



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**FILOGEOGRAFÍA Y GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN DEL  
VENADO BURA (*Odocoileus hemionus*) EN MÉXICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**DANIEL TORRES OROZCO JIMÉNEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
BIOL. MARCO ANTONIO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ  
2012**



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  
Torres Orozco  
Jiménez  
Daniel  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
408010102
2. Datos del Tutor  
Biol.  
Rodríguez  
Rodríguez  
Marco Antonio
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Piñero  
Dalmau  
Daniel Ignacio
4. Datos sinodal 2  
Dr.  
Martínez  
Meyer  
Enrique
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Medellín  
Legorreta  
Rodrigo
6. Datos del sinodal 4  
M. en C.  
Castellanos  
Morales  
Gabriela
7. Datos de la tesis  
Filogeografía y genética de la conservación del venado bura (*Odocoileus hemionus*) en México  
73 p.  
2012



---

La presente investigación se realizó bajo la tutoría del Biol. Marco A. Rodríguez Rodríguez y del Dr. Luis E. Eguiarte Fruns en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología de la UNAM con apoyo del proyecto “Conocimiento y Conservación de la Biodiversidad de Churince, Cuatro Ciénegas”

---



## AGRADECIMIENTOS

---

Agradezco todos los integrantes del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental que me ayudaron a realizar este trabajo. Especialmente al Dr. Luis Eguiarte y la Dra. Valeria Souza por abrirme las puertas del laboratorio. A Biol. Marco Rodríguez Rodríguez por su asesoramiento y paciencia a lo largo del proyecto. A los técnicos del laboratorio la Dra. Erika Aguirre y M. en C. Laura Espinoza por su apoyo. A doña Chivis por su entusiasmo y apoyo. A Enrique, Gaby, Jaime, Natalia y Santiago por su ayuda durante la creación de este documento. Y a todas aquellas personas con las que compartí esta enriquecedora experiencia dentro del Lab... a pesar de las prisas disfrute muchísimo y en gran parte eso se lo debo a ustedes. Gracias.

A los sinodales por sus comentarios y ayuda para mejorar la tesis.

Gracias también a la Dirección General de Vida Silvestre de la SEMARNAT, y a M.V.Z. Ivonne Cassaingé por la recolección de las muestras de pelo sin las cuales esta tesis no podría haberse realizado.

A la UNAM por brindarme una gran educación y muchísimas experiencias increíbles. A la Universidad de Helsinki, muy especialmente a Marika Karjalainen y Jacqueline DeFaveri por permitirme mi primera aproximación con el mundo de la Ecología y Evolución Molecular.

GRACIAS

Con cariño

A mis padres y a mi hermano Andy, por ser mi constante apoyo; sin ustedes nada de esto sería posible. De verdad, gracias. Los quiero.

A los abuelos, tíos y primos por los buenos momentos que hemos compartido.

Finalmente, a los buenos amigos, con los que compartí mi infancia y con los que he compartido mi juventud.



## RESUMEN

---

El venado bura (*Odocoileus hemionus*) es un cérvido de amplia distribución geográfica característico de la región Neártica occidental. La especie tiene una gran importancia ecológica, económica y social. En México, el venado bura actualmente está sujeto a la extracción cinegética, sin embargo, su plan de manejo no ha considerado hasta la fecha la importancia de los factores genéticos. El objetivo de esta investigación fue describir la diversidad genética y los patrones filogeográficos del venado bura en México mediante el uso de la región control y el NADH2 (ND2) (1 155 pb) de la mitocondria, bajo una perspectiva de conservación y manejo.

Se analizaron 94 individuos dentro de los estados de Baja California, Chihuahua y Sonora. Los resultados mostraron la existencia de 51 haplotipos y una alta diversidad genética ( $0.967 \pm 0.009$ ) en el venado bura, tanto haplotípica como nucleotídica, que se infiere es el producto de la expansión demográfica y de los grandes tamaños efectivos de sus poblaciones ancestrales. Además, este trabajo demostró que existen al menos tres unidades estructurales y de manejo distintas, las cuales concuerdan en gran medida con los estados de Baja California, Sonora y Chihuahua. Baja California Sur presenta los niveles más altos de diversidad genética y la red de haplotipos confirma que este haplogrupo presenta la mayor divergencia dentro de *O. hemionus*. La mayor diferenciación genética se encontró entre Chihuahua y el conjunto restante. La filogenia puede indicar que este haplogrupo es resultado de una introgresión.

En cuanto a las implicaciones de este estudio para el manejo de la especie, se recomienda, para preservar los procesos evolutivos, mantener el flujo genético entre poblaciones del mismo haplogrupo, incrementar el tamaño de las poblaciones y evitar la reintroducción de organismos de distintos linajes. Finalmente, se considera necesario realizar estudios más detallados sobre el origen de la población de Coyame, Chihuahua, así como investigar las relaciones de las subespecies isleñas de México no consideradas en este estudio.

## ABSTRACT

---

The mule deer (*Odocoileus hemionus*) not only plays a relevant role in the ecology of the southwest deserts of Mexico. It is also important in social and economic aspects of human activities. In Mexico *O. hemionus* is one of the most important big game mammals. Its conservation and management is held by private owners under the supervision of the specie's master management plan, nonetheless, this program does not take into account the genetic patterns. The objective of this investigation was to describe the genetic diversity and possible phylogeographic patterns of the mule deer in Mexico, assessed by mitochondrial markers (D-loop and NADH2), as a necessity for a successful conservation and management.

We found high levels of haplotype and nucleotide diversity ( $0.967 \pm 0.009$ ), which can be related to the enormous ancestral effective population size and the Pleistocene range expansion. In addition, we found significant structure levels within the populations from Baja California Sur, Sonoran and Chihuahuan populations. Furthermore, the analyses showed a single mule's deer haplotype network, with individuals from Baja California Sur with highest diversity. The highest differentiation was found between the Chihuahuan haplogroup with the rest where the phylogenetic relationships suggest that its origin could be related to a possible introgression event.

Our results suggest the need of designing different management planning in order to preserve the evolutionary processes within each lineage. If reintroductions are planned they should be done only within the same lineage. We also recommend to further study of the possible introgressed Chihuahuan population and the inclusion of the other Mexican subspecies as *O. fulginatus*, *O. sheldoni* and *O. cerrosensis*.

# ÍNDICE

---

## 1. INTRODUCCIÓN

<b>I.</b>	<b>El venado bura</b>	
i.	Generalidades	
a.	Descripción de la especie.....	2
b.	Ecología.....	3
c.	Distribución histórica.....	5
d.	Distribución actual en México.....	6
ii.	Importancia cultural, económica y social.....	7
iii.	Problemática del venado bura.....	8
<b>II.</b>	<b>La conservación y el manejo sustentable</b> .....	9
<b>III.</b>	<b>La genética de la conservación</b>	
i.	Genética de poblaciones.....	10
a.	Diversidad genética.....	10
b.	Diferenciación genética.....	11
ii.	Filogeografía.....	13
iii.	Unidades evolutivamente significativas.....	14
iv.	Marcadores moleculares.....	14
<b>IV.</b>	<b>Antecedentes</b> .....	16

## 2. OBJETIVOS

i.	Objetivo general.....	19
ii.	Objetivo particular .....	19

3. MÉTODOS	
<b>I. Área de estudio</b> .....	20
<b>II. Muestreo</b> .....	20
<b>III. Extracción de ADN</b> .....	20
<b>IV. Amplificación y secuenciación</b> .....	22
<b>V. Métodos estadísticos</b>	
i. Diversidad genética.....	23
ii. Estructura y diferenciación.....	24
iii. Filogénia molecular.....	26
iv. Análisis demográficos.....	27
v. Red de haplotipos.....	31
4. RESULTADOS.....	32
5. DISCUSIÓN.....	49
6. CONCLUSIONES.....	60
8. LITERATURA CITADA .....	62
9. APÉNDICES	
i. Anexo I .....	72
ii. Anexo II .....	73

“La genética tiene responsabilidades sociales en dos direcciones:  
La primera es colaborar en la planeación de la conservación de los sistemas biológicos con la finalidad de adquirir el mayor potencial evolutivo; la segunda es establecer una ética evolutiva, como parte de la ética social, en donde será aceptado por el hombre civilizado reconocer la existencia de otras especies como parte integral de su propia existencia. Esto requiere continuar con la evolución.”

Sir Otto Frankel, 1974.

Padre de la Genética de la Conservación

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## I. El venado bura (*Odocoileus hemionus*)

### i. Generalidades

#### a. Descripción de la especie

El venado bura es un artiodáctilo de la familia Cervidae que habita en el occidente de Norteamérica. Es junto con el venado cola blanca (*O. virginianus*) una de las dos especies del género *Odocoileus* y se considera un cérvido de tamaño mediano, comparado con las otras 40 especies de la familia (Gilbert *et al.*, 2006). La nomenclatura de género es complicada ya que ambas especies se asemejan en su tamaño corporal y la forma de sus astas y orejas e hibridan en zonas simpátricas (Heffelfinger, 2006). Actualmente los caracteres morfológicos diacríticos más evidentes son el tamaño de las glándulas metatarsales y preorbitales que son más conspicuas en el venado bura que en el cola blanca (Heffelfinger, 2006). Su nombre específico, *hemionus*, significa literalmente “medio-asno” debido a la similitud de sus orejas con la de los asnos (Heffelfinger, 2006).

La especie presenta un notable dimorfismo sexual. Los machos son más grandes que las hembras y en la edad adulta alcanzan un peso de entre 70 a 150 kg y una altura de un metro a la cruz del cuerpo (Anderson y Wallmo, 1984). Además, presentan astas deciduas anuales que crecen dicotómicamente de febrero a julio, las cuales se desprenden a finales del invierno (Anderson y Wallmo, 1984; Heffelfinger, 2006; MDWG, 2003). El color de su pelaje cambia homogéneamente de grisáceo, en invierno, a rojizo, en verano, salvo en la frente y en la punta de la cola que siempre muestran una coloración oscura (Anderson y Wallmo, 1984; Sánchez *et al.*, 2006). Las orejas grandes y la punta de la cola de color negro se cuentan entre sus características más distintivas (Heffelfinger, 2006) (ver Fig. 1.1).



Figura 1.1 Venado bura: (a) Dimorfismo sexual: macho con astas y hembra de menor tamaño (Martínez, 2007) (b) hembras juveniles gregarias (Sartore, 2011) (c) conducta de huida (Ray, 2012) (d) individuo en el que se aprecian sus grandes orejas (Perry, 2012).

## b. Ecología

Existen pocos estudios sistemáticos y a detalle sobre la ecología del venado bura en México (Weber y Galindo, 2005).

*Odocoileus hemionus* es un herbívoro medianamente selectivo en su dieta. Elige su alimento dependiendo de la estación del año y de los recursos disponibles. En los ecosistemas áridos de México es uno de los herbívoros nativos de mayor tamaño (Sánchez *et al.*, 2006) y su dieta está constituida principalmente por encinos (*Quercus spp.*), mezquites (*Prosopis spp.*), nopales (*Opuntia spp.*), sotol (*Dasyilirion spp.*), yucas (*Yucca spp.*) y gran diversidad de herbáceas (pastos) (Leopold, 1959).

No existen estudios sobre la reproducción del venado bura en México. Los estudios realizados en las poblaciones de Estados Unidos señalan que su fecundidad es directamente proporcional a la calidad y cantidad de alimento disponible en la época pre-reproductiva (MDWG, 2006). La época de reproducción de este venado ocurre de noviembre a diciembre, cuando machos y hembras son gregarios. En junio y julio,

después de 200 días de gestación, se presenta el pico de nacimientos. La tasa de nacimientos se considera alta y es de 1.0 a 1.9 crías/hembra/año (Ballard *et al.* 2001). Las hembras alcanzan su madurez reproductiva al año de edad, sin embargo, usualmente se reproducen hasta el segundo año. La longevidad media es de 9 a 11 años (MDWG, 2003), aunque existen registros de longevidad en animales de vida libre de hasta 20 años (Anderson y Wallmo, 1984).

El sistema de apareamiento del venado bura es polígamo. Durante la época reproductiva los machos permanecen con una hembra hasta que copulan con ella y después se dispersan, recorriendo a veces grandes distancias hasta encontrar otra hembra (Weber y Galindo, 2005). El venado bura es un animal que presenta conducta territorial facultativa relacionada con la temporada del año o de su etapa reproductiva (Anderson y Wallmo, 1984). Las hembras presentan un comportamiento filopátrico y forman unidades sociales de dos a ocho individuos. Los machos, en cambio, se dispersan al llegar a la madurez sexual (Anderson y Wallmo, 1984) y permanecen solitarios hasta la siguiente época reproductiva. El tamaño promedio del ámbito hogareño de *O. hemionus* es de 58.8 ha (Anderson y Wallmo, 1984).

En la actualidad existen pocos datos sobre la abundancia del venado bura en México (Sánchez *et al.* 2006), sin embargo, históricamente se han reportado densidades de 21.2 a 55.6 ind/ km<sup>2</sup> (Anderson y Wallmo, 1984). El reclutamiento anual está correlacionado con la cantidad de precipitación anual. Las densidades poblacionales cambian en función de la disponibilidad de agua en el ambiente, observándose las más altas densidades en sitios cercanos a las fuentes de agua (Heffelfinger *et al.* 2006).

El venado bura tiene gran importancia ecológica debido a su influencia sobre la red trófica de las comunidades donde vive. Martin y Klein (1984) sostienen que paleogeográficamente las extinciones de los grandes mamíferos herbívoros durante el Pleistoceno están correlacionadas con la expansión geográfica del venado bura. Aparentemente, la ausencia de competidores interespecíficos les permitió incrementar su rango de distribución y así se convirtieron en uno de los herbívoros de mayor tamaño corporal de los desiertos del suroeste de América.

Al carecer de depredadores sus poblaciones pueden presentar un crecimiento exponenciales aún en ambientes desfavorables (Smith, 1991). Por ello, su depredación es importante en la regulación de sus poblaciones. Existen varios depredadores naturales de *O. hemionus*, entre ellos el lobo (*Canis lupus*), el coyote (*Canis latrans*), el



puma (*Puma concolor*), el linco (*Lynx rufus*), los osos (negro, *Ursus americanus* y café, *U. arctos*), y el águila real (*Aquila chrysaetos*) (Anderson y Wallmo, 1984; Ballard *et al.*, 2001; Smith, 1991). De entre ellos, su depredador más frecuente es el coyote, el cual es reportado en el 70.59% de los estudios, seguido por el puma (17.64%) y el lobo (11.77%) (Ballard *et al.*, 2001).

### c. Distribución histórica

La distribución histórica del venado bura comprendía gran parte de Norteamérica Occidental, desde las islas costeras de Alaska, incluyendo las Grandes Praderas, las provincias de Saskatchewan, Alberta y Columbia Británica, hasta los estados de San Luis Potosí, Zacatecas y las islas Cedros y Tiburón en México (Anderson y Wallamo, 1981; Heffelfinger *et al.*, 2006; ver Fig. 1.2).

La talla corporal, el tamaño y forma de las astas, los hábitos alimenticios así como el resto de su morfología varían considerablemente a lo largo de su área de distribución. Con base en dichas variaciones morfológicas Hall y Wallamo (Anderson y Wallamo, 1981) reconocieron diez subespecies: *O. h. siitkensis*, *O. h. columbianus*, *O. h. hemionus*, *O. h. californinus*, *O. h. inyoensis*, *O. h. fulginatus*, *O. h. peninsulae*, *O. h. crooki*, *O. h. cerrosensis*, *O. h. sheldoni*. De éstas, las últimas cinco se distribuyen en el territorio mexicano (ver Fig. 1.2), siendo *O. h. fulginatus*, *O. h. peninsulae* y *O. h. crooki* subespecies continentales, mientras que *O. h. cerrosensis* y *O. h. sheldoni* son endémicas de Isla Cedros e Isla Tiburón, respectivamente. Debido a que las diferencias morfológicas de las poblaciones entre subespecies adyacentes son rara vez conspicuas (Heffelfinger, 2006), algunos autores han sugerido la revisión de estas unidades taxonómicas con la ayuda de herramientas moleculares (Nagorsen *et al.*, 1999).

Para facilitar el estudio de las poblaciones de venado bura sin considerar los problemas taxonómicos, DeVos y colaboradores (2003) dividieron su área de distribución en siete regiones ecológicas diferentes: el bosque lluvioso, el bosque boreal, la Gran Planicie, la Meseta del Colorado, el Oeste Intermontano, el Chaparral Californiano y los Desiertos del Suroeste. Aunque las poblaciones de México se ubican dentro de la ecorregión de los desiertos del suroeste, no se considera la gran diversidad de ambientes en donde habita el venado bura en México.

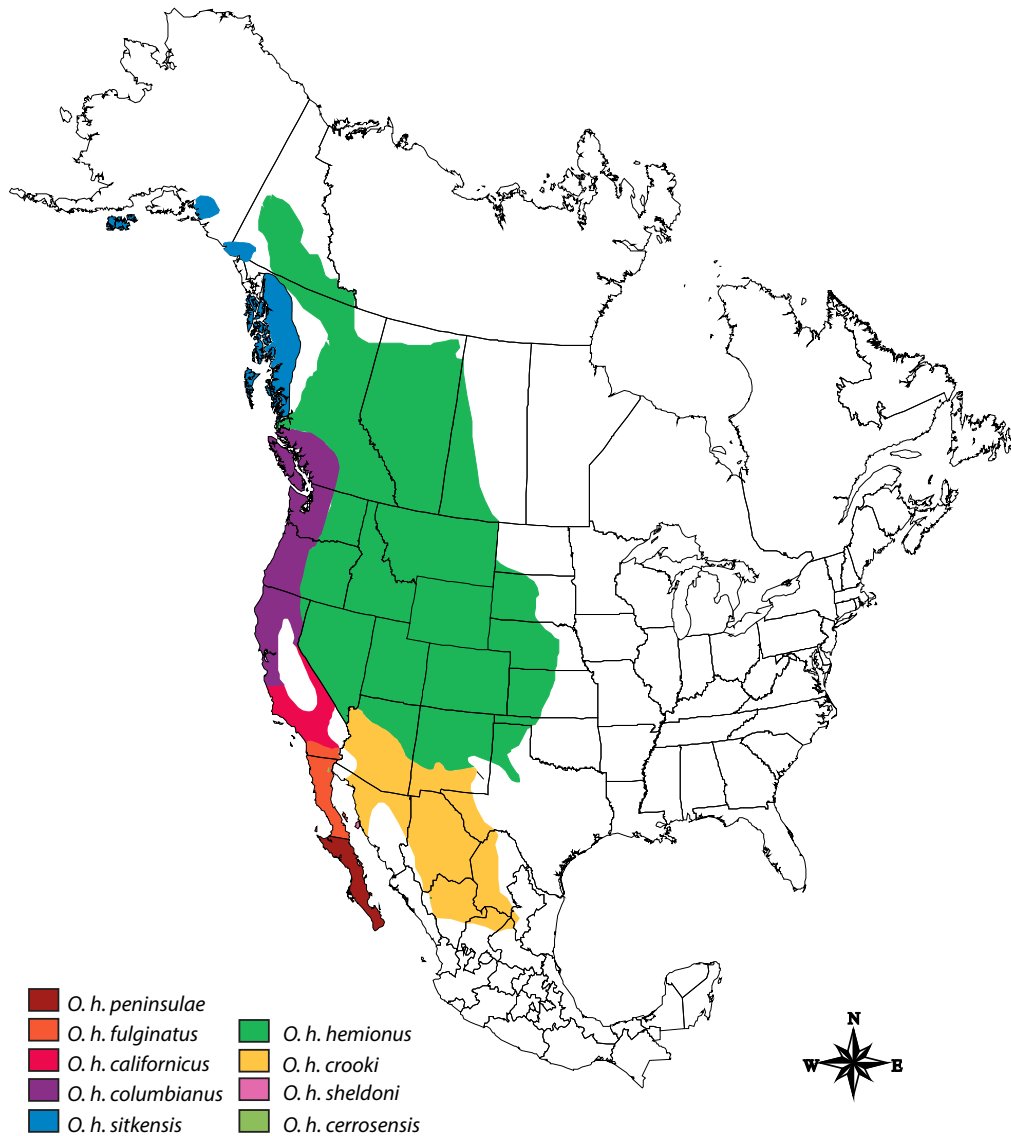


Figura 1.2 Distribución histórica del venado bura y de sus subespecies  
(Modificado de Heffelfinger *et al.*, 2006)

#### d. Distribución actual en México

En México, el venado bura habita principalmente en pastizales y matorrales xerófilos, pero también es posible encontrarlo en otros tipos de vegetación, como en las comunidades con vegetación halófila, en matorrales desértico rosetófilos, en mezquiales, chaparrales, bosques de pino y bosques de pino-encino (INEGI, Ceballos *et al.*, 2006).

El área de distribución histórica del venado bura en México ha disminuido recientemente. Así, en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua y Durango las poblaciones se presentan en parches geográficos aislados

(Gallina *et al.*, 2009; Heffelfinger *et al.*, 2006; MDWG. 2003; Sánchez *et al.*, 2006), mientras que las poblaciones de Isla Tiburón, Isla Cedros, y las de los estados de Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas y San Luis Potosí enfrentan un riesgo aún mayor de desaparecer (SEMARNAT, 2010). A pesar de que la información sobre la abundancia del venado bura en México es escasa, se estima que las poblaciones naturales poseen densidades bajas (SEMARNAT, 2010).

## ii. *Importancia cultural, económica y social*

El venado bura ha sido sujeto de inspiración para los pueblos indígenas de México, tanto en la creación de mitos como de artefactos. En muchas de las culturas precolombinas, el venado recibía una posición especial dentro de la cosmogonía de los pueblos y, aún actualmente, los huicholes, mazahuas, mexicas, kikapús, tarahumaras, tepehuanos, yaquis, coras y seris ven a los venados como hermanos, tótems o divinidades para los que organizan fiestas, bailes y reverencias (Mandujano *et al.*, 2010).

