

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *Crotalus* PERTENECIENTES AL NORTE, CENTRO Y SUR DE MÉXICO

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF DIFFERENT SPECIES OF THE GENUS *Crotalus* TO NORTHERN, CENTRAL AND SOUTHERN MEXICO

Sánchez-Sánchez N.¹, Reyes-Ruiz J. C.¹, Matamoros-González F.¹, Méndez-Palacios N.^{1*}, Galicia-Domínguez J. A.¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Laboratorio de Genética y Reproducción. Km. 7.5 Carretera Cañada Morelos, El Salado, Tecamachalco, Puebla. C.P. 75470

*Autor de correspondencia: nestor.mendezp@correo.buap.mx

Recibido: 07/junio/2024

Aceptado: 10/diciembre/2024

RESUMEN

El género *Crotalus*, se caracteriza por tener un “cascabel” en la punta de la cola, es considerada una especie fundamental en la biodiversidad biológica y cultural de México. Filogenéticamente es muy diversa, con características y adaptaciones particulares según la región del país donde se distribuyan (norte, centro y sur). Debido a esta gran variabilidad, se planteó determinar si alguna de estas especies es el “ancestro” del cual se generaron las demás y que posteriormente se distribuyeron por todo el país. Para ello se utilizaron plataformas de acceso libre con el fin de obtener las secuencias reportadas y realizar los análisis pertinentes. Mediante la información reportada en la página del National Center for Biotechnology Information de la National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), además de diversas herramientas, como el programa MEGA 11, el cual sirvió para realizar alineación y construir los árboles filogenéticos. En los resultados más importantes destaca el valor de la Prueba de Neutralidad de Tajima que fue de $D = -0.089457$ lo que supone existió selección natural balanceada de las *Crotalus* en México, es probable no ha existido intervención de otras especies que modifiquen su acervo genético, además

de que la mayoría de las mutaciones son raras, pudiendo ocasionar una contracción demográfica o selección direccional, esto indica que los fenotipos han sido adaptados por el medio ambiente y la geografía de las zonas más que por los cambios en el genotipo.

Palabras clave: *Crotalus*, Filogenia, Genética de poblaciones.

ABSTRACT

The *Crotalus* genus, characterized by having a “rattle” at the tip of its tail, considered a fundamental species in the biological and cultural biodiversity of Mexico. Phylogenetically they are truly diverse, with characteristics and adaptations depending on the region of the country where they were distributed (north, center, and south). Due to this great variability, the objective of the research was to determine if any of these species was the “ancestor” from which the others were generated after they were distributed throughout the country. For this, open access platforms were used to obtain the reported sequences and perform the pertinent analyses. Through the information reported on the page of the National Center for Biotechnology Information of the National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), in addition to various tools, such as MEGA 11 software, which is used to perform alignment and build phylogenetic trees. The most important results, it is worth highlighting the value of the Tajima Neutrality Test, which was $D = -0.089457$, which helps to assume that there was balanced natural selection of *Crotalus* in Mexico; there has been no intervention by other species that modify its genetic pool, in addition to the fact that most mutations are rare, and can cause demographic contraction or directional selection, this indicates that the phenotypes have been adapted by the environment and the geography of the areas rather than by changes in the genotype.

Key words: *Crotalus*, Phylogeny, Population genetics.

