



a

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Genética de poblaciones de una especie en peligro de
extinción: caso de estudio del Berrendo (*Antilocapra
americana*, Ord 1815) en Valle de Colombia, Coahuila,
México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RAFAEL SILVIO RAMÍREZ ÁLVAREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS:
BIÓLOGO JAIME GASCA PINEDA
2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de Datos del Jurado

1.- Datos del Alumno

Ramírez
Álvarez
Rafael Silvio
55 54 19 75
Universidad Nacional Autónoma de México
Biología
30350296

2.- Datos del tutor

Biólogo
Jaime
Gasca
Pineda

3.- Datos del sinodal 1

Dr.
Luis Enrique
Eguiarte
Fruns

4.- Datos del sinodal 2

Dra.
Livia Socorro
León
Paniagua

5.- Datos del sinodal 3

Dr.
Juan Pablo
Jaramillo
Correa

6.- Datos del sinodal 4

Dra.
Blanca Estela
Hernández
Baños

7.- Datos del trabajo escrito

Genética de poblaciones de una especie en peligro de extinción: caso de estudio del Berrendo (*Antilocapra americana*, Ord 1815) en Valle de Colombia, Coahuila, México.
76 p
2011

Con cariño y aprecio

A mi padre José Leonardo Ramírez Pomar por todo su apoyo a lo largo de todos mis estudios y por siempre estar conmigo en todo momento. Por preocuparse siempre por mí y tolerar todas las cosas buenas y malas que he hecho. Por ser un guía para mí que me aconseja siempre lo mejor y al final por dejarme hacer siempre las cosas que me gustan sin ningún impedimento.

A mi madre Georgina Álvarez Palma por estar siempre conmigo, por preocuparse por mí en todo momento, por apoyarme, por ser comprensiva y siempre estar al pendiente de mí. Por acompañarme a lo largo de mis estudios y motivarme siempre a hacer algo más en la vida.

A mi hermano Román Ramírez Álvarez por ser un gran amigo por más de 24 años y por compartir tantas cosas juntos,

A Marta Suárez Coya por amarme y tolerarme, por ayudarme en todo momento. Por hacerme sonreír y disfrutar de todo, y por hacerme pasar los mejores años .

A mis hermanos Tonatiuh, Cristóbal, Omar, Pablo y Teresa por estar conmigo siempre.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme tanto y dejarme desarrollar a nivel académico como deportivo. Por formarme como profesional y como persona, por inculcarme los ideales de esta casa y por el orgullo de ser estudiante de esta gran universidad.

Al Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns por su apoyo y amistad, por dejarme realizar esta investigación y no dudar de ella, por abrirme las puertas del laboratorio de evolución molecular y experimental. Por ser un gran maestro e inculcarme el gusto por la genética de poblaciones.

Al Dr. Rodrigo Medellín Legorreta y al laboratorio de ecología y conservación de vertebrados por la donación de las muestras para que pudiera realizar este proyecto.

Al Biólogo Jaime Gasca Pineda por ser un gran tutor y amigo durante tanto tiempo, por siempre motivarme a hacerlo todo mejor y no desesperarme, por explicarme tantas cosas y por estar siempre dispuesto a resolver todas las dudas que me surgían.

Al laboratorio de evolución molecular y experimental por ser un excelente lugar para poder realizar este proyecto y al grupo del laboratorio que siempre me ayudó y me apoyó.

A la Dra. Valeria Souza Saldivar, por su amistad y por los consejos que me dio para mi proyecto.

A las técnicas Dra. Erika Aguirre Planter y M. en C. Laura Espinosa Asuar por su valioso apoyo técnico en todo momento en el laboratorio y por su amistad.

Al Biólogo Marco Antonio Rodríguez por su gran amistad, su ayuda y sus explicaciones siempre que me surgía una duda. Y por hacer más ameno todo el trabajo en el laboratorio.

Al gran grupo de laboratorio: Carolina, Jorge, Eria, Santiago, Morena, Roberto, Enrique, Andrea, Esmeralda, Manuel, Ricardo, Sandra por sus aportaciones ideas y amistad.

A doña Chivis por siempre ayudarme con todo lo que necesitaba para realizar mi trabajo en el laboratorio.

Al taller de Sistemática molecular, Filogeografía y Genética de la Conservación de Vertebrados y Plantas.

A la Dra. Blanca Estela Hernández Baños por dejarme estudiar en el taller, por su amistad y consejos, por ayudarme en la realización de este proyecto y por enseñarme todo lo que sé acerca de aves.

A Patricia Padilla por toda su ayuda técnica que me proporcionó con el secuenciador dentro del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Al Representativo de Fútbol de la UNAM y al Representativo de Fútbol Media Superior de la UNAM por los grandes 9 años que pasé representando a la UNAM en torneos nacionales, por los campeonatos conseguidos y por enseñarme a aprender de una derrota. A todos los compañeros que jugaron conmigo y con los que formamos una gran amistad.

A mis amigos y amigas de toda la vida, Pipe, Silva, Wences, Raúl, Beto, Inés, María Barrera, Manu, Alonso, Rodrigo, Gerardo, Juskani, Chuy por tantos años de amistad y por el apoyo incondicional de cada uno de ellos. Por ser los principales causantes de haberme hecho terminar la carrera en 6 años y muchas malas mañanas.

A mis grandes amigos y compañeros de la licenciatura Gabo, Angélica, Josué, Tania y Kbeta por divertirnos durante toda la carrera.

Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción	10
1.1 Descripción de la especie.....	10
1.2 Historia Natural	11
1.3 Distribución Histórica	12
1.4 Distribución Actual	13
1.5 Hábitat.....	14
1.6 Ecología.....	15
1.7 Problemática de la Especie en México.....	17
1.8 Acciones de Conservación en México	19
1.9 Genética de Poblaciones	20
1.10 Variación y Diversidad Genética.....	22
1.11 Marcadores Moleculares	24
1.12 Antecedentes.....	26
2. Objetivos	28
2.1 Objetivo General	28
2.2 Objetivos Particulares	28
3. Métodos	29
3.1 Área de estudio	29
3.2 Obtención de material biológico	29
3.3 Extracción de ADN.....	30
3.4 Amplificación de microsátélites nucleares.....	30
3.5 Amplificación de ADNmt	31
3.6 Electroforesis.....	32
3.7 Registro De Alelos	33
3.8 Diversidad Genética Para Microsátélites Nucleares.....	34
3.9 Equilibrio de Hardy-Wienberg	35
3.10 Coeficiente de endogamia	35
3.11 Coeficiente de paternidad.....	35
3.12 Estructura Genética.....	36
3.13 Secuencias ADN mitocondrial.....	36
3.14 Alineación de secuencias.....	37
3.15 Índices de polimorfismo en ADN mitocondrial	37
3.15.1 Diversidad nucleotídica (π).....	37
3.15.2 Diversidad haplotípica (Hd)	37
3.15.3 Theta de Watterson (θ).....	38
3.15.4 Prueba D-Tajima	38
3.15.5 Número de Haplotipos (h).....	38
3.15.6 Análisis de Distribución de las Diferencias Pareadas	38
3.15.7 Árbol de Haplotipos Bayesiano	39
3.15.8 Análisis de Skyline Plots.....	39
3.16 Comparación de Haplotipos	39
4. Resultados	40
4.1 Microsátélites	40
4.2 Secuencias de ADN mitocondrial.	41
5. Discusión	46
5.1 Microsátélites Nucleares.....	46
5.2 ADN mitocondrial.....	49
6. Sugerencias y Perspectivas	53

7. Conclusiones	55
Bibliografía	56
Apéndices	63
Apéndice 1	63
Apéndice 2	64
Apéndice 3	65
Apéndice 4	67
Apéndice 5	68
Apéndice 6	69
Apéndice 7	71
Apéndice 8	74
Apéndice 9	75

Resumen

El berrendo (*Antilocapra americana*) es un mamífero ungulado perteneciente a la familia Antilocapridae que habita en Norteamérica desde hace más de 20 millones de años, en México se cuenta con tres de las cinco subespecies que se reconocen, pero todas en peligro de extinción, por lo que se han realizado reintroducciones para poder restablecer a la especie en el país. En este caso, en el 2009 se llevó a cabo una reintroducción de 48 individuos provenientes de Nuevo México, EE.UU. a Valle de Colombia, Coahuila, México. Se obtuvo el ADN a partir de muestras de pelo de los 48 individuos, y se utilizaron dos marcadores moleculares diferentes; microsatélites (SSRs) y la región control del ADN mitocondrial (ADNmt), para poder evaluar genéticamente a la población. Con el fin de saber si presenta problemas como una baja diversidad genética, endogamia y estructuración genética, además a nivel nucleotídico problemas de baja diversidad haplotípica así como nucleotídica. Ya que dichos factores pueden afectar de manera significativa el establecimiento de esta población y a las generaciones siguientes.

El valor obtenido de diversidad genética se encuentra dentro de lo esperado para la especie ($H_E = 0.7426$), la población resultó quedar fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg por lo que el valor del coeficiente de endogamia es significativo ($F_{IS} = 0.0953$) ($P = 0.0002$). No se encontró diferenciación genética dentro de la población.

En cuanto al nivel nucleotídico la población resultó contar con alta variación ($H_d = 0.879$) pero se está viendo afectada por un posible cuello de botella en el pasado ya que la diversidad nucleotídica obtenida es baja ($\pi = 0.00852$).

Dado los resultados, la población reintroducida de berrendos cuenta con una buena diversidad genética para poder establecerse en su nueva ubicación y también para restablecer la especie que se encuentra en peligro de extinción en México desde hace más de 20 años.

Abstract

The pronghorn (*Antilocapra americana*) is an ungulate mammal which belongs to the Antilocaprinae family. It has inhabited in North America prairies for more than 20 million years, in Mexico exist three of the five recognized subspecies, but all of them are endangered or have become extinct, that is why it has been carried out reintroductions for reestablishing the species in the country. In this case, in 2009 a reintroduction has been carried out of 48 individuals from New Mexico, EE.UU. to Valle de Colombia, Coahuila, México. The DNA was obtained from hair samples of the 48 individuals, two molecular markers were used; microsatellites (VNTRs) and the control region of the mitochondrial DNA (DNaMt), to evaluate the genetic composition of the population and to know if it has problems like a low genetic, nucleotide and haplotype diversity, also if it has inbreeding and genetic differentiation. These factors can affect significantly the establishment of this population and the subsequent generations.

The obtained value from genetic diversity is according to other studies of the species ($H_E = 0.7426$), otherwise the population resulted to be out of the Hardy-Weinberg equilibrium hence the inbreeding coefficient turns out to be significant ($F_{IS} = 0.0953$) ($P = 0.0002$). In addition, the population does not present differentiation within.

At the nucleotide level the population resulted to have a high level of diversity ($H_d = 0.879$) but this one, seems to be affected by a bottleneck that could have occurred in the past because the nucleotide diversity is low ($\pi = 0.00852$).

After analyzing the results, this reintroduced population of pronghorns has a good level of genetic diversity to succeed and establish itself in its new location, and to reestablish the species which has been critically endangered for more than 20 years in Mexico.

1. Introducción

1.1 Descripción de la especie

El berrendo (*Antilocapra americana*) es un artiodáctilo endémico de Norteamérica perteneciente a la familia Antilocapridae, la cual cuenta con un género y una especie. Perteneciente a uno de los géneros de mamíferos ungulados (*Antilocapra*) del mundo; esta familia solo se puede localizar en el norte de México, el centro de los Estados Unidos de América y el centro-sur de Canadá (El Berrendo en México Acciones de Conservación, 2006). Se reconocen 5 subespecies (*Antilocapra americana americana*, *Antilocapra americana mexicana*, *Antilocapra americana peninsularis*, *Antilocapra americana oregona*, y *Antilocapra americana sonorensis*) de las cuales 3 se localizan en México (*A. a. mexicana*, *A. a. peninsularis* y *A. a. sonorensis*) (O'Gara, 1978).

El berrendo presenta una longitud corporal de 1300 a 1500 mm, una alzada a la cruz de 700 a 800 mm, un largo de cola de 100 mm, una longitud de oreja de 150 mm y un peso de 47 a 70 Kg los machos y de 47 a 56 Kg las hembras (O'Gara, 1978). Al berrendo se le conoce por ser el mamífero más veloz de las planicies América en donde alcanza una velocidad máxima de 95.56 km/h (Byer, 2003).

La familia Antilocapridae, al igual que las familias Bovidae y Cervidae, presenta cuernos, pero a diferencia de las demás familias, en ésta sólo presentan una ramificación y son exclusivos de los machos, aunque algunas hembras llegan a presentar pero muy chicos (Ceballos, 2005). Estos cuernos, junto con el color contrastante del blanco en el vientre y en el interior de las patas con el café-rojizo o café cenizo en la parte superior, le dan el rasgo distintivo a la especie. También la grupa es de color blanco, así como las bandas que tienen en el cuello, los labios, los cachetes y la base de los cuernos. El berrendo presenta una crin de color negro, y sus machos, por lo general, tienen la cara más oscura y poseen debajo de las orejas unas manchas que semejan unas patillas (Figura 1). Los pelos de la grupa son los más largos del cuerpo y los pueden levantar o contraer como señal de alarma.



Figura 1. Foto del Berrendo (Imagen tomada de Geist, 2001).

1.2 Historia Natural

El berrendo ha vivido en las planicies de América del Norte desde hace 20 millones de años (m.a.) (El Berrendo en México Acciones de Conservación, 2006); sin embargo, todavía no resulta claro cual de todos los antilocápridos fósiles sería el ancestro directo del berrendo actual. De la familia Antilocapridae se han descrito 18 géneros que se han agrupado en dos subfamilias, Merycodontinae y Antilocaprinae, las cuales habitaron en el Mioceno y Plioceno respectivamente (Heffelfinger, 2006). Los merycodontes prosperaron a mediados del Mioceno hace 19 m.a. y cuando empezaron a desaparecer del registro fósil, hace 14 m.a., la subfamilia Antilocaprinae se hizo más abundante (Heffelfinger, 2006).

En general, se acepta que algunos linajes de los merycodontes evolucionaron en antilocápridos más desarrollados (Heffelfinger, 2006). Además, se han encontrado aproximadamente 4000 especímenes de Merycodontinae dentro del rango de

distribución histórica de *A. americana* (Frick, 1937). Los esqueletos y dientes de los géneros de *Antilocaprinae* extintos son muy similares a la de los berrendos actuales. En cuanto a los cuernos, el berrendo actual presenta sólo dos médulas óseas rectas y no ramificadas. Los fósiles de *A. americana* del Pleistoceno tardío, hace 20 mil años, no presentan ninguna diferencia morfológica con respecto a los berrendos actuales (Heffelfinger, 2006).

