0.000	0.067*
	143	0.063	0.067	0.000	0.033
	147	0.000	0.000	0.000	0.067*
	149	0.188	0.267	0.000	0.000
	151	0.094	0.100	0.000	0.067
	153	0.125	0.067	0.063	0.300
	155	0.000	0.000	0.063*	0.000
	157	0.000	0.100*	0.000	0.000
	159	0.156	0.000	0.125	0.000
	161	0.094	0.133	0.250	0.000
	163	0.125	0.133	0.125	0.033
Ch787	N	15	15	9	14(Frecuencia de alelos Nulos: 0.456)
	135	0.000	0.033*	0.000	0.000
	149	0.000	0.100	0.000	0.214(0.133)
	151	0.200	0.200	0.056	0.286(0.142)
	153	0.167	0.000	0.111	0.000
	155	0.133	0.300	0.389	0.250(0.137)
	157	0.067	0.000	0.056	0.000
	159	0.000	0.067	0.056	0.000
	161	0.100	0.033	0.000	0.000
	163	0.333	0.267	0.056	0.000
	167	0.000	0.000	0.056*	0.000
	169	0.000	0.000	0.056*	0.000
	171	0.000	0.000	0.111	0.071(0.032)
	173	0.000	0.000	0.000	0.179*(0.100)

		177	0.000	0.000	0.056*	0.000
MfrD5	N	16	15	8	16	
		159	0.000	0.033*	0.000	0.000
		167	0.031	0.033	0.000	0.000
		169	0.094	0.233	0.250	0.000
		171	0.000	0.000	0.063*	0.000
		175	0.031	0.067	0.000	0.000
		177	0.000	0.067*	0.000	0.000
		179	0.375	0.033	0.000	0.500
		181	0.219	0.033	0.375	0.281
		183	0.125	0.000	0.063	0.063
		185	0.094	0.400	0.188	0.125
		187	0.031	0.100	0.063	0.000
		189	0.000	0.000	0.000	0.031*
Mfr15	N	16	14	10	15	
		159	0.000	0.000	0.050	0.200
		161	0.156	0.000	0.150	0.333
		163	0.188	0.464	0.150	0.233
		165	0.156	0.429	0.300	0.000
		167	0.094	0.071	0.150	0.033
		169	0.094	0.000	0.050	0.000
		171	0.063	0.036	0.000	0.167
		173	0.125	0.000	0.050	0.000
		177	0.125	0.000	0.050	0.033
		179	0.000	0.000	0.050*	0.000