INTRODUCCIÓN

Las serpientes de cascabel son los vipéridos más ampliamente conocidos, presentan una gran variedad de coloraciones y patrones, sin embargo, entre las características que comparten se encuentra la presencia del cascabel o crótalo en el extremo de su cola, este es utilizado como mecanismo de defensa. Su cabeza presenta forma triangular típica de las serpientes venenosas con pupilas elípticas verticales y colmillos retráctiles los cuales son los encargados de inocular el veneno letal que les permite atrapar a sus presas. Son reptiles de origen americano que pertenecen a la familia *Viperidae* y a la subfamilia *Crotalinae* (Castro *et al.*, 2014; Semarnat, 2018). Son consideradas una especie fundamental en la biodiversidad biológica y cultural de México, en estudios realizados con anterioridad se estima que existe por lo menos una serpiente de cascabel por cada estado del país (Semarnat, 2018; Gonzales y Pérez 2018). Filogenéticamente son una especie muy diversa con características y adaptaciones particulares según la región del país donde se distribuya (norte, centro y sur). Debido a esta gran variabilidad, existe la posibilidad que una de estas especies sea el “ancestro” del cual se generaron las demás después de que se fueron distribuyendo por todo el país. Poco se sabe del origen de estas dentro de México, por lo que se planteó analizar y comparar diferentes secuencias de ADN reportadas dentro de la base de datos del GenBank, donde existe un registro amplio de las diferentes especies de *Crotalus* distribuidas dentro del país, todo esto con el objetivo de identificar el origen del ancestro común del cual se desprenden todas las especies de *Crotalus* en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron plataformas de acceso libre para obtener las secuencias reportadas, poder realizar los análisis y generar los árboles filogenéticos. A través de la plataforma del National Center for Biotechnology Information de la National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se emplearon las siguientes herramientas:

- GenBank: se utilizó la base de datos de secuencias genéticas del NIH (National Institutes of Health), con la colección de las secuencias de ADN disponibles públicamente (NCBI, 2024). De esta base de datos se descargaron archivos FASTA con la información completa de las secuencias reportadas que posteriormente sirvieron para realizar los análisis y la generación de los árboles filogenéticos.

- BLAST: (Basic Local Alignment Search Tool) se encarga de identificar las regiones de similitud local entre secuencias. El programa se utilizó para comparar las secuencias de nucleótidos elegidas y calcular la importancia estadística de las coincidencias (NCBI, 2024). Se tomaron como base secuencias de *Crotalus* de origen mitocondrial y con estas se realizaron alineaciones tipo BLAST para seleccionar las secuencias con alta similitud que sirvieran para realizar la filogenia.
- Para el análisis poblacional, nucleotídico y la generación de los árboles filogenéticos se empleó el programa MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Es una herramienta integrada para la alineación de secuencias automática y manual, infiriendo árboles filogenéticos, estimación de tasas de evolución molecular y pruebas de hipótesis evolutivas (Tamura, 2021).
- Prueba de Neutralidad de Tajima: se utilizó para comparar la relación entre el número de sitios polimórficos con la diversidad nucleotídica. (Un sitio se considera polimórfico si hay dos o más nucleótidos en ese sitio; la diversidad nucleotídica se define como el número promedio de las diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias) (Tajima, 1989).

$$D = \frac{\hat{k} - S / a_1}{[V(\hat{k} - S / a_1)]^{1/2}}$$

Donde:

\hat{k} es la diversidad nucleotídica por secuencia

S número de sitios polimórficos por secuencia

$a_1 = 1 + 2^{-1} + 3^{-1} + \dots + (m-1)^{-1}$ [m es el número de secuencias]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestros resultados son similares en cuanto a la distribución de los géneros con los reportados en un análisis de reconstrucción filogenética de las serpientes de cascabeles del género *Crotalus* endémicas de las Islas del Golfo de California, en donde se utilizaron secuencias de ADN mitocondrial, así como la historia evolutiva y de algunos aspectos generales sobre la ecología de

la serpiente de cascabel de manchas gemelas, sobre todo haciendo énfasis en el extremo sur de su área de distribución (Cruz Andrés, 2014; Ayala Rodríguez, 2023). Estos trabajos muestran contrastes de la información existente sobre la evolución de las *Crotalus*, sin embargo, resultan de gran ayuda para plantear las bases de nuestra investigación, debido a que no se trabajaron muestras obtenidas de organismos en vida libre, únicamente se utilizaron secuencias reportadas en el GenBank por otros autores.