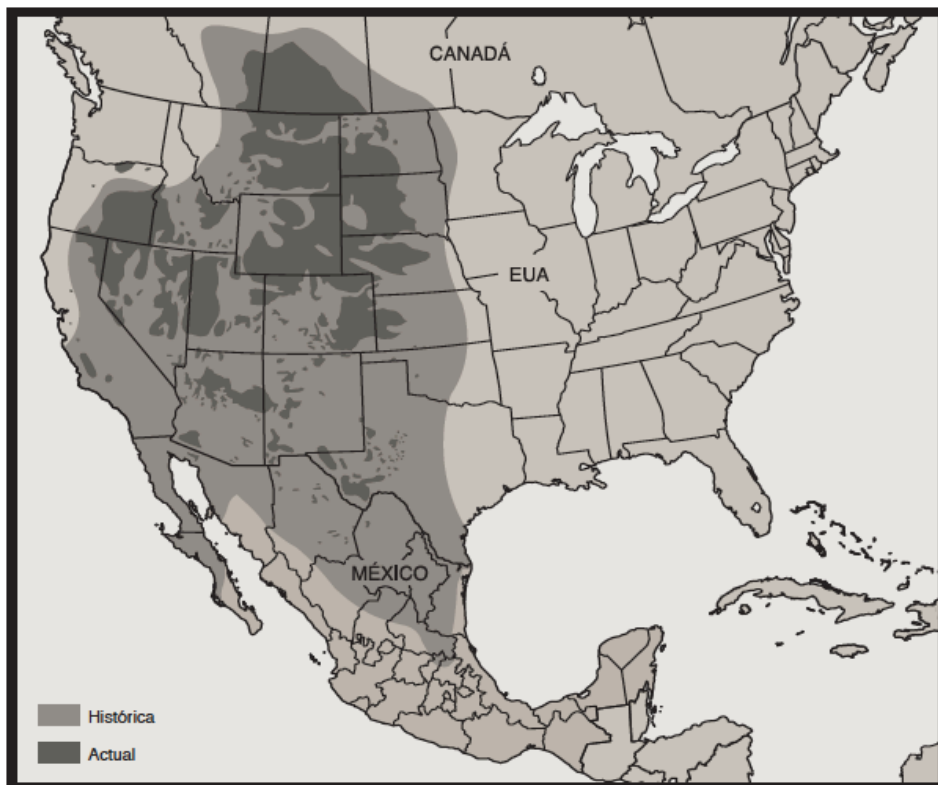
Actualmente el berrendo no cuenta con depredadores naturales, pero en el pasado existió un felino norteamericano (*Miracinonyx spp*) similar al guepardo, que se distribuía de forma similar al berrendo, por lo que se le considera su depredador natural. Sin embargo, este felino no se encuentra en el registro fósil hasta finales del Plioceno hace 2.5 m.a., lo que no coincide con la fecha de aparición del berrendo (Byers, 1997).

1.3 Distribución Histórica

El berrendo se distribuía ampliamente desde el sur de Canadá hasta los desiertos y los pastizales del altiplano central de México.

La distribución de las subespecies mexicanas ha disminuido considerablemente desde 1930 (El Berrendo en México Acciones de Conservación, 2006). Por ejemplo, *A. a. mexicana* se localizaba desde el sureste de Arizona y el suroeste del estado de Nuevo México y el oeste de Texas, en los Estados Unidos; así como Chihuahua, Coahuila y Durango, hasta el sur de Puebla en México a principios del siglo XX (Álvarez, 1966). (Figura 2). La subespecie *A. a. peninsularis* se distribuía en 1815 (Ord, 1815; O’Gara, 1978) en una amplia región de la península de Baja California, desde las bahías de San Felipe y San Quintín, hasta el norte de bahía Magdalena (Nelson, 1925) (Figura 2). Por último, la subespecie *A. a. sonorensis* se distribuía desde el suroeste de Hermosillo y el sur de Bahía de Kino en Sonora, hasta el suroeste del estado de Arizona en los Estados Unidos, incluyendo una porción de Baja California. En 1945 aún se distribuía en casi todas las planicies del noreste de Sonora (Melendez *et al.*, 2006) (Figura 2).

La subespecie *A. a. americana*, se extendía en 1815 (cuando fue descrita; Ord, 1815; O’Gara, 1978), por todo el centro de Estados Unidos hasta el suroeste de Canadá en los estados de Alberta, Saskatchewan y Manitoba. Mientras que la subespecie *A. a. oregona* se localizaba en el oeste de Estados Unidos, en los estados de Oregón, Nevada, Ohio, California y Washington (Geist, 2001) (Figura 2).



Distribución histórica y actual del berrendo

Figura 2. Mapa de distribución geográfica histórica (1815) y actual (Tomado de: El berrendo en México, acciones de conservación, 2006).

1. 4 Distribución Actual

Actualmente el berrendo mexicano (*A. a. mexicana*) se encuentra en diversas lugares de Chihuahua, principalmente en las localidades de “La Perla”, “La Gregoria”, “San Luis”, “Terraceño”, “El Sueco-Moctezuma”, “Janos-Ascención” y “Coyame”, así como en el “Valle de Colombia” y el rancho “El Novillo”, Coahuila (Pallares, 1999) (Figura 3). La subespecie peninsular (*A. a. peninsularis*) se distribuye en un área aproximada de 362,385 ha, restringida a la Reserva de la Biosfera "El Vizcaíno" y sus inmediaciones (SEDUE, 1998) (Figura 3). La distribución del berrendo de Sonora (*A. a. sonorensis*) se encuentra actualmente limitada al extremo noroeste de este estado, incluyendo los municipios de Caborca, Puerto Peñasco, Plutarco Elías Calles y San Luis Río Colorado. Una proporción considerable de ésta área está comprendida dentro de las Reservas de la Biosferas "El Pinacate" y “Gran Desierto de Altar” (Meléndez *et al.*, 2006) (Figura 3).

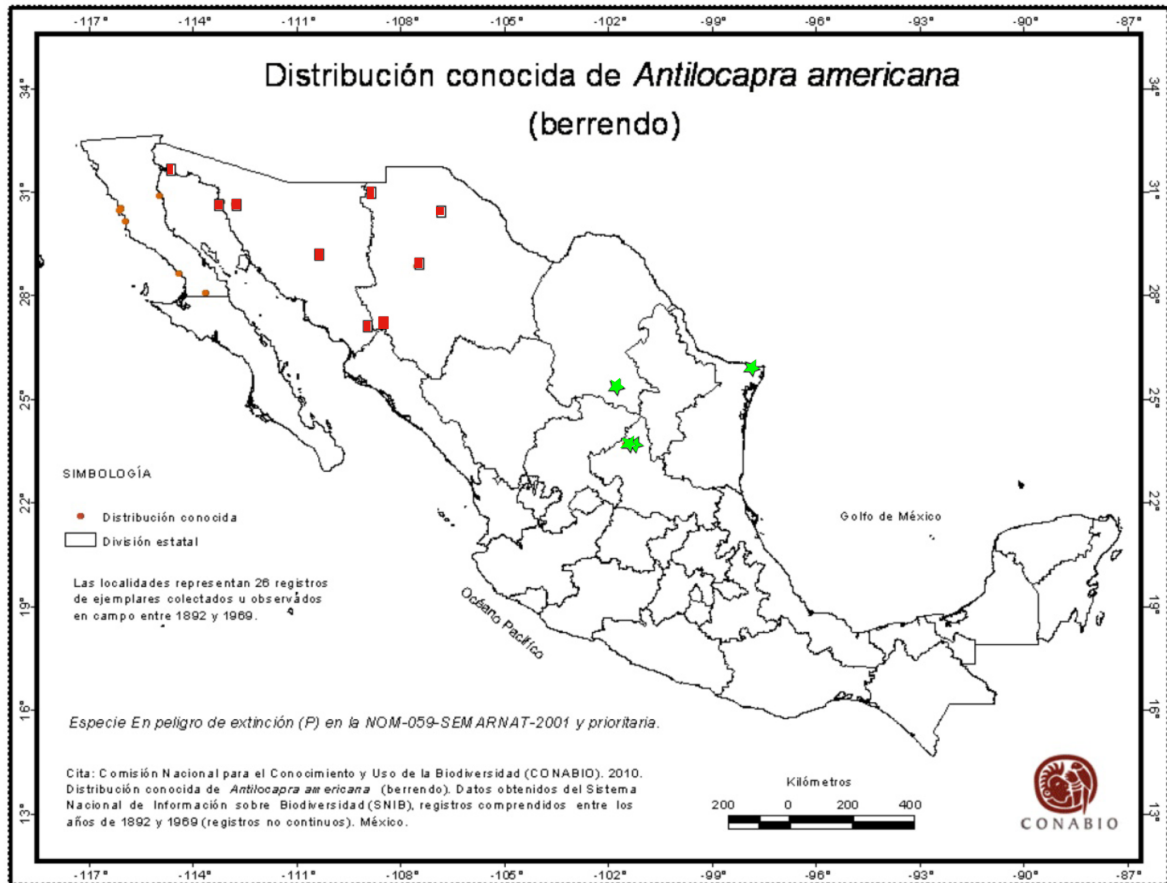


Figura 3. Mapa de ubicación de las subespecies de berrendo en México. Círculos en naranja: *A. americana peninsularis*. Cuadrados en rojo: *A. americana sonorensis*. Estrellas en verde: *A. americana mexicana*. (Imagen tomada de: www.conabio.gob.mx)

La subespecie norteamericana (*A. a. americana*) se encuentra prácticamente en todas las zonas originales de los Estados Unidos de América donde habitó, pero con una reducción considerable en la distribución y con muchas poblaciones fragmentadas. Finalmente, la subespecie *A. a. oregona* también ha visto disminuida su distribución considerablemente durante los últimos 30 años, ocupando un menor territorio en los estados de Oregón y Nevada (Geist, 2001).

1.5 Hábitat

El berrendo se encuentra generalmente en lugares con vegetación xerófila, la cual varía junto con la altitud dependiendo de la subespecie. Por ejemplo, el berrendo mexicano (*A. a. mexicana*) se encuentra entre 1220 y 1700 metros sobre el nivel del mar (msnm) (González-Romero y Lefón-Terrazas, 1993) en pastizales combinados con yuca, dominados por las especies *Boutleoua hirsuta*, *B. curtipendula*, *B. eriopoda*, *B.*

gracilis y *Dalea citrina* (Treviño, 1987). El berrendo peninsular (*A. a. peninsularis*) se localiza del nivel del mar a los 250 msnm, en matorrales xerófilos típicos de la Reserva de la Biosfera “El Vizcaíno” entre Baja California Norte y Sur. Entre las especies arbustivas dominantes de este hábitat se encuentran: *Frankenia palmeri*, *Chaenactis lacera*, *Errazurizia benthamii* y *Larrea tridentata* (Cancino *et al.*, 1995). La subespecie *A. a. sonorensis* se encuentra entre los 120 a 1200 msnm (Thompson-Olais, 1994), en hábitats tan variados como las dunas bajas, las planicies arenosas, los lomeríos, los depósitos de morusa y los derrames basálticos. Las dunas contienen comunidades vegetales de baja diversidad biológica dominadas por las siguientes especies: *Helianthus niveus*, *Oenothera deltoides* y *Abronia villosa* (AGFD, 1981). Finalmente, las subespecies norteamericanas se distribuyen entre los 150-2500 msnm dependiendo de la región en la que se localicen. En general habitan en pastizales dominados por *Bromus tectorum*, *Poa sanberggi*, *Purshia tridentata* y *Bromus tectorum*, mientras que a una altitud mayor predominan *Artemisa tridentata* y *Chrysothamnus spp.* (Geist, 2001).

1.6 Ecología

Los berrendos son rumiantes que se alimentan de una gran variedad de plantas, aunque sus preferencias cambian dependiendo de su ubicación. Por ejemplo, los del norte de EE.UU. se enfocan más en el forraje de *Artemisia tridentata*, mientras que las subespecies nativas de México tienen aparentemente una dieta más variada. De esta forma, *A. a. peninsularis* se alimenta de 44% de arbustos, 22% de herbáceas, 4% de gramíneas y 30% de flores (Cancino, 1994) y *A. a. sonorensis* consume un 69% de plantas herbáceas, 22% de arbustivas, 7% de cactáceas y 2% de gramíneas (AGFD, 1981).

Estos animales satisfacen sus necesidades de agua a través de sus adaptaciones fisiológicas y conductuales, consumiéndola en forma de rocío o extrayéndola directamente del forraje que consumen (O’Gara, 1978). Bajo condiciones de sequía extrema, los berrendos pueden reducir considerablemente sus requerimientos de agua, hasta los 3 litros por día. Aunque también disminuyen su consumo de alimento, su movilidad y otras actividades de alto costo energético (Yoakum, 1990).

El establecimiento del territorio está principalmente relacionado con el comportamiento sexual de los machos. Durante la temporada reproductiva, los machos dominantes delimitan sus territorios con orina, heces y secreciones de sus glándulas

subauriculares (Geist, 2001). En esta misma época, los territorios son defendidos a través de conductas agonísticas como avistamientos, vocalizaciones, acercamientos, interacciones y persecuciones. La defensa territorial permite que los machos de mayor talla y agresividad cubran a las hembras reproductivas y eviten que machos más jóvenes las cortejen (Geist, 2001).

El berrendo es una especie polígama. Las hembras maduran sexualmente alrededor los 16 meses de edad y los machos al final del primer año de vida, aunque los machos más jóvenes son generalmente excluidos de la reproducción por los adultos dominantes (O' Gara, 1978). La época de celo varía con el rango geográfico de las diferentes subespecies. En México, la subespecie *A. a. peninsularis* se reproduce entre los meses de junio y julio (Cancino *et al.*, 1995), la subespecie *A. a. sonorensis* durante septiembre y octubre (Castillo, 1993) y la subespecie *A. a. mexicana* de noviembre a diciembre (Treviño, 1978). La gestación toma alrededor de 252 días y es mucho más común ver el nacimiento de mellizos que de una sola cría. La sobrevivencia de estas puede verse afectada por la depredación por coyotes (*Canis latrans*) y pumas (*Puma concolor*) (Cancino *et al.*, 1995) y la de los adultos por cacería.

1.7 Problemática de la Especie en México

En México, existen tres de las cinco subespecies descritas del berrendo y se estima que entre 1930 y 1990 las poblaciones se redujeron en un 81.9% (El Berrendo en México Acciones de Conservación, 2006). A principios del siglo XX, se cree que existían apenas unos 2,400 individuos, mientras que hacia 1984 se calculó un máximo de 446 berrendos en todo el territorio nacional (González-Romero y Lafón, 1993). Hacia 2006 se contaron 1,032 individuos en México, principalmente en Chihuahua y Sonora (El Berrendo en México Acciones de Conservación, 2006) (Tabla 1). Este aumento de tamaño que tuvieron las poblaciones de berrendo fue debido a la protección que se le empezó a dar a la especie con diversas normas y programas que se mencionarán adelante.

Tabla1. Número estimado de individuos por subespecie y ubicación geográfica (El Berrendo en México Acciones de Conservación, 2006).

Subespecie	Población Actual Estimada	Estado
<i>Antilocapra americana mexicana</i>	318	Chihuahua
<i>Antilocapra americana mexicana</i>	80	Coahuila
<i>Antilocapra americana sonorensis</i>	433	Sonora
<i>Antilocapra americana peninsularis</i>	200	Baja California Sur

La disminución observada durante el siglo XX fue producto principalmente de las actividades humanas, como el cambio del uso de los suelos, que ocasiona pérdida del hábitat y fragmentación de las poblaciones en grupos pequeños y aislados (González-Romero y Lafón, 1993). Los cercos y las autopistas además redujeron la capacidad de movimiento y con ello el intercambio genético entre poblaciones. Otra

actividad que causó la disminución de las poblaciones silvestres fue el sobrepastoreo de especies domésticas (CES,1992). A pesar de que la cacería del berrendo está vedada en México desde 1922, existe evidencia de furtivismo a través de reportes de pobladores locales y mediante el hallazgo de cartuchos de alto calibre y rastros de vehículos en las áreas actuales de distribución, también se han documentado raptos de crías por parte de los humanos para tenerlos como mascotas mientras son jóvenes (SEMARNAT, 2009).

Existen causas naturales que impiden el crecimiento de las poblaciones de berrendo. La depredación por coyotes (*Canis latrans*) es considerada la más importante en México, ya que genera una tasa de mortalidad importante en las crías (INE, 2000). Otros factores naturales como la precipitación pluvial o las sequías prolongadas también constituyen riesgos para la especie, pues afectan la tasa de reproducción y viabilidad de las crías (Yokara y O’Gara, 1990).