Por ejemplo, en la cultura huichol, el venado es un elemento importante por su simbolismo y su estética; recibe el nombre de *Tamatz Kayaumari* "nuestro hermano mayor cola de venado" y es el dueño de todas las criaturas (Barnett, 2009). Otra muestra está plasmada en la tradición sociocultural indígena yaqui llamada *Mazoyiwua* o la danza del venado. En la cosmología yaqui el venado es un animal lleno de armonía, verdad y belleza; así, el intérprete del venado es criado y educado siguiendo estos ideales.

Además de su importancia social, el venado bura es fuente de alimento y de materias primas para el vestido y calzado en diversas regiones de la República (Mandujano, 2010). Su alto valor comercial y su mal manejo principalmente por la caza para subsistencia y la caza deportiva, tanto furtiva como regulada han provocado su sobreexplotación en México (SEMARNAT, 2010; Weber y Galindo, 2005).

Distintas entidades del país cuentan con Unidades de Manejo Ambiental (UMA) cinegéticas en donde se permite la caza legal de venado bura. Durante el año 2011 SEMARNAT aprobó el aprovechamiento de 231 individuos de *O. hemionus* en todo el país (DEGEIA, 2011). Cada UMA ofrece distintos paquetes turísticos para la caza. Sonora es el estado con mayor aprovechamiento cinegético de venado bura en el país, seguido por Coahuila y Chihuahua, en donde el uso de este recurso representa una fuente importante de ingresos y una alternativa para la conservación de los ecosistemas (Sánchez *et al.*, 2006)

### iii. Problemática del venado bura

A pesar de la gran importancia que el venado bura representa como recurso económico para las poblaciones humanas y de su importancia ecológica, en México se han desarrollado pocas investigaciones sobre el mismo. Entre los principales problemas que enfrentan las poblaciones de este mamífero están: la caza ilegal, la pérdida de hábitat, la depredación por la fauna feral, así como la ganadería (Sánchez Rojas et al., 2008). Aunque la especie no se considera en peligro, tres de las cinco subespecies mexicanas designadas morfológicamente (*O. h. cerrosensis*, *O. h. penninsulae* y *O. h. sheldoni*) presentan problemas de conservación (Gallina et al., 2009). Las subespecies isleñas, *O. h. sheldoni* y *O. h. cerrosensis*, están protegidas por la legislación mexicana (NOM-059-ECOL-2010), ya que se encuentran en la categoría de Amenazada (A) y sujeta a protección especial (P), respectivamente (SEMARNAT, 2010; Sánchez Rojas et al., 2008).

En 1997 surgió en México el esquema de las Unidades de Manejo Ambiental (UMA) con el fin de promover la conservación biológica mediante el aprovechamiento sustentable de los recursos naturales y combatir la sobreexplotación y la caza furtiva (SEMARNAT, 2010). Las acciones del Plan de manejo del venado bura dentro de las UMAs incluyen el monitoreo poblacional, zoonosanitario, veterinario y de hábitat, así como la mitigación de los cambios de la comunidad vegetal y revertir la perturbación causada por sequías, sobrepastoreo e incendios; también se contempla el combatir los factores limitantes, como el abastecimiento de agua y la competencia con el ganado (Lutz et al., 2003; MDWG, 2003; SEMARNAT, 2010), sin embargo, no considera la evaluación de aspectos genéticos poblacionales.

En México, el manejo de las poblaciones del venado bura requieren de estudios de genética de poblaciones, así como de un conocimiento más profundo de sus procesos evolutivos y filogeográficos. Es necesario identificar las relaciones que existen entre las distintas poblaciones de *O. hemionus* a partir de análisis moleculares con ADN mitocondrial para con ello, contribuir al manejo de las poblaciones en cautiverio y en consecuencia, a la conservación de la especie. Así, el objetivo de este estudio es conocer las relaciones filogeográficas del venado bura (*Odocoileus hemionus*) de México usando como marcador genético secuencias de ADN de mitocondria, para avanzar en la comprensión de su ecología evolutiva y la identificación de sitios prioritarios para mejorar las estrategias de manejo y conservación y nos permitan entender su ecología evolutiva.

## II. La conservación y el manejo sustentable

La conservación y el manejo son herramientas humanas que requieren de una planeación sistemática, pues los recursos económicos destinados a dicho propósito son limitados (Moilanen y Meller, 2011). Por ello la toma de decisiones sobre conservación deben sustentarse en investigaciones integrales que consideren las metas de manejo y conservación, de tal forma que se logren la mayor cantidad de beneficios al menor costo posible (Moilanen y Meller, 2011).

La meta de la conservación es la preservación de los procesos evolutivos dentro de los linajes (Crandall *et al.*, 2000; Eguiarte y Piñero, 1990; Frankel, 1974), manteniendo así tanto los recursos naturales como su potencial evolutivo. Existen formas directas (*v. gr.*, diferencias en las historias de vida, morfología, hábitat) e indirectas (*v. gr.*, análisis moleculares) para conocer los procesos evolutivos. Los análisis moleculares permiten distinguir los distintos patrones evolutivos que han moldeado la variación genética y la estructura de las poblaciones de una especie en el espacio a través del tiempo. La identificación de dichos procesos, así como del flujo genético y la estructura de las poblaciones, es vital para lograr un manejo eficiente de las poblaciones (Crandall *et al.*, 2000).

Un manejo de poblaciones en cautiverio que no considere los aspectos genéticos puede provocar problemas diversos, como la pérdida de variación genética, depresión por endogamia, deriva genética y adaptaciones al cautiverio, lo cual puede repercutir negativamente en la viabilidad de las poblaciones, al erosionar su diversidad genética (Soulé, 1985; Eguiarte y Piñero, 1990; Frankham *et al.*, 2002). Una alternativa para evitar esta erosión genética es a través del uso de herramientas de genética de poblaciones en el manejo de las poblaciones (Hedrick, 2011).

### III. La genética de la conservación

La genética de la conservación es la aplicación de herramientas moleculares y su análisis a partir de la genética de poblaciones para lograr la preservación de las especies como entidades dinámicas capaces de hacer frente a los cambios ambientales (Eguiarte y Piñero, 1990; Frankham *et al.*, 2002). En otras palabras, es la síntesis de varias disciplinas como la genética de poblaciones y la filogeografía con un mismo objetivo: la conservación o preservación de los procesos evolutivos (Crandall *et al.*, 2000).

#### *i. Genética de poblaciones*

La genética de poblaciones estudia la evolución de las poblaciones, es decir, de los cambios que se presentan en la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones en el tiempo a través de sus frecuencias alélicas (Hedrick, 2011). Parte de un modelo nulo, llamado principio de Hardy-Weinberg, caracterizado y modelado a partir de una población infinita, con apareamientos aleatorios, carente de cualquier fuerza evolutiva –mutación, deriva genética, flujo génico, selección natural- que afecte la distribución de las frecuencias alélicas para explicar distintos procesos evolutivos (Hedrick, 2011). A partir del rechazo de éste modelo nulo es posible conocer las desviaciones del apareamiento aleatorio y explorar la presencia de procesos como la selección, la deriva genética y la endogamia (Frankham *et al.*, 2002).

#### *a. Diversidad genética*

Toda la diversidad biológica es el resultado de la transformación de la variación genética dentro de la población que conlleva a diferencias entre poblaciones y grupos taxonómicos superiores (Charlesworth y Charlesworth, 2010). Por esto, la diversidad genética es el componente más básico de la biodiversidad (Piñero *et al.*, 2008) y es considerada como el motor de la evolución. La cantidad y tipo de variación genética en las poblaciones está influenciada por la ecología del organismo (*v. gr.*, densidad poblacional sistemas de apareamiento, patrones de dispersión, preferencia de hábitat), por los procesos demográficos (*v. gr.*, expansión y reducciones demográficas) y por diversos factores genéticos como la selección, la mutación, el intercambio genético y la deriva genética (Hedrick, 2011; Piñero *et al.*, 2008).

La comprensión de la diversidad genética es fundamental para entender los procesos evolutivos y planear la conservación (Piñero *et al.*, 2008). Por ejemplo, la mayoría de las especies amenazadas o que han experimentado cuellos de botella presentan una variabilidad genética menor que las especies no amenazadas o con tamaños poblacionales grandes (Frankham *et al.*, 2002). En este sentido, las acciones de conservación deben procurar tanto el incremento del tamaño poblacional como el de la diversidad genética. Además, hay una correlación entre la pérdida de variación genética con el decremento en la sobrevivencia y reproducción de los individuos (Rocha y Gasca, 2007). Por esto, el dogma central de la genética de la conservación supone que una variabilidad genética alta es benéfica y por lo tanto debe ser conservada (Pertoldi *et al.* 2007).

#### b. Diferenciación genética

La diversidad genética de una especie puede estar distribuida diferencialmente entre sus poblaciones y dar como resultado una estructura genética. Así, la estructura genética es el resultado de la acción diferencial de las diversas fuerzas evolutivas en distintas poblaciones de tamaño finito (Hedrick, 2011). Por ejemplo, las poblaciones pueden diferir en su diversidad genética debido a cambios en las frecuencias de las variantes (*i.e.*, alelos, haplotipos) debido a la acción de procesos estocásticos dependientes del tamaño poblacional – deriva génica –, o como consecuencia de ventajas o desventajas relativas de un genotipo sobre otros bajo ciertas condiciones ambientales – selección natural –, así como por un intercambio genético preferencial entre ciertos genotipos (*v. gr.*, apareamientos no aleatorio) (Hedrick, 2011).

La diferenciación poblacional puede ser evaluada con los estadísticos que miden la subdivisión poblacional (*v. gr.*,  $F_{ST}$  y sus análogos) y por las diferencias en las frecuencias alélicas entre dos poblaciones (*v. gr.*, distancia genética de Nei (1987)), entre otros métodos (Frankham *et al.*, 2002). Medir la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones ( $F_{ST}$ ) resulta ventajoso, ya que permite estimar indirectamente el flujo génico que existe entre las poblaciones. Para estudiar el flujo génico, Sewall Wright (1951) propuso dos modelos: el modelo de islas y el modelo de aislamiento por distancia. El primero supone que los organismos se encuentran en poblaciones discretas, como islas, en donde la mutación y la deriva génica promueven la diferenciación poblacional; el segundo, en cambio, infiere que los individuos se distribuyen en un continuo y que la probabilidad de intercambio genético disminuye con la distancia geográfica (Aguirre, 2007). A partir de ambos modelos es posible

calcular el número de migrantes promedio por generación ( $Nm$ ). En el modelo de islas infinitas cada isla tiene el mismo número poblacional ( $N$ ) y recibe una misma proporción constante de migrantes ( $m$ ), entonces, la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones ( $F_{ST}$ ) dependerá tanto del tamaño de la población ( $N$ ) como de la tasa de migrantes ( $m$ ) por generación (Aguirre, 2007). A partir de esta relación es posible calcular el número promedio de migrantes por generación para organismos diploides como  $Nm \approx \frac{1}{4} (1/F_{ST} - 1)$ , donde un número mayor o igual a uno indica que el flujo génico homogeneiza los cambios diversificadores de la selección o deriva (Avice, 2000). Por otro lado, el modelo de aislamiento por distancia busca una relación lineal significativa entre el flujo génico de pares de poblaciones ( $M$ ) con la distancia geográfica entre ellas. Las poblaciones con un alto intercambio genético poseerán una variabilidad genética similar y, al contrario, las poblaciones con flujo génico limitado tenderán a la divergencia.

No todos los individuos de una especie contribuyen a la evolución de la misma manera, al contribuir de manera diferencial pero aleatoria a la composición genética de la siguiente generación. El mismo número poblacional en linajes separados puede tener impactos genéticos distintos al diferir en número de individuos estériles, juveniles, post-reproductivos, proporción de sexos y apareamiento no aleatorio (Frankham *et al.*, 2002). Wright propuso el término de tamaño efectivo ( $N_e$ ) definido como el tamaño de una población ideal que pierde diversidad genética – por deriva o endogamia – a la misma tasa que la población observada. La conversión del tamaño poblacional al tamaño efectivo permite realizar comparaciones entre especies con diferente estructura y sistemas de apareamiento y por tanto es una herramienta importante en la genética de la conservación (Frankham *et al.*, 2002; Moreno, 2007). Más aún, gracias al tamaño efectivo poblacional es posible conocer la historia evolutiva de una especie, ya que su cálculo en análisis filogeográficos permite identificar procesos demográficos (*v. gr.*, cuellos de botella y expansiones poblacionales; Moreno, 2007).

La aplicación de estadísticos de genética de poblaciones en la conservación permite realizar un manejo adecuado de los recursos, no obstante los análisis de la estructura poblacional pueden ser más informativos si se considera el espacio geográfico (Frankham *et al.*, 2002)



## ii. *Filogeografía*

El análisis filogeográfico permite inferir los factores históricos que han moldeado la variación de los linajes genealógicos de las poblaciones en su distribución geográfica (Avice, 2000). Este análisis interpreta conjuntamente datos ecológicos, biogeográficos y de la genética de poblaciones (*v. gr.*, estadísticos  $F$ , el número de migrantes y el tamaño efectivo entre poblaciones) para explicar patrones geográficos (Domínguez-Domínguez *et al.*, 2009). Es una herramienta útil para reconocer los procesos demográficos históricos (*v. gr.*, refugios pleistocénicos, vicarianza, extinción) y evolutivos (*v. gr.*, especiación y adaptación) que han moldeado la distribución actual de los linajes genéticos de un taxón (Beebe y Rowe, 2003). Esta facultad integradora ha situado a la filogeografía como punto de unión entre la microevolución y la macroevolución (Avice, 2000).

La reconstrucción filogeográfica clásica se basa en la elaboración de un árbol filogenético que muestra las relaciones genealógicas de un marcador molecular resultado de la interacción de distintas fuerzas evolutivas y procesos demográficos. La coalescencia es un método con gran aceptación en la actualidad para analizar las relaciones genealógicas de secuencias mitocondriales. Parte del principio de que todas las diferencias de las secuencias entre individuos y entre poblaciones surgieron de una secuencia ancestral determinado tiempo atrás. De esta forma, la coalescencia busca remontarse en el tiempo hasta el punto en que dos variantes haplotípicas coalescen (convergen en el tiempo) en una sola secuencia ancestral (Frankham *et al.*, 2002). Los resultados generalmente se muestran en árboles filogenéticos, llamados en este contexto genealogías de genes. La topología del árbol permite la detección de procesos como la selección, el aislamiento entre poblaciones, la migración y cambios en el tamaño efectivo (Frankham *et al.*, 2002). Posteriormente, dicha genealogía es sobrepuesta en el espacio geográfico. Este tipo de análisis cuentan con la ventaja de presentar los datos de una forma gráfica y sencilla, como lo son las redes filogenéticas (Beebe y Rowe, 2003).

Así entonces, la filogeografía permite reconocer diferencias infraespecíficas en los patrones geográficos, como el flujo genético y la estructura de las poblaciones. Estos componentes son vitales para identificar linajes evolutivamente independientes que presenten un potencial evolutivo diferente al resto de la especie (Guia *et al.*, 2006). Este método permite identificar sitios prioritarios para la conservación (*v. gr.*, unidades evolutivas significativas, grupos operativos, unidades de manejo) en función de sus

niveles de diversidad y distribución genética para realizar un manejo eficiente de los recursos naturales, principalmente de las poblaciones de fauna (Crandall *et al.*, 2000).

### *iii. Unidades evolutivas significativas*

En 1986, Ryder definió una unidad evolutiva significativa (ESU, por sus siglas en inglés) como aquella población que ha estado aislada de otros grupos de la misma especie el tiempo suficiente para haber desarrollado atributos genéticos diferentes (Guia *et al.* 2006), sin embargo, no mencionó ningún método para su identificación. Actualmente, la aproximación más utilizada consiste en buscar la monofilia recíproca del ADN mitocondrial y una divergencia significativa en las frecuencias alélicas nucleares entre distintas poblaciones (Moritz, 1994). Sin embargo, la definición de Moritz es más efectiva para evaluar el aislamiento genético que para examinar la persistencia del potencial evolutivo (Guia *et al.*, 2006). Actualmente, el debate sobre la metodología para identificar una ESU es extenso y la elección del procedimiento depende de los autores.

Crandall y colaboradores (2000) proponen evaluar las ESU a partir del rechazo a la intercambiabilidad (*exchangeability*) de los miembros entre distintas poblaciones en escala histórica y reciente. En una población panmíctica, todos los individuos son intercambiables entre sí tanto genética como ecológicamente. En otras palabras, un individuo será ecológicamente intercambiable si al introducirlo a otra población ocupa el mismo nicho ecológico y será genéticamente intercambiable si entre las poblaciones existe el mayor flujo genético posible. En este sentido, ambos intercambios limitan la dispersión de nuevas variantes a través de la ausencia de deriva genética y selección natural, así como por la presencia de flujo genético. El intercambio es rechazado cuando existen evidencias de diferenciación poblacional causadas por selección, deriva o flujo génico restringido y da como resultado una ESU parcial con implicaciones importantes en la conservación de las especies (Crandall *et al.* 2000).

### *iv. Marcadores moleculares*

El análisis de la ecología y la evolución molecular requiere de la utilización de marcadores moleculares que permitan conocer la variación genética. Los marcadores moleculares son universales y se distinguen entre sí por su grado de polimorfismo, dominancia y procedencia (Rentería, 2007).

La elección de un marcador no es un asunto trivial. El ADN mitocondrial (ADNmt) es el marcador molecular empleado en el 80% de los estudios filogeográficos en animales (Awise, 2000; Beebee y Rowe, 2003). Entre sus cualidades están la gran cantidad de mitocondrias presente en tejidos animales, su fácil amplificación en PCR, su haploidia, la ausencia de recombinación, su herencia matrilineal asexual y su alta tasa de mutación la cual permite obtener sitios polimórficos (Beebee y Rowe, 2002; Piñero *et al.*, 2008; Vázquez, 2007). Además, su transmisión por vía materna permite inferir el sistema de apareamiento y los patrones de dispersión femeninos (Setchell y Curtis 2003).

La mitocondria tiene 37 genes, de los cuales los más usados para conocer los procesos filogeográficos son la región control, el citocromo B y NADH subunidad dos (Beebee y Rowe, 2003; Zink *et al.* 2006). Donde los conjuntos de variantes de cada una de las secuencias de ADNmt reciben el nombre de haplotipos.

La región control es la principal región no codificante del ADN mitocondrial. Esta región se caracteriza por presentar un fragmento conservado flanqueado por dos regiones hipervariables (Douzery y Randi, 1997). Su empleo en estudios de genética de poblaciones y filogeografía de cérvidos es amplio y abarca desde estudios taxonómicos de la familia Cervidae (Douzery y Randi, 1997; Hundertmark *et al.*, 2003), hasta estudios filogeográficos (Zachos *et al.*, 2003; Pérez-Espona *et al.*, 2009) y de conservación (Zeng *et al.*, 2007). Gracias a estos trabajos se ha podido determinar la tasa promedio de evolución de la región control en los cérvidos, siendo ésta de  $0.17 \pm 0.04\%$  transversiones/millón de años/linaje (Douzery y Randi, 1997).

El NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) es la segunda subunidad de genes codificantes en la mitocondria encargados de transferir electrones durante la cadena respiratoria (Nelson y Cox, 2000). El ND2 ha sido utilizado ampliamente en estudios de genética de poblaciones y filogeografía de peces (Broughton, 2000; Mateos, 2005;), aves (Zink *et al.*, 2006; Kearns *et al.*, 2009) y mamíferos (Stanley *et al.*, 2005) donde a pesar de ser un gen codificante las presiones selectivas no influyen sobre la topología filogenética (Zink *et al.*, 2006).

#### IV. Antecedentes

La genética del venado bura ha sido poco estudiada. Los estudios existentes se centran en las introgresiones entre *O. virginianus* (venado cola blanca) y *O. hemionus* (Cathey *et al.* 1998; Carr *et al.*, 1986). Los datos moleculares mitocondriales y del cromosoma Y sugieren que la hibridación ocurre en ambos sentidos, es decir, tanto entre machos de cola blanca y hembras de bura, como entre machos bura y hembras cola blanca (Cathey *et al.*, 1998). No obstante, el comportamiento de apareamiento más agresivo de machos bura promueve que los híbridos más frecuentes sean producto de los machos bura con hembras cola blanca (Carr *et al.*, 1986; Heffelfinger, 2006).

La filogeografía del venado bura también ha sido pobremente estudiada. Pease y colaboradores (2009) estudiaron la genética del paisaje del venado bura de California para reconocer los factores ecológicos o históricos que han promovido su diferenciación genética. Analizaron 18 microsátélites y observaron que las poblaciones se subdividían en cinco grupos. Posteriormente, evaluaron las barreras históricas al flujo genético mediante la secuenciación de la región control del ADN mitocondrial y obtuvieron dos clados diferentes. El modelado de nicho en el último máximo glacial mostró dos subgrupos concordantes con los del ADNmt en vez de los cinco esperados si la separación genética actual datara del Pleistoceno. Así, los autores concluyeron que la diferenciación genética actual del venado bura en California corresponde en mayor medida a los factores ecológicos y a las preferencias de hábitat que a los eventos de recolonización post-glacial. No obstante, el estudio del venado bura en toda su área de distribución podría arrojar resultados distintos.

Durante el Cuaternario, las glaciaciones repetidas fueron los agentes que moldearon la trayectoria evolutiva de distintas poblaciones, incluidas las de *O. hemionus*. Existen dos hipótesis que podrían explicar la relación entre las glaciaciones y la discontinuidad genética que se observa en las especies. La hipótesis de la recolonización postula que las especies sobrevivieron en dos o más regiones o refugios separados durante la glaciación y posteriormente entraron en contacto (Latch *et al.* 2009). En cambio, la hipótesis de borde frontera (*leading border*) sugiere que todos los individuos sobrevivieron al sur y que durante el deshielo los migrantes de largas distancias fueron colonizando ciertas zonas y dispersaron sus genes (Latch *et al.* 2009). Latch y

colaboradores (2009) realizaron la primera revisión filogeográfica del venado bura a lo largo de casi toda su área de distribución, buscando identificar los refugios pleistocénicos potenciales y los patrones de recolonización. El grupo investigó la región control (*D-loop*) y el citocromo B (*cytB*) mitocondrial de 1766 individuos, reconociendo una alta diversidad haplotípica ( $h_d=0.89$ ) y nucleotídica ( $\pi = 7.34$ ). La red de haplotipos agrupó los 496 haplotipos identificados en 12 haplogrupos diferentes, cinco de los cuales se presentan en México. Tanto la red de haplotipos como el árbol filogenético separaron al venado cola negra (*O. hemionus sitkensis* y *O. h. columbianus*) de los restantes grupos de venado bura. La topología de la red de haplotipos obtenida por ellos sugiere que ocurrió una expansión hace 19,000 años, fecha que se aproxima a la del deshielo de los glaciares que ocurrió entre hace 10,000 y 15,000 años. Con estos resultados, concluyen que la hipótesis de borde frontera (*leading border*) es la que se ajusta mejor a los patrones filogeográficos del venado bura.