Las secuencias fueron obtenidas mediante búsqueda de especies emparentadas y que existan reportes de genes conservados pertenecientes a 21 especies diferentes distribuidas a lo largo del país, esto con la finalidad de determinar qué tan cercanas o lejanas son genéticamente y si esta cercanía o lejanía fue por influencia de las adaptaciones evolutivas que presenta cada grupo. Las secuencias que se utilizaron para determinar el origen evolutivo de las serpientes dan una aproximación de cuan conservados se encuentran la mayoría de estos genes, por medio de alineaciones BLAST y ClustalW se pudo determinar estas similitudes, en el cuadro 1 se muestran los porcentajes de nucleótidos para las mismas posiciones en cada una de las secuencias analizadas.

Arboles filogenéticos

La construcción del árbol filogenético se generó con las 21 secuencias reportadas en el GenBank (cuadro 1), estas fueron agrupadas según la distribución geográfica de cada especie de *Crotalus* (norte, centro y sur), la confiabilidad fue estimada usando el método de bootstrap con 1000 repeticiones, no se definió una raíz inicial.

Cuadro 1. Porcentajes de nucleótidos presentes en las secuencias genéticas analizadas.

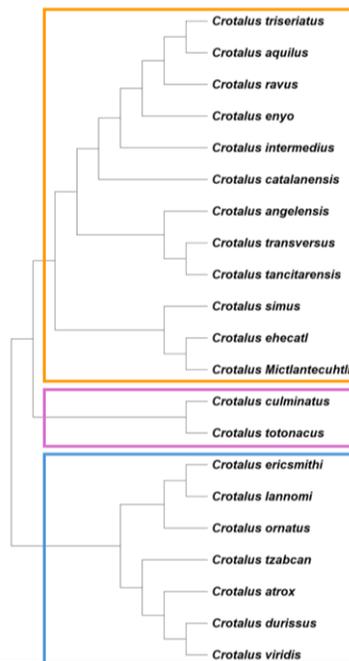
| <i>Especie</i> | Número de acceso GenBank | Nucleótido | | | | |
|------------------------|--------------------------|--------------|---------|------|------|------|
| | | Distribución | % T (U) | % C | % A | % G |
| <i>C. angelensis</i> | KP753853.1 | NORTE | 22.5 | 32.9 | 35.1 | 9.5 |
| <i>C. atrox</i> | AB257084.1 | | 27.1 | 19.2 | 31.3 | 22.3 |
| <i>C. catalinensis</i> | AF259151.1 | | 20.6 | 25.4 | 38.4 | 15.7 |
| <i>C. enyo</i> | AF259137.1 | | 20.9 | 25.0 | 38.6 | 15.6 |
| <i>C. ornatus</i> | MN327924.1 | | 28.2 | 19.0 | 29.7 | 23.1 |
| <i>C. totonacus</i> | AY704837.1 | | 25.4 | 33.4 | 29.7 | 11.4 |
| <i>C. viridis</i> | GQ451439.1 | | 27.3 | 19.4 | 31.2 | 22.1 |
| <i>C. aquilus</i> | AF259125.1 | CENTRO | 20.4 | 25.3 | 38.7 | 15.6 |
| <i>C. intermedius</i> | AF259131.1 | | 21.6 | 23.9 | 38.9 | 15.6 |
| <i>C. lannomi</i> | KF410331.1 | | 28.5 | 19.4 | 28.8 | 23.3 |
| <i>C. ravus</i> | AF259121.1 | | 21.3 | 24.4 | 38.7 | 15.6 |