El berrendo se considera en peligro de extinción desde 1994 (SEDESOL, 1994) y dicho estado de conservación se mantuvo en 2002 (SEMARNAT, 2002). Lo cual indica que la especie no se pudo recuperar lo suficiente en 8 años. En cuanto a su clasificación según la CITES (2009), la población mexicana, que incluye todas sus subespecies, se encuentra en el apéndice I, lo que indica que se encuentra en peligro de extinción y está prohibida su comercialización. Internacionalmente las subespecies mexicanas están reconocidas en la categoría de riesgo crítico por la UICN (Unidad Internacional para la Conservación de la Naturaleza, 2003). Mientras que nivel nacional, la NOM-ECOL-059-2001, clasifica al berrendo dentro de la categoría “P”, es decir, en peligro de extinción.

1.8 Acciones de Conservación en México

En México los programas de recuperación para el berrendo y sus subespecies fueron iniciados por la SEMARNAP (ahora SEMARNAT) en 1997, bajo el “Proyecto de Conservación y Recuperación de Especies Prioritarias de Vida Silvestre” (PREP). Este está encaminado a ejecutar acciones de protección, conservación, recuperación, reintroducción y aprovechamiento sustentable de las especies mexicanas que se encuentren bajo alguna categoría de riesgo.

Para la subespecie *A. a. peninsularis* se tiene un programa de manejo en cautiverio desde 1998. Este programa se aplica en el suroeste de Guerrero Negro, en la zona centro de la Reserva de la Biosfera “El Vizcaíno”, Baja California Sur. Este programa logró incrementar la población de berrendos peninsulares de apenas 5 a 90 ejemplares entre 1998 y 2003 (Cancino *et al.*, 2005). En Coahuila se creó el proyecto “El Retorno del Berrendo” (Valdés y Manterola, 2006), en el cual se reintrodujeron 65 individuos provenientes de Nuevo México en el Valle de Colombia, Coahuila en 1996. En 1998 hubo una segunda reintroducción de 85 individuos, y posteriormente se realizaron monitoreos aéreos dentro del Valle de Colombia entre 2003 y 2005. Dichos monitoreos mostraron que la población mínima dentro del valle se ha logrado estabilizar entre los 43 y 50 individuos (Valdés y Manterola, 2006). Por otro lado, en Nuevo León se reintrodujeron 12 ejemplares de berrendo por medio de un convenio multilateral entre organismos mexicanos y estadounidenses, en donde además se dejó abierta la posibilidad de reforzar el pie de cría. Desafortunadamente, el experimento se limitó a ese esfuerzo, ya que en el transcurso de cuatro años los individuos fueron desapareciendo (Programa de Acción para la Conservación de la Especie: Berrendo *Antilocapra americana*, 2009).

En Zacatecas se realizó una introducción de 159 individuos (76 machos y 83 hembras) en junio de 2007, proporcionados por la BFA y el WGFDF que incluyó un acuerdo multianual de captura e introducción de 250 individuos anuales de 2007 a 2011 (Programa de Acción para la Conservación de la Especie: Berrendo *Antilocapra americana*, 2009). Sin embargo, este aún no cuenta con resultados, ya que es un programa a mediano plazo y se está esperando a que los individuos introducidos se adapten primero para después empezar la reproducción y la liberación de los mismos. En 2008, los gobiernos de los estados de Coahuila y Nuevo León dieron inicio al “Programa Regional de Reintroducción y Conservación del Berrendo (*Antilocapra*

americana) en el Noreste de México”. Este programa tiene como fin la reintroducción y manejo de la especie en UMAs (Unidad de Manejo Ambiental) privadas en dichos estados. Estas serían en zonas donde se puede iniciar un pie de cría para continuar con su repoblación en otros sitios dentro del área de distribución histórica de la región. A mediano y largo plazo se busca también promover el aprovechamiento sustentable del berrendo en las regiones donde se extinguió hace más de 30 años (Programa de Acción para la Conservación de la Especie: Berrendo *Antilocapra americana*, 2009).

1.9 Genética de Poblaciones

La genética de poblaciones es la descripción algebraica de la constitución genética de una población y de la forma en que las frecuencias alélicas cambian en las poblaciones a lo largo del tiempo (Eguiarte, 1999). A través de esta descripción se trata de explicar en términos cuantitativos y predictivos el proceso de adaptación y medir la pérdida de diversidad genética que tienen las especies naturales, ya que ésta es necesaria para que una población evolucione y pueda adaptarse a los cambios ambientales (Frankham *et al.*, 2010). Actualmente la genética de poblaciones es una parte central de la teoría evolutiva moderna y sus aportaciones a la biología de la conservación, tanto teóricas como prácticas, son cada vez mayores, al punto que integran la disciplina conocida como "genética de la conservación" (Eguiarte y Piñero, 1990). Uno de los objetivos de esta disciplina es ayudar a minimizar las extinciones y reducir los problemas genéticos de las poblaciones pequeñas, que son producto de diversos factores como la pérdida de diversidad, los tamaños efectivos de población pequeños, la depresión por endogamia, así como los efectos de la fragmentación e aislamiento.

El equilibrio de Hardy-Weinberg es un principio que se emplea en los estudios de genética y conservación. Este principio proporciona las bases para estimar las frecuencias alélicas en los loci. El principio consiste en tres postulados: 1) Todos los individuos de una población tienen la misma probabilidad de aparearse de forma azarosa; 2) El tamaño de la población es infinito; 3) No existe ninguna fuerza evolutiva ejerciendo presión a la población. Si se cumplen los tres postulados, las frecuencias alélicas y genotípicas se mantienen constantes en cada generación. Al ser las poblaciones naturales tan complejas, este principio nos ayuda a entender cual es el problema que presenta una población, ya que al no encontrarse dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg, se puede inferir que alguno de los postulados no se está cumpliendo.

Cuando las poblaciones son grandes, la pérdida de diversidad genética por deriva génica es mínima, y la mutación, la selección y la migración dominan los procesos evolutivos. Además las poblaciones grandes tienen una probabilidad muy baja que la depresión por endogamia las afecte (Mortiz *et al.*, 1993).

En cuanto a las poblaciones pequeñas, éstas son propensas a la extinción debido a que los factores estocásticos ya sean genéticos, demográficos, ambientales y catástrofes aceleran su declive (Primarck *et al.*, 2001). Al contrario de las poblaciones grandes, en las pequeñas el papel del azar predomina, propiciando la introducción de los factores estocásticos antes mencionados, además de que pasan por endogamia mucho más rápido y los efectos de la selección son reducidos o eliminados (Frankham *et al.*, 2010).

Otros problemas que presentan las poblaciones pequeñas son los cuellos de botella y la deriva génica. El primero altera fuertemente la composición genética de una población, debido a que reduce la diversidad genética, además de que puede llevar a la pérdida de alelos (particularmente los raros) y cambios importantes en las frecuencias alélicas. En este caso, los cambios en las frecuencias pueden originar que las poblaciones se desvíen del equilibrio de Hardy-weinberg, dando como resultado altos niveles de endogamia y reducida diversidad genética. En cuanto a la deriva génica, ésta reduce la diversidad genética e incrementa la probabilidad de fijación de alelos dentro de la población, con la cual se reduce la capacidad para evolucionar, y al ser una fuerza evolutiva se sobrepone a otras como la selección natural y mutación dependiendo del caso.

1.10 Variación y Diversidad Genética

La variación genética se expresa en forma de diferentes alelos para cada gen, y se da tanto entre las poblaciones como dentro de las mismas. La diversidad genética es la materia prima para la evolución, ya que de ella dependen la adaptación y la especiación de las especie. De los niveles altos de diversidad, se deriva la habilidad de una especie o población para responder a enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales, entre otros (Hedrick, 2005).

La cantidad y tipo de variación genética en una población están afectadas por factores como la selección natural, la endogamia, la deriva génica, el flujo génico y la mutación. Estos factores tienen efectos particulares, por ejemplo la deriva génica y la endogamia disminuyen la diversidad genética, mientras que la mutación la aumenta. En el caso de la selección, su efecto depende de la situación particular en la que se encuentre la población, ya que ésta puede aumentar o disminuir la cantidad de variación genética (Hedrick, 2005). En cuanto al flujo génico, éste puede afectar a las poblaciones en ciertos casos en donde ya existe una población establecidas y cuentan con alguna adaptación local, por lo que la inclusión de nuevos individuos podría afectarla, ya que no tienen la adaptación que presenta la población original. Pero existen otros casos donde el flujo génico sirve para aumentar la diversidad genética, en especial en poblaciones muy pequeñas que tienen problemas de deriva y altos índices de endogamia.

No obstante, no siempre corresponden las predicciones ecológicas y evolutivas con los patrones de diversidad observados, y algunas especies para las que se predice poca variación tienen niveles de diversidad altos, mientras que otras especies presentan mucha menor variación de la esperada. Por ejemplo, se encuentran especies muy abundantes, e incluso invasivas, que tienen poca variación genética, como las hierbas acuáticas o algunos pastos (Baurd y Schmid, 1996), y especies con altos niveles de variación genética cuyas poblaciones están declinando (Amos y Harwood, 1998). Por lo tanto, si encontramos una población con altos niveles de diversidad, no necesariamente ésta se encuentra en un buen estado evolutivo (Rocha y Gasca, 2007).

Generalmente se asume que la reducción de la diversidad se correlaciona con una baja adecuación, pero también influye la actividad del hombre de una forma mucho más directa y en menor tiempo (Frankham *et al.*,2010). Se ha observado que la

distribución y niveles de variación genética en las poblaciones de especies raras o amenazadas son muy variables y dependen, entre otras cosas, de si la especie ha sido históricamente rara o si su reducido tamaño poblacional es reciente. En tal caso, esta reducción poblacional podría ser fruto la acción del hombre (Bevill y Louda, 1999).

Los individuos heterocigotos son aquellos que presentan dos formas diferentes de un gen (dos alelos), por lo tanto dentro de esos individuos existe variación y esa ésta la que permite que las especies sigan evolucionando. También existen individuos homocigotos en las poblaciones que sólo presenta una forma para un gen (un alelo), estos individuos no presentan variación en ese gen, pero no significa que estén mal, simplemente es una condición natural que tienen los individuos dentro de las poblaciones. Pero para los estudios de diversidad genética los individuos heterocigotos son lo que se consideran para calcular los índices de diversidad porque son lo que presentan variación dentro de la población.

Para poder medir la diversidad genética existen diferentes índices y algunos de los más utilizados son la heterocigosis esperada (H_E), que representa la cantidad de organismos heterocigotos esperados en una población bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg. También se usa la heterocigosis observada (H_O), que es el número de heterocigotos en un locus dado dividido por el total de individuos muestreados (Hedrick, 2005; Frankham *et al.*, 2010). Adicionalmente existen otros índices que miden la diversidad, como la diversidad nucleotídica (π), la diversidad haplotípica (h), la prueba de Tajima (D) y la theta de Waterson (θ), que se explicarán mas adelante (ver página 35).

Existen otros estadísticos que son de gran utilidad para medir la diferencia que existe dentro de las poblaciones en cuanto a su variación genética, como son los coeficientes F (Hedrick, 2005), incluyendo el coeficiente de endogamia (F_{IS}) y el coeficiente de estructura (F_{ST}), que se abordarán mas adelante (ver página 33).

1.11 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son fragmentos de secuencias de ADN que están asociadas a una parte del genoma y son una herramienta necesaria en muchos campos de la biología, como la evolución, la ecología, la biomedicina, y las ciencias forenses. Además son utilizados en estudios de diversidad y para como referencia para encontrar genes de interés. Los diferentes tipos de marcadores moleculares se distinguen por tener distintos niveles de polimorfismo: se pueden encontrar marcadores con mucha variación o con muy poca y se pueden encontrar en loci simples o múltiples, y pueden ser de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997).

La ventaja de los marcadores moleculares es que se pueden amplificar por medio de la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), que consiste en imitar la síntesis de ADN de las células, pero en este caso se sintetiza solamente la región buscada y no toda la cadena, por medio de una polimerasa a altas temperaturas y de los primers (Asuar, 2007).

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs), también llamados VNTRs (variable number of tandem repeats) (Allendorf y Luikart, 2007), están formados por una sucesión de secuencias de ADN cortas, generalmente de 1 a 4 pares de bases, por ejemplo el dinucleótido (AT_n). Estos loci se encuentran en regiones codificantes y no codificantes del ADN y el número de repeticiones en un locus polimórfico puede alcanzar las 100, aunque también puede haber menores de 5 (Armour *et al.*, 1994; Coltman *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 1994). Los microsatélites se encuentran tanto en plantas y hongos, como en animales y son utilizados fundamentalmente para estudios de variación genética intra e interespecífica (Edwards *et al.*, 1991; Armour *et al.*, 1993; Dervey *et al.*, 1996; Queller *et al.*, 1993). La mayor ventaja de estos marcadores es que son altamente polimórficos, incluso en poblaciones pequeñas y en especies en peligro de extinción como en el caso del orix árabe (*Oryx leucoryx*) (Price, 1989), y el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) (Hedrick y Frederickson, 2008). Además son cada vez más accesibles económicamente y fáciles de montar. Este alto polimorfismo resulta de su alta tasa de mutación, la cual puede alcanzar los 10⁻³ o 10⁻⁴ indeles por sitio por generación (Allendorf y Luikart, 2007). Los primers desarrollados para una especie pueden ser utilizados en especies relativamente cercanas, debido a que los sitios donde se encuentran los microsatélites generalmente están conservados (Allendorf y Luikart, 2007).

Otro marcador utilizado en los estudios de genética de poblaciones en animales es la región control del ADN mitocondrial. Esta se ha utilizado durante las últimas tres décadas como una herramienta para inferir el pasado evolutivo y demográfico tanto de poblaciones como de especies (Ballard y Whitlock, 2004). Esta región por si sola no puede responder todas las preguntas que uno busca, ya que se hereda por vía materna (y así solo se sabe la mitad de la historia evolutiva), pero es de gran ayuda si se le complementa con análisis de microsatélites nucleares (Ballard y Whitlock, 2004).

El genoma mitocondrial de los mamíferos es una molécula circular de ADN de doble hebra, con un tamaño de 15,000 - 17,000 pares de bases (pb) y su región control tiene una longitud de entre 1000 - 1400 pb (Ballard y Whitlock, 2004). En general se asume que el ADNmt no pasa por el proceso de recombinación (Beebee y Rowe, 2008), y el de los mamíferos tampoco (Birky, 2001), por lo que toda la mitocondria se comporta como un solo gene.

La región control es la parte con mayor tasa de sustitución de todo el genoma mitocondrial, siendo de 4 a 5 veces más alta que el del resto de la molécula y de 5 a 10 veces mayor que el promedio de genoma nuclear (2.2×10^{-9}) (Brown *et al.*, 1979; Ballard *et al.*, 2004; Sudhir y Sankar, 2002). Además, la región control presenta una mayor variación en los extremos derechos e izquierdos que en la región central (Saccone *et al.*, 1991; Douzery *et al.*, 1997).

1.12 Antecedentes

Stephen y colaboradores (2005a) realizaron un estudio de genética de poblaciones del berrendo de Sonora (México) y Arizona (EE.UU.) y los resultados se compararon con individuos del norte de EE.UU. ($n=269$). Utilizaron microsatélites y ADNmt para analizar la estructura y los niveles de diversidad genética de las poblaciones, encontraron 38 haplotipos, de los cuales 4 fueron exclusivos de 12 individuos de Sonora. El valor de F_{IS} osciló entre -0.057 a -0.143, y la H_E entre 0.0734 y 0.502. Los valores de F_{st} entre poblaciones estuvieron entre 0.034 y 0.205, mientras que entre la población mexicana y la de la misma subespecies en Arizona fue de $F_{st} = 0.073$. Por lo que concluyeron que la subespecie sonorensis se ha empezado a diferenciar de las demás subespecies de berrendo.