El trabajo de Latch *et al.* (2009) es una buena aproximación para conocer la historia de *O. hemionus*, sin embargo, no considera una muestra representativa de la especie en México. Ningún trabajo hasta la fecha ha abordado la genética del venado bura y sus implicaciones para la conservación y manejo en nuestro país. No obstante, existen distintas investigaciones de genética de la conservación y filogeografía de otros cérvidos, principalmente del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), del ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y sus subespecies.

Según Heffelfinger (2006), el venado bura es un híbrido antiguo, resultado del apareamiento durante el Pleistoceno, del venado cola blanca con el venado cola negra. Los estudios filogenéticos concuerdan con el registro fósil al calcular la divergencia hace 1.4 a 4.3 millones de años, convirtiendo al género *Odocoileus* en uno de los más recientes de la familia de los cérvidos (Douzery *et al.* 1997).

El género *Odocoileus* presenta por lo general altos niveles de diversidad haplotípica ( $H_d$ ), además de niveles muy variables de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y de estructura, ver Tabla 1. (Calderon-Lobato 2009; Latch *et al.* 2009; Moscarella. 2001; Pease *et al.* 2009; Prudue *et al.* 2000; Ruiz García *et al.* 2007). La mayor parte de los trabajos de filogeografía y genética de poblaciones del género se centran en *O. virginianus* y reportan altos niveles de diversidad haplotípica, valores de diversidad nucleotídica que van de 0.026 a 0.882 y niveles de estructura poblacional que varían entre 0.189 y 0.63 en la región control mitocondrial. Hasta la fecha, sin embargo, no

existen reportes a profundidad sobre la genética de poblaciones ni de filogeografía del venado bura en México.

Tabla 1. Diversidad y estructura genética del género *Odocoileus*. (n= número de individuos;  $h$  = número de haplotipos;  $H_d$ = diversidad haplotípica;  $\pi$ = diversidad nucleotídica; Tajima  $D$ = Prueba de neutralidad de Tajima  $F_{ST}$ = diferenciación genética (estructura); \*=  $\Phi_{ST}$ ).

Sitio	n	H	h	$\pi$	Tajima D	Fst	Referencia
<i>O. hemionus</i>							
				0.037			
Toda la distribución	1766	496	0.89	(SD±0.018)	-	-	Latch et al. 2009
California	65	53	-	-	-	0.77	Pease et al. 2009
<i>O. virginianus</i>							
Venezuela	26	23	0.99	0.026	-	0.267	Moscarella et al. 2003
México	66	58	0.879	0.571-0.8824	-	0.189 *	Calderon-Lobato, 2009
Noreste de México	105	24	-	-	-	-	Logan-Lopez et al. 2007
EUA	370	15	0.41	-	-	0.63	Prudue et al. 2000
Colombia	4	-	-	0.0454	0.193	-	Ruiz-García et al. 2007

## 2. OBJETIVOS

---

### Objetivo General

- ⤴ Describir la diversidad genética y los patrones filogeográficos del venado bura (*Odocoileus hemionus*) en México, bajo una perspectiva de manejo y conservación.

### Objetivos Particulares

- ⤴ Estimar los niveles de diversidad y diferenciación genética entre las poblaciones de venado bura en México mediante el uso de marcadores mitocondriales.
- ⤴ Conocer los posibles factores que determinaron la distribución actual de los linajes genéticos del venado bura en México.
- ⤴ Generar información fundamentada en datos moleculares que permita complementar los planes actuales de manejo y aprovechamiento sustentable del venado bura en México y contribuir con ello al desarrollo de estrategias adecuadas para su conservación.

### 3. MÉTODOS

---

#### I. Área de estudio

El área de estudio abarca distintas poblaciones en confinamiento sujetas a manejo dentro de la distribución natural de venado bura en los estados de Chihuahua, Sonora y Baja California Sur. En toda la región el clima es seco y con vegetación predominante de tipo matorral xerófilo. Las poblaciones muestreadas en el desierto Sonorense se restringen al municipio de Comondú dentro de la Sierra de la Giganta en Baja California Sur y a los municipios de Carbó, Caborca y Benjamín Hill al noroeste de Sonora. Por lo que respecta a Chihuahua, las poblaciones se encuentran dentro del desierto Chihuahuense en el municipio de Coyame. (ver Fig. 3.1)

#### II. Muestreo

En el presente trabajo se analizaron 94 muestras de pelo obtenidos de trofeos cinegéticos que representan distintos individuos de venado bura que se encontraban en encierros dentro del rango de distribución geográfica de la especie, en los estados de Sonora (n= 60), Chihuahua (n= 23) y Baja California Sur (n=11) (ver Tabla 3.1 y Fig. 3.1). La colecta de muestras se realizó a través de la Delegación Federal de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) de cada estado y fueron donadas por la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la SEMARNAT al Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM. Todas las muestras fueron almacenaron a -80°C hasta su extracción.

#### III. Extracción de ADN

La extracción del ADN a partir del folículo piloso se efectuó siguiendo el protocolo de Extracción de Chelex al 5% (*Resina BioRad Chelex 100*) (ver Anexo I) realizando la digestión de las proteínas con Proteinasa K. Posteriormente se precipitó el ADN (ver Anexo II) con el objetivo de incrementar su calidad y evitar inhibidores de la amplificación.



Tabla 3.1 Sitios de procedencia de las muestras utilizadas en este estudio  
y número de muestras por sitio.

(n= número de individuos muestreados)

Estado	Municipio	UMA	n	Latitud	Longitud
Chihuahua	Coyame	Santa Anita (STA)	5	29.461014	105.250000
	Coyame		18	29.471194	105.127972
Sonora	Caborca	La Candelaria (CAN)	35	30.351725	112.508775
	Carbó	Rancho 60 (RAN)	10	29.660508	111.018100
	Caborca	El Tepeyac (TEP)	6	30.194950	112.396111
	Benjamin Hill	Las Animas (ANI)	5	30.823889	111.304861
	Caborca	La Tortuga (TOR)	3	30.673547	112.140678
	Guaymas	Baboyagüi (BAB)	1	28.496697	110.660303
	BCS	Comondú	El Rosario (ROS)	2	25.200556
Comundú		Los Pumas (PUM)	9	26.070789	111.844200
			94		

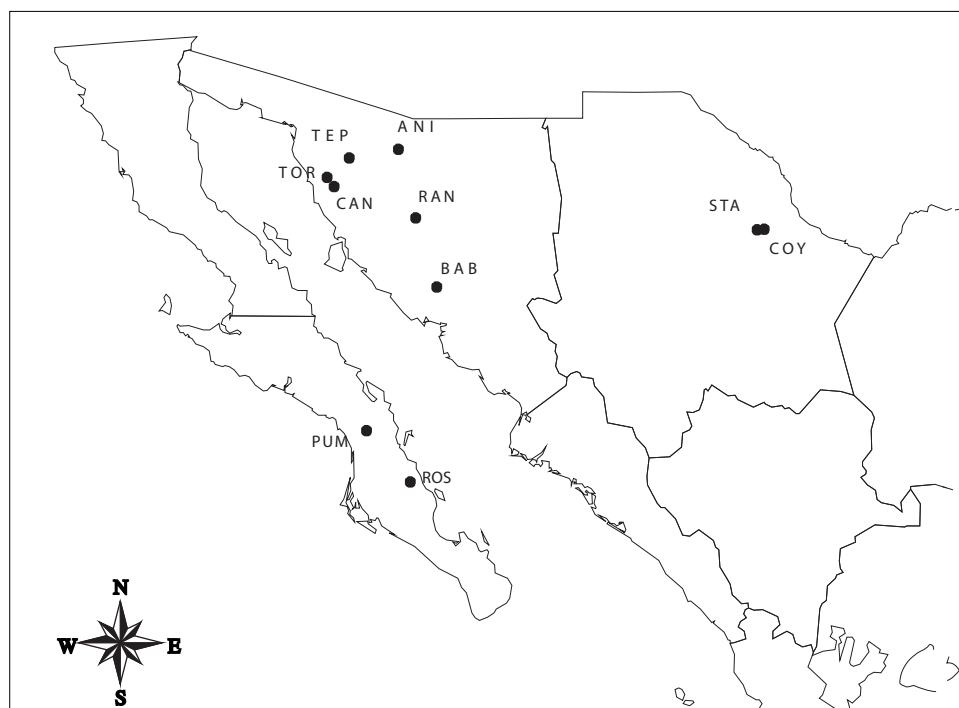


Figura 3.1 Ubicación de las poblaciones consideradas en el presente estudio

(En Baja California PUM= Los Pumas, ROS=Rosario; en Sonora BAB= Baboyagüi, RAN=Rancho el 60, CAN=Candelaria, TOR=La Tortuga, TEP=El Tepeyac, ANI=Las Animas, en Chihuahua STA=La Santa y COY= Coyame)

#### IV. Amplificación y secuenciación

La región control del ADN mitocondrial se amplificó a través de tres pares de cebadores (= *primers*; F1 – R1, F2 – R2, F1-435 – Mit-R6) mientras que para el ND2 se utilizó sólo uno (ver Tabla 3.2). Todas las amplificaciones fueron realizadas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un volumen de 25 µl utilizando concentraciones de 1x de amortiguador, 1.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP, 0.4 mM de cada cebador, 1 U/µl de polimerasa y 3 µl ADN para los cebadores F2, F1-435 y ND2; mientras que para la amplificación de F1 se utilizaron 2.5mM de MgCl<sub>2</sub> y 2µl de ADN.

Las condiciones de amplificación para los marcadores F1, F2 y ND2 fueron las propuestas por M. Rodríguez-Rodríguez (en preparación). Todas las reacciones contaron con un ciclo de desnaturalización de 94°C, seguidas de treinta ciclos de 94°C de desnaturalización por 30 segundos, una temperatura de alineación que varió para cada región por 45 segundos, una temperatura de extensión de 72°C durante dos minutos para finalizar con un único ciclo de 72°C de extensión por siete minutos. La Tabla 3.2 muestra las temperaturas de alineación para cada región amplificada y la secuencia de cada uno de los cebadores utilizados.

Tabla 3.2 *Primers* y temperaturas de alineación (T<sub>m</sub>) utilizadas para la amplificación de la Región Control y ND2

M= A ó C; Y= C ó T; S= G ó C; W= A ó T

Primer	Secuencia (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C) Referencia
<i>Región Control</i>		
Hipervariable 1 F1	CAGTTTTGCACTCMAYAGCCA	64 Rodríguez-Rodríguez, en preparación
R1	TAGRTGAGATGGCCCTGWAGA	
Conservada F2	CCGYCCCYTAGATCACGAGCT	58 Rodríguez-Rodríguez, en preparación
R2	GGGSCCTYWGACGGCCATAGC	
Hipervariable 2 F1435	CTYCYAGTCAACATGCGTATCC	54 Gasca-Pineda, en preparación 2011 Boyce <i>et al.</i> 1999
Mit-R6	GTAGACTCATCTAGGCAT	
<i>NADH2</i>		
NADH2-F	GGCCAATGAACCGTAATAAAA	54 Rodríguez-Rodríguez, en preparación
NADH2-R	TGGCATAAATCCTGATAGTGG	

Para confirmar el éxito de la amplificación se realizó la electroforesis de los productos del PCR con un indicador del peso molecular o escalera (*Nucleic Acid Markers, 100 pb DNA Ladder, Invitrogen*) en geles de agarosa al 1.5% con un Buffer TAE 0.5x teñidos con bromuro de etidio (1µl/10ml TAE) durante 30 minutos a 100Vt. Posteriormente el producto de PCR se visualizó con luz ultravioleta y se fotografió (Kodak EDAS 240).

Las reacciones exitosas y con el peso molecular requerido fueron secuenciadas en la Universidad de Washington (*High Throughput Genomic Unit*). La calidad de las secuencias y concatenación de la región control fue realizada en Consed (Gordon *et al.* 1998). Las cabeceras de las secuencias fueron editadas con el Editor de Cabeceras (Scheinvar, 2010). El alineamiento de las secuencias separadas de la región control y el ND2 se realizó en *Muscle* (Edgar, 2004) y fue revisado manualmente en BioEdit (Hall, 1999). Finalmente la concatenación de la región control y el ND2 se realizó mediante DnaSP v.5 (Librado y Rozas, 2009) y se alinearon la secuencias concatenadas en *Muscle* (Edgar, 2004) y se revisaron manualmente en BioEdit (Hall, 1999).

## V. Métodos estadísticos

Para observar como se relacionan los haplotipos se construyó un árbol de máxima verosimilitud con el modelo de evolución GTR en PhyML (Guindon *et al.*, 2010). A partir de los principales nodos del árbol se definieron los haplogrupos o filogrupos que se utilizaron en el resto del trabajo. Además, se realizaron los estadísticos a nivel estatal y en las localidades con cinco o más de individuos, sin embargo, esto no fue posible para Baboyagüi (BAB; n=1), La Tortuga (TOR; n=3) y El Rosario (ROS; n=2) debido al bajo número de muestras. Para conocer el la profundidad del muestreo se realizaron curvas de rarefacción por haplogrupo y por grupos inferidos en STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) en Excel 2011.

### i. Diversidad genética

Distintos estimados sobre la cantidad de variación genética de las poblaciones como la diversidad haplotípica y las medidas de diversidad nucleotídica ( $\pi$  y  $\theta$ ) se calcularon en DnaSP v.5 (Librado y Rozas, 2009).

La riqueza haplotípica ( $H_d$ ) fue calculada como el cociente de la frecuencia de las variantes haplotípicas entre el número de muestra siguiendo la fórmula de Nei (1987):

$$H_d = \frac{n(1 - \sum p_i^2)}{(n-1)}$$

donde  $n$  es el número de individuos muestreados y  $p_i$  es la frecuencia del  $n$ -enésimo haplotipo.

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es la heterocigocidad esperada en cada sitio nucleotídico. Se calcula como Nei (1987):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum p_i p_j \pi_{ij}$$

y se define como el número de diferencias por sitio nucleotídico ( $\pi_{ij}$ ) entre dos secuencias tomadas al azar ( $p_i$  y  $p_j$ ). Esta medida es independiente del tamaño de la muestra, sin embargo, se encuentra fuertemente afectada por las variantes con mayor frecuencia (Librado y Rozas, 2009).

La  $\theta$  de Watterson es un estimado a partir del número de sitios polimórficos o sitios segregantes ( $S_k$ ) en un grupo de secuencias. Este estadístico depende del tamaño muestral, sin embargo, es corregido al ponderarlo por el número de nucleótidos ( $m_T$ ) y número de secuencias de la muestra ( $a_k$ ) (Librado y Rozas, 2009). Puede ser calculada con la fórmula de Nei (1987) como:

$$\theta = \frac{S_k}{m_T a_k}$$

donde  $a_k = 1 + 1/2 + 1/3 + \dots + 1/(k-1)$  es el factor de corrección. En un modelo Wright-Fisher,  $\pi$  es igual a  $\theta$ .

## ii. Estructura y diferenciación genética

La diferenciación poblacional se calculó en Dna SP v.5 (Librado y Rozas, 2009) mediante la  $F_{ST}$  de Hudson *et al.* 1992:

$$F_{ST} = 1 - \frac{H_w}{H_b}$$

donde  $H_w$  es la media de las diferencias pareadas en las secuencias de una misma subpoblación y  $H_b$  es el número promedio de las diferencias pareadas entre las secuencias de dos subpoblaciones muestreadas. Los valores de  $F_{ST}$  oscilan de cero a uno; un valor de 0 indica la ausencia de estructura, mientras que la unidad significa que todas las poblaciones están diferenciadas. A partir de este estadístico es posible conocer el número de migrantes efectivos ( $Nm$ ) debido a la relación  $F_{ST} = 1/(2Nm+1)$  donde  $N$  es

el tamaño poblacional y  $m$  es la tasa de migración que se supone constante (Aguirre, 2007).

Además se calculó la distancia genética de Nei (1987) entre pares de haplogrupos como:

$$d = d_{xy} - \frac{(d_x + d_y)}{2}$$

en donde  $d_x$  y  $d_y$  corresponden a las distancias genéticas promedio intrapoblacionales, es decir, las diferencias nucleotídicas promedio entre los individuos de una misma población ( $X$  ó  $Y$ ), mientras que  $d_{xy}$  es la distancia promedio entre ambas poblaciones. La distancia genética fue calculada en Dna SP v. 5 (Librado y Rozas, 2009).

Para inferir simultáneamente el número de poblaciones y los miembros dentro de cada una de ellas se realizó una prueba de asignación bayesiana de grupos en STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000). El modelo de agrupamiento para genotipos multilocus propuesto por Pritchard *et al.* (2000) supone que los individuos muestreados tienen una ancestría común en  $K$  grupos. Donde cada grupo  $K$  se caracteriza por presentar un conjunto de frecuencias alélicas particulares (Hubitz *et al.*, 2009). Para conocer la pertenencia a cierta población ( $K$ ) mediante las frecuencias alélicas se realiza una prueba de verosimilitud asignando a los individuos a una o más poblaciones de acuerdo a su probabilidad posterior de que un genotipo pertenezca a cierto grupo ( $K$ ).

STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000) utiliza MCMC (Cadenas Markovianas de Monte Carlo) para buscar la probabilidad posterior de: 1) el número de poblaciones ( $K$ ) y 2) las frecuencias alélicas en la población dado el genotipo que observamos (Hubitz *et al.*, 2009). Dicho algoritmo itera independientemente variando el valor de  $K$  para así poder estimar el número apropiado de grupos ( $K$ ).

En este trabajo los haplotipos fueron transformados a una tabla de estados de caracter compatible con STRUCTURE 2.3.3. (Pritchard *et al.*, 2000) en xmf2struct. Se consideraron de 1 a 6 poblaciones ( $K$ ) elegidos a priori con base en los patrones de dispersión de la especie bajo un modelo de ligamiento. El *modelo de ligamiento* supone cierto grado de ligamiento entre los marcadores utilizados, debido a la posible correlación entre los marcadores y el exceso de alelos comunes esperados por la ancestría común entre los individuos de un mismo grupo ( $K$ ) y a la correlación entre marcadores presentes dentro de un mismo cromosoma (Falush *et al.*, 2003). Este modelo es más útil para datos con marcadores que están ligados como los

mitocondriales. Se corrieron 15 corridas previas que presentaron una asíntota similar a partir de la octava. Posteriormente se realizó la corrida definitiva. El número de repeticiones MCMC para estimar los distintos parámetros fue de 500 000 con un *burnin* de 15 000.

El análisis de resultados de STRUCTURE 2.3.3 (Pitchard *et al.*, 2000) se realizó en *Structure Harvester* (Earl *et al.*, 2012; Evano *et al.*, 2005) a través de la comparación del promedio del logaritmo de verosimilitud ( $\ln(K)$ ) y la varianza obtenidos en STRUCTURE 2.3.3 de las --- corridas para elegir el valor de K más adecuado para los datos.

### Estructura filogeográfica

Para confirmar la relación geográfica con la estructura filogeográfica se realizaron las comparaciones de  $G_{ST}$  y  $N_{ST}$  calculados en Dna SP v.5 (Librado y Rozas, 2009).

La  $N_{ST}$  es un índice de diferenciación que considera tanto la distancia genética como la similitud entre los haplotipos y se define como (Pons y Petit, 1996):

$$N_{ST} = \frac{\sum_{ij} \pi_{ij} c_{ij}}{V_T}$$

donde  $\pi_{ij}$  son las distancias entre los haplotipos  $i$  y  $j$ ,  $V_T$  es la diversidad total y  $c_{ij}$  denota la covarianza entre frecuencia del haplotipo  $i$  y  $j$  dentro de cierta población.

La  $G_{ST}$  es un caso particular de  $N_{ST}$  en donde todas las distancias genéticas ( $\pi_{ij}$ ) son iguales a uno (Pons y Petit, 1996). De esta forma  $G_{ST}$  sólo depende de las frecuencias haplotípicas y es calculada como  $G_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$ .

La comparación de ambos estimados permite determinar el tipo de estructura genética. Si  $N_{ST}$  es mucho menor que  $G_{ST}$  la estructura genética será independiente de distribución geográfica de los haplotipos, en cambio, cuando la  $N_{ST}$  es mayor, los haplotipos de una misma población están más fuertemente relacionados entre sí, demostrando que los haplotipos tienen un grado de covarianza entre los haplotipos de una misma población y una distancia genética ( $\pi_{ij}$ ) mayor entre poblaciones, es decir, demuestra la presencia de una estructura filogeográfica. Finalmente cuando  $N_{ST}$  y  $G_{ST}$  son iguales significa que las distancias genéticas ( $\pi_{ij}$ ) entre las poblaciones son iguales y por lo tanto los haplotipos son equivalentes o intercambiables entre sí (Pons y Petit, 1996).

### iii. Análisis demográficos

#### *Tamaño Efectivo*

Posteriormente se aproximó el tamaño efectivo poblacional para toda la muestra y por haplogrupo. El tamaño efectivo se obtuvo a partir del despeje de la  $\theta$  de Watterson (1975) ( $\theta_W = 2N_{ef}u$ ), es decir, como:

$$N_{ef} = \frac{\theta_W}{2u}$$

donde  $N_{ef}$  es el tamaño efectivo de hembras,  $u$  es la tasa de mutación y  $\theta_w$  es un estimado de la diversidad genética. Se utilizaron los valores de  $\theta_w$  obtenidos con Dna SP v.5 (Librado y Rozas, 2009) por medio del método descrito arriba en la sección *i* y la tasa de mutación ( $u$ ) de  $3.22 \times 10^{-8}$  sustituciones/sitio/año reportada por Latch *et al.* (2009) para la región control y el *cytB* de *O. hemionus*.