| | | | | | | |
|---------------------------|----------------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>C. tancitarensis</i> | JN022791.1 | SUR | 27.1 | 30.1 | 33.0 | 9.8 |
| <i>C. transversus</i> | JN022789.1 | | 27.2 | 30.4 | 33.2 | 9.2 |
| <i>C. triseriatus</i> | AF259124.1 | | 20.5 | 25.2 | 38.6 | 15.7 |
| <i>C. culminatus</i> | MN067337.1 | | 27.4 | 32.0 | 29.3 | 11.3 |
| <i>C. durissus</i> | DQ164403.1 | | 26.6 | 18.6 | 32.1 | 22.7 |
| <i>C. ehecatli</i> | MZ855484.1 | | 24.1 | 31.0 | 31.3 | 13.6 |
| <i>C. mictlantecuhtli</i> | MZ855485.1 | | 24.7 | 31.4 | 31.1 | 12.8 |
| <i>C. simus</i> | GECP01000381.1 | | 30.3 | 21.3 | 28.5 | 19.9 |
| <i>C. tzabcan</i> | KU666903.1 | | 25.2 | 21.3 | 26.7 | 26.7 |
| <i>C. ericsnithi</i> | KF410330.1 | | 28.5 | 19.4 | 28.8 | 23.3 |
| Promedio | | | 25.1 | 23.8 | 33.2 | 17.9 |

Fuente: elaboración propia.

Las agrupaciones observadas en el árbol muestran la relación existente entre los individuos más comunes (Felsenstein, 1973; Edwards, 2009; Duchén, 2021) se observa que los individuos evaluados se separan en tres grupos (figura 1).

Figura 1. Árbol filogenético donde se muestra la relación filogenética de las 21 especies de *Crotalus* analizadas durante esta investigación, se muestra la distribución; norte, centro y sur de México.



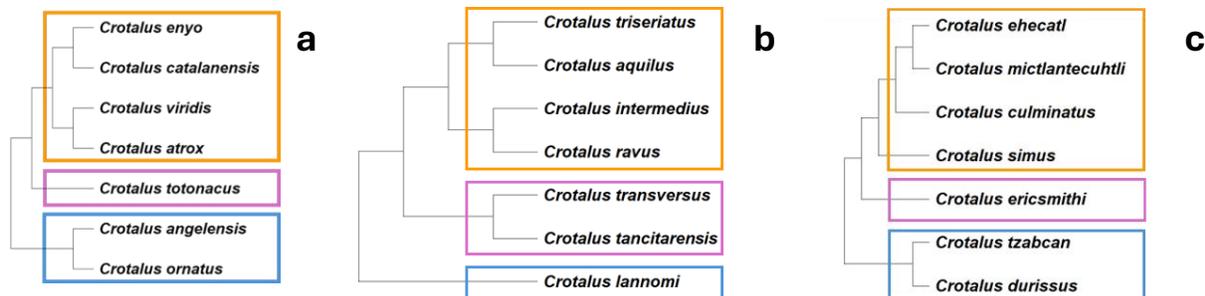
Fuente: elaboración propia.

Gonzales y Pérez (2018) plantearon que no existe un estudio sobre el valor adaptativo de los caracteres ecológicos que permita entender los procesos y mecanismos evolutivos entre las

serpientes de cascabel. Esto deja la incógnita de cómo fue que estas generaron características únicas que las diferencian entre especies según la distribución que presentan a lo largo del país (Gonzales y Pérez 2018). Se sabe que las serpientes del género *Crotalus* presentan una amplia distribución y de la misma forma una gran variedad de patrones y colores, pero hasta el momento no ha sido posible determinar una relación filogenética y de cómo fueron evolucionando a lo largo del tiempo. Algunos resultados filogenéticos apoyan la hipótesis de tres linajes bien definidos y morfológicamente distintos, generados por la actividad orogénica de la Faja Volcánica Transmexicana (Cisneros *et al.*, 2018).

En la figura 2a se observa la relación filogenética entre las especies de *Crotalus* presentes al norte del país, en donde se determinó que las especies de *Crotalus angelensis* y *Crotalus ornatus* son las más cercanas a su especie ancestral. Mientras que el centro del país se encuentra la especie de *Crotalus lannomi* (figura 2b) como la más cercana a la especie ancestral y en el caso de las *Crotalus* del sur del país son las especies *C. tzabcan* y *C. durissus* (Figura 2c) las que se pueden esperar como las más cercanas a un ancestro común.

Figura 2. Árboles filogenéticos donde se puede observar la relación que existe entre las 7 diferentes especies de *Crotalus* distribuidas en las zonas: a) norte, b) centro y c) sur del país.