Por otro lado, Stephen y colaboradores (2005b) realizaron otro estudio sobre las consecuencias genéticas que puede ocasionar la reintroducción de especies, tomando como ejemplo la reintroducción del berrendo en Oregón (EE.UU.). Utilizaron cinco loci de microsatélites y ADNmt y encontraron que la población reintroducida en el 2000 presenta una reducción en la diversidad genética ($H_E = 0.66$) cuando se compara con la de la población fundadora ($H_E = 0.75$) y con otra población más lejana ya establecida ($H_E = 0.69$). Los valores de F_{IS} encontrados en este estudio estuvieron entre -0.07 y 0.07, y los de F_{ST} fueron de 0.021 a 0.110. Esta investigación es un buen ejemplo de cómo las frecuencias alélicas pueden cambiar muy rápido en poblaciones reintroducidas. En cuanto al ADNmt, se amplificaron 491 nucleótidos de la región control, en donde se encontraron 15 haplotipos en los 120 individuos de las 3 poblaciones, y valores de diversidad haplotípica de $H_d = 0.72$ a 0.90. Donde el valor mínimo era perteneciente a la población reintroducida.

Igualmente, Conde (2000) realizó una investigación con la región control de la mitocondria para conocer la estructura genética y la filogeografía de 9 poblaciones de berrendo, de las cuales 3 eran mexicanas (Baja California Sur, Chihuahua y Sonora), y las demás eran de diferentes zonas de EE.UU. Esta autora encontró 32 sitios polimórficos que formaron 29 haplotipos en los 93 individuos analizados, generando una diversidad nucleotídica de $\pi = 0.00865$, el cual es bajo comparándolo con la del venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) de México que tiene una ($\pi = 0.0416$; Rodríguez, 2011).

Finalmente, Jenks y colaboradores (2006) realizaron un estudio para evaluar la variabilidad genética del berrendo en el “Wind Cave National Park”, en Dakota del Sur, EE.UU., pues se ha visto que en esta el número de individuos está disminuyendo. Se utilizaron cinco loci de microsatélites para determinar la heterocigosis, el coeficiente de endogamia de 75 individuos provenientes de tres poblaciones, así como la estructura genética entre las poblaciones. Obtuvieron valores de H_E entre 0.473 y 0.594, un coeficiente de endogamia entre -0.168 y 0.037, y un F_{ST} de 0.028. Concluyeron que la disminución del tamaño poblacional en el “Wind Cave National Park” no parece ser producto de una falta de variabilidad genética, ya que ésta es muy similar al de otras poblaciones, con las cuales se encontró muy poca diferenciación. Esta disminución puede ser debida a factores como la mala condición para el forraje y la poca sobrevivencia de los adultos.

Los estudios anteriores se realizaron por la necesidad de saber como se encuentra la especie a nivele genético, ya que cada vez hay menos individuos en toda Norteamérica. En especial en el caso de México, donde se encuentra en peligro de extinción, es muy importante analizar genéticamente esta población para verificar que no tendrá problemas en un futuro, ya que como se encontró en otros estudios, las poblaciones al ser reintroducidas pasan por porcesos de estocasticidad genética, ambiental y demográfica, los cuales generan la pérdida de la diversidad genética en un tiempo relativamente corto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

- Realizar un estudio de genética de poblaciones para conocer los niveles de diversidad genética de una población de berrendos reintroducida para fundar una nueva población en Valle Colombia, Coahuila.

2.2 Objetivos Particulares

- Obtener un estimado de la endogamia de la población.
- Conocer si la población cuenta con estructura genética.
- Obtener índices de diversidad haplotípica y nucleotídica.
- Obtener las relaciones de parentesco entre los individuos de la población.
- Proponer estrategias para la reintroducción del berrendo con base a la información obtenida.

3. Métodos

3.1 Área de estudio

El Valle de Colombia se ubica en el norte del estado de Coahuila, se encuentra en el Municipio de San Buenaventura a 1300 msnm y tiene una extensión aproximada de 75,000 ha. (Figura 3). En dicho valle se llevó a cabo la reintroducción de 48 berrendos en el 2009 provenientes de Nuevo México, EE.UU., los cuales fueron puestos en un encierro para tener un mayor control y evitar la fragmentación de la población fundadora.



Figura 3. Mapa del área de estudio (Tomado de: El berrendo en México, acciones de conservación, 2006).

3.2 Obtención de material biológico

El material biológico (pelo) utilizado para el estudio fue muestreado en esa misma época y fue donado por el Laboratorio de Ecología y Conservación de Vertebrados del Instituto de Ecología de la UNAM, y se conservó a una temperatura de -20°C .

3.3 Extracción de ADN

Las muestras de pelo fueron cortadas por la raíz con tijeras estériles y depositadas en tubos Eppendorf de 1.5ml. En promedio se utilizaron 10 raíces por muestra. El ADN de las raíces se extrajo con el protocolo de Chelex (ver Apéndice 1). Para las muestras en las que se obtuvo muy poco ADN, se realizó una precipitación para concentrarlo (ver protocolo en Apéndice 2).

3.4 Amplificación de microsatélites nucleares

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante la reacción de PCR, la cual estaba compuesta por buffer, MgCl₂, dNTP's (desoxinucleósidos trifosfato), primers forward y reverse, Taq polimerasa (BIOGENICA 5U/μl) y agua. Se utilizaron rangos de temperatura de 56°C a 58°C y concentraciones de MgCl₂ de 1mM a 4mM (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencias de los primers, concentración de magnesio y temperatura de alineación para amplificar cuatro microsatélites en berrendo.

Microsatélite	Secuencia (5' - 3')	[Magnesio]	Temp. Alineación	Referencia
MAF36	F TTGCGAAAAG TTGGACACAATTGAGC	3mM	56°C	(Swarbric, <i>et al.</i> , 1991)
	R CATATACCTG GGAGGAATGC ATTACG			
MAF48	F AGACGTGACT GAGCAACTAA GTACG	3mM	58°C	(Buchanan, <i>et al.</i> , 1991)
	R GGAAACCAAA GCCACTTTTCAGATGC			
MAF209	F GATCACAAAAAGTTGGATACAACCGTGG	1mM	56°C	(Buchanan, <i>et al.</i> , 1992)
	R TCATGCACTTAAGTATGTAGGATGCTG			
Aam4	F GAGCCTGGCAGGTTACAGTCTA	4mM	57°C	(Carling, <i>et al.</i> , 2003)
	R TCCCCTCCCAATAAAAAAAGAT			

El volumen final de la reacción para cada PCR fue de 10 μ l, con su respectivo ajuste de magnesio. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador (PTC-100 MJ, Research, Inc.) con las condiciones específicas para cada microsatélite (Apéndice 3).

Todos los microsatélites nucleares utilizados fueron dinucleótidos, tres de ellos (MAF36, MAF48, MAF209) son específicos para bóvidos, mientras que el último, es específico para la familia antilocapridae (Aam 4). Durante el estudio se probaron otros tres microsatélites (BM1818, INRA063, ETH225), pero estos resultaron ser monomórficos y fueron excluidos de los análisis posteriores.

3.5 Amplificación de ADNmt

Para la amplificación de la región control del ADNmt se utilizaron 3 primers internos previamente diseñados en el laboratorio por medio del programa FastPCR (Kalendar *et al.*, 2009) (Tabla 3). Para la PCR todos los primers requirieron la misma concentración de reactivos, un volumen final de 15 μ l por reacción y el mismo programa en el termociclador (Apéndice 4). Con su amplificación y alineamiento se obtuvieron los 1,200 pb que componen esta región.

Tabla 3. Secuencias de los primers, concentración de magnesio y temperatura de alineación para amplificar la región control del ADNmt del berrendo.

Microsatélite	Secuencia (5'-3')	[Magnesio]	Temp. Alineación	Referencia
Mit-R1	F AACCTCCCTAAGACTCAAGG	1.5mM	54°C	(Gasca-Pineda, en preparación 2011)
R1-435	R CRGGATACGCATGTTGACTRGRAC			
F1-435	F GTYCYAGTCAACATGCGTATCCYG	1.5mM	54°C	(Gasca-Pineda, en preparación 2011)
Mit-R6	R GTAGACTCATCTAGGCAT			
3F1_122	F TATGRAAMGTTTGCCCAGGTA	1.5mM	54°C	(Este estudio)
5R1_523	R CACCACAGTTATGTGTGAGCATGG			

3.6 Electroforesis

Los productos obtenidos en las PCR fueron separados y observados a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 2% usando TAE al 0.5% como solución de amortiguación. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (40µl/ 1000ml de buffer TAE 0.5%) para poder visualizar las bandas de ADN. Los geles fueron fotografiados en una cámara Kodak EDAS 240 de luz ultravioleta. Cada una de las fotografías se digitalizó usando el programa Kodak ID 3.6.

De cada reacción de PCR se tomaron 3µl y se mezclaron con 2µ de loading buffer. Cada una de las mezclas se depositó en los pozos de los geles. Se utilizó también 1.5µl de indicador de peso molecular (ladder) de 50pb (O'RangeRuler 50pb DNAladder, Reddy-to-use, Fermentas life sciences) en cada gel para poder comparar el tamaño de las bandas obtenidas.

3.7 Registro De Alelos

Los productos de PCR fueron precipitados (Apéndice 5) y mezclados en una solución de LIZ (GeneScan™- 600LIZ Size Standard, Applied Biosystems) y Hi-Di (Formamida altamente desionizada) para ser utilizados en el secuenciador Applied Biosystems Prism 3100. La proporción de LIZ y Hi-Di siempre fue la misma para cada uno de los microsatélites (Tabla 4), aunque en algunos casos se combinaron hasta tres marcadores con diferentes colores de fluorescencia y sin sobrepasar los 2µl de volumen de reacción de PCR.

Tabla 4. Volumen de reactivos para la solución del secuenciador.

Volumen Producto PCR	LIZ	Hi-Di
0.2µl a 2µl	0.25µl	9µl

Para analizar los resultados del secuenciador, se utilizó el programa Peak Scanner Software v1.0 de Applied Biosystems, el cual nos muestra los resultados en forma gráfica (picos), indicándonos si el individuo amplificado es heterócigo u homócigo, así como el o los tamaños del (los) alelo(s) obtenido(s) en la PCR, en pares de bases. En los heterócigos se observan dos picos sobresalientes, mientras que los homócigos presentan uno solo (Figura 4 y 5, respectivamente).

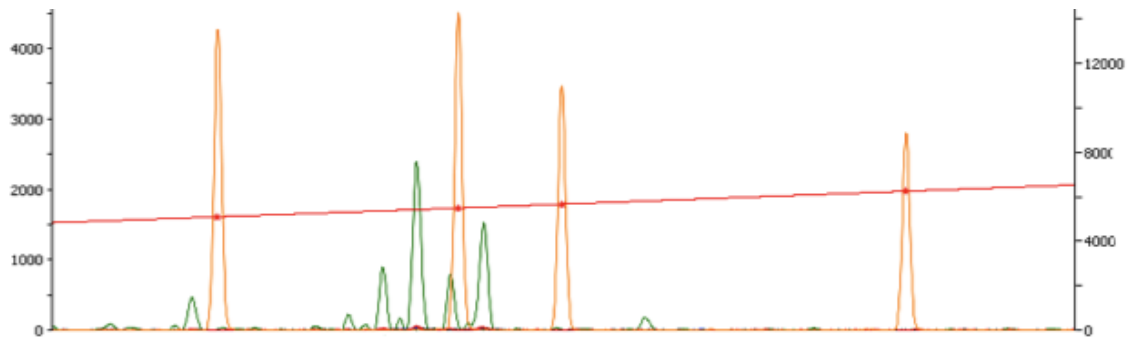


Figura 4. Gráfica de resultados del programa Peak Scanner para un individuo heterocigoto. Los dos picos verdes más altos son los alelos amplificados del microsatélite MAF36 para un individuo.

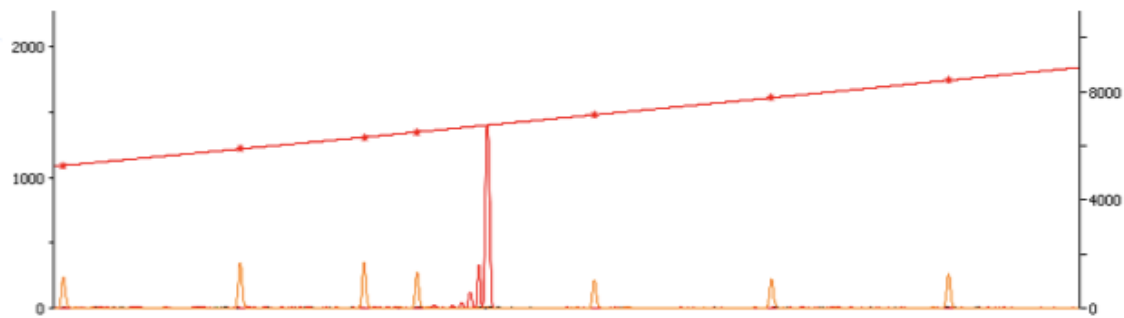


Figura 5. Gráfica de resultados del programa Peak Scanner para un individuo homocigoto. El pico rojo más alto indica el alelo amplificado del microsatélite MAF209 para un individuo.

Para terminar con el registro de los tamaños de los alelos, se realizó una matriz en una hoja de cálculo, anotando para cada individuo el tamaño en pares de bases de cada uno de los alelos de cada microsatélite.

3.8 Diversidad Genética Para Microsatélites Nucleares

Todos estos análisis para microsatélites fueron realizados mediante el programa Genepop v 4.0 (Rousset F, 2008).

La heterocigosis (H_E) para cualquier locus con n alelos se calcula como uno menos la suma de las homocigosis esperadas en una población en equilibrio Hardy-Weinberg (Nei, 1987):

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia observada para el i ésimo alelo en la población.

3.9 Equilibrio de Hardy-Wienberg

Para determinar si una población está en o no equilibrio H-W, se comparan la heterocigosis esperada (H_E) y la heterocigosis observada (H_O) por medio de una prueba de χ^2 - cuadrada. Para realizar la prueba de equilibrio, se tomó como hipótesis nula la deficiencia de heterocigotos y se cálculo por medio de la prueba de exceso y deficiencia de heterócigos de (Rousset y Raymond, 1995).

3.10 Coeficiente de endogamia

Este coeficiente es una medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de una subpoblación, donde los valores positivos indican una deficiencia de heterócigos y los negativos un exceso de heterócigos. En el presente estudio se utilizó el coeficiente F_{IS} (Nei, 1987) para determinar endogamia:

$$\overline{F}_{IS} = \frac{\overline{H}_S - \overline{H}_O}{\overline{H}_S}$$

Donde H_O es el promedio de la heterocigosis observada en un locus dentro de una subpoblación y H_S es el promedio de la heterocigosis esperada para ese mismo locus dentro de todas las subpoblaciones.

3.11 Coeficiente de paternidad

El coeficiente de paternidad (r) es una medida del grado de relación que existe entre los individuos de una población, es decir, la fracción de alelos que dos individuos comparten (Blouin, 2003). Para encontrar las relaciones de los individuos dentro de la población, se utilizó el programa ML Relate (Kalinowski *et al.*, 2006).

$$r = \frac{1}{2}k_1 + k_2$$

Donde k_1 y k_2 son las probabilidades de que dos individuos no compartan alelos y compartan un alelo respectivamente.

3.12 Estructura Genética

Para realizar el estudio de estructura genética se utilizó el programa STRUCTURE 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000). Para calcular la estructura genética de una población, este programa asume que dentro de la muestra utilizada existen k poblaciones, las cuales son caracterizadas cada una por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus. Con esto asigna a los individuos a las poblaciones (en el caso que exista más de una) según la similitud de sus genotipos.