#### *Distribuciones mismatch*

Slatkin y Hudson (1991) proponen que la distribución de las diferencias pareadas de los sitios nucleotídicos, también llamada distribución *mismatch*, refleja la historia demográfica de la especie. Cuando la distribución *mismatch* es multimodal se infiere que la población se encuentra en equilibrio demográfico (Excoffier *et al.*, 2006). En cambio, si observamos un patrón unimodal se espera que las poblaciones hayan estado sujetas a una expansión demográfica y/o de rango reciente (Excoffier *et al.*, 2006).

En este trabajo se buscó conocer si la especie ha presentado un incremento poblacional súbito o una expansión de rango geográfico. Esta hipótesis se probó al asumir que la población haploide en equilibrio demográfico cambió su tamaño poblacional de  $N_0$  a  $N_1$  hace  $\tau$  generaciones. Entonces la probabilidad de observar  $S$  diferencias entre dos haplotipos no recombinantes elegidos al azar puede ser calculada a partir de la fórmula de Li (1977):

$$F_S(\tau, \theta_0, \theta_1) = F_S(\theta_1) + \exp\left(-\tau \frac{\theta_1 + 1}{\theta_1}\right) \sum_{j=0}^S \frac{\tau^j}{j!} [F_S - j(\theta_0) - F_S - j(\theta_1)]$$

donde la probabilidad de observar dos haplotipos elegidos al azar con  $S$  diferencias en una población estacionaria esta dada por  $F_S(\theta) = \frac{\theta^S}{(\theta+1)^{S+1}}$  (Watterson, 1975),  $\theta_0 = 2N_0u$ ,  $\theta_1 = 2N_1u$ ,  $\tau = 2ut$ , y  $u$  es igual a la tasa de mutación.

El método se simplifica asumiendo que no hay eventos coalescentes después de la expansión, es decir,  $\theta_1 \rightarrow \infty$ . Esto permite derivar  $\theta$  antes ( $\theta_0$ ) de la fluctuación en el tamaño poblacional y el tiempo de la expansión ( $\tau$ ) en generaciones según Rogers (1995) como:

$$\hat{\theta}_0 = \sqrt{v - m}$$

$$\hat{\tau} = m - \hat{\theta}_i$$

donde  $m$  es la media y  $v$  es la varianza de la distribución *mismatch* observada.

La prueba de expansión súbita se realizó en Arlequin 3.1 (Schneider y Excoffier, 1999). La validación del modelo se obtuvo a partir del cálculo de la rugosidad y de la suma de desviaciones cuadradas entre la distribución *mismatch* esperada y observada.

El índice de rugosidad mide la variación alrededor de la curva y se define como (Harpending, 1994):

$$r = \sum_{i=1}^{d+1} (x_i - x_{i-1})^2$$

donde  $d$  es el número máximo de las diferencias entre haplotipos y  $x$  son las frecuencias de las clases *mismatch*.

El índice suele ser mayor cuando las poblaciones están en equilibrio y presentan una gran variación (ruido) en la curva que en poblaciones que han pasado por una expansión y muestran un patrón unimodal más suave (Harpending, 1994). Un valor de  $p > 0.05$  significa que los datos se ajustan relativamente al modelo de expansión súbita. Si el test no es significativo no se puede rechazar la hipótesis nula de la población en equilibrio.

#### *Pruebas de neutralidad*

Para conocer las relaciones demográficas se estimó la  $D$  de Tajima y la  $F_s$  de Fu. Ambos estimados se basan en el modelo de sitios infinitos sin recombinación y por lo tanto útiles para los haplotipos mitocondriales (Excoffier *et al.* 2006).



La  $D$  de Tajima es una prueba que se basa en la detección de las diferencias entre  $\pi$  y  $\theta$  de Watterson y se define como (Tajima, 1989):

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$$

Surge como un método para identificar la neutralidad de los alelos ya que  $\pi$  se ve mayormente afectada por los alelos de mayor frecuencia y es independiente del tamaño de muestra a diferencia de  $\theta$ , que se encuentra afectada por el tamaño muestral y por la deriva génica o los alelos poco frecuentes (Castillo, 2007). Si  $D$  es igual a cero las frecuencias se comportan como se espera en el equilibrio neutral, en cambio si  $D$  es mayor que cero la selección balanceadora incrementa las frecuencias alélicas causando el aumento de  $\pi$ . Cuando  $D$  es negativa,  $\theta$  es mayor que  $\pi$  debido a la presencia de alelos deletéreos, o sea, tenemos selección direccional (Castillo, 2007). Sin embargo, también puede ser utilizado para conocer el equilibrio entre la mutación y la deriva genética en una población y así inferir procesos demográficos como expansiones poblacionales o cuellos de botella. Por ejemplo, uno esperaría que una población con tamaño constante a través del tiempo presente el mismo número de variantes comunes y únicas o raras entre linajes ( $\pi = \theta$ ). Sin embargo, cuando la  $D$  es positiva en regiones no codificantes podemos suponer un exceso de variantes comunes ( $\pi > \theta$ ) en la diversidad genética lo que se espera cuando ocurre un decremento poblacional. En cambio, cuando la  $D$  es negativa existe una mayor proporción de variantes únicas o raras ( $\theta > \pi$ ) se puede inferir una expansión poblacional.

La  $F_s$  de Fu (1997) supone neutralidad en los alelos y estima la probabilidad ( $S'$ ) de observar una muestra aleatoria neutral con un número de alelos igual o menor al observado dado el nivel observado de diferencias pareadas. Así  $F_s$  puede ser calculada como el logaritmo de  $S'$  como (Fu, 1997).

$$F_s = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

donde  $S' = P(K \geq k_{obs} | \theta = \theta_\pi)$ . Un valor negativo de  $F_s$  es evidencia de un exceso en el número de alelos, como es lo esperado en una expansión súbita. En cambio, un valor positivo muestra una deficiencia de alelos, como lo esperado bajo selección con ventaja del heterocigoto o después de un cuello de botella reciente. Las simulaciones de

Fu (1997) indican que la  $F_s$  es más sensible para detectar expansiones poblacionales súbitas que la  $D$  de Tajima.

Tanto la  $F_s$  de Fu como la  $D$  de Tajima se calcularon en Arlequin 3.1 (Schneider y Excoffier, 1999) para el total de individuos muestreados y para los haplogrupos.

### *Skyline plot*

La coalescencia de secuencias homólogas permite conocer parte de historia evolutiva de una especie. El método de *skyline plot* bayesiano se basa en este hecho para estimar las fluctuaciones en el tamaño efectivo poblacional a través del tiempo ( $N(t)$ ) (Drummond *et al.* 2005). Es decir, a partir de la coalescencia de las secuencias de ADN dado un modelo de sustitución nucleotídica y mediante cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) es posible conocer la distribución posterior del tamaño efectivo poblacional en el tiempo (Drummond *et al.* 2005). El método carece de la elección *a priori* de parámetros importantes e incluye intervalos de confianza, y por lo tanto posee una ventaja sobre otros análisis para conocer el cambio en el tamaño poblacional (*v. gr.*, sobre el análisis *mismatch* y otros) (Drummond *et al.* 2005).

En este trabajo se calculó el *Skyline plot* en BEAST v1.7.2 (Drummond *et al.* 2007) para todos los individuos muestreados utilizando 1, 155 pb de ADN mitocondrial (Región control y ND2). El modelo de sustitución utilizado fue el GTR con la corrección I + G y utilizando un reloj relajado log normal. Para alcanzar la distribución normal de las probabilidades posteriores se realizaron 60 millones de generaciones de MCMC.

#### iv. Red de haplotipos

La red de haplotipos se realizó en el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) con el fin de visualizar las diferencias entre las secuencias sin estar ajustadas a la división dicotómica de los árboles genéticos (Posada y Crandall, 2001). Se utilizó una red de *minimum spanning network* con un 90% de confiabilidad. Este método tiene la ventaja de mostrar los cambios en las bases nucleotídicas entre las secuencias pero sólo contempla los haplotipos muestreados y por lo tanto es imposible inferir los haplotipos no muestreados.

## v. Filogenia molecular

Además se buscó conocer la relación de los haplotipos encontrados con el resto de la tribu Odocoileini. Se realizó un árbol filogenético de máxima verosimilitud en el servidor en línea de PhyML (Guindon *et al.*, 2010). La máxima verosimilitud es un método basado en los caracteres de las secuencias, que permite reconstruir las relaciones genealógicas de una especie mediante la evaluación de topologías alternativas (Vinuesa, 2011). En otras palabras, compara las verosimilitudes de distintos modelos, para con ello escoger la mejor topología. La estima filogenética se realizó con un modelo de sustitución de tiempo reversible general (GTR) elegido a partir de JModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) que considera seis tasas diferentes de sustitución (Nei, 2000). Además se realizaron pruebas de confiabilidad de la topología inferida a través de un remuestreo con remplazo con un número repeticiones bootstrap de 1000.

El árbol incluye haplotipos de los miembros de la tribu Odocoileini presentes en México. Las secuencias de venado cola blanca (*O. virginianus*) y temazate (*Mazama americana*) fueron procesadas por M. A. Rodríguez-Rodríguez (en preparación) y por L. Escobedo (en preparación) respectivamente. El caribú (*Rangifer tarandus*) con el número de acceso en GenBank AB245426.1 se utilizó como grupo externo. Ningún trabajo de venado bura anterior a éste ha amplificado el ND2, por lo tanto, la inclusión de haplotipos de las subespecies de venado bura con este gen fue imposible. Con el fin de analizar las subespecies se realizó un árbol de máxima verosimilitud exclusivamente de la región control en PhyML (Guindon *et al.* 2010) con los mismos parámetros utilizados anteriormente.

## 4. Resultados

### I. Diversidad Genética

Se obtuvieron 94 secuencias de 1, 155 pares de bases producto de la concatenación de la región control y el ND2 procedentes de individuos distintos. De todos los sitios nucleotídicos analizados el 10.13% (n = 117) fueron sitios polimórficos y el resto monomórfico. En total se detectaron 51 haplotipos de los cuales 34 están presentes en Sonora, diez en Baja California Sur y ocho en Chihuahua. La mayoría de los haplotipos fueron muestreados sólo una vez, y tan solo el 7.84 % de los haplotipos son compartidos (ver Fig. 4.1).

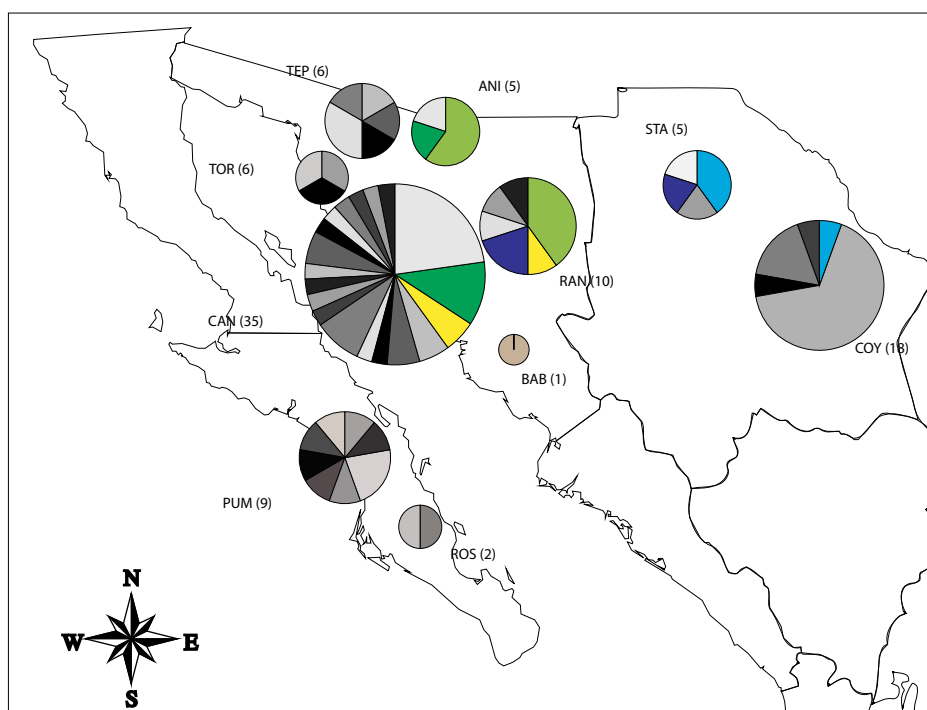
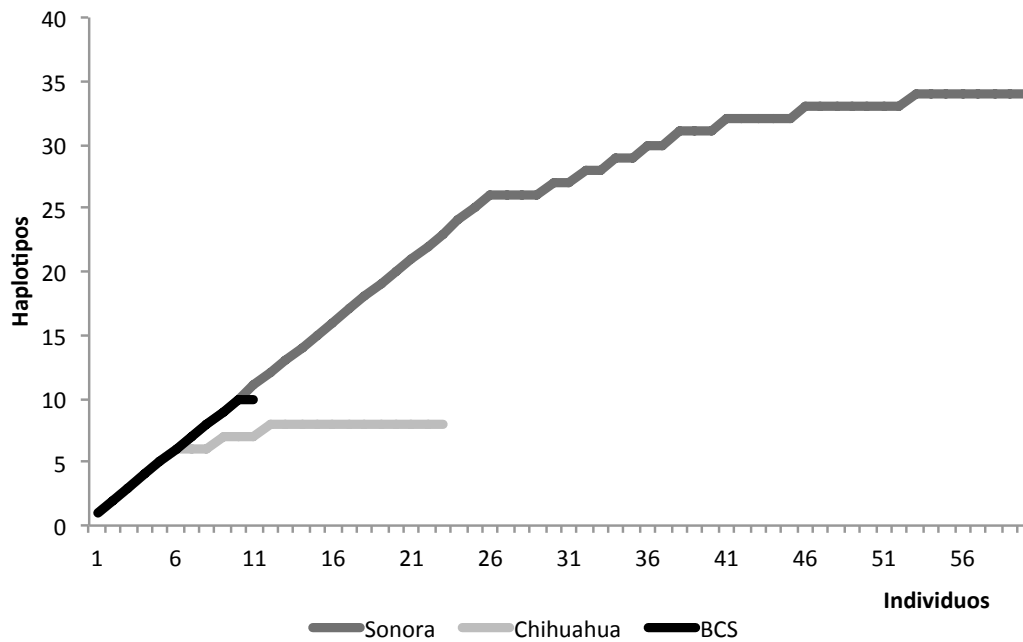


Figura 4.1. Mapa de la diversidad haplotípica por localidad muestreada (El área en los círculos representa el número de individuos. En color se muestran los haplotipos compartidos y en escala de grises los haplotipos únicos)

Con el objetivo de conocer la eficiencia del muestreo se realizaron curvas de rarefacción por cada uno de los estados (ver Tabla 4.1). Al parecer tanto el muestreo en Chihuahua como en Sonora se aproximó a la asíntota. Contrariamente la pendiente de la curva de Baja California Sur sugiere que no se ha llegado a la asíntota. La disparidad

entre el límite de las curvas de Chihuahua y Sonora podrían deberse a la cantidad de localidades muestreadas (dos y seis localidades respectivamente). Esto demuestra que se necesita realizar un mayor esfuerzo de muestreo en Baja California Sur y posiblemente en Chihuahua.

Tabla 4.1 Curva de rarefacción



Con el fin de poder realizar un estadístico más fino, se agruparon a los individuos en distintos haplogrupos que surgieron a partir de los principales nodos del árbol de máxima verosimilitud de la región control y ND2 (1, 155 pb) realizado en PhyML (Guidon *et al.* 2000) bajo el modelo de evolución GTR (ver Fig. 4.2).

Existen pocos haplotipos compartidos a nivel estatal (ver Fig. 4.3). Los haplogrupos coinciden fuertemente con la distribución espacial de los individuos. El haplogrupo 1 (H1) y el haplogrupo 3 (H3) incluyen haplotipos provenientes de sólo un Estado, Chihuahua y Baja California Sur respectivamente. En cambio, el haplogrupo 2 (H2) está conformado por todos los haplotipos procedentes de Sonora y por cuatro haplotipos originarios de Chihuahua y uno de Baja California Sur.

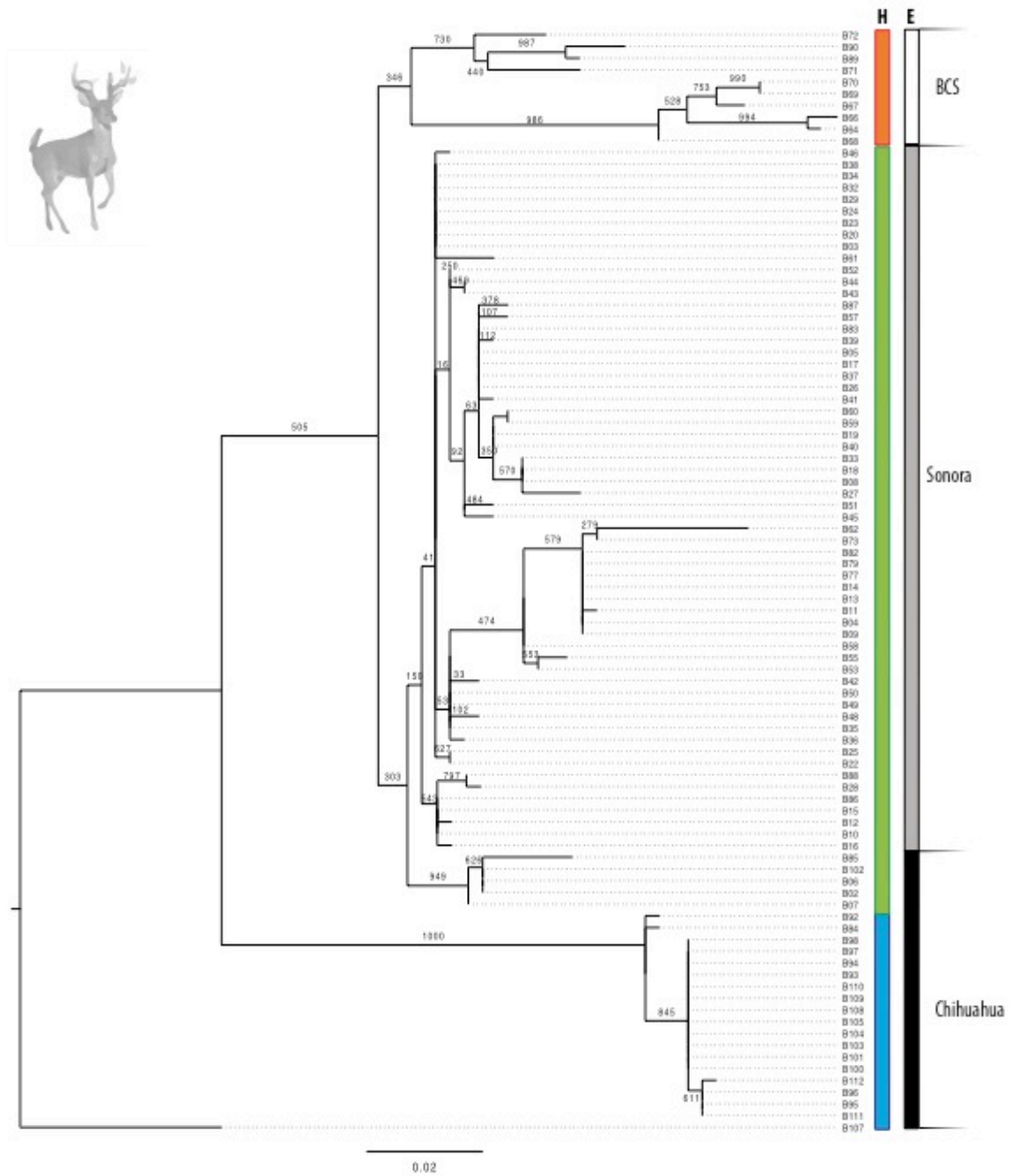


Figura 4.2 Filogenia del Venado Bura en México

(Filogenia de máxima verosimilitud a partir de la región control y ND2 (1 155 pb). Cada individuo se indica con un número diferente (Bxx). Por colores se representan los haplogrupos (H) H1=azul, H2= verde, H3=naranja. La procedencia de los individuos (E); en blanco Baja California Sur, en gris Sonora y en negro Chihuahua. La escala muestra la distancia genética. Además sobre las ramas se muestra el valor de bootstrap de 1000 iteraciones.

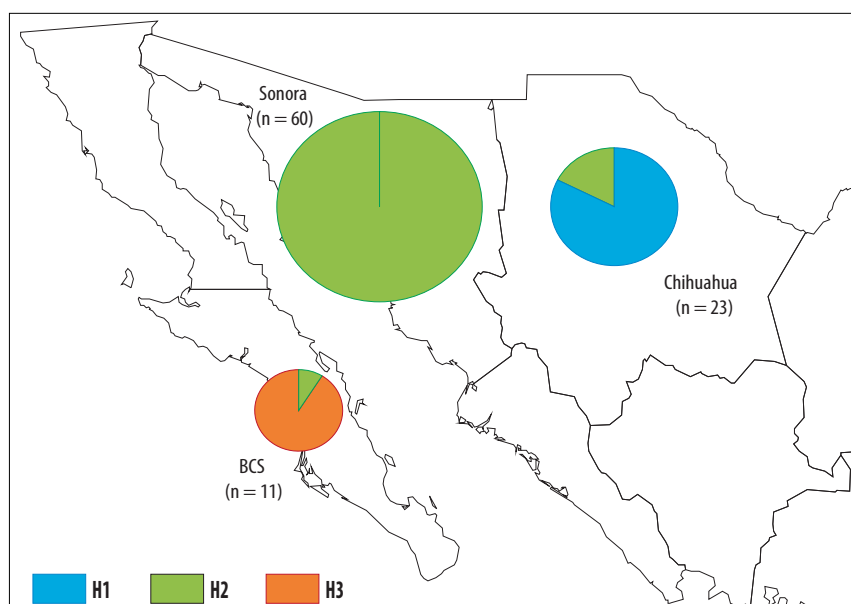


Figura 4.3 Distribución de los haplogrupos de venado bura por Estado  
(El área en los círculos representa el número de individuos. Por colores se representan los haplogrupos)

La diversidad haplotípica ( $H_d$ ) promedio es alta,  $0.967 \pm 0.009$  (Tabla 4.2). El patrón de la diversidad haplotípica varía de 0.5964 en el H1 a 0.98 en H3. Esto concuerda con lo observado a nivel estatal (Tabla 4.2), donde la menor diversidad ( $H_d = 0.715$ ) se presenta en Chihuahua y la mayor ( $H_d = 0.982$ ) en Baja California Sur.