Fuente: elaboración propia.

Después de observar con detenimiento los 4 árboles filogenéticos resalta que de las 5 especies consideradas como más próximas a la especie ancestral solo 4 se encuentran presentes en la rama próxima a la especie ancestral en el árbol filogenético de las 21 especies analizadas (figura 1). Por lo tanto, se considera que las especies *C. lannomi*, *C. ornatus*, *C. tzabcan* y *C. durissus* son

realmente las especies más próximas a la especie ancestral, mientras que la *C. angelensis*, aunque se encuentra cercana en el árbol filogenético de las especies del norte no tiene una cercanía significativa a la especie ancestral en la figura 1.

Algunas especies como *C. enyo*, *C. viridis* y *C. atrox* fueron evaluadas por Lawing y Polly, 2011, donde suponen tuvieron un desplazamiento hacia el norte por las condiciones climáticas (Lawing y Polly, 2011; Adams, 2014), lo que hace sospechar son parte de un origen común para las demás especies, aunque *C. enyo* y *C. atrox* junto con otras especies se han encontrado aisladas en algunas islas del Golfo de Baja California (Cruz, 2014). Análisis de ADN mitocondrial de *C. viridis* y otras especies de *Crotalus* realizados en las Montañas Rocosas, establecen un origen similar el cual dividió a especies occidentales en Estados Unidos de América y que pudieron dirigirse al Sur de América (Pook *et al.*, 2000; Wüster *et al.*, 2005).

Las adaptaciones del fenotipo debidas a un cambio en la regulación de la expresión de un gen son parte del mecanismo principal de evolución. La prueba de neutralidad de Tajima fue utilizada para probar la hipótesis nula de equilibrio evolutivo y del tamaño constante en una población con selección natural balanceada (Kimura, 1983; Tajima, 1989). La prueba es positiva en el caso de sobredominancia, cero para sitios neutrales (no mutaciones) y negativa en selección balanceada (Tajima, 1989). Para el presente estudio el valor de la Prueba de Neutralidad de Tajima fue negativo ($D = -0.089457$) lo que asegura que la selección natural de las serpientes ha sido balanceada, lo que ayuda a suponer no ha habido intervención de otras especies que modifiquen el acervo genético de las *Crotalus* (cuadro 2), esto sugiere que la mayoría de las mutaciones son raras, lo que puede ser ocasionado por una contracción demográfica o selección direccional (Kimura, 1983; Tajima, 1989; Nei, 2000).

Para el análisis se consideraron 21 secuencias nucleotídicas, los sitios ambiguos se removieron para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). En total se analizaron 2204 posiciones en promedio para cada una de las secuencias utilizadas.

Cuadro 2. Resultado de la Prueba de Neutralidad de Tajima

| | | | | | | |
|----------|----------|----------|-----------|----------|-------|----------|
| <i>m</i> | <i>n</i> | <i>S</i> | <i>ps</i> | Θ | π | <i>D</i> |
|----------|----------|----------|-----------|----------|-------|----------|

| | | | | | | |
|--|------|------|----------|----------|----------|-----------|
| 21 | 2204 | 1769 | 0.802632 | 0.223093 | 0.218289 | -0.089457 |
| m: número de secuencias, n: número total de sitios evaluados, S: Número sitios segregados, ps: S/n, Θ : ps/a1, π : diversidad nucleotídica, y D resultado del estadístico de la prueba de Tajima. | | | | | | |

Fuente: elaboración propia.

Los valores calculados para la prueba de Neutralidad de Tajima no fueron estadísticamente significativos (Θ y π) no se puede afirmar que en esta población exista o existió un equilibrio entre deriva-mutación y selección balanceada, es decir que la variabilidad de los alelos ha sido selectivamente neutral sin existir preferencia hacia algún gen o grupo de genes.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos reflejan que a lo largo de la evolución de los *Crotalus* en México no han existido mutaciones que pudieran favorecer o afectar de alguna manera los fenotipos, si no que el ambiente y la geografía han intervenido de manera directa en su evolución, esto debido principalmente a lo que se obtuvo con la filogenia y las distancias genéticas, ya que, el origen ancestral de las *Crotalus*, está asociado a las serpientes del norte, específicamente *Crotalus ornatus*, esto explica el desplazamiento posterior hacia las regiones centro y sur del país.