Para determinar si la población cuenta con estructura genética, se realizó un análisis con un periodo de “burnin” de 150,000 iteraciones y seguidas por 150,000 iteraciones MCMC (Markov Chain Monte Carlo), este análisis se repitió diez veces, para cada valor de k , también se utilizó el modelo de ancestría de no mezclada (no admixture).

Para determinar la k óptima se utilizó el programa STRUCTURE HARVESTER v.0.6.8 (Earl y von Holdt, 2011), donde se graficaron los valores de probabilidad entre la población y como complemento se realizó la prueba de Evanno (Evanno *et al.*, 2005).

3.13 Secuencias ADN mitocondrial

La secuenciación del ADN mitocondrial fue efectuada en el laboratorio de High-Throughput Genomics Unit de la Universidad de Washington, Seattle, EE.UU. Los resultados fueron comparados con secuencias obtenidas del GeneBank (www.ncbi.gov) realizando un Blast de Nucleótidos con los parámetros por defecto para corroborar el resultado. Se considero que la amplificación de las secuencias eran de la misma especie al saber que tenían el 99% de similitud con respecto a las del GenBank.

3.14 Alineación de secuencias

La alineación y edición de las secuencias se llevó a cabo con los programas CONSED v. 19 (Gordon, 2004), y Bioedit v. 7.0.9 (Hall, 1997), con los cuales se agruparon las secuencias en haplotipos.

3.15 Índices de polimorfismo en ADN mitocondrial

Los índices indicados a continuación se calcularon con el programa DnaSP v.5.10 (Dna Sequence Polymorphism) (Librado y Rozas, 2009).

3.15.1 Diversidad nucleotídica (π)

Este índice define la diversidad genética a nivel nucleotídico en una población (Nei y Li, 1979), y para calcularlo se determinan el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias elegidas aleatoriamente dentro de una misma población:

$$\pi = \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde, x_i es la frecuencia de la i -ésima secuencia en la población, x_j es la frecuencia de la j -ésima secuencia en la población y π_{ij} es el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre estas dos secuencias.

3.15.2 Diversidad haplotípica (Hd)

La diversidad haplotípica es un análogo de la heterocigosis al nivel de las secuencias de ADN (Frankham *et al.*, 2010) y es calculada como:

$$Hd = 1 - \sum f_i^2$$

Donde f_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo.

3.15.3 Theta de Watterson (θ)

Este índice (Watterson, 1975) indica el número de sitios nucleotídicos segregantes en una muestra de secuencias y se determina con la fórmula:

$$\theta_s = S / aL$$

Donde S es el número de sitios segregantes y aL es la media armónica de la muestra.

3.15.4 Prueba D-Tajima

Este test (Tajima, 1989) se utiliza para probar la hipótesis nula de que existe un equilibrio de mutación-deriva génica dentro de una población. Para esto se utiliza la información de las secuencias de nucleótidos de una población, así como las frecuencias de las diferentes secuencias y las diferencias entre ellas (Hedrick, 2005). Este valor se calcula como:

$$D = \frac{d}{V(d)^{1/2}}$$

Donde d es igual a la media armónica de la muestra y $V(d)^{1/2}$ la raíz cuadrada de la varianza de d

3.15.5 Número de Haplotipos (h)

Es un índice que nos sirve para saber cuántos haplotipos hay en una población y poder ver la variedad que existe dentro de la misma (Frankham *et al.*, 2010). Se calcula contando la cantidad de secuencias diferentes que se encuentran dentro de la población.

3.15.6 Análisis de Distribución de las Diferencias Pareadas

El análisis se realizó con el programa Arlequin v.3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010). Se utilizaron dos diferentes modelos demográficos para este análisis, el primero fue el modelo expansión espacial y el segundo fue el modelo expansión repentina. Los resultados obtenidos se graficaron con el programa R v. 2.13.2 (R Development Core Team, 2009).

3.15.7 Árbol de Haplotipos Bayesiano

Para obtener el modelo de sustitución se utilizó el programa JModel Test() con 88 modelos y el criterio de selección fue el akaike con corrección para el tamaño de muestra. Se realizó un árbol bayesiano con un modelo obtenido TN93 con sitios invariables y distribución gamma (BEAST v.1.6, Drummond y Rambaut, 2007), con 100,000,000 de generaciones de MCMC (Markov Chains Monte Carlo), con un muestreo de 10,000 generaciones y un burn-in del 10% al muestreo a partir de los haplotipos obtenidos de las secuencias del ADNmt y con los haplotipos del estudio de (Conde, 2000). Para eso se redujo el tamaño de las secuencias a 400 pb para poder comparar la misma región. Σ

Una vez obtenido los resultados del programa BEAST, se utilizó el programa TreeAnnotator (Drummond y Rambaut, 2007) para hacer un consenso de todos los árboles obtenidos con un periodo burn-in del 10% de la muestra. Por último el árbol fue editado en el programa FigTree v 1.3.1 (Rambaut, 2006).

3.15.8 Análisis de Skyline Plots

Para el análisis de skyline plots se utilizaron los resultados obtenidos en el análisis bayesiano para el árbol de haplotipos, los datos fueron interpretados por el programa Tracer v1.4 (Drummond y Rambaut, 2007). Las distribuciones posteriores fueron inspeccionadas visualmente, en particular que la forma de la distribución tuviera sólo una moda. Asimismo se verificó que los tamaños efectivos de muestreo (ESS por sus siglas en inglés) tuvieran valores superiores a 500.

3.16 Comparación de Haplotipos

Se obtuvieron los haplotipos de (Conde, 2000), para realizar un estudio comparativo de diversidad con los haplotipos obtenidos en este estudio. Al ser de 400pb los haplotipos de (Conde, 2000), se redujeron los demás a ese tamaño para comparar exactamente la misma longitud.

El análisis se realizó con el programa DnaSP v.5.10 (Dna Sequence Polymorphism) (Librado y Rozas, 2009). Y se calcularon los mismo índices de polimorfismo del ADNmt previamente mencionados.

4. Resultados

4.1 Microsatélites

Se lograron amplificar siete microsatélites (Aam4, MAF209, MAF48, MAF36, BM1818, ETH225 e INRA063), de los cuales cuatro fueron polimórficos (Aam4, MAF209, MAF48, MAF36) y tres fueron monomórficos (BM1818, ETH225 e INRA063). El análisis reveló un total de 37 alelos diferentes (una media de 9.25 alelos por locus y una D.E. = 3.8622). De este total de alelos encontrados dentro de los loci polimórficos, el locus que tuvo un menor número de alelos fue el MAF209 con siete alelos y una $H_E = 0.8331$, y el locus con mayor número fue el MAF36, con 15 alelos, y una $H_E = 0.7528$ (Apéndice 6).

Se obtuvo un valor de diversidad genética promedio de $H_E = 0.7426$ y de $H_O = 0.6719$. El valor promedio del coeficiente de endogamia fue de ($F_{IS} = 0.0953$) es significativamente diferente de cero ($P = 0.0002$), que aunque bajo, muestra una deficiencia de heterocigos. Lo anterior indica que la heterocigosis esperada es mayor que la observada, por lo cual la población no se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. A su vez el valor de H_E se encuentra dentro lo reportado para la especie (Tabla 7).

Los valores de diversidad genética (H_E y H_O), coeficiente de endogamia y frecuencias alélicas por locus (Apéndice 6) varían de un alelo a otro. Esto tal vez se deba a que cada alelo puede tener diferentes tasas de mutación y una diferente historia evolutiva.

El análisis de estructura genética reveló una total ausencia de la misma dentro de la población ($k= 1$), la cual se obtuvo apartir de la gráfica de probabilidades en función de k (número de poblaciones) (Apéndice 9). Debido a que el mayor valor de probabilidad se encuentra con $k=1$, se descarta el método de Evanno (Evanno *et al.*,2005) debido a que este elimina los extremos marginales del análisis. Este resultado se esperaba al ser sólo una población la analizada, sin embargo el análisis se llevó acabo para corroborar que no existía algún individuo proveniente de otra población mientras se hacia la captura para la reintroducción a México.

El análisis de paternidad reveló que dentro de la población la mayoría de individuos (76.4%) no tienen parentesco entre sí. Sin embargo, de los 48 individuos estudiados, el 10.93% parecen ser hermanos, el 8.33% primos hermanos y el 4.34% mostraron relaciones que sugieren que son padre-hijo según el programa ML Relate.

Estos resultados sugieren que la probabilidad de tener mayores problemas de endogamia aumentaría con el tiempo, ya que cerca de un cuarto de los individuos tienen alguna relación entre sí.

Tabla 5. Diversidad genética esperada (H_E), Diversidad genética observada (H_O), coeficiente de endogamia (F_{IS}) y estructura genética (F_{ST})

<i>Referencia</i>	H_E	H_O	F_{IS}	F_{ST}
Ramírez, 2011	0.7426	0.6719	0.0953	-

4.2 Secuencias de ADN mitocondrial.

La región amplificada tuvo una longitud de 931pb, de los cuales 72 fueron sitios segregantes, que formaron 21 haplotipos. Esto nos indica que el berrendo para este marcador es muy variable, ya que considerando que la muestra es de tan solo 48 individuos. Se obtuvo un valor de diversidad haplotípica (Hd) de 0.879 (D.E.=0.00135). Y se obtuvo un valor de diversidad nucleotídica (π) de 0.00852. En cuanto a la Theta de Watterson (θ), el valor fue de 0.01264, con la prueba de Tajima (D) el valor obtenido fue de -1.30511 ($P > 0.10$). Al ser negativa, indica que la población pudo haber pasado por un cuello de botella que redujo la diversidad (Tabla 6).

Tabla 6. sitios segregantes (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), theta de Watterson (θ) y prueba de Tajima (D).

Referencia	S	h	Hd	π	θ	D
(Ramírez, 2011)	72	21	0.879 (0.00135)	0.00852	0.01264	-1.30511

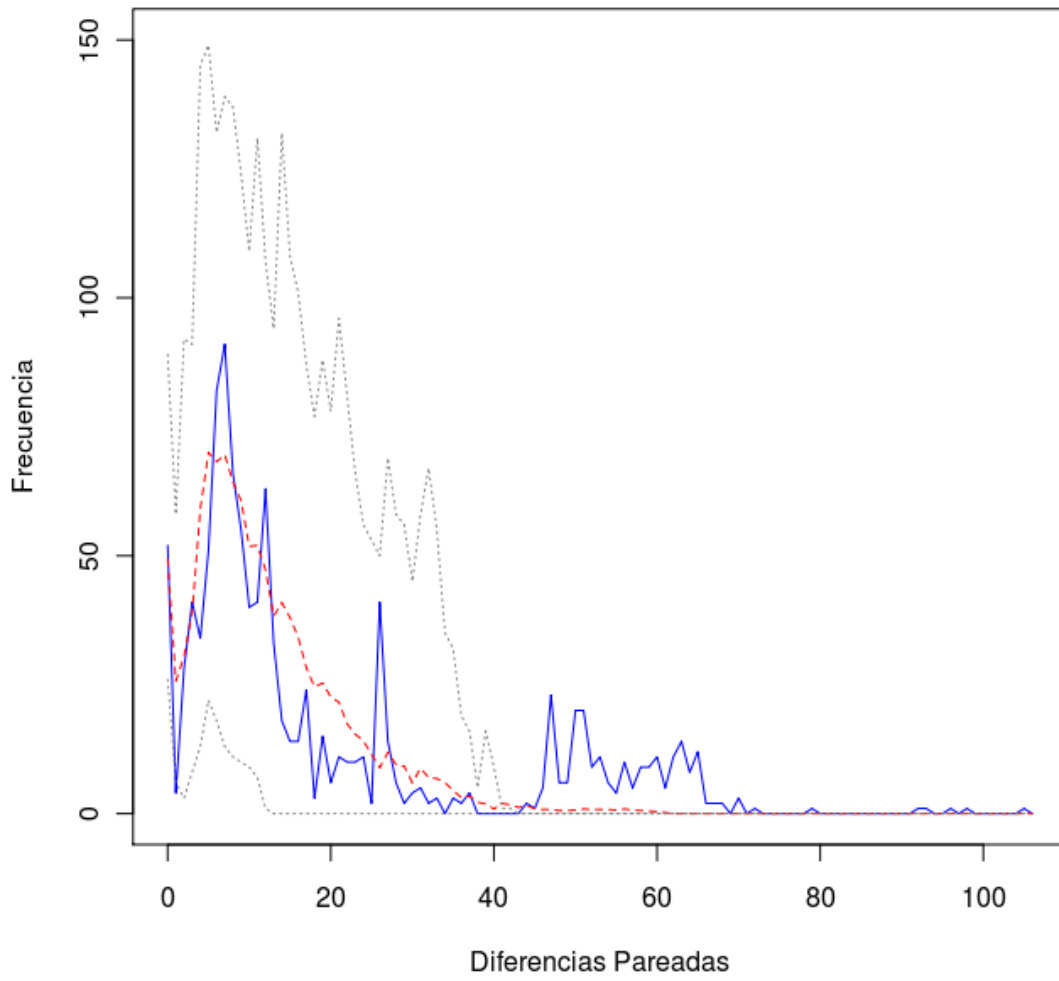


Figura 6. Gráfica del análisis de diferencias pareadas bajo el modelo expansión espacial. La línea continua azul representa las diferencias pareadas esperadas en las secuencias, y la línea discontinua roja representa las diferencias observadas. Las líneas punteadas muestran los intervalos de confianza.

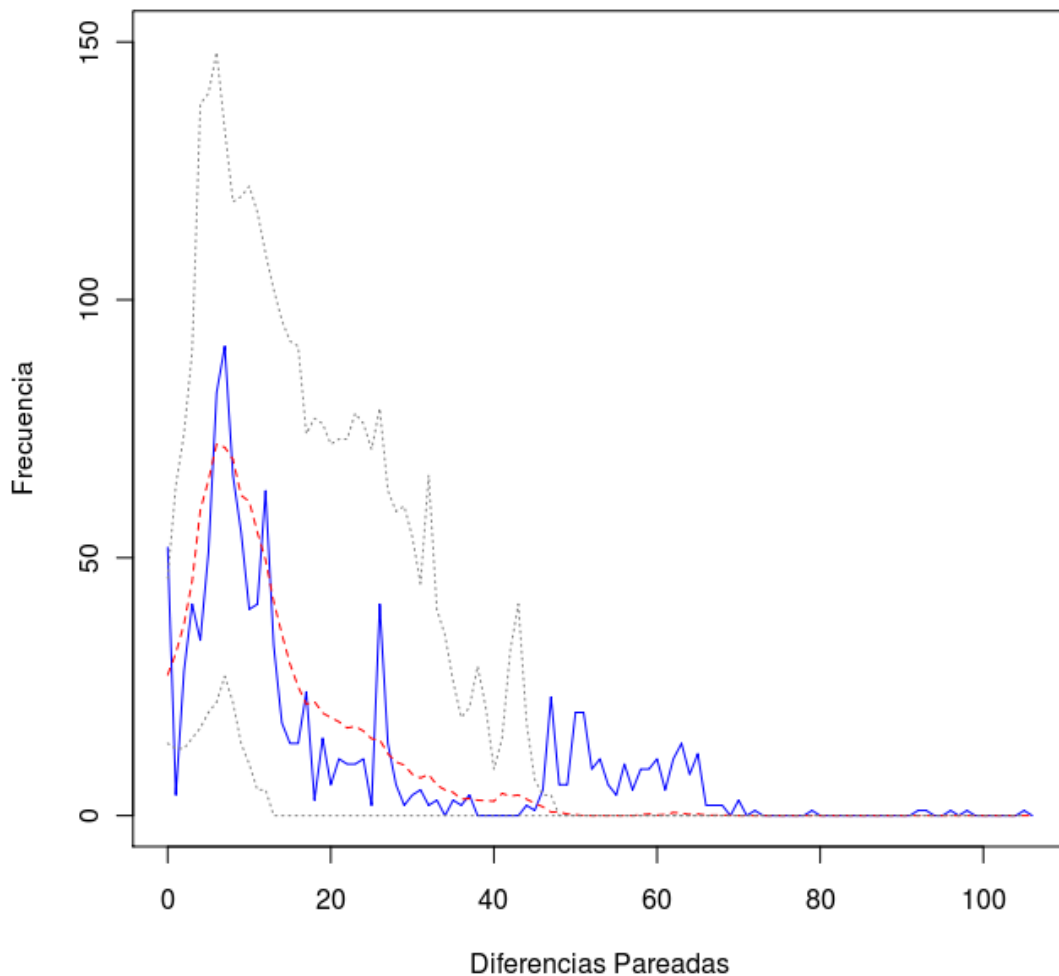


Figura 7. Gráfica del análisis de diferencias pareadas bajo el modelo de .expansión repentina. Línea Azul representa las diferencias pareadas observadas, línea roja discontinua las diferencias pareadas esperadas, las líneas punteadas grises representan los intervalos de confianza.