El rango de la diversidad estimada dentro de las localidades adquiere valores similares a los previos. Todas las localidades presentan una diversidad haplotípica mayor a 0.85 ( $H_d > 0.85$ ), excepto las Animas (ANI), Sonora y Coyame (COY), Chihuahua que presentan una diversidad haplotípica de 0.7 y 0.5 respectivamente.

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) promedio fue de  $0.01739 \pm 0.0014$ , sin embargo, el rango de diversidad varió de 0.00528 a 0.01809 entre haplogrupos, de 0.0064 a 0.022 entre estados y de 0.002 a 0.02 entre localidades (Tabla 4.2). La  $\theta_w$  promedio fue de 0.01980. Los individuos provenientes de Baja California Sur (H3, estatal y PUM) cuentan con la mayor diversidad genética, tanto haplotípica como nucleotídica. Los valores de diversidad nucleotídica son muy similares en el H1 y H2, sin embargo, la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) es muy diferente demostrando su sesgo por el tamaño de muestra (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Diversidad Genética del venado bura

(n=no. de muestra; h= no. de haplotipos;  $H_d$ = diversidad haplotípica;  
 $\pi$  y  $\theta$ = diversidad nucleotídica)

Región	n	h	$H_d$	$\pi$	$\Theta$	
Haplogrupo 1	19	6	0.5965	0.0053	0.0124	
Haplogrupo 2	65	36	0.9639	0.0058	0.0106	
Haplogrupo 3	10	9	0.9778	0.0181	0.0159	
Estado	Chihuahua	23	8	0.7154	0.0177	0.0164
	Sonora	60	34	0.9605	0.0064	0.0147
	BCS	11	10	0.9818	0.0221	0.0234
UMA	COY	18	5	0.5490	0.0087	0.0164
	STA	5	4	0.9000	0.0047	0.0054
	ANI	5	3	0.7000	0.0073	0.0083
	CAN	35	19	0.9311	0.0027	0.0059
	RAN	10	6	0.8444	0.0058	0.0049
	TEP	6	5	0.9333	0.0063	0.0057
	PUM	9	8	0.9722	0.0218	0.0229
	Total	94	51	$0.967 \pm 0.009$	$0.017 \pm 0.001$	0.0198

## II. Estructura y diferenciación genética

El índice de diferenciación poblacional  $F_{ST}$  general entre estados es de 0.42, demostrando la existencia de estructura genética (Tabla 4.3). La mayor diferenciación ( $F_{ST}=0.554$ ) se encontró entre Sonora y Chihuahua, mientras que la menor se encontró entre Baja California Sur y Sonora ( $F_{ST}=0.336$ ).

La distancia genética de Nei ( $d$ ) describe patrones similares. La comparación entre Sonora y Baja California Sur presentó la menor distancia genética (0.021), entretanto la comparación entre el Baja California Sur y Chihuahua mostró el mayor valor (0.031) a diferencia de  $F_{ST}$  que indicó mayor diferenciación entre Sonora y Chihuahua. Ambos índices sugieren que Chihuahua se encuentra más diferenciado que el resto (Tabla 4.3).



Tabla 4.3 Diferenciación genética

(por debajo de la diagonal los valores de  $d$ ; por arriba  $F_{ST}$ ,

\*\*\* valores significativas  $p < 0.001$  )

	BCS	SON	CHI
BCS		0.336***	0.369***
SON	0.021		0.554***
CHI	0.031	0.027	

También se calculó la diferenciación genética por localidades (Tabla 4.4). Los valores de  $F_{ST}$  cubren un rango de 0.012 a 0.823. Tanto el índice de diferenciación ( $F_{ST}$ ) como la distancia genética de Nei ( $d$ ) mostraron que la población de Coyame, Chihuahua (COY) es la más diferenciada, en cambio, los valores más bajos se obtuvieron entre las localidades de Sonora, como se observa entre el Tepeyac (TEP) y la Candelaria (CAN), y entre las Animas (ANI) y el Rancho 60 (RAN).

Tabla 4.4 Diferenciación genética

(por debajo de la diagonal los valores de  $d$ ; por arriba  $F_{ST}$ ,

significancia \*  $0.01 < p < 0.05$ , \*\*  $0.001 < p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ )

	STA	COY	CAN	RAN	TEP	ANI	PUM
STA		0.805**	0.494***	0.380*	0.389*	0.494*	0.380**
COY	0.0345		0.823***	0.774***	0.773***	0.753***	0.534***
CAN	0.0073	0.0322		0.343***	0.061***	0.451**	0.364***
RAN	0.0090	0.0323	0.0065		0.165**	0.012*	0.292***
TEP	0.0090	0.0330	0.0048	0.0073		0.258**	0.326**
ANI	0.0118	0.0324	0.0091	0.0066	0.0092		0.265***
PUM	0.0214	0.0327	0.0193	0.0195	0.0209	0.0198	

Los análisis de asignación de poblaciones y de individuos dentro de ellas identificaron cuatro grupos poblacionales ( $K= 4$ ) diferentes. A cada grupo el análisis asignó cierto número de individuos (ver Tabla 4.5). El grupo tres es el grupo más pequeño ( $n=6$ ) pero el único grupo que concuerda completamente con la distribución geográfica, al presentar exclusivamente individuos de Baja California Sur. Los grupos dos y cuatro cuentan con el mayor número de individuos ( $n=17$  y  $n=56$  respectivamente), siendo la mayoría de éstos de Chihuahua en el primero y de Sonora en el segundo. El grupo uno, aunque presenta una mayor proporción de individuos de Sonora está conformado por organismos de todos los estados.

Tabla 4.5 Estructura del venado bura

(k= grupo o población, la procedencia de los individuos de Chihuahua (CHI), Sonora (SON) y Baja California Sur (BCS), N= número de individuos dentro de la categoría)

K	Individuos															CHI	SON	BCS	N				
1	B04	B09	B11	B13	B14	B62	B71	B72	B73	B77	B79	B82	B84	B89	B90	1	11	4	16				
	B107																						
2	B92	B93	B94	B95	B96	B97	B98	B100	B101	B103	B104	B105	B108	B109	B110	16	-	1	17				
	B111 B112																						
3	B64	B66	B67	B68	B69	B70														-	-	6	6
4	B02	B03	B05	B06	B07	B08	B10	B12	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B22	6	49	-	55				
	B23 B24 B25 B26 B27 B28 B29 B32 B33 B34 B35 B36 B37 B38																						
	B39 B40 B41 B42 B43 B44 B45 B46 B48 B49 B50 B51 B52 B53																						
	B55 B57 B58 B59 B60 B61 B83 B85 B86 B87 B88 B102																						
Total																23	60	11	94				

La Fig. 4.4 muestra las probabilidades de pertenencia a cierto grupo (K) dado el genotipo de los individuos. La mayoría de los organismos tiene una probabilidad muy alta ( $P > 0.8$ ) de pertenecer al grupo asignado. No obstante, en algunos casos la probabilidad de pertenencia fue menos determinante, como se observa en algunos individuos con probabilidades semejantes de pertenecer tanto al grupo uno como al grupo tres o al grupo uno y al grupo cuatro.

Los grupos poblacionales inferidos (**K**) son similares a los haplogrupos de la Fig. 4.2. Se rescató el haplogrupo de Chihuahua en el grupo dos, el haplogrupo de Baja California Sur en el grupo tres y el haplogrupo de Sonora en los grupos poblacionales (**K**) uno y cuatro.

Además, el árbol de distancias pareadas ponderadas de la red nucleotídica - *net nucleotide distance* - entre los grupos (**K**) evidencia las relaciones entre las poblaciones inferidas (Fig. 4.5). Los grupos uno y cuatro se encuentran más fuertemente relacionados lo cual se ve reflejado al pertenecer al mismo haplogrupo dentro de la filogenia y al agrupar todos los individuos provenientes de Sonora (ver Fig. 4.2). Mientras que el grupo dos es el más diferente al resto de las poblaciones inferidas, lo que concuerda con la separación del haplogrupo uno (H1) procedente de Chihuahua.

También se realizaron curvas de rarefacción para conocer que tan bien representados se encontraban los grupos (**K**) dentro de la muestra (ver Fig. 4.6). La Fig. 4.6 indica que el grupo cuatro es el mejor representado mientras que el resto de los grupos requiere de un mayor esfuerzo de muestreo. El patrón coincide con el observado previamente para el número de muestra total como se observa en la Fig. 4.1.

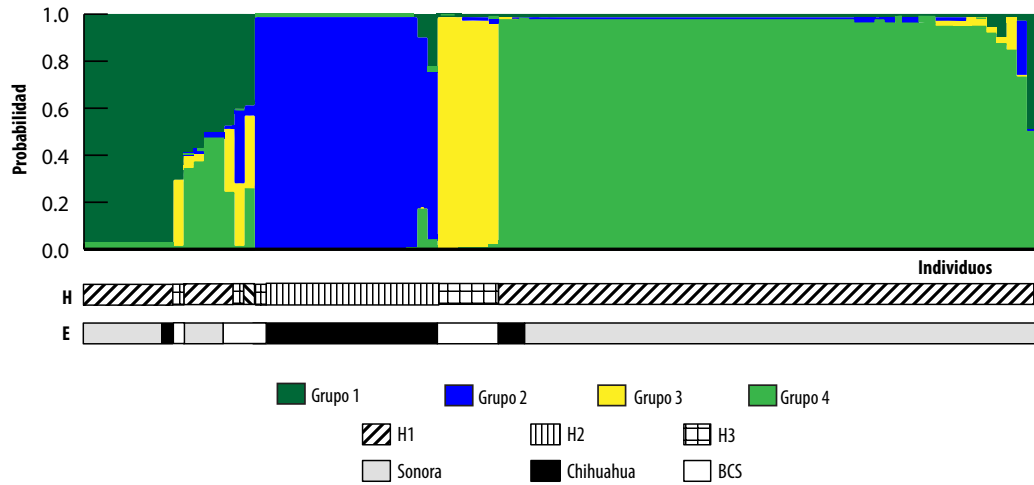


Figura 4.4 Estructura del Venado Bura (ver texto)

(H = haplotipos; E = Estados)

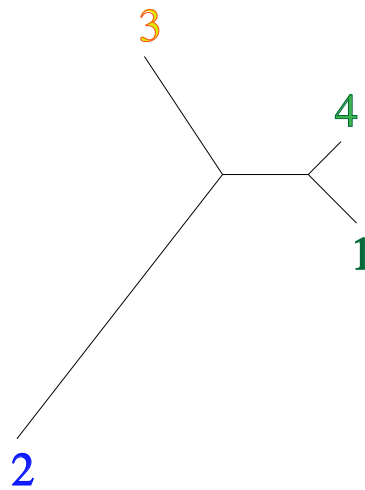


Figura 4.5 Árbol de distancia de la red nucleotídica (Falush *et al.*, 2003) entre los distintos grupos (K) definidos por STRUCTURE (ver texto).

(1= grupo uno, 2= grupo dos, 3= grupo tres, 4= grupo cuatro)

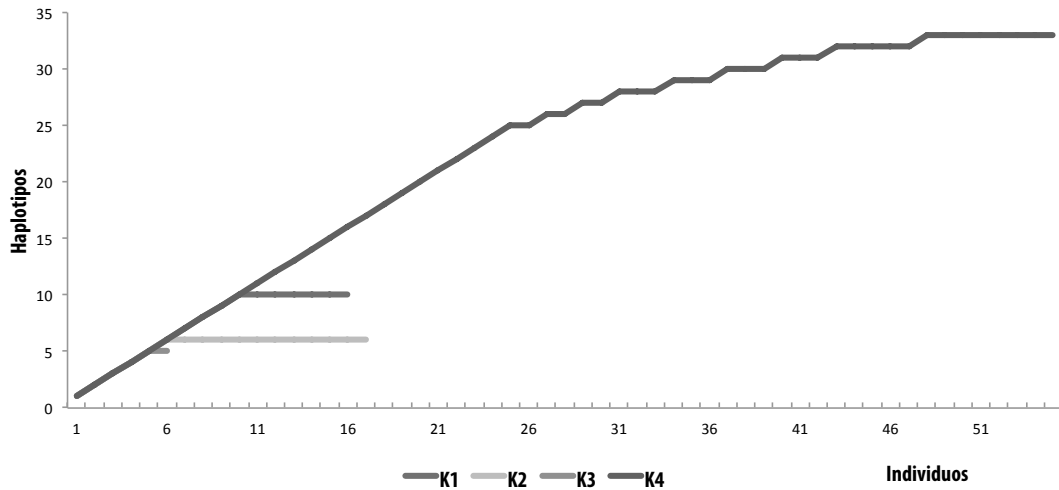


Fig 4.6 Curva de Rarefacción por grupo ( $K$ ) obtenido de STRUCUTURE

### Estructura filogeográfica

La comparación de  $N_{ST}$  y  $G_{ST}$  demostró que los valores de  $N_{ST}$  son mayores que  $G_{ST}$  (ver Tabla 4.6). Estos resultados sugieren que existe una estructura filogeográfica entre los estados, principalmente entre Chihuahua y el resto de los estados.

Tabla 4.6 Estructura Filogeográfica del Venado Bura  
(arriba de la diagonal los valores de  $G_{ST}$ ; por debajo los valores de  $N_{ST}$ )

	BCS	SON	CHI
BCS		0.202	0.080
SON	0.336		0.070
CHI	0.371	0.554	

Además, todos los valores de  $N_{ST}$  entre localidades fueron mayores a los de  $G_{ST}$  sugiriendo la presencia de una estructura filogeográfica inclusive entre localidades (ver Tabla 4.7). Las diferencias más grandes entre ambos índices se encontraron entre Coyame, Chihuahua (COY) y el resto de las poblaciones, seguida de los Pumas (PUM) con respecto al resto. En cambio, las diferencias menores se encontraron entre localidades pertenecientes a Sonora como entre Tepeyac (TEP) y Candelaria (CAN) y entre Rancho 60 (RAN) y Animas (ANI).

Tabla 4.7 Estructura Filogeográfica del venado bura  
(arriba de la diagonal los valores de  $G_{ST}$ ; por debajo los valores de  $N_{ST}$ )

	STA	COY	CAN	RAN	TEP	ANI	PUM
STA		0.137	0.049	0.051	0.044	0.111	0.036
COY	0.807		0.129	0.178	0.141	0.194	0.137
CAN	0.495	0.823		0.048	0.041	0.067	0.028
RAN	0.419	0.776	0.343		0.060	0.002	0.048
TEP	0.390	0.774	0.060	0.165		0.100	0.026
ANI	0.496	0.754	0.452	0.013	0.260		0.085
PUM	0.380	0.536	0.363	0.292	0.326	0.265	

### III. Análisis demográficos

La Tabla 4.8 muestra el tamaño efectivo histórico de las hembras inferido a partir de la  $\theta_w$ . Se estimó un tamaño efectivo total ( $N_e$ ) de 307, 453 individuos, con tamaños efectivos menores para cada haplogrupo. El haplogrupo tres perteneciente a Baja California Sur presentó el mayor tamaño efectivo mayor, en cambio, el tamaño efectivo del haplogrupo uno (Chihuahua) fue el menor.

Tabla 4.8 Tamaño efectivo de hembras ( $N_{ef}$ )  
inferido a partir de la  $\theta_w$ .

Haplogrupo	Nef
H1	192391.304
H2	164440.994
H3	247049.689
Total	307453.416

También se obtuvieron las curvas de la prueba *mismatch* para todos los individuos muestreados y para cada uno de los haplogrupos (ver Fig. 4.7). Las curvas *mismatch* para el haplogrupo uno (H1), el haplogrupo dos (H2) y para todos los individuos (a) muestran curvas multimodales con una cresta pronunciada entre las primeras veinte diferencias. Mientras que el haplogrupo tres (H3) presenta una curva multimodal con una distribución más errática en sus diferencias pareadas.

La topología de las diferencias pareadas de la Fig. 4.7.a sugiere un patrón estocástico diferente a lo esperado con una expansión poblacional súbita; la distribución multimodal sugiere que las poblaciones de *O. hemionus* tal vez se encuentran en equilibrio demográfico, es decir, con tamaño poblacional constante, sin embargo, los valores de  $p$  son de 0.849 y de 0.773 para la rugosidad y SSD respectivamente e indican que no hay diferencia significativa entre la hipótesis nula de expansión súbita y los datos.

Si buscamos la señal por haplogrupo, obtenemos una mejor definición en los patrones de expansión. El haplogrupo uno muestra una curva unimodal, sin embargo, la prueba de rugosidad fue no-significativa ( $p > 1$ ) e indica que el haplogrupo presentó una expansión súbita. Dicho patrón es el reflejo de la gran similitud entre los haplotipos dentro del linaje. Por otro lado, tanto la prueba de SSD como de la rugosidad del haplogrupo dos (H2) fueron no significativas ( $p = 0.8190$  y  $p = 0.914$ ), sugiriendo también una expansión súbita. En cambio, el haplogrupo tres (H3) presentó una curva multimodal caracterizada por gran cantidad de picos y valles, lo que sugiere que el haplogrupo se encuentra en un equilibrio demográfico aunque no existen diferencias significativas ( $p > 0.4$ ) entre el modelo expansión y los datos.

Las pruebas de neutralidad sugieren un patrón similar al propuesto con las distribuciones *mismatch* (ver Fig. 4.7). Los individuos de toda la muestra presentaron valores negativos tanto de  $F_s$  como de  $D$  de Tajima, lo que reafirma el patrón de expansión poblacional súbita de la Fig. 4.7.a (ver Tabla 4.9). La  $D$  de Tajima obtuvo un valor positivo para el haplogrupo tres (H3) y valores negativos significativos ( $p < 0.002$ ) para los haplogrupos uno (H1) y dos (H2). En cambio, la prueba de  $F_s$ , que se caracteriza por ser más sensible a los cambios poblacionales que la  $D$  de Tajima (Fu, 1997), arrojó un valor positivo para el haplogrupo uno (H1) y valores negativos para los haplogrupos dos y tres, siendo el primero significativamente diferente ( $p < 0.002$ ). Finalmente, sea cual sea la prueba existen evidencias de una expansión poblacional súbita del haplogrupo dos y muy posiblemente de todos los individuos de México.

Para poder fechar cuando ocurrió la expansión poblacional se realizó un *Skyline plot* (Drummond *et al.*, 2005). El *Skyline plot* sugiere una expansión poblacional hace 40,000 años (ver Fig. 4.8), sin embargo, la fecha es muy aproximada debido a que la tasa de mutación utilizada fue la estimada por Latch *et al.* (2009) para la región control y el *cytB* del venado bura

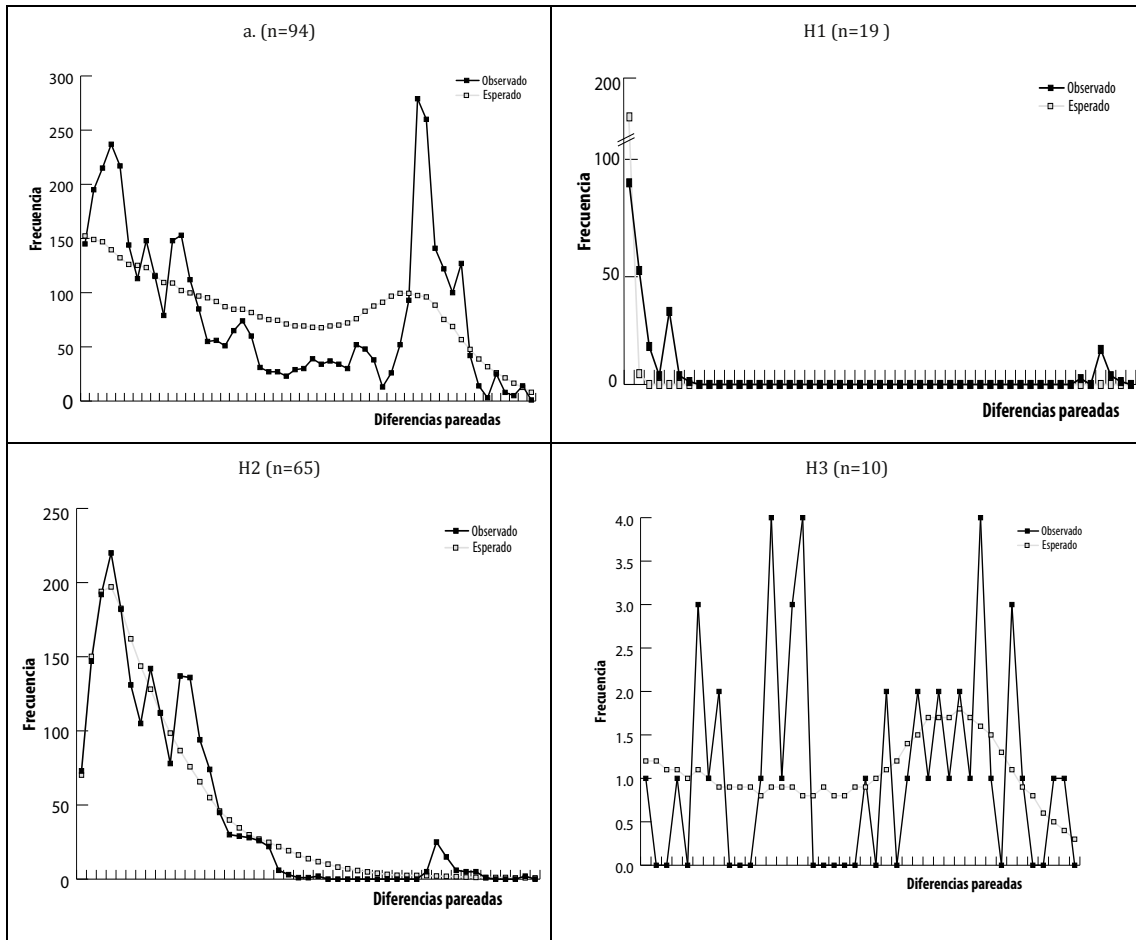


Figura 4.7 Distribución *mismatch* modelado para expansión poblacional repentina  
(a = todos los individuos, H1 = haplogrupo 1; H2 = haplogrupo 2;  
H3= haplogrupo 3, n= no. de individuos)

Tabla 4.9 Pruebas de Neutralidad  
(D = D de Tajima; Fs = Fs de Fu; en negritas las  
pruebas significativas  $p < 0.002$ )

	D	Fs
H1	<b>-2.3358</b>	3.35109
H2	<b>-1.9617</b>	<b>-16.876</b>
H3	0.6674	-0.0867
Total	-0.5268	-8.2780

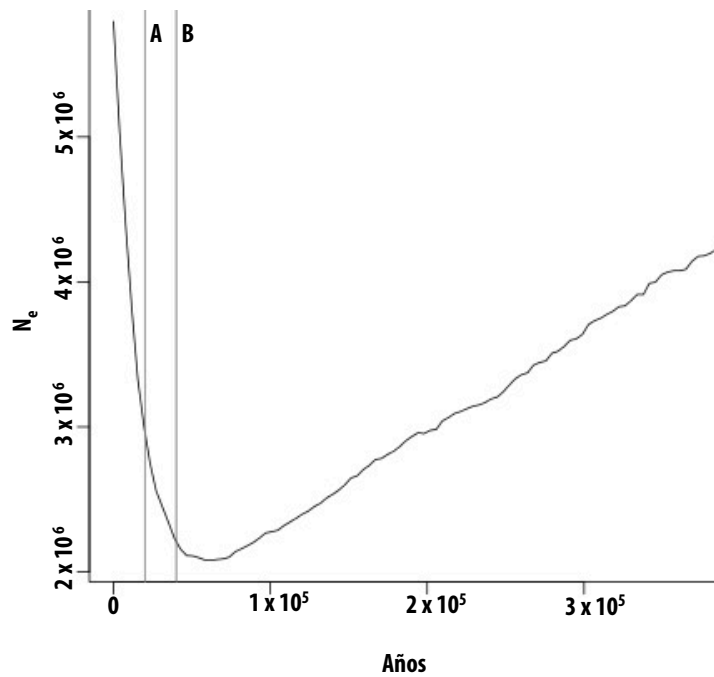


Figura 4.8 *Skyline plot* de todos los individuos muestreados  
 (1, 155 pb de la región control y ND2; n=94;  
 A = 20, 000 años, B = 40, 000 años)

#### IV. Red de haplotipos

La red de haplotipos muestra cómo los haplogrupos se encuentran diferenciados. El H1 permanece aislado del resto de la red, aún cuando el límite de conexión es de 90%. En cambio, H2 y H3 conforman una sola red. Los haplotipos más comunes son el B03 y el B100, sin embargo, la mayor parte son haplotipos privados.