REFERENCIAS

- Adams, D. C. (2014). A method for assessing phylogenetic least squares models for shape and other high-dimensional multivariate data. *Evolution*, 68(9), 2675-2688. <https://doi.org/10.1111/evo.12463>
- Ayala Rodríguez, J. J. (2023). Ecología y evolución de la serpiente de cascabel de manchas gemelas (*Crotalus pricei*). <http://hdl.handle.net/11317/2604>
- Castro, E. E. N., Valle, M. B., Cano, A. A., (2014). Reptiles venenosos en México. *Revista Digital Universitaria*, 15(11). <https://ru.tic.unam.mx/handle/123456789/2269>
- Cisneros Bernal A. Y., Flores Villela O. A., Fujita Mathew K. y Fernández J. A. (2018). Tiempos de divergencia y patrones filogeográficos de la cascabel pigmea *Crotalus ravus* (Viperidae).

https://cathi.uacj.mx/bitstream/handle/20.500.11961/6133/Memorias_completas%20RNH%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Cruz Andrés, O.R. (2014). Filogenia de las serpientes de cascabel endémicas de las islas del Golfo de California, México. *Tesis de maestría en ciencias, Centro de investigaciones biológicas del Noreste*, S.C.J.

https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1621/1/cruz_o%20TESIS.pdf

Duchen, P. (2021). Métodos de reconstrucción filogenética II: inferencia bayesiana. *Tequio*, 4(11), 81-89. <https://doi.org/10.53331/teq.v4i11.0055>

Edwards, A. W. F. (2009). Statistical Methods for Evolutionary Trees. *Genetics*, 183(1), 5-12. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107847>

Felsenstein, J. (1973). Maximum Likelihood and Minimum-Steps Methods for Estimating Evolutionary Trees from Data on Discrete Characters. *Systematic Biology*, 22(3), 240-249. <https://doi.org/10.1093/sysbio/22.3.240>

Gonzales Ramos. S. J. y Pérez Mendoza H. A. (2018). Análisis comparativo de los atributos de historia de vida en las víboras de cascabel del género *Crotalus* y *Sistrurus*. https://cathi.uacj.mx/bitstream/handle/20.500.11961/6133/Memorias_completas%20RNH%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Kimura M. (2001). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University. Press, Carbridge, Massachusetts, 1983. Thomas, R. *Evolución molecular y filogenética*. Herencia 86, 385. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.0923a.x>

Lawing AM, Polly PD. (2011). Pleistocene climate, phylogeny, and climate envelope models: an integrative approach to better understand species' response to climate change. *PLoS One*;6(12):e28554. doi: 10.1371/journal.pone.0028554.

National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; (2024) – [cited 2024 March 06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nei M. and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press, New York*.

- Pook, C. E., Wüster, W., & Thorpe, R. S. (2000). Historical Biogeography of the Western Rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus viridis*), Inferred from Mitochondrial DNA Sequence Information. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 15(2), 269-282. <https://doi.org/10.1006/mpev.1999.0756>
- Semarnat (2018). Programa de Acción para la Conservación de las Especies: Serpientes de Cascabel (*Crotalus* spp.). *Semarnat/Conanp, México*. https://www.conanp.gob.mx/pace/PACE_Serpientes_de_Cascabel.pdf
- Tajima F. (1989). Statical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polimorfism. *Genetics*, 123:585-595.
- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Wüster, W., Ferguson, J. E., Quijada-Mascareñas, J. A., Pook, C. E., Da Graça Salomão, M., & Thorpe, R. S. (2005). Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology*, 14(4), 1095-1108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02471.x>