Los análisis de diferencias pareadas sugieren que la población pudo haber tenido una expansión poblacional (Figura 6 y 7). Sin embargo, para ambas hipótesis los valores se encuentran dentro de los intervalos de confianza, por lo que las dos podrían ser aceptadas. Así mismo, el skyline plot (Figura 9) muestra que la población tuvo una reducción demográfica en el pasado.

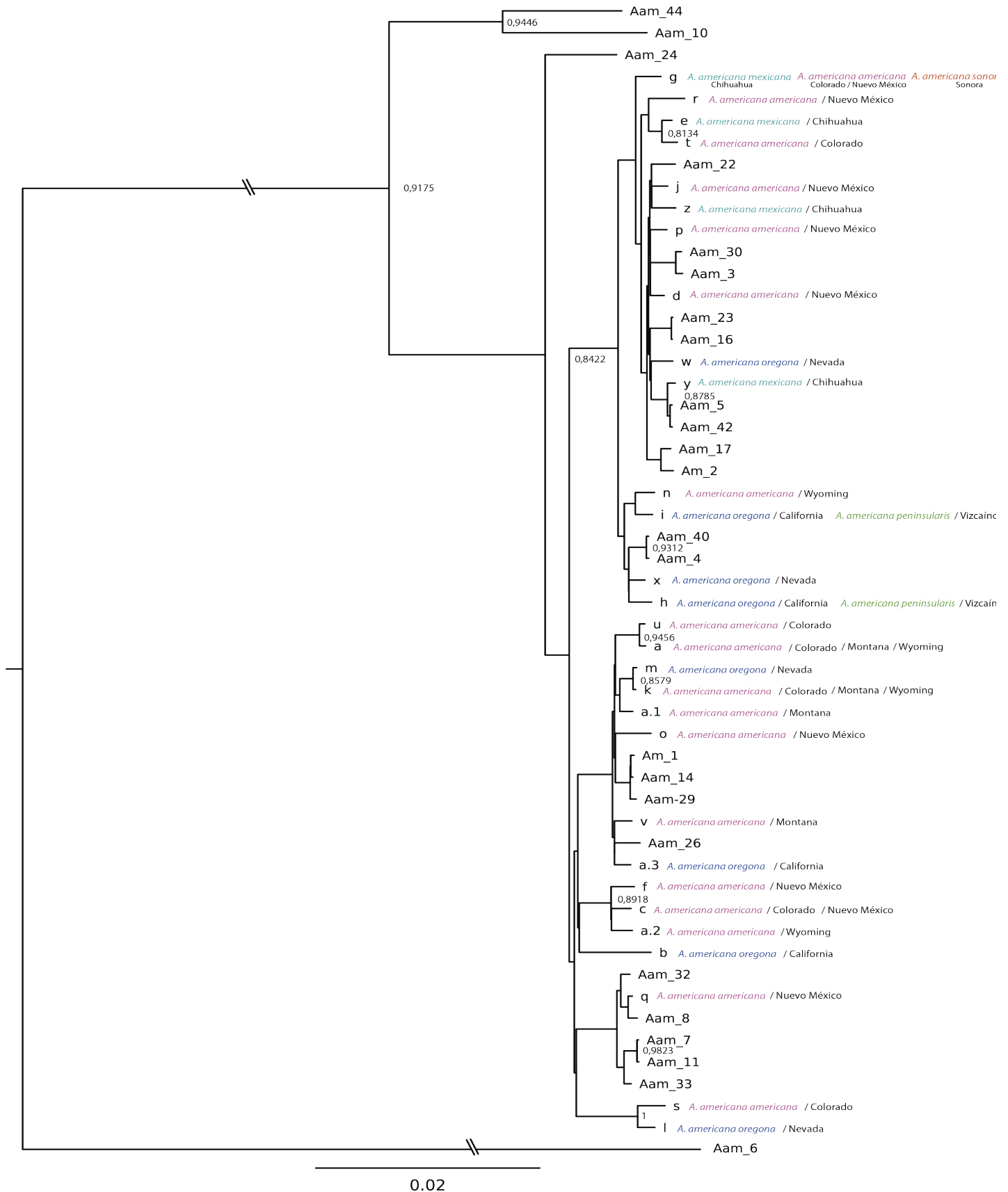


Figura 8. Árbol de haplotipos bayesiano con un modelo TN93 con sitios invariables y distribución gamma. Cada color representa una subespecie. Los individuos Aam_# son de la subespecie *A. a. americana* son de Nuevo México, EE.UU. El símbolo // representan en la parte superior del árbol una distancia de 0.06 y en la inferior una de 0.14.

El árbol bayesiano (Figura 8) agrupa a todos los haplotipos y se observa que todos se mezclan sin importar la subespecie y la región geográfica en donde se encuentren, lo que sugiere que la especie debe tener muy poca estructuración genética.

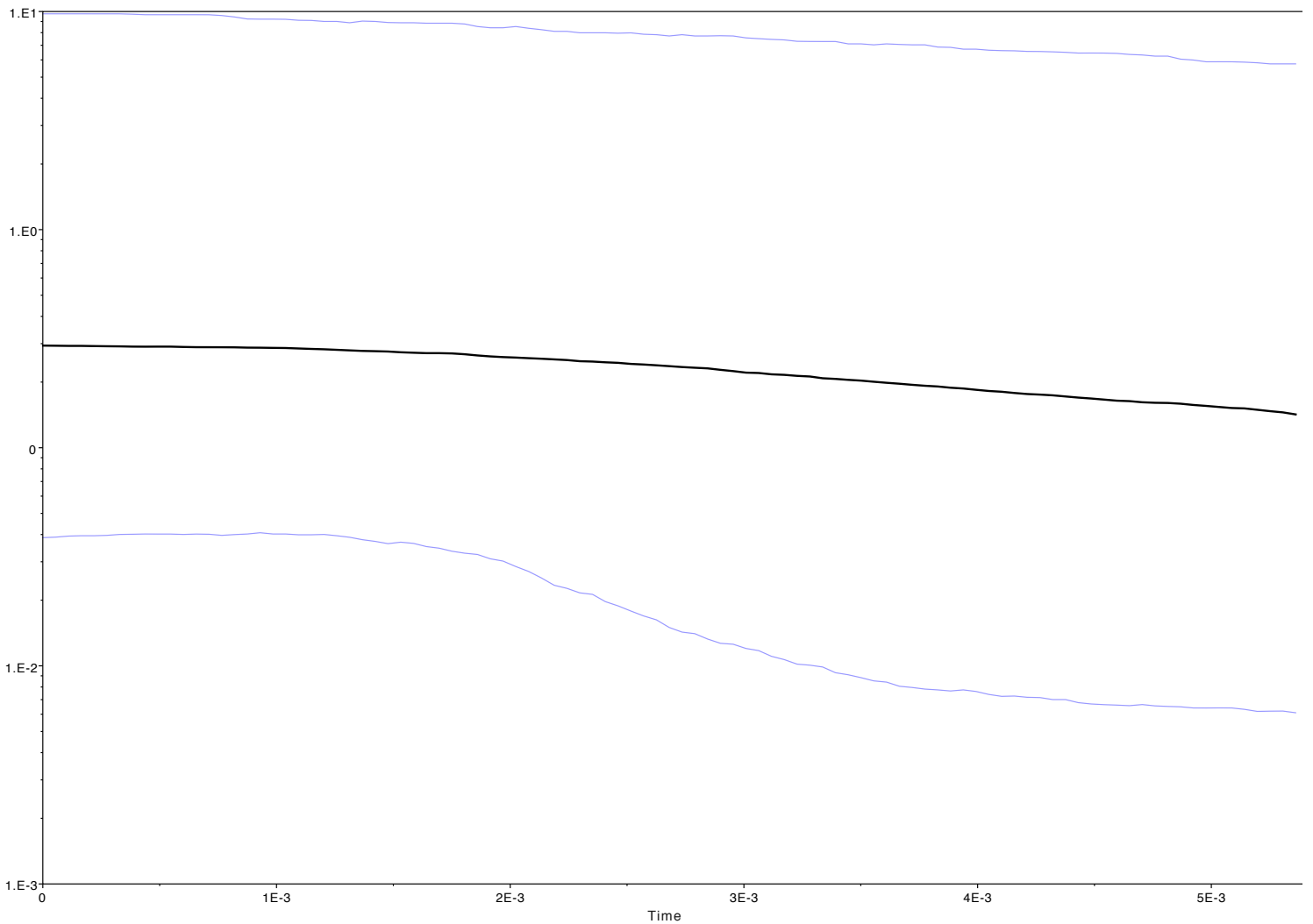


Figura 9. Gráfica Skyline plot bayesiano. La línea continua negra es el cambio del tamaño efectivo de población a lo largo del tiempo, y las líneas continuas azules son los intervalos de Confianza al 90%.

5. Discusión

5.1 Microsatélites Nucleares

Los resultados de los microsatélites revelan que la diversidad genética (H_E) de 0.7426 se encuentra dentro de los rangos reportados en otros estudios de berrendo (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de diversidad genética esperada (H_E), diversidad genética observada (H_O), coeficiente de endogamia (F_{IS}) y estructura genética (F_{ST}), entre estudios previos de berrendo.

Referencia	H_E	H_O	F_{IS}	F_{ST}
Ramírez, 2011	0.7426	0.6719	0.0953	-
Stephen, et al., 2005a	0.502 - 0.734	-	-0.057 a - 0.143	0.034 a 0.205
Stephen et al., 2005b	0.66 - 0.75	-	-0.07 a 0.07	0.021 a 0.110
Jenks et al., 2006	0.473 - 0.594	-	-0.168 a 0.037	0.028

El berrendo presenta una mayor diversidad genética, al comparar los resultados con estudios de genética de poblaciones de borrego cimarrón hechos en el laboratorio (J. Gasca, C. Durán) que utilizaron exactamente los mismos microsatélites con excepción del (Aam 4) que es específico para la especie (Tabla 8).

Los estudios previos, así como éste fueron realizados con poblaciones de los Estados Unidos, en donde la especie no se encuentra tan amenazada, por lo tanto las poblaciones pueden mantenerse en contacto entre sí, lo que lleva a que éstas se encuentren en mejor estado ya que al vivir en ambientes menos deteriorados y fragmentados se les facilita la obtención de recursos.

Tabla 8. Comparación de diversidad genética (H_E) en estudios usando los mismos loci de microsatélites nucleares

<i>Referencia</i>	<i>Especie</i>	H_E
Ramírez, 2011	<i>Antilocapra americana</i>	0.7426
Gasca, 2010	<i>Ovis canadensis</i>	0.5051
Durán, 2011	<i>Ovis canadensis</i>	0.5567

El valor significativo del coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0.0953$) fue diferente a cero ($P= 0.0002$), lo que indica que la endogamia puede deberse a que la población es pequeña y no se está apareando de manera aleatoria. Esto se puede ver en las relaciones de parentesco, en donde se muestra que el 23.6% de los individuos de la población están relacionados entre sí, con un 10.93% parecen ser hermanos, el 8.33% primos hermanos y el restante 4.34% padre-hijo. Además, comparando los resultados con otros estudios similares en berrendos, el coeficiente de endogamia encontrado para esta población es de los más altos (Tabla 7). Por lo que es muy probable que en el futuro presente problemas de depresión por endogamia y también la pérdida de diversidad genética, ya que estos dos problemas son inevitables en poblaciones pequeñas (Frankham *et al.*, 2010), como es el caso de esta población reintroducida. Así que sería importante impedir que la endogamia aumente para evitar los problemas ocasionados por depresión por endogamia, como la reducción en la adecuación, problemas de fecundidad materna y baja producción de espermias en los machos (Frankel & Soulé, 1981), además de la pérdida de diversidad genética.

Otro factor que podría influir para que las siguientes generaciones tampoco se encuentren en equilibrio de Hardy-Weinberg es la deriva génica, ya que si la población se mantiene pequeña la probabilidad de que se fije un alelo sería mayor, debido a que esta probabilidad es igual a la frecuencia inicial del mismo (Hedrick, 2005). Por lo tanto si un alelo se fija, la diversidad genética se empezaría a perder. Incluso a una tasa inversamente proporcional al tamaño poblacional (Hedrick, 2005).

El análisis de estructura genética mostró que la población conforma un grupo genético homogéneo ($k= 1$), pero podrían generarse problemas como consecuencia de su aislamiento. Ya que en México las poblaciones de berrendo no pueden intercambiar individuos fácilmente y son muy pequeñas. Por lo tanto el riesgo de que las poblaciones empiecen a diferenciarse con respecto a otras es alto.

Además, si llegará a suceder que la población contara con un tamaño efectivo reducido, el problema sería mayor pues los valores F_{ST} aumentarían a un tasa inversamente proporcional al tamaño efectivo poblacional (Frankham *et al.*, 2010).

Existen trabajos de estructura poblacional de berrendos (Stephen *et al.*, 2005a; Stephen *et al.*, 2005b), en los cuales los valores de F_{ST} (Tabla 7) son bajos, pero se empieza a ver una pequeña estructuración entre los berrendos, producto del aislamiento y la distancia entre las poblaciones muestreadas por lo que es posible que esto le suceda a la población.

Los problemas estocásticos ya sean ambientales, demográficos o genéticos a los que está sujeta esta población, serán muy fuertes, por lo que este es conveniente reintroducir más individuos para poder restablecer de una mejor manera a la población en México, y así evitar estos problemas, como se hizo con el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) (Hedrick y Frederickson, 2008) o en el orix árabe (*Oryx leucoryx*) (Price, 1989). Para todos estos programas de reintroducción y conservación, se utilizaron análisis de paternidad con microsatélites para poder identificar los pedigrees y encontrar individuos fundadores. Y de esta forma evitar el cruzamiento de los individuos más cercanos para así poder reducir la endogamia y aumentar el número de individuos.

5.2 ADN mitocondrial

La amplificación de las secuencias de ADNmt de los berrendos demostró que hay variación dentro de la población, la cual es normal dado que la región control es muy variable (Saccone *et al.*, 1991; Douzery *et al.*, 1997), sobre todo si se amplifica prácticamente por completo (Tabla 9).

Tabla 9. Tabla comparativa de sitios segregantes (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), theta de Watterson (θ) y prueba de Tajima (D).

Referencia	S	h	Hd	π	θ	D
(Ramírez, 2011)	72	21	0.879 (0.00135)	0.00852	0.01264	-1.30511
(Conde, 2000)	32	29	0.999 (0.00017)	0.00865	-	-

En trabajos anteriores (Conde, 2000) sólo se encontraron 29 haplotipos en 93 individuos provenientes de diferentes regiones de Norteamérica (Tabla 9). Además, todos los resultados obtenidos podemos observar que se encuentran dentro de lo reportado para estudios de ADNmt en berrendo (Tabla 9).