La red de haplotipos en forma de estrella a partir del haplotipo B03 sugiere que la expansión poblacional fue a partir del haplogrupo dos (H2) procedente de Sonora. Además, se muestra que la mayoría de los individuos están separados entre sí por pocos pasos mutacionales. No obstante, el H3 es la excepción. Éste se une con al menos 13 pasos mutacionales al resto de la red. Además, es el agregado con mayor número de pasos mutacionales entre haplotipos de un mismo haplogrupo.



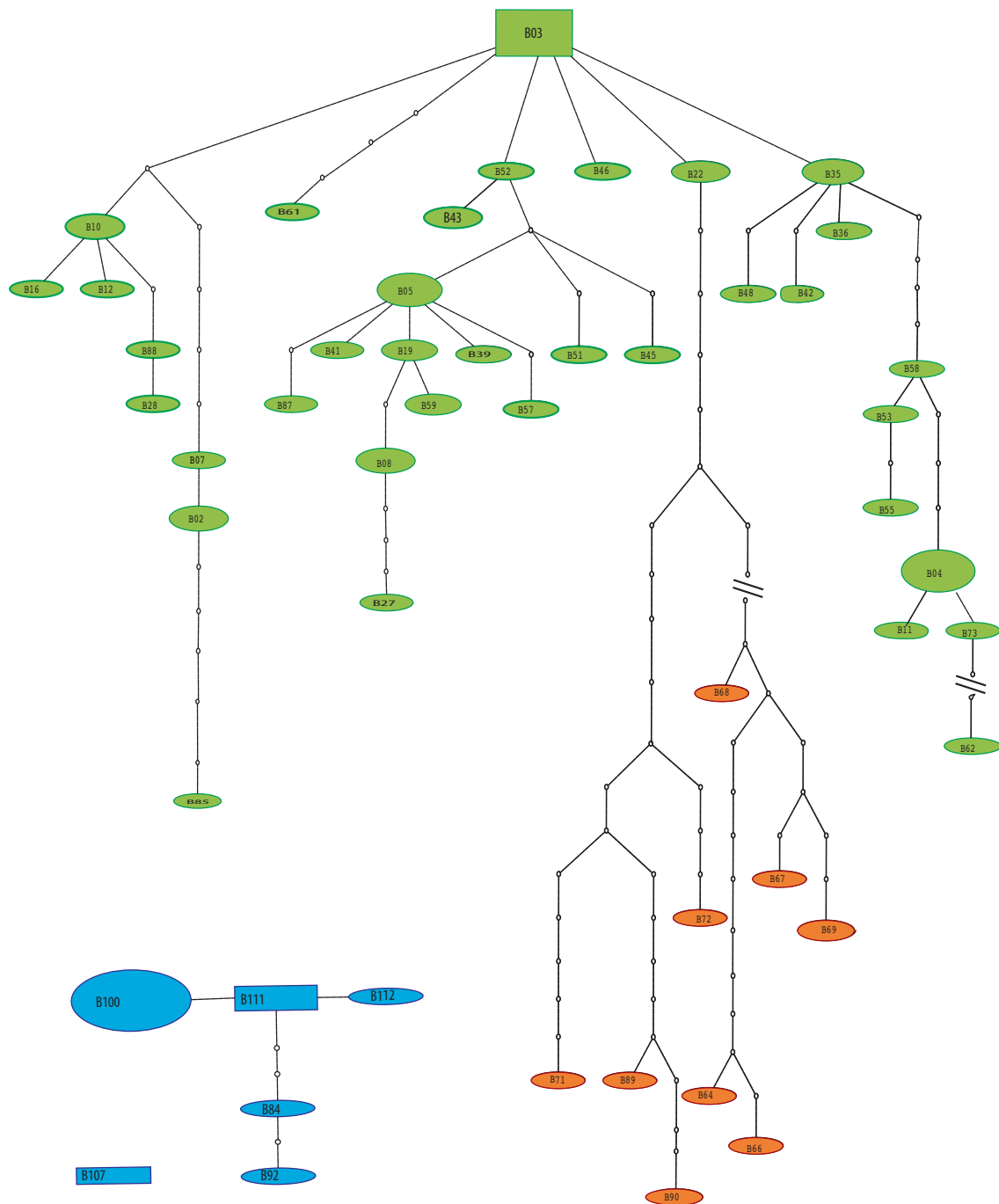


Figura 4.9 Red de haplotipos de región control y ND2 de *O. hemionus*  
 (Los colores representan los haplogrupos (H) H1=azul, H2= verde, H3=naranja. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos que presenta cada haplotipo. Cada círculo abierto representa un paso mutacional)

## V. Filogenia molecular

El árbol filogenético de máxima verosimilitud de la tribu Odocoileini (ver Fig. 4.10) se construyó a partir del modelo de sustitución GTR. Los valores de *bootstrap* varían de cero a 1000, lo que demuestra que algunos grupos están alejados filogenéticamente y la señal es muy fuerte, mientras que otros son muy cercanos y la señal filogenética es más débil. El árbol muestra grupos monofiléticos entre especies de la tribu presentes en México (*Mazama*, *Odocoileus virginianus* y *Odocoileus hemionus*), sin embargo, la topología del árbol es un poco distinta al de la Fig. 4.2.

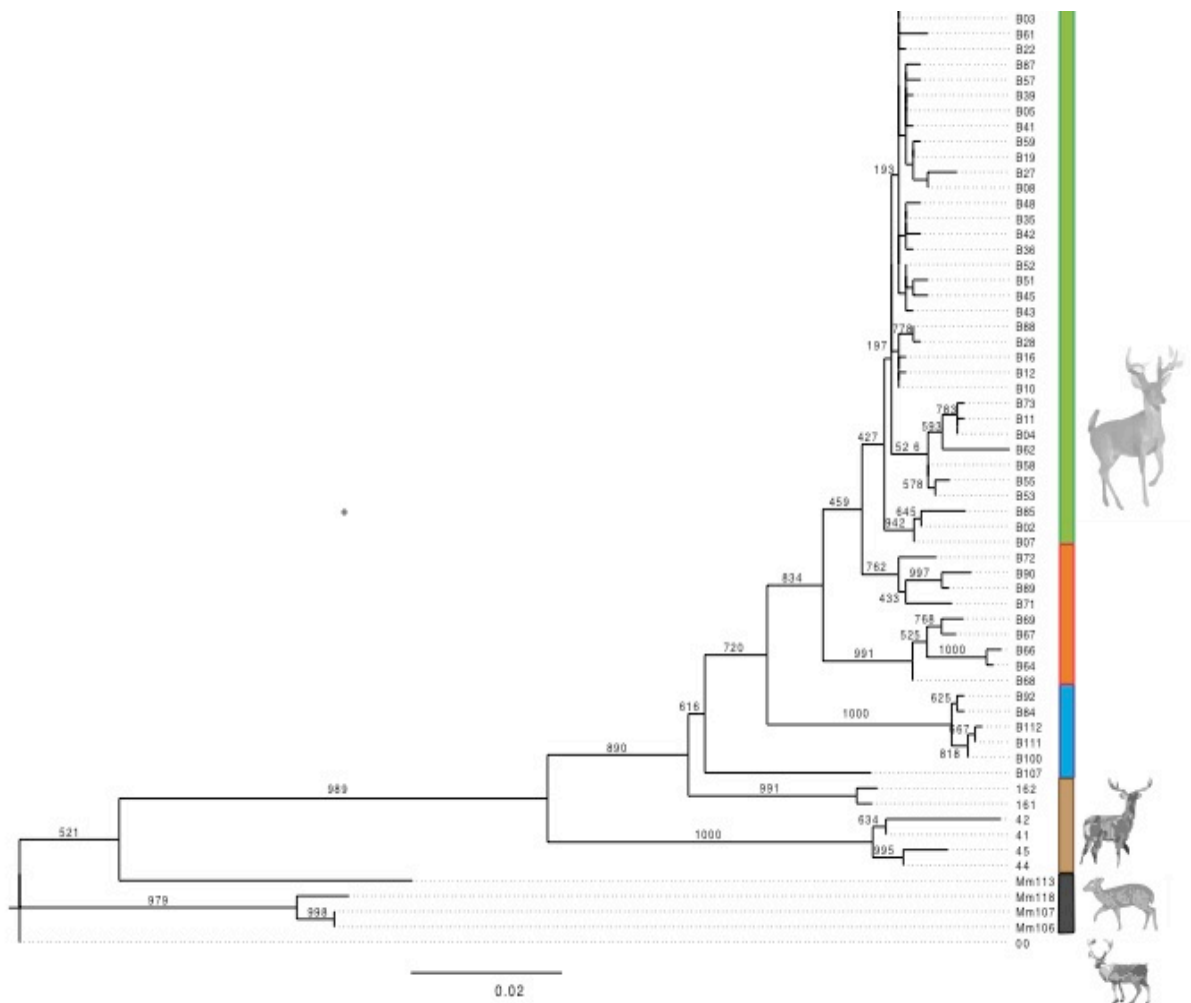


Figura 4.10 Filogenia del la tribu Odocoileini utilizando 1, 155 pb de la región control y el ND2 mitocondrial

(Se utilizó el modelo de evolución GTR. La escala representa la distancia genética y los valores sobre las ramas indican el valor de bootstrap de 1000 iteraciones. Los haplogrupos (H) en azul (H1), en verde (H2), y en naranja (H3), en café el venado cola blanca (*O. virginianus*), en negro el temazate (*Mazama americana*). Como grupo externo 00 el caribú (*Rangifer tarandus*).

Para poder incluir haplotipos ya reportados de las distintas subespecies de venado bura se construyó un árbol de máxima verosimilitud únicamente con la región control (ver Fig. 4.11). Al igual que la filogenia anterior, se utilizaron haplotipos del resto de la tribu Odocoileini y al caribú (*Rangifer tarandus*) como grupo externo. La filogenia separa al género *Odocoileus* en dos clados con un valor de *bootstrap* mayor al 95% en ambos casos. La separación no concuerda con las especies y subespecies. El primer clado incluye individuos *Odocoileus hemionus* de las subespecies *sitkensis* y *columbianus*. El segundo clado agrupa a los haplotipos descritos en este trabajo y al resto de las subespecies del venado bura (*O. h. hemionus*, *O. h. peninsulae*, *O. h. fuliginatus*, *O. h. californicus* y *O. h. emericus*) y al venado cola blanca (*O. virginianus*). Es interesante observar la parafilia que existe entre los haplotipos de H1 de venado bura y *O. virginianus*. Hay que resaltar que se recuperaron todas las subespecies en los clados, lo cual podría sugerir que es necesario reconsiderar su existencia o realizar más estudios.

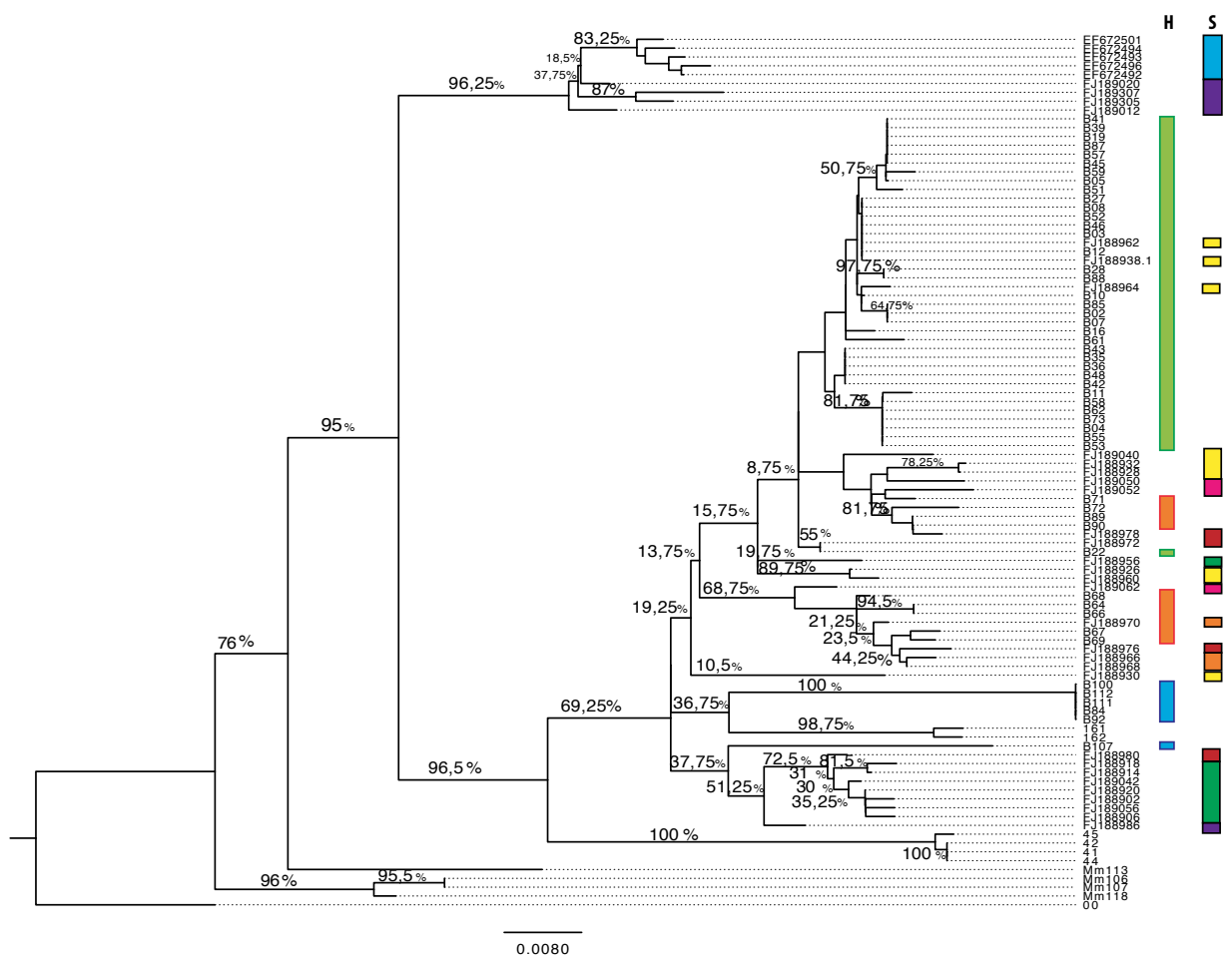


Figura 4.11 Filogenia de Máxima verosimilitud de las subespecies de *O. hemionus* utilizando la región control mitocondrial ( 718 pb) y el modelo de evolución GTR. (Los haplogrupos (H) en azul (H1), en verde (H2), y en naranja (H3). Las subespecies (S) en

azul *O. h. sitkensis*; en morado *O. h. columbianus*; en amarillo *O. h. crooki*; en rosa *O. h. californicus*; en verde *O. h. hemionus*; en naranja *O. h. fulginatus*; en rojo *O. h. peninsulae*. Cada haplotipo está nombrado con su clave de acceso en GenBank o con el nombre dado en ésta investigación. Abajo se muestra la escala de la distancia genética y sobre las ramas el valor en porcentaje de bootstrap de 1000 iteraciones)

## 5. Discusión

---

### I. Muestreo

El estudio de la mastofauna presenta complicaciones de muestreo. Las muestras utilizadas en este estudio no son representativas ni de toda la distribución del venado bura en México ni de su abundancia, sin embargo, consideramos que los datos obtenidos muestran patrones genéticos y filogeográficos interesantes y se aproximan a lo que sucede naturalmente en estas poblaciones.

Para contar con un muestreo más representativo se tendría que ampliar la muestra de Chihuahua y Baja California Sur ya que en ninguno de los casos el esfuerzo de muestreo es suficiente, se recomienda contar con al menos cinco poblaciones por estado. Con la finalidad de hacer los estudios comparables, se recomienda ligar este estudio con el resto de las muestras de Estados Unidos, se requiere amplificar el *cytB* de las muestras de nuestro estudio y estandarizar los análisis.

### II. Diversidad genética

La alta variación genética encontrada en el venado bura es interesante y complica su conservación, pero no es necesariamente sorprendente. Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica reportados para marcadores mitocondriales en distintas especies de rumiantes (Tabla 5.1) oscilan entre 0.41 y 0.988 y entre 0.0021 y 0.57 respectivamente. Cabe notar que los valores más altos de diversidad genética dentro de este grupo se han reportado en el género *Odocoileus*.

Los valores de diversidad genética de otros estudios de *O. hemionus* son similares a los de esta investigación (Latch *et al.* 2009; Pease *et al.* 2009) y coinciden con los estimados para su especie hermana *O. virginianus* (Moscarella *et al.* 2003; Calderon-Lobato, 2009; Prudue *et al.* 2007). Esto pareciera indicar que el género *Odocoileus* se caracteriza por presentar una alta variación, probablemente producto de tamaños efectivos ancestrales muy grandes (Marton y Klein, 1984) como se demostró en la estimación del tamaño efectivo de hembras de este estudio.

Los resultados muestran gran número de haplotipos únicos (Tabla 5.1). Esto podría deberse al tipo y profundidad del muestreo o a la historia demográfica de la especie. Proporciones de haplotipos únicos similares a las aquí reportadas se han encontrado en otros cérvidos cuyas poblaciones presentan una expansión reciente como ocurre en el

venado cola blanca (*O. virginianus*; Calderón-Lobato, 2009), el reno (*Rangifer tarandus*; Flagstad *et al.* 2003) y el wapití o ciervo rojo (*Cervus elaphus*; Zachos *et al.* 2003). Por lo que la cantidad de haplotipos únicos encontrados en esta investigación podría ser reflejo de la expansión poblacional de *O. hemionus* en México.

Tabla 5.1 Comparación de la diversidad genética mitocondrial en rumiantes ( $n$ =individuos,  $h$ =no. de haplotipos,  $hU$ = haplotipos únicos  $H_d$ = diversidad haplotípica,  $\pi$  = diversidad nucleotídica, MD-F= haplogrupo)

Familia	Especie	Sitio	n	Marcador	pb	h	hU	Hd	$\pi$	Referencia
Antilocapridae										
	<i>Antilocapra americana</i>	Arizona central	83	RC	550	16	-	0.850	-	Stephen <i>et al.</i> 2005
	<i>A. americana</i>	Arizona occidental	71	RC	550	9	-	0.780	-	Stephen <i>et al.</i> 2005
Bovidae	<i>Ovis canadensis</i>	Coahuila, Mex	58	RC	550	3	0	0.440	0.0071	Duran-Álvarez, 2012
Cervidae										
	<i>Alces alces</i>	America Central, EUA	24	RC	554	6	5	0.760	0.0052	Hundertmark <i>et al.</i> 2003
	<i>A. alces</i>	Columbia Británica, EU	11	RC	554	6	4	0.730	0.0087	Hundertmark <i>et al.</i> 2003
	<i>C. elaphus</i>	Escocia, RU	625	RC	821	74	5	0.670	0.0035	Perez Espona <i>et al.</i> 2009
	<i>Cervus elaphus</i>	Europa	63	RC	332	15	12	0.650	0.0086	Zachos <i>et al.</i> 2003
	<i>C. e. montanus</i>	Serbia y Rumania	120	RC	582	14	7	0.340	0.4300	Feulner <i>et al.</i> 2004
	<i>Rangifer tarandus</i>	Toda la distribución	150	RC	470	70	50	-	-	Flagstad <i>et al.</i> 2003
	<i>R. tarandus</i>	Norte América	113	RC	470	11	-	0.688	0.0021	McDevitt <i>et al.</i> 2009
	<i>R. tarandus</i>	Yukon	47	RC	470	6	-	0.665	0.0062	McDevitt <i>et al.</i> 2009
	<i>Odocoileus hemionus</i>	Toda la distribución	1766	RC; cytB	1 613	496	-	0.889	0.0370	Latch <i>et al.</i> 2009
	<i>O. hemionus</i>	MD-F	388	RC; cytB	1 613	135	-	0.982	-	Latch <i>et al.</i> 2009
	<i>O. hemionus</i>	California	65	RC	624	53	-	-	-	Pease <i>et al.</i> 2009
	<i>O. hemionus</i>	México	94	RC; ND2	1 155	51	37	0.967	0.0170	Torres Orozco, presente
	<i>O. virginianus</i>	México	66	RC	414	58	50	0.879	0.5710	Calderon-Lobato, 2009
	<i>O. virginianus</i>	Venezuela	26	RC	730	23	-	0.988	0.0260	Moscarella <i>et al.</i> 2003
	<i>O. virginianus</i>	EUA	370	RC	750	15	-	0.410	-	Purdue <i>et al.</i> 2000
	<i>O. virginianus</i>	Colombia	4	RC	1 133	-	-	-	0.0454	Ruiz-García <i>et al.</i> 2007
Giraffidae										
	<i>Giraffa camelopardali</i> : Africa		266	RC; cytB	1 707	35	23	0.540	0.0072	Brown <i>et al.</i> 2007

Los resultados de esta investigación sugieren que la ecorregión de los desiertos del Suroeste propuesta por DeVos y colaboradores (2003) incluye al menos tres haplogrupos distintos en México. El análisis de la diversidad genética a nivel estatal, local y mediante la construcción de haplogrupos permitió comparaciones interpoblacionales. Cabe mencionar que los haplogrupos reflejan en gran parte la procedencia de los individuos formando grupos monofiléticos en Baja California Sur (H3) y Chihuahua (H1). Esto permite que la variación genética a nivel de haplogrupo, estatal y local sea semejante. En todos los casos las cifras más altas se encontraron en Baja California Sur. Esto podría ser resultado de una alta variación intrínseca de las poblaciones nativas o un mayor aislamiento entre los individuos del mismo haplogrupo.

En el primer escenario, la alta diversidad genética podría deberse a que las poblaciones de Baja California Sur provienen de poblaciones con gran variación. De ser cierto, la diversidad genética obtenida y la de los individuos filogenéticamente más cercanos (subespecies distribuidas en la península y en California) debería presentar cantidades relativamente similares y altas. Esto concuerda con lo reportado por Latch y

colaboradores (2009) quienes encontraron que la diversidad genética más alta del venado bura se encuentra en el haplogrupo de California (ver MD-F en Tabla 5.1).

En el segundo escenario, una menor necesidad de desplazamiento de los individuos debido a la presencia de cuerpos de agua y la intrincada topografía de la Sierra de la Giganta podrían favorecer el aislamiento entre poblaciones y por lo tanto mantener niveles altos de diversidad genética en la región. Esto podría ser evaluado a través de los índices de fijación (*v. gr.*,  $F_{ST}$ ) en diversas poblaciones de la región, sin embargo, el número de individuos y poblaciones muestreadas en este estudio impide la obtención de estos resultados.

Finalmente, a partir de nuestros datos el primer escenario resulta más plausible para explicar la alta diversidad pero es imposible descartar alguna de las dos hipótesis hasta que no se realicen estudios con mayor número de poblaciones dentro de la península. Es factible que la gran variación genética encontrada en Baja California Sur dependa de la interacción de ambos escenarios.

Ahora bien, los valores más bajos de diversidad genética a nivel haplogrupo (H1) y local (COY) se localizan en Chihuahua. Esto podría ser interpretado como una característica de las poblaciones del desierto Chihuahuense. No obstante, los valores de variación haplotípica de Santa Anita (STA) en Chihuahua también son similares al resto de las localidades estudiadas y provocan un incremento en la diversidad nucleotídica a nivel estatal. Esto sugiere que los niveles de diversidad de Coyame (COY) podrían ser resultado de la homogenización genética debida a la ancestría común (endogamia) entre los individuos de la misma población.

### III. Estructura genética

Todos los estimados de diferenciación genética y de asignación de poblaciones indicaron la existencia de estructura genética. La mayor estructura se esperaría encontrar entre Baja California Sur (H3) y el resto de las poblaciones no peninsulares. No obstante, los valores más altos de diferenciación genética, tanto de distancia genética como del índice de fijación, se encontraron entre Chihuahua y el resto de los estados en contraste con lo esperado bajo un aislamiento por distancia.

El análisis entre localidades ayuda a entender el panorama observado a nivel estatal. Las localidades geográficamente cercanas entre sí mostraron una diferenciación genética menor que las más lejanas, lo que coincidiría con un aislamiento por distancia (Aguirre, 2007), excepto en la localidad de Coyame (COY). La localidad de Coyame (COY) se distingue porque presenta menor diversidad haplotípica, los valores más altos de  $F_{ST}$

y de distancia genética inclusive al compararla con localidades cercanas como STA. El valor promedio de las distancias genéticas entre COY y las demás poblaciones es el triple ( $\bar{x} = 0.03285$ ) que el promedio entre las poblaciones restantes ( $\bar{x} = 0.0116$ ), lo que indica una diferenciación poblacional importante y se ve reflejado en el árbol de distancia genética calculada a partir de las diferencias pareadas entre grupos (**K**).

A pesar de que no siempre es posible conocer el valor óptimo de **K** (Pritchard *et al.* 2000), las cuatro poblaciones inferidas muestran un patrón de diferenciación similar al de los haplogrupos. Pero el análisis bayesiano de STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) identificó una subestructura en el haplogrupo de Sonora (H2). Como era de esperarse, la menor distancia genética calculada a partir de las diferencias pareadas entre grupos (**K**) se encontró entre las poblaciones inferidas en Sonora. Esta agrupación resulta concordante con la distancia geográfica encontrada entre los sitios de muestreo y los patrones de dispersión de la especie (Anderson y Wallmo, 1984).

La carencia de haplotipos compartidos entre las muestras peninsulares y continentales, el patrón de estructura genética, la identificación de los individuos dentro del **K=3**, y la monofilia recíproca de los individuos dentro del H3 indican que las poblaciones no han experimentado altos niveles de flujo genético histórico y es consistente con un aislamiento por distancia ancestral entre los individuos de Baja California Sur con respecto al resto de las poblaciones mexicanas. Grismer (2000) y Riddley y colaboradores (2000) también encontraron monofilas recíprocas de ADNmt entre mamíferos y reptiles terrestres distribuidos tanto en la península como en el continente. Este resultado ha sido interpretado como evidencia filogeográfica de la separación y posterior aislamiento de las poblaciones del desierto Peninsular de Baja California con el resto del desierto Sonorense hace aproximadamente un millón de años (Grismer, 2000). Contrariamente, la filogenia de todas las subespecies de *O. hemionus* sugiere otro patrón.

Al parecer, los niveles de diferenciación entre Baja California Sur y el resto de la muestra podrían ser resultado de la deriva génica y del aislamiento causado por la cordillera de las Rocallosas y las sierras de California. De ello resulta que los valores y formas de variación genética entre los haplogrupos de California y Baja California Sur sean más similares entre sí que con el resto (Tabla 5.1). Además, esta hipótesis coincide con lo reportado para otros cérvidos; donde las Rocallosas son propuestas como una barrera al flujo genético y un factor promotor de la subespeciación como ocurre con el alce (*Alces alces*) (Hundertmark *et al.* 2003).

Finalmente, se esperarían mayores niveles de estructura genética entre las poblaciones peninsulares y las del resto del continente debido al aislamiento del flujo



genético histórico y actual, ya que actualmente el Mar de Cortés es una barrera más conspicua para la dispersión de vertebrados terrestres que la Sierra Madre Occidental la cual separa a los desiertos Sonorense y el Chihuahuense.

Ahora bien, el patrón de estructura observado entre Chihuahua y el resto de las poblaciones podría ser explicado de tres formas: 1) por la existencia de una frontera al flujo genético como la Sierra Madre Occidental, 2) como el resultado de los factores ecológicos y la predicción de hábitat sobre la estructura genética como lo reportado por Pease y colaboradores (2009) y 3) como el resultado de una introgresión entre las especies *O. hemionus* y *O. virginianus*.

La Sierra Madre Occidental ha sido propuesta como una frontera al flujo genético entre las poblaciones del desierto Chihuahuense y Sonorense de mamíferos de tamaño pequeño como *Peromyscus eremicus* (Walpole *et al.* 1997). Sin embargo, esto no concuerda con las regiones faunísticas de la República que incluyen los desiertos de México en una misma región (INEGI, 2011). De ello resulta que la hipótesis de predicción de hábitat o introgresión resulten más probables.

Bajo la hipótesis de predicción de hábitat se esperaría que el desierto Chihuahuense presentara características únicas (*v. gr.*, vegetación, precipitación, temperatura) que promovieran la diferenciación del grupo H1 con relación al resto de las poblaciones. No obstante, la semejanza genética de STA con respecto a las poblaciones de Sonora, su pertenencia al H2, así como la carencia de otras poblaciones muestreadas en el desierto Chihuahuense imposibilita ésta aseveración.

Finalmente, la alta diferenciación de COY con respecto a las otras poblaciones sugiere la existencia de híbridos en dicha población y por lo tanto la distancia genética observada podría ser el producto del muestreo de ADN materno proveniente de la especie hermana (*O. virginianus*). Se van a necesitar mas datos, tanto de genes nucleares como de mas poblaciones para explorar estas ideas ya que también podría deberse a que los haplotipos en esta población son más antiguos y han estado aislados.

#### **IV. Análisis demográficos**

El venado bura surgió probablemente hace 1.4 a 4.3 millones de años en el suroeste de Estados Unidos (Douzery *et al.*, 1997) y sobrevivió durante el Pleistoceno al margen de los glaciares (Latch *et al.*, 2009), sin embargo, otros grandes herbívoros no soportaron los cambios climáticos.

Los análisis de distribución *mismatch*, los estadísticos de neutralidad (*v. gr.* **F<sub>s</sub>** de Fu y **D** de Tajima) y el *skyline plot* indican una expansión poblacional de *O. hemionus* en

México. Esto permite explicar los enormes tamaños efectivos y la alta diversidad genética encontrada. Además, concuerda con los tamaños efectivos propuestos para otros sobrevivientes de las extinciones Pleistocénicas (Martin y Klein, 1984; Pérez-Espona, 2009). Al parecer, la extinción de la megafauna herbívora creó un vacío en muchos de los nichos ecológicos, lo que podría haber afectado positivamente la tasa de crecimiento y el rango de distribución de herbívoros de talla mediana como el berrendo, los venados bura y cola blanca, los pecaríes y las liebres (Challenger, 1998).

Los efectos Pleistocénicos sobre las biotas fueron distintos en cada región. En el desierto Sonorense el descenso en el nivel del mar provocó una expansión de los territorios áridos, causando la expansión en la distribución de varias especies (Morafka *et al.*, 1992). Lo anterior concuerda con la red de haplotipos en forma de estrella, las distribuciones *mismatch* y las pruebas de neutralidad negativas significativas para el H2. En cambio, los efectos climáticos del desierto Chihuahuense provocaron la reducción en las distribuciones, acompañada por un incremento en la especiación vicariante de la biota (Morafka *et al.*, 1992), lo cual puede haber influido en la diferenciación de las poblaciones de venado bura y podría verse reflejado en las pruebas de neutralidad no significativas.

El *Skyline plot* sugiere que la expansión poblacional ocurrió durante el Pleistoceno antes del último máximo glacial (UMG), hace 40 000 años aproximadamente. Los análisis previos plantean que la expansión poblacional de la especie debió ocurrir antes o durante el UMG. Las fechas aproximadas reportadas por otros autores para la expansión del venado bura varían entre hace 27, 000 ± 11, 000 y 3 000 ± 2 000 años según el haplogrupo (Latch *et al.*, 2009; Pease *et al.*, 2009). La datación utilizada en este estudio debe ser interpretada con cuidado, debido a que la tasa de sustitución utilizada es una aproximación propuesta por Latch *et al.* (2009) a partir de las tasas de sustitución de la región control y del *cytB* y no de la región control y el ND2. No obstante, los valores obtenidos en este estudio se encuentran dentro del margen de error propuesto por Latch *et al.* (2009) anteriormente y permiten concluir que la expansión no es consecuencia de la influencia reciente del hombre sobre las poblaciones de venado bura.

## V. Red de Haplotipos

La red de haplotipos coincide con los patrones observados anteriormente en la estructura genética, la filogenia y la expansión poblacional encontradas en esta investigación, como se resume en la Fig. 5.1. Los haplotipos de *O. hemionus* conforman

una red con el centro en el desierto Sonorense y una expansión de varios pasos mutacionales hacia Baja California Sur, lo que concuerda con lo propuesto por Riddler y colaboradores (2000).

La topología en forma de estrella sugiere la existencia de una expansión poblacional a partir del H2, es decir, a partir del Desierto Sonorense. Esto se ajusta con la expansión poblacional post-glacial del venado bura y coincide con las distribuciones *mismatch* y las pruebas de neutralidad. Sin embargo, en el resto de haplogrupos no se observa el mismo patrón. Esto puede ser resultado del muestreo diferencial entre las distintas poblaciones, ya que las redes de haplotipos dependen exclusivamente de los haplotipos muestreados (Posada y Crandall, 2001). En la red de haplotipos también es evidente la disociación entre el posible haplogrupo “híbrido” proveniente del desierto chihuahuense (H1) con el resto de la red.

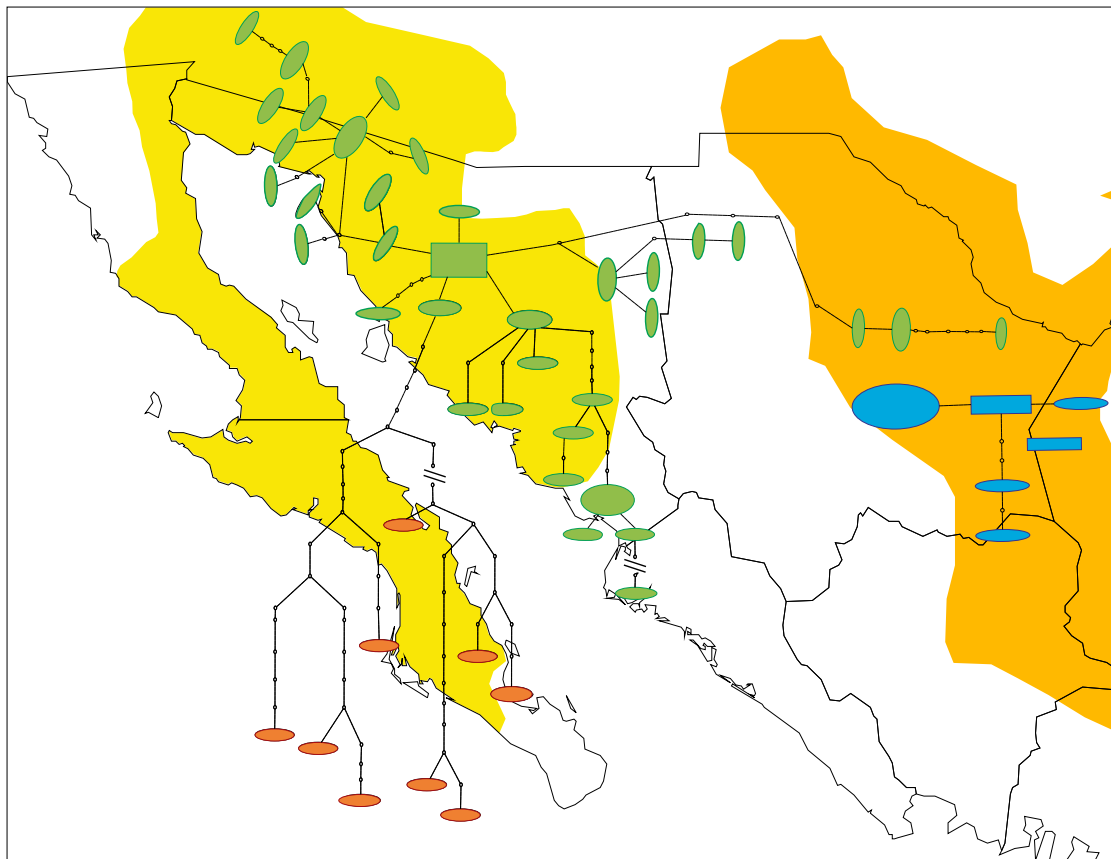


Figura 5.1 Red de Haplotipos en un contexto geográfico

(Los colores de la red representan los haplogrupos (H) H1=azul, H2=verde, H3=naranja. El tamaño del círculo es proporcional al número de individuos en ellos. Cada círculo representa un paso mutacional. Además se muestran los desiertos Chihuahuense (naranja) y Sonorense (amarillo) )

## VI. Filogenia molecular

Nuestra filogenia de las especies del género (Fig. 4.10) coincide con las filogenias reportadas previamente por Gilbert y colaboradores (2006) y por Douzery y Randi (1997). En todas ellas el género *Odocoileus* es un grupo monofilético con respecto al género *Mazama*. La topología del árbol difiere a la Fig. 4.2 en las relaciones entre Baja California Sur, convirtiendo el grupo monofilético en parafilético. Esto puede ser resultado a la inclusión de mayor número de individuos como grupo externo. Si todos los individuos de Baja California se hubieran mantenido aislados del resto del continente se esperaría un grupo monofilético, sin embargo, la condición parafilética es un paso previo a la monofilia recíproca. En otras palabras, los individuos de Baja California Sur parecen estar en proceso de divergencia, o ser un artefacto de los métodos de reconstrucción y los marcadores usados.

Un patrón filogenético más interesante surge a partir de la inclusión de las subespecies del venado bura como lo muestra el árbol de la región control mitocondrial (ver Fig. 4.11). Conforme a lo esperado, el árbol reúne monofiléticamente al género *Odocoileus*, sin embargo, la división entre *O. hemionus* y *O. virginianus* no es evidente.

La topología separa en grupos monofiléticos al venado cola negra (*O. h. sitkenis* y *O. h. columbianus*) y al resto del género *Odocoileus*, incluidas las otras subespecies de *O. hemionus* y a *O. virginianus*. En otras palabras, la filogenia muestra una divergencia entre los linajes mitocondriales del venado cola negra y el resto del género. Lo que concuerda con la alta divergencia genética entre el venado bura y el venado cola negra en ADN mitocondrial reportado por Latch y colaboradores (2009) y considerado entre los niveles de divergencia más altos encontrados dentro de una misma especie (Latch et al. 2009).

Esto podría discrepar con la teoría de Heffelfinger (2006) sobre el origen del venado bura, la cuál sugiere que el venado bura es un híbrido resultado del apareamiento del venado cola negra y el venado cola blanca durante el Plesitoceno. No obstante, debido a su conducta los híbridos más probables son resultado de la cruce de machos *O. hemionus* y hembras *O. virginianus* (Carr et al., 1986; Heffelfinger, 2006). Bajo ésta perspectiva se esperaría que el venado bura presentara linajes maternos (v. gr., ADNmt) de venado cola blanca y una carga genética mixta en marcadores de herencia biparental (v. gr., microsátélites). Dicho patrón concuerda con el encontrado en esta investigación (Fig. 4.11).

Además, se observó una coherencia parcial con la designación de subespecies de Hall y Wallmo (Anderson y Wallmo, 1981). El haplogrupo perteneciente a Sonora (H2)

concuera con la subespecie reportada en la región (*O. h. crooki*), mientras que el haplogrupo peninsular (H3), aunque en menor medida, también comparte similitudes con la subespecie *O. h. peninsulae* designada para la región del muestreo.

Probablemente la característica más interesante del árbol es la parafilia entre el venado cola blanca y el haplogrupo chihuahuense (H1), por consiguiente, la tercer hipótesis de la estructura genética del haplogrupo de Chihuahua (H1) sobre la introgresión entre las especies de *Odocoileus* resulta la más probable. Posiblemente los individuos de COY son resultado del apareamiento de machos bura con hembras cola blanca provocando la existencia de haplotipos mitocondriales de cola blanca en individuos con fenotipo bura (Cathey *et al.* 1998; Carr *et al.* 1986) lo que a su vez coincidiría con sus índices de diversidad haplotípica y grado de diferenciación genética previamente discutidos. Este tipo de híbridos se han reportado con mayor frecuencia debido a que el macho *O. hemionus* presenta un cortejo más agresivo (Carr *et al.* 1986; Heffelfinger, 2006).

Sin embargo, la topología por sí sola no permite discernir entre los dos tipos de híbridos. También es posible que los dos haplotipos de cola blanca unidos monofiléticamente al resto del H1 (161 y 162 en Fig. 4.7) presenten haplotipos mitocondriales de *O. hemionus* y que el resto (41 - 45 en Fig. 4.7) representen a los individuos de *O. virginianus* sin introgresión. Para poder esclarecer estas relaciones se recomienda realizar una filogenia con mayor número de haplotipos de *O. virginianus*.

## VII. Implicaciones para la Conservación

La genética tiene responsabilidades sociales importantes como la colaboración en la planeación de la conservación con el fin de preservar el potencial evolutivo de la especie (Frankel, 1974; Crandall *et al.* 2000). Los altos niveles de diversidad genética podrían ser traducidos en un estado saludable de las poblaciones (Petroldi *et al.* 2007) si no consideramos la biología evolutiva del organismo. Sin embargo, los grandes tamaños efectivos ancestrales de hembras obtenidos en este trabajo y en Latch y colaboradores (2000) podrían explicar los altos valores de diversidad obtenidos y concuerdan con la hipótesis de expansión de rango reciente.