Tabla 10. Tabla comparativa de sitios segregantes (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), theta de Watterson (θ) y prueba de Tajima (D). Entre especies cercanas en cautiverio de México

Especie	# de individuos	S	h	Hd	π	θ	D
<i>Antilocapra americana</i>	48	72	21	0.879 (0.00135)	0.00852	0.01264	-1.30511
<i>Odocoileus virginianus</i>	58	-	33	.976	0.0416	0.04044	-
<i>Ovis canadensis</i>	33	11	3	0.453	0.01104	0.00678	1.42218

El valor de la diversidad haplotípica resultó ser alto $Hd= 0.879$ (0.00135) comparándolo con el del borrego cimarrón (Tabla 10), y muy parecido a la que se tiene reportada para la especie (Tabla 9) y en el trabajo de Stephen y colaboradores (2005b) ($Hd= 0.72$ a 0.90). Este valor nos indica que la población es muy variable genéticamente.

En cuanto a la diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00852$), al compararla con el estudio de (Conde, 2000) observamos que se encuentra en el rango reportado para la especie (Tabla 9), pero comparándolo con otras especies de ungulados como el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) (Tabla 10), podemos ver que la población del berrendo se encuentra a un orden de magnitud menor con respecto a estas dos especies.

Para entender de una mejor manera los procesos evolutivos que han determinado la diversidad nucleotídica en esta especie utilizamos la prueba de D de Tajima para los datos de la mitocondria. La D negativa fue de ($D= -1.30511$), lo que puede sugerir que hubo selección purificadora (lo cual se puede esperar en la mitocondria) o que la especie pasó por un cuello de botella (Hein *et al.*, 2004). Pero la prueba resultó ser no significativa ($P > 0.10$), debido al tamaño de muestra reducido. En el caso que la reducción del tamaño haya sido consecuencia de un cuello de botella, las poblaciones pasan por deriva génica mientras se logran recuperar, por lo tanto la diversidad genética se reduce y es muy probable que se empiece a perder variación genética (Hedrick, 2005).

Al final este análisis nos da una idea de la historia evolutiva de la población y el porque de la poca variación genética a nivel nucleotídico en la región control, pero se requieren de más datos, tanto de secuencias como de individuos y poblaciones para poder asegurarlo.

Otra factor importante al considerar tanto el valor de (π) en el estudio de (Conde, 2000), como en éste, es la cantidad de individuos y la región de donde provenían, ya que en el de (Conde, 2000), se realizó con todas las subespecies tanto de México como de EE.UU., mientras que en este estudio fue con sólo una de EE.UU. ubicada en Nuevo México. Entonces al comparar la (π) observamos que al valor es bajo en ambos casos y muy parecido, lo que puede sugerir que a nivel global la especie pasó por un evento demográfico que redujo considerablemente su tamaño poblacional, y en el caso de este estudio puede ser un cuello de botella como insinúa la prueba D de Tajima y como se observa en la gráfica de skyline plot (figura 9), donde el análisis también sugiere que

en el pasado hubo una reducción en el tamaño efectivo de población (N_e), pero debido a nuestro tamaño de muestra no es posible calcularlo, sin embargo tenemos una señal que muestra de que el (N_e) se vio afectado.

Además en las gráficas de diferencias pareadas en sus dos hipótesis (Figura 6 y 7) también sigieren que hubo una reducción y un incremento posterior. En este caso no es posible aceptar alguna de las dos debido a que ambas se encuentran dentro de los intervalos de confianza, este problema estadístico es consecuencia del tamaño reducido de la muestra con el que se trabajó.

Con estos análisis se puede sugerir que el valor bajo de (π) es consecuencia a un problema demográfico en el pasado (reducción del N_e), y que no afecta únicamente a la población en estudio, sino a gran parte de la población mundial.

La población en estudio cuenta solamente con 48 individuos, vale la pena recordar que además es el número de individuos que se contemplaba usar para fundar a la nueva población. Debido a esto se esperaría que el N_e fuera pequeño y éste se irá reduciendo con el tiempo si la población no aumenta de tamaño, además cuando las poblaciones son reducidas como mencionan (Frankham *et al.*, 2010), si se cuenta con una población con un $N_e= 25$ o menor, la variación genética se pierde rápidamente a un grado tal que puede ser la mitad de la misma en 1.4 generaciones de N_e . Y sabiendo las circunstancias en las que se encuentra esta población es probable que la variación genética se pierda en un tiempo relativamente corto.

También se estimó la variación genética con la Theta de Watterson, que se basa en el número de sitios segregantes en la muestra. La población tuvo un valor de ($\theta= 0.01264$), que es bajo comprándolo con el del venado de cola blanca (Tabla 10), desafortunadamente no existen estudios previos de berrendo que hayan utilizado este estadístico por lo que no es posible compararlo con otras poblaciones. Pero el valor bajo también puede ser consecuencia del evento demográfico por el cual se sugiere que pasó la especie, por lo tanto esta población lo presenta.

Adicionalmente, las actividades humanas influyen en este caso, ya que la caza ilegal, la destrucción del hábitat y la fragmentación del mismo pueden evitar el crecimiento de la población y por lo tanto su tamaño efectivo.

En cuanto al árbol de haplotipos (Figura 8) podemos observar como la gran mayoría de los haplotipos encontrados por Conde en el 2000, son iguales a los encontrados en este estudio, lo interesante es que los haplotipos del estudio de Conde son de todas las subespecies, mientras que los de éste son de *Antilocapra americana*

americana. Podemos ver haplotipos que se comparten en diferentes regiones y en diferentes subespecies, por ejemplo el haplotipo “g” se localiza en Chihuahua, México con la subespecie *A.a.mexicana*, en Colorado y Nuevo México, EE.UU. con la subespecie *A.a.americana*, y por último también se localiza en Sonora, México con la subespecie *A.a.sonorensis*. lo que indica que la gran parte de los haplotipos se encuentran mezclados en las regiones geográficas en las que se encuentran en especial en el centro de Norteamérica.

El análisis de diversidad de haplotipos mostró resultados significativos. Se puede observar, que la población en estudio tiene mayor diversidad que las diferentes poblaciones analizadas por (Conde, 2000) en los primeros 400pb (Tabla 11), y como se mencionó antes, las poblaciones de (Conde, 2000) son de todas las subespecies ubicadas en diferentes regiones, mientras que el estudio fue hecho con la subespecie *Antilocapra americana americana* ubicada en Nuevo México, EE.UU. por lo que esta población cuenta con suficiente diversidad genética para poder recuperar la especie en México, aunque la (π) sea baja en la población, porque como se mencionó antes, todo parece indicar que es más un problema demográfico a nivel especie que a nivel de una sola población, así que para poder mantener la (π) y que no reduzca más en esta población, es muy importante que se incremente tanto el tamaño poblacional como el efectivo.

Tabla 11. Tabla comparativa de sitios segregantes (S), número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), theta de Watterson (θ) y prueba de Tajima (D). Con 400pb de la región control del ADNmt.

Referencia	S	h	Hd	π	θ
(Ramírez, 2011)	59	23	0.902 (0.046)	0.02139 (0.00872)	0.03930
(Conde, 2000)	27	29	0.993 (0.011)	0.00922 (0.00116)	0.01710

6. Sugerencias y Perspectivas

Con los resultados obtenidos a partir de los análisis de diferencias pareadas, el skyline plot, la diversidad nucleotídica y la prueba D de Tajima, sugieren que hubo una reducción tanto en el tamaño efectivo como en el poblacional, dada la la señal que dan los datos, puede ser un cuello de botella el evento demográfico que ocasionó la reducción, además si se complementa con los datos obtenidos del árbol bayesiano donde todos los haplotipos de la población analizada se mezclan con todos los de las subespecies obtenidos por (Conde, 2000) en especial las tres subespecies del centro de Norteamérica *A.a.americana*, *A.a.mexicana* y *A.a. sonorensis*, se podría estar hablando que probablemente la región donde la población se extrajo fue un refugio pleistocénico, esta hipótesis también apoyaría el valor bajo de (π) , pues se ha visto que en las especies de mamíferos del Norteamérica que pasaron por un refugio pleistocénico en la última glaciación hace 60,000-80,000 años atrás generalmente muestran una variación molecular limitada dentro de sus poblaciones como se menciona en el estudio de Lessa y colaboradores (2003). Pero como no se logró tener una buena resolución en los datos, no es posible detectar la fecha cuando fue el probable cuello de botella. Para ello sería bueno calcular el N_e de una manera más precisa, pero para eso es necesario contar con más muestras y más poblaciones.

Al encontrar que la población es buena para cumplir el objetivo de la reintroducción mas allá de los problemas que presenta toda la especie con la diversidad nucleotídica, sería recomendable introducir más individuos a la población, en especial que fueran de la misma subespecie que ésta o que se encuentren en condiciones similares para evitar problemas de estocasticidad ambiental, sabemos que esto tiene un costo elevado, pero si la intención es recuperar una especie y mantenerla a largo plazo, este paso debe de contemplarse. Sería recomendable entre 5 y 10 individuos nuevos cada 2 años, como se hizo en el caso de (Cancino *et al.*, 2005). Donde con cinco individuos se logró fundar una población, en la cual cada 2 años se intergaban el número de inviduos antes mencionados, el problema es que no se tiene un estudio genético del caso, por lo que no se sabe si la población cuenta con endogamia, por eso sería también recomendable escoger individuos con potencial reproductivo, bajo coeficiente de endogamia y alta diversidad genética, para eso habría que realizar un

análisis de genética de poblaciones como el realizado, con marcadores moleculares nucleares y mitocondriales, para saber con cuanta diversidad cuentan los nuevos individuos.

Al final la introducción de nuevos individuos también ayudaría a reducir el problema de endogamia ya que se reduciría el porcentaje de individuos relacionados, además al para las siguientes generaciones se podría llegar al equilibrio de Hardy-Weinberg y evitaría la fijación de alelos.

7. Conclusiones

- La población reintroducida de berrendos cuenta con suficiente diversidad genética para cumplir con el objetivo de fundar una nueva población.
- Si la población se mantiene en un tamaño tan pequeño puede sufrir el riesgo de empezar a perder la diversidad genética con la que cuenta.
- Para esta generación la población no se encuentra en el equilibrio de Hardy-Weinberg, y muestra una endogamia significativa.
- Es conveniente reintroducir más individuos para reducir la probabilidad de fijación de alelos y disminuir la endogamia.
- Se sugiere introducir individuos de México o de otra región similar de donde se extrajo la población de Estados Unidos de América, para evitar la estructuración de la población, siempre y cuando éstos no cuenten con problemas de estocasticidad genética y estén adaptados a condiciones ambientales similares.

Bibliografía

- AGFD (Arizona Game and Fish Department). 1981. The Sonoran pronghorn. Phoenix, Arizona. Special Report No. 10. 55 pp.
- Allendorf, F. Luikart, G. 2007. Conservation and the Genetics of Populations, Blackwell Publishing, Singapore, 69 pp.
- Álvarez, T. 1966. Apéndice No. 2. Informe sobre la piel. En: Alfonso Caso y Elizabeth Smith. Interpretación del Códice Colombino y del Becker I. Soc. Mex. de Antrop. México.
- Amos W. y J. Harwood. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Phil. Trans. Royal Soc. London B* 353:177-186.
- Armour, J. A., R. Neumann, S. Gobert y A. J. Jeffreys. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics*. 3: 599-605.
- Asuar, L. 2007. Ecología Molecular de la Conservación. En *Ecología molecular*. Eguiarte L. E. y Souza V. (Ediotres). SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO.
- Ballard, W. Whitlock M. 2004. The incomplete Natural History of Mitochondria. *Molecular Ecology Notes*. 13, 729-744.
- Baur B. y B. Schmid. 1996. Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. En: Gaston, K. J. (ed). *Biodiversity: a biology of numbers and difference*. Blackwell Science, Reino Unido.
- Beebe T. Y Rowe G. 2008. *An Introduction to Molecular Ecology*. UK. Oxford University Press.
- Bevill R.L. y S.M. Louda. 1999. Comparisons of related rare and common species in the study of plant rarity. *Cons. Biol.* 13:493-498.
- Birky CW (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*, 35, 125–148.
- Blouin, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstructions and kinship analysis in natural populations. *Trends Ecol. Evol.* 18:503-511.
- Boyce W.M. *et al.* 1999. Population Subdivision Among Desert Bighorn Sheep (*Ovis canadensis*) Ewes Revealed by Mitochondrial DNA Analysis. *Molecular Ecology*. Vol. 8-1. 99-106.
- Brown WM, George M Jr, Wilson AC. 1979. Rapid evolution of animal

mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 76, 1967–1971.

- Buchanan, F.C. and Crawford, A.M. 1992. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF209 locus. *Anim. Genet.* 23 (2), 183
- Buchanan, F.C. Swarbrick, P.A. and Crawford, A.M. 1991. Ovine dinucleotide repeats polymorphism at the MAF48 locus. *Anim. Genet.* 22 (4), 379-380
- Byers, J.A. 1997. American Pronghorn Social Adaptations and the Ghost of Predators Past. The University of Chicago Press. Chicago. 300pp.
- Cancino, *et al.* 2005. From the Field: Capture, Hand-Raising and Captive Management of Peninsular Pronghorn. *Wildlife Society Bulletin*. Vol. 33 (1): 000-000.
- Cancino, J. Miller, P. Stoop, B. y Lewis, J. (eds.). 1995. Population and Habitat Assessment for the peninsular pronghorn (*Antilocapra americana peninsularis*). IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group. Apple Valley. Montana.
- Carling, M.D, *et al.* 2003. DNA Microsatellites of Pronghorn (*Antilocapra americana*). *Molecular Ecology Notes*. 10.1046/j.1471-8286
- Castillo, C.S. 1993. Informe Técnico y Programa de Manejo para el Berrendo Sonorense (*Antilocapra americana sonorensis*) en Sonora, México. Centro Ecológico de Sonora. Pp. 1-70.
- CES (Centro Ecológico de Sonora). 1992. Estrategia para la recuperación del berrendo sonorense. Segunda Fase: Captura, marcaje y protección. Informe Técnico Final. Centro Ecológico de Hermosillo Sonora.
- CITES (Convención Sobre El Comercio de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre). 2009.
- Coltman, D.W. et al. 2008. PCR primers for harbour seal (*Vitulina concolor*) microsatellites amplify polymorphic loci other pinniped species. *Molecular Ecology* 5:161-163.
- Conde, A. 2000. Filogenia y Estructura Genética del Berrendo (*Antilocapra americana*) e implicaciones para su conservación. Tesis de licenciatura. UNAM. México.
- Devey, M.E. et al. 1996. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers. *TAG*.

- Douzery E, Randi E. 1997. The Mitochondrial Control Region of Cervid: Evolutionary Patterns and Phylogenetic Content
- Drummond, AJ & Rambaut, A. 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evolutionary Biology* 7, 214
- Edwards, A. et al. 1991. DNA typing and mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal Human. Ecol. Evol.* 8:285-289
- Eguiarte, L. E. 1999. Una Guía Para Principiantes a la Genética de Poblaciones. en *La Evolución Biológica*. Facultad de Ciencias. Nuñez-Farfán J. y L. E. Eguiarte (editores). México. 35-49 pp.
- Eguiarte, L. E. y D. Pinero. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias. Número especial 4. Ecología y conservación en México*: 34 –47 reimpresso en Nuñez-Farfán J. y L. E. Eguiarte (editores). *La evolución biológica*. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, Conabio. Pp. 371-398).
- Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7Version: v0.6.8 Oct 2011
- Evanno G, S Regnaut, J Goudet 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Frankel OH and Soulé MH. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge, UK. Cambridge University Press.
- Frankham, R. 2005. Genetics and Extinction. *Biol. Conserv.* 126. 131-140.
- Frankham, R. *et al.* 2010. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Frick, C., 1937. Horned ruminants of North America. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 69, pp. 1–699.
- Fu, Y y Li, W. 1993. Statistical Tests of Neutrality of Mutations. *Genetics Society of America*. 133: 693-709.

- Geist, Valerius. 2001. Antelope Country. Pronghorns: The last Americans.
- González-Romero, A. y A. Lafón- Terrazas. 1993. Distribución y Estado Actual del Berrendo(*Antilocapra americana*) en México. Pp. 411-419, en: Avances en el Estudio de los Mamíferos de México (Medellín, R.A. y G. Ceballos, eds). Publicaciones especiales 1, Asociación Mexicana de Mastozoología, México.
- Gupta M. *et al.* 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical. Applied Genetics* 89:998-1006.
- Gordon, D. 2004. “Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed“, in *Current Protocols in Bioinformatics*, A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley & Co., 11.2.1-11.2.43
- Hall, T. 1997. Bioedit. Ibis Biosciences. CA. USA
- Hedrick, P. 2005. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. United States of America.
- Heffelfinger, J. 2006, *El Berrendo en México Acciones de Conservación*, Agrupación Sierra Madre, S.C. . 19-25 pp.
- Hein, J. et al. 2004. *Genetic Genealogies, Variation and Evolution. A primer in coalescent theory*. Oxford University Press. UK.
- INE. 2000, *Proyecto para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable del Berrendo (Antilocapra americana)*, SEMARNAP, 23pp.
- Jenks, J. *et al.* 2006. Evaluating Genetic Viability of Pronghorn in Wind Cave National Park. *The Prairie Naturalist*. 38(3): September.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH 2009. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1):1-14
- Kalinowski ST, AP Wagner, ML Taper. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.
- Lessa *et al.* 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the Late Quaternary. *PNAS*. Vol. 100. N. 18
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452 | doi: 10.1093/bioinformatics/btp187

- Litt M. y J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle gene. *American Journal of Human Genetics* 44:397-401.
- Melendez, C. et al. 2006, *El Berrendo en México Acciones de Conservación*, México Agrupación Sierra Madre, S.C. .71pp.
- Moritz C., D.J. Coates, W. Sherwin, T. Clancy y C.J. Limpus. 1993. Population ecology and genetics. En: Moritz, C y J. Kikkawa (eds.). *Conservation Biology in Australia and Oceania*. Surrey Beatty & Sons, Australia. pp.359-362.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press. USA.
- Nei, M. and W.-H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76: 5269-5273
- Nelson, E. W. 1925. Status of the pronghorn antelope (1922 - 1944). United States Department of Agriculture. Washington, D.C. Department Bulletin # 1346.
- O'Gara, B. W. 1978. *Antilocapra americana*. Mammalian species. American Society of Mammalogists. No. 90. 7pp.
- Pallares, E. 1999. El retorno del berrendo: rescate de una especie en peligro de extinción. *National Geographic*. Marzo. Conservación en América Latina.
- Primac, R. R. Rozzi, P. Feisinger, R. Dirzo y F. Masardo. 2001. *Fundamentos de conservación biológica*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Pritchard, J. K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Programa de Acción para la Conservación de Especie: Berrendo (*Antilocapra americana*). 2009. SEMARNAT. México.
- Queller D.C J.E. Strassmann, C.R. Hughes. 1993. Microsatellites and kinship. Trends repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3(4):599-605.
- R Development Core Team. 2009. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

- Rambaut, A. 2006. FigTree. Institute of Evolutionary Biology. University of Edinburgh. UK.
- Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources* 8: 103-106.
- Rousset, F. & Raymond, M., 1995. Testing heterozygote excess and deficiency. *Genetics* 140: 1413-1419.
- Rocha M. y Gasca J. 2007. Ecología Molecular de la Conservación. En *Ecología molecular*. Eguiarte L. E. y Souza V. (Editores). SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO. Pp 258.
- Saccone C. Pesole G and Sbisá E. The Main Regulatory Region of Mammalian Mitochondrial DNA: Structure-Function Model and Evolutionary Pattern. *Journal of Molecular Evolution*. 33: 83-91.
- Sudhir Kumar, Sankar Subramanian, *Mutation Rates in Mammalian Genomes*, PNAS, January 22, 2002, Vol. 99, No. 2, p. 803-808.
- SEDESOL (Secretaría de Desarrollo Social). 1994. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-ECOL-1994. Que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. *Diario Oficial de la Federación*, 16 de mayo de 1994. Tomo CDLXXXVIII(10): 2-60.
- SEDUE (Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología). 1988. Decreto Presidencial de la Reserva de la Biosfera "El Vizcaíno". *Diario Oficial de la Federación*. Secretaría de Gobernación, México.
- SEMARNAT. (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-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. *Diario Oficial de la Federación*, 6 de marzo de 2002, 1-56.
- SEMARNAT. 2009. Programa de Acción para la Conservación de la Especie: Berrendo (*Antilocapra americana*). México. 28pp.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot.*
- Stephan W, Langley C. 1992. Evolutionary consequences of DNA mismatch repair opportunity. *Genetics* 132. 567-574.
- Stephen, C. 2005a. Population Genetics Analysis of Sonoran Pronghorn

- (*Antilocapra americana sonorensis*). *Journal of Mammalogy*. 86(4): 000-000.
- Stephen, C. 2005b. Genetics Consequences of Reintroductions: An example from Oregon Pronghorn Antelope (*Antilocapra americana*), *Journal of Wildlife Management*, No 69 (4). 1463-1474 pp.
 - Swarbrick, P.A. Buchanan, F.C. and Crawford, A.M. 1991. Ovine dinucleotide repeats polymorphism at the MAF36 locus. *Anim. Genet.* 22 (4), 377-378.
 - Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
 - Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*.
 - Treviño, J.L. 1978. Number and distribution Pronghorn Antelope in Chihuahua. Thesis of Master. New México State University. U.S.A.
 - UICN. 2003. Unidad Internacional para la Conservación de la Naturaleza
 - Valdés, M *et al.* 2006. El Berrendo en México Acciones de Conservación, Agrupación Sierra Madre, S.C. México. 16-17 pp.
 - Valdés M, Manterola C. 2006. El Berrendo en México Acciones de Conservación, Agrupación Sierra Madre, S.C. 101-102pp.
 - Watterson, G.A. 1975. "On the number of segregating sites in genetical models without recombination.", *Theoretical Population Biology* 7 (2): 256–276.
 - Yoakum, J. D. 1990. Food habits of the pronghorn. *Pronghorn Antelope Workshop Proc.* 14:102-111.

Apéndices

Apéndice 1

Protocolo de extracción de ADN para muestras de pelo usando Chelex.

1. Cortar el pelo lo más cercano a la raíz, de preferencia no dejar mas de 5mm de pelo.
2. Colocar las raíces en un tubo Eppendorf de 1.5ml y agregar 100µl de solución Chelex al 5% .
3. Agregar 15µl de Proteinasa K (10mg/ml) .
4. Agregar 5µl de soulución de DTT (0.5M).
5. Incubar a 61°C por 4 horas con agitación periódica (1000rpm cada 10 minutos).
6. Verificar que la solución no contenga sólidos visibles, de lo contrario agregar mas Proteinasa K e incubar hasta que se disuelva por completo.
7. Incubar a 95°C por 10 minutos con agitación periódica (400rpm cada 2 minutos).
8. Colocar en hielo durante 10 minutos.
9. Centrifugar 3 minutos a 10,000rpm.
10. Tomar sobrenadante cuidando de no tocar el precipitado y colocar en un tubo nuevo.

Apéndice 2

Precipitación de ADN

1. Tomar el ADN extraído por Chelex.
2. Agregar 7 μ l de EDTA 125mM (pH 8.4).
3. Agregar 7 μ l de NaOAc 3M (pH 5.2).
4. Añadir 130 μ l de alcohol al 100%.
5. Agitar en Vortex e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
6. Centrifugar a 14,000rpm durante 15 minutos.
7. Desechar con cuidado el alcohol.
8. Agregar 100 μ l de alcohol al 70%.
9. Centrifugar a 14000rpm durante 15 minutos.
10. Desechar el alcohol y dejar secar.
11. Resuspender en 35 μ l de H₂O ultra pura.

Apéndice 3

Programas de amplificación para microsatélites nucleares y concentraciones.

MAF36 [] 2mM MgCl₂

Fase	t° Alineación	Tiempo	No. De Ciclos
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1
Desnaturalización	94°	15 segundos	33
Alineación	56°	27 segundos	
Extensión	72°	1 segundo	
Extensión final	72°	10 minutos	1

MAF48 [] 3mM MgCl₂

Fase	t° Alineación	Tiempo	No. De Ciclos
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1
Desnaturalización	94°	15 segundos	30
Alineación	58°	27 segundos	
Extensión	72°	1 segundo	
Extensión final	72°	10 minutos	1

MAF209 [] 1mM MgCl₂

Fase	t° Alineación	Tiempo	No. De Ciclos
Desnaturalización inicial	94°	5 minutos	1
Desnaturalización	94°	15 segundos	30
Alineación	56°	25 segundos	
Extensión	72°	1 segundo	
Extensión final	72°	10 minutos	1

Aam 4 [] 4mM MgCl₂

Fase	t° Alineación	Tiempo	No. De Ciclos
Desnaturalización inicial	95°	5 minutos	1
Desnaturalización	94°	30 segundos ⁹	
Alineación	57°	30 segundos	
Extensión	72°	30 segundos	

			31
Extensión final	72°	5 minutos	1

Concentraciones utilizadas para cada microsatélite.

	[] _f	[] 1mM MgCl ₂	[] 2mM MgCl ₂	[] 3mM MgCl ₂	[] 4mM MgCl ₂
Buffer	1x	1x	1x	1x	1x
MgCl ₂	X	.333μl	.666μl	.999μl	1.333μl
DNTP's	.1mM	.1μl	.1μl	.1μl	.1μl
Primer Forward	.2mM	.2μl	.2μl	.2μl	.2μl
Primer Reverse	.2mM	.2μl	.2μl	.2μl	.2μl
Taq Polimerasa	1U/μl	.2μl	.2μl	.2μl	.2μl
H ₂ O	-	6.166μl	5.634μl	5.3μl	4.967μl
ADN	2μl	2μl	2μl	2μl	2μl
Total	-	10μl	10μl	10μl	10μl

Tabla de volúmenes de reactivos para cada reacción de PCR dependiendo de su concentración de magnesio .

Apéndice 4

Programas de amplificación del termociclador para ADN mitocondrial

Programa para los microsatélites
Mit-R1/R1-435/F1-435/Mit-R6/3FI_122/5R1_523

Fase	t°	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	32
Alineación	54°C	45 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

Concentración de reacción de PCR

	[] inicial	[] final	Volumen de reacción
Buffer	10x	1x	1.5µ
MgCl ₂	30mM	1.5mM	0.75µ
DNTP's	2.5mM	0.2mM	0.3µ
Primer Forward	10mM	0.53mM	0.6µ
Primer Reverse	10mM	0.53mM	0.6µ
Taq Polimerasa	5u/ml	1u/ml	0.2µ
ADN	40ng	80ng	3µ
H ₂ O	-	-	8.05µ
Total	-	-	15µ

Concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para la reacción de PCR de ADNmt.

Apéndice 5

Precipitación de productos de PCR

1. Agregar 45µl de H₂O
2. Agregar 7µl de EDTA 125mM (pH 8.4).
3. Agregar 7µl de NaOAc 3M (pH 5.2).
4. Añadir 130µl de alcohol al 100%.
5. Añadir de .2µl a 2µl de producto de PCR
6. Agitar en Vortex e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
7. Centrifugar a 14,000rpm durante 15 minutos.
8. Desechar con cuidado el alcohol.
9. Agregar 100µl de alcohol al 70%.
10. Centrifugar a 14,000rpm durante 15 minutos.
11. Desechar el alcohol y dejar secar.

Apéndice 6

Genotipos y valores de Diversidad Genética por locus

Locus	103	105	105	107	109	103	107	109	111	103	107	109	111	111	126	Total
1	107	107	109	109	109	111	111	111	111	113	113	113	113	115	126	
	4	1	3	3	1	7	6	4	13	1	1	1	1	1	1	48
Total	4	1	3	3	1	7	6	4	13	1	1	1	1	1	1	48

Locus 1: Microsatélites MAF36

MAF36	H_E	H_O	F_{IS}
48	0.7528	0.6875	0.05228

Valores de H_E , H_O y F_{IS} para el locus 1

Locus	117	117	119	117	119	123	117	119	125	Total
2	117	119	119	123	123	123	125	125	125	
	2	3	2	5	17	1	11	3	4	48
Total	2	3	2	5	17	1	11	3	4	48

Locus 2: Microsatélite MAF48

MAF48	H_E	H_O	F_{IS}
48	0.7558	0.8125	-0.0751

Valores de H_E , H_O y F_{IS} para el locus 2

Locus	126	126	128	126	128	130	128	Total
3	126	128	128	130	130	130	132	
	13	4	9	14	5	2	1	48
Total	13	4	9	14	5	2	1	48

Locus 3: Microsatélite MAF209

MAF209	H_E	H_O	F_{IS}
48	0.6558	0.5000	0.2376

Valores de H_E , H_O y F_{IS} para el locus 3

Locus	241	241	245	247	245	251	261	Total
4	241	245	245	247	251	251	263	
	8	5	1	4	11	2	17	48
Total	8	5	1	4	11	2	17	48

Locus 4: Microsatélite Aam 4

Aam 4	H_E	H_O	F_{IS}
48	0.8331	0.6875	0.1748

Valores de H_E , H_O y F_{IS} para el locus 4.

Apéndice 7

Frecuencias Alélicas por locus

Alelo 1	Conteo de muestra	Frecuencia	F_{IS}	R&H
103	12	0.1250	-0.1325	
105	4	0.0417	-0.0330	
107	15	0.1562	-0.1750	
109	13	0.1354	0.0318	
111	45	0.4688	0.2153	
113	4	0.0417	-0.0330	
115	1	0.0104	0.0000	
126	2		1.0000	
Total	96		0.0528	0.1163

Frecuencias alélicas del locus 1. Microsatélite MAF 36.

Alelo 2	Conteo de muestra	Frecuencia	F_{IS}	R&H
117	23	0.2396	-0.0759	
119	27	0.2812	-0.1750	

123	24	0.2500	-0.2122	
125	22	0.2292	0.1846	
Total	96		-0.0751	-0.0672

Frecuencias alélicas del locus 2. Microsatélite MAF 48.

Alelo 3	Conteo de muestra	Frecuencia	F_{IS}	R&H
126	44	0.4530	0.2546	
128	28	0.2917	0.5037	
130	23	0.2396	-0.0759	
132	1	0.0104	0.0000	
Total	96		0.2376	0.1480

Frecuencias alélicas del locus 3. Microsatélite MAF 209.

Alelo 4	Conteo de muestra	Frecuencia	F_{IS}	R&H
241	21	0.2188	0.7006	
245	18	0.1875	-0.0836	
247	8	0.0833	1.0000	
251	15	0.1562	0.1412	
261	17	0.1771	-0.2051	
263	17	0.1771	-0.2051	
Total	96		0.1748	0.2410

Frecuencias alélicas del locus 4. Microsatélite Aam 4.

Apéndice 9

Gráfica de probabilidad media sobre población.

En la gráfica se observa que en $k=1$ encontramos el mayor valor de probabilidad y la menor desviación estándar del análisis con las diez repeticiones para cada valor de k .