Contrariamente, se estima que las poblaciones mexicanas tienen un pequeño tamaño poblacional (SEMARNAT, 2010) y por lo tanto es posible que su tamaño efectivo sea también reducido. Esta aseveración es consistente con las densidades poblacionales menores registradas en las zonas áridas comparadas con poblaciones de otras zonas ecológicas (Challenger, 1998). La posible disparidad encontrada entre los tamaños

efectivos ancestrales de esta investigación y el tamaño efectivo actual estimado podría estar influenciada por el incremento en la aridez del Suroeste de Estados Unidos y del norte de México hace 9, 000 años (Van Devender y Spaulding, 1979), provocando un decremento poblacional y con el aumento de los factores limitantes antrópicos de la especie como la ganadería, la pérdida de hábitat y la actividad humana durante los últimos siglos (MDWG, 2003; Sánchez-Rojas *et al.* 2008). Para poder distinguir entre ambos panoramas es necesario conocer los tamaños efectivos actuales a través de estudios poblacionales rigurosos o mediante la utilización de marcadores moleculares como los microsátélites ya que su alta tasa de mutación es más efectiva para investigar patrones filogeográficos recientes. Este resultado será clave para la designación de la vulnerabilidad de las subespecies continentales que actualmente se encuentran sin protección legal (SEMARNAT, 2010; Sánchez Rojas *et al.*, 2008) y podrían ser fuente de otras investigaciones ya que si las poblaciones eran muy grandes las reducciones recientes podrían tener efectos importantes debido a depresión por endogamia.

Generalmente se considera un  $N_e > 50$  actual (ya que la estimación de este trabajo es histórica) como el tamaño efectivo mínimo para que una población local sobreviva a largo plazo, sin embargo, debido a las características intrínsecas de la especie se podrían requerir de tamaños efectivos mayores. Frankham *et al.* (2002) sugieren que para conservar el potencial evolutivo de la especie se requiere conservar el 90% de la diversidad genética de la especie durante los próximos 100 años, es decir, cerca de 500 a 5000 individuos por haplogrupo. Estas reglas generales, también llamadas “reglas mágicas”, son una buena aproximación inicial y permiten tomar medidas de conservación urgentes cuando los datos son escasos. Pero pueden no reflejar la historia evolutiva del grupo (Eguiarte y Piñero, 1990) ni considerar la estocasticidad demográfica y ambiental a la que están sujetas las poblaciones (Lande, 1988). Podría ser recomendable realizar además análisis de viabilidad poblacional (PVA) que permiten saber con mejor precisión el tamaño poblacional necesario para conservar a la especie

Esta investigación encontró que dentro de la distribución mexicana del venado bura existen al menos tres linajes evolutivos diferentes que coinciden en gran parte a los estados de Baja California Sur, Sonora y Chihuahua. Esto conlleva implicaciones en la conservación y manejo interesantes. Los resultados indican que los individuos de *O. hemionus* no son intercambiables entre sí, es decir, que es necesario realizar un manejo diferencial de las poblaciones por lo menos a nivel estatal. De esta manera se conservará tanto la especie en diferentes regiones como el distinto potencial evolutivo de las poblaciones dentro de unidades de manejo diferentes.

Las UMAs han sido propuesta como alternativa *in situ* para la conservación de ecosistemas (Sánchez *et al.* 2006). El manejo exitoso dentro las poblaciones en cautiverio de venado bura deberá evitar la introducción de individuos con diferente linaje evolutivo en las poblaciones y permitir que el flujo genético continúe entre los individuos del mismo linaje. La primera acción busca conservar las relaciones del flujo genético histórico y el potencial evolutivo de los linajes obtenidos a partir de esta investigación. Además evitaría posibles riesgos de depresión por exogamia como los reportados por la translocaciones de individuos de diferentes linajes en artiodáctilos como *Ovis canadensis* (Halloran y Glass, 1959) y *Capra ibex ibex* (Frankham, 2002). De lo contrario, un flujo génico ( $Nm$ ) entre linajes diferentes mayor a uno ( $Nm > 1$ ) podría promover la unificación en las frecuencias haplotípicas de la especie y por lo tanto imposibilitaría la existencia de divergencias interpoblacionales debidas a la deriva genética e impediría la preservación de adaptaciones a los ambientes locales afectando negativamente la adecuación de los individuos (Aguirre, 2007; Eguiarte y Piñero, 1990).

La segunda acción pretende evitar los problemas frecuentes en las poblaciones en cautiverio, como la depresión por endogamia, la pérdida de diversidad genética, el decremento en el número censal evitando el riesgo de extinción de la especie por procesos estocásticos o inducidos.

Siguiendo estas recomendaciones, resultado de esta investigación, se espera contribuir en la conservación y el manejo del venado bura en México. Estas recomendaciones consideran la historia ancestral del venado. La investigación de A. Tapia (en proceso) sobre los procesos genéticos actuales de la especie a partir de marcadores nucleares (microsatélites) permitirá realizar recomendaciones de manejo y conservación más puntuales.

## 6. Conclusiones y Perspectivas

---

Este trabajo es una primera aproximación al estudio genético del venado bura en México. Si bien los resultados no muestran toda su historia evolutiva, sí permiten la identificación de patrones básicos necesarios para comenzar a determinar la forma de manejo bajo una perspectiva de conservación y para entender la historia evolutiva de la especie.

Entro los aspectos genéticos relevantes que brinda esta investigación están los altos niveles de diversidad genética de *O. hemionus* y la diferenciación genética marcada al menos a nivel estatal entre Baja California Sur, Sonora y Chihuahua.

Como hemos visto, todos los individuos presentan una estructura filogeográfica fuertemente marcada que se confirma a través de la comparación  $N_{ST}$  y  $G_{ST}$ , la parcial congruencia entre las cuatro poblaciones inferidas en STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000) con los haplogrupos. Además se ratifica por la semejanza entre los haplogrupos y la delimitación a nivel estatal que se ajusta a todos los individuos, excepto a cinco individuos que se incluyen H2 y no provienen de Sonora. Sin embargo, su inclusión resulta evidente dado que la expansión poblacional proviene de dicho haplogrupo.

A partir de esta investigación se identificaron ciertos temas de interés sobre la historia evolutiva y la conservación del venado bura. Ejemplo de ello es la radiación de la especie posiblemente a partir del desierto Sonorense, la posible origen Californiano de las poblaciones de Baja California Sur y la gran diferenciación poblacional de COY en Chihuahua, indicando la existencia de híbridos o de factores ecológicos promotores de la divergencia.

Finalmente, con el objetivo de conservar dichos procesos evolutivos en las distintas poblaciones de cada región, se sugiere evitar reintroducciones entre individuos de distintos estados, además se podría incrementar la conectividad entre los individuos del mismo grupo para minimizar la deriva génica. Sin embargo, la investigación de las poblaciones con marcadores moleculares permitirá conclusiones más profundas.

Además, se recomienda ampliar la muestra de los individuos por población e incluir individuos del resto de la distribución de *O. hemionus*. Sería interesante contar con más individuos de Chihuahua para determinar si en realidad existe una estructura tan marcada o es simplemente producto de la posible hibridación de la población muestreada. Es necesario incluir poblaciones de *O. h. fulginatus* que se encuentra en Baja California Norte, esto podría ayudar a esclarecer el surgimiento de las poblaciones de la península. Igualmente se requieren estudios sobre la ancestría de la población de



Coyame, Chihuahua usando también marcadores nucleares, ya que existen evidencias de una posible introgresión entre el género *Odocoileus*. También se requiere incluir en una futura investigación las subespecies isleñas *O. h. sheldoni* y *O. h. cerrosencis* que se encuentran sujetas a protección legal debido a sus pequeños tamaños poblacionales.

## Literatura Citada

---

- Aguirre, E. 2007. Flujo Génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En Eguiarte, L., Souza, V. Y Aguirre, X. (Compiladores). *Ecología molecular*. México, CONABIO, INE, UNAM., SEMARNAT.
- Anderson, A. y Wallmo, O. 1984. *Odocoileus hemionus*. The American Society of Mammalogist **219**: 1-9
- Avise, J. 2000. *Phylogeography. The story and formation of species*. Londres: Harvard University Press
- Ballard, W., Lutz, D., Keegan, T., Carpenter, L., y C.deVos,Jr, J. 2001. Deer-predatorelationships:a review of recent North American studies with emphasis on mule and black-tailed deer. *Predation*. **29**: 99-115
- Barnett, R. 2009. Huichol art, a matter of survival III: motifs and symbolism. Recuperado del vínculo web el 20 de junio de 2012: <http://www.mexconnect.com/articles/3280-huichol-art-a-matter-of-survival-iii-motifs-and-symbolism>
- Beebee, T., y Rowe, G. 2003. *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford: Oxford University Press
- Boyce, W., Ramey, R., Rodwell, T., Rubin, E., y Singer, R. 1999. Population subdivision among desert bighorn sheep (*Ovis canadensis*) ewes revealed by mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* **8**: 99-106
- Broughton, R. y Gold, J. 2000. Phylogenetic Relationships in the North American Cyprinid Genus *Cyprinella* (Actinopterygii: Cyprinidae) Based on Sequences of the Mitochondrial ND2 and ND4L Genes. *Copeia* **1**: 1-10
- Brown, D., Brennman, R., Koepfil, K., Pollinger, J., Milá, B., Geordiadis, N., Louis Jr, E., Grether, G., Jacobs, D. y Wayne, R. 2007. Extensive population genetic structure in giraffe. *BMC Biology* **5**:57
- Calderón-Lobato, R. 2009. Análisis genético para la conservación y manejo de subespecies de *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) en México. Tesis profesional de Maestría. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional.
- Carr, S., Ballinger, S., Derr, J., Blankenship, L y Bickham, J. 1986. Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in west Texas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 9576-9580
- Castillo, A. 2007. La selección natural a nivel molecular. En Eguiarte, L., Souza, V. Y Aguirre, X. (Compiladores). *Ecología molecular*. México, CONABIO, INE, UNAM.,

- SEMARNAT. 441-466
- Cathey, J., Bickham, J. y Patton, J. 1998. Introgressive Hybridization and Nonconcordant Evolutionary History of Maternal and Paternal Lineages in North American Deer. *Society for study of Evolution* **52**: 1224-1229
- Ceballos, G., Blanco, S., González, C. y Martínez, E. 2006. *Odocoileus hemionus* (venado bura). Distribución potencial. Extraído del proyecto DS006 Modelado de la distribución de las especies de mamíferos de México para un análisis GAP. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Financiado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México
- Challenger, A. 1998. *Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México: Pasado, presente y futuro*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: México
- Charlesworth, B y Charlesworth, D. 2010. *Elements of Evolutionary Genetics*. Colorado: Roberts and Company Publishers
- Clement M., Posada D., and Crandall K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**: 1657-1660
- Contreras, J., Mellink, E., Martinez, R., Medina, G. 2007. Parásitos y enfermedades del Venado Bura (*Odocoileus hemionus fuliginatus*) en la parte norte de la sierra de San Pedro Mártir, Baja California, México. *Revista Mexicana de Mastozoología* **11**:8-20
- Crandall, K., Bininda-Emonds, O., Mace, G y Wayne, R. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree* **15**: 290-295
- deVos, Jr. J. C., M. R. Conover, and N. E. Hedrick (editors). 2003. En Heffelfinger, J. 2006. *Deer of the Southwest*. Texas: Texas A&M University Press
- Dirección General de Estadística e Información Ambiental (DEGEIA). 2003. Aprovechamiento de la Vida Silvestre. En *Informe de la Situación del Medio Ambiente en México 2002*. México Pp 211-265
- Ditchkoff, S., Lochmiller, R., Masters, R., Starry, W. Y Leslie, D. 2001. Does fluctuating asymmetry of antlers in White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) follow patterns predicted for sexually selected traits? *Proc. R. Soc. Lond B* **268**: 891-898
- Domínguez-Domínguez, O y Vázquez-Domínguez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*. **32**: 59-70
- Douzery, E. y Randi, E. 1997. The Mitochondrial Control Region of Cervidae: Evolutionary Patterns and Phylogenetic Content. *Molecular Biology and Evolution*. **14**: 1154-1166

- Drummond, A., Rambaut, A. y Suchard, M. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 214
- Drummond, A., Rambaut, A., Shapiro, B. y Pybu O. 2005. Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. *Mol. Biol. Evol.* **22**: 1185–1192
- Duran-Álvarez, C. 2012. *Genética de poblaciones de borrego cimarrón (Ovis canadensis) en Pilares, Coahuila, México. Su manejo y conservación en cautiverio*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Earl, D. y vonHoldt, B. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**: 359-361
- Edgar, R. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-97
- Eguiarte, L. Y Piñero, D. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *CIENCIAS*. **4**: 34 – 46
- Excoffier, L. Laval, G y Schneider, S. 2006. Arlequin ver 3.1. An integrated software package for population genetics data analysis. Universidad de Berna. Suiza
- Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* **164**: 1567–1587
- Feulner, P., Bielfeldt, W., Bradvarovic, J., Eckert, I. y Hartl, G. 2004. Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). *Conservation Genetics* **8**: 1051 – 1059
- Flagstad, O y Roed, K. 2003. Refugial origins of reindeer (*Rangifer tarandus L.*) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Evolution*, **57**: 658 – 670
- Frankham, R., Ballou, J y Briscoe, D. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Reino Unido: Cambridge University Press
- Fu, Y. 1997. Statistical Test of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*. **147**: 915-925
- Gallina, S. Y Mandujano, S. 2009. Investigaciones sobre ecología, conservación y manejo de ungulados silvestres en México. *Tropical Conservation Science* **2**: 128-139
- Gilbert, C., Ropiquete, A. y Hassainin, A. 2006. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Rumianta): Systematics, morphology and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**:101-117
- Gordon, D., Abajian, C. y Green, P. 1998. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research* **3**: 195-202

- Greig, J. 1979. Principles of genetic conservation in relation to wildlife management in Southern Africa. *South African Journal of Wildlife Restoration*. **9**: 57 – 78
- Grismer, L. 2000. Evolutionary biogeography on Mexico's Baja California peninsula: A synthesis of molecules and historical geology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 14017-14018
- Guia, A. y Saitoh, T. 2007. The gap between the concept and definition in the Evolutionary Significant Unit: the need to integrate neutral genetic variation and adaptative variation. *Ecol Res* **22**: 604-612
- Guindon, S. et al. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **59**: 307-321
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98
- Halloran, A., y Glass, B. 1959. The Carnivores and Ungulates of the Wichita Mountains Wildlife Refuge, Oklahoma. *Journal of Mammalogy*. **3**: 360 – 370
- Harpending, H. y Rogers, A. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 552-569.
- Hedrick, P. 2011. *Genetics of Populations*. 3ra edición. Massachusetts: Johnes and Bartlett publishers
- Heffelfinger, J. 2006. Deer of the Southwest. Texas: Texas A&M University Press
- Heffelfinger, J. R., C. Brewer, C. H. Alcalá-Galván, B. Hale, D. L. Weybright, B. F. Wakeling, L. H. Carpenter, and N. L. Dodd. 2006. Habitat Guidelines for Mule Deer: Southwest Deserts Ecoregion. Mule Deer Working Group, Western Association of Fish and Wildlife Agencies.
- Hubitz, M., Falush, D., Stephens, M., y Pritchard, J. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* **9**: 1322–1332
- Hudson, R., Slatkin, M. y Madisson P. (1992). Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* **132**: 583-589.
- Hundertmark, K, Bowyer, T., Shields, G. Y Schwartz, C. 2003. Mitochondrial phylogeography of moose (*Alces alces*) in North America. *Journal of Mammalogy* **84**: 718 – 728
- Hundertmark, K, Bowyer, T., Shields, G. y Schwartz, C. 2003. Mitochondrial phylogeography of moose (*Alces alces*) in North America. *Journal of Mammalogy*, **84**:718-728
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2011. Regiones faunísticas. Recuperado el 18 de junio de 2012 del vínculo web:

<http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/datosgeogra/vegfauna/vegetaci.cfm?c=191>

- Kearns, A., Joseph, L., Edwards, S. y Double, M. 2009. Inferring the phylogeography and evolutionary history of the splendid fairy-wren *Malurus splendens* from mitochondrial DNA and spectrophotometry. *Journal of Avian Biology* **40**: 7-17
- Latch, E., Heffelfiner, J., Fike, J., y Rohodes, O. 2009. Species-wide phylogeography of North American mule deer (*Odocoileus hemionus*): cryptic glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology* **18**: 1730-1745
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*. 241: 1455-1460
- Librado, P, y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. **25**: 1451-1452
- Logan, K., Cienfuegos, E., Sifuentes, A., González, M., Clemente, F., Mendoza, G., y Tarango, L. 2007. Patrones de Variación genética en cuatro subespecies de venado cola blanca del noreste de México. *Agrociencia*. **41**: 13-21
- Lutz, D. W., M. Cox, B. F. Wakeling, D. McWhirter, L. H. Carpenter, S. Rosenstock, D. Stroud, L. C. Bender, and A. F. Reeve. 2003. Impacts to changes to mule deer habitat. Pages 13-61 in J. C. deVos, Jr., M. R. Conover, and N. E. Headrick eds. Mule Deer conservation: issues and management strategies. Berryman Institute Press. Utah State University, Logan, Utah.
- Mandujano, S. et al. 2010. *Venados: animales de los dioses. Xalapa, México*: Secretaría de Educación de Veracruz
- Martin, P. S., and R. G. Klein (editors), 1984. Quaternary Extinctions: a prehistoric revolution. University of Arizona Press. Tucson, Arizona.
- Martínez, V. 2007. Retribuido el 20 de junio del vínculo web: <http://muledeercountry.com/2009/05/it-all-starts-with-the-bucks/>
- Mateos, M. 2005. Comparative phylogeography of livebearing fishes in the genera *Poeciliopsis* and *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes) in central Mexico. *Journal of Biogeography* **32**:775-780
- McDevitt, A., Mariani, S., Hebblewhite, M., Decesare, J., Morgantini, L., Seip, D., Weckworh, B. y Musiani, M. 2009. Survival in the Rockies of an endangered hybrid swarm from diverged caribou (*Rangifer tarandus*) lineages. *Molecular Ecology* **18**: 665-679
- McDevitt, A., Mariani, S., Hebblewhite, M., Decesare, N., Morgantini, L., Seip, D.,

- Weckworth, B. y Musiani, M. 2009. Survival in the Rockies of an endangered hybrid swarm from diverged caribou (*Rangifer tarandus*) lineages. *Molecular Ecology*. **18**: 665 – 679
- Moilanen, A y Meller, L. 2011. *Concepts and principles of spatial conservation planning*. Finlandia: University of Helsinki.
- Morafka, D. Adest, G., Reyes, L., Aguirre, G. y Lieberman, S. 1992. Differentiation of North American deserts: A phylogenetic evaluation of vicariance model. En Darwin, S. y Welden, A. *Biogeography of Mesoamerica: Proceedings of a symposium*. Mérida, Yucatán, México.
- Moreno, A. 2007. Tamaño Efectivo. En Eguiarte, L., Souza, V. Y Aguirre, X. (Compiladores). *Ecología molecular*. México, CONABIO, INE, UNAM, SEMARNAT.
- Moritz, C. 1994. Defining 'Evolutionary Significant Units' for conservation. *Tree* **9**: 373-375
- Moscarella, R. 2001. *Filogeografía y Genética de la Conservación del venado carmerudo de Venezuela*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Simón Bolívar. Venezuela
- Mule Deer Working Group (MDWG). 2003. Mule Deer: Changing landscapes, changing perspectives. Mule Deer Working Group, Western Association of Fish and Wildlife Agencies Consultado el 8 de abril de 2012 del vínculo web <http://www.muledeer.org/hunting/mule-deer-facts>
- Nagorsen, D., Fraker, M., y Panter, N. 1999. Conserving Mammals at Risk: The role of Taxonomy. *Proc Biology and Management of Species and Habitats at Risk* **1**: 41-48
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc.Natl. Acad. Sci.* **70**: 3321-3323.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Univ. Press
- Nei, M., y Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Nueva York: Oxford University Press
- Nelson, D. y Cox, M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Nueva York: Worth Publishers
- NOM-059-SEMARNAT-2010 NORMA Oficial Mexicana. 2010. 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.
- Pease K., Freedman, A., Pollinger, J., McCormack, J., Buermann, W., Rodzen, J., Banks, J., Meredith, E., Bleich, V., Schaefer, R., Jones, K., y Wayne, R. 2009. Landscape Genetics of California mule deer (*Odocoileus hemionus*): the roles of ecological and historical

- factors generating differentiation. *Molecular Ecology*. **18**: 1848-1862
- Pérez-Espona, S., Pérez-Barbería, F., Goodall, W, Jiggins, C., Gordon, I. y Pemberton, J. 2009. Genetic diversity and population structure of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*) populations: a mitochondrial survey. *Heredity*. **102**: 199–210
- Pérez-Espona, S., Pérez-Barbería, FJ., Goodall-Copestake, WP, Jiggins, CD., Gordon, IJ. Y Pemberton, JM. 2009. Genetic diveristy and population strucutre of Scottish Highland red deer (*Cervus elaphus*) populations: a mitochondrial survey. *Heredity* **102**: 199-210
- Perry, S. 2012. Mule Deer Looking Back At Ya. Retribuido del vínculo web: <http://www.backcountrygallery.com/photos/mule-deer-looking-back-at-ya/>
- Pertoldi, C., Bijlsma, R., y Loeschcke, V. 2007. Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challengs. *Biodiversity Conservation* **16**: 4147-4163
- Piñero et al., 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En 2008. CONABIO (ed): *Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 437-494
- Piñero, D., et al. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 437-494.
- Pons, O. y Petit, R. 1996. Measuring and Testing Genetic Differentiation with Ordered Versus Unordered Alleles. *Genetics* **144**: 1237-1245
- Posada, D. y Crandall, K. 2001. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *PNAS*. **98**: 13757–13762
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1253-1256.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. **155**:945–959
- Purde, J, Smith, M y Patton, J. 2000. Female Phylopatry and extreme Spatial Genetic Heterogeneity in White Tailed Deer. *Journal of Mammalogy*. **81**:179-185



- Ray. 2012. Mule Deer. Fur & Feathers 500 - a Canada Big Year for Birds and Mammals. Retribuido el 20 de junio de 2012 del vínculo web: [http://canadafurandfeathers.blogspot.mx/2012\\_02\\_01\\_archive.html](http://canadafurandfeathers.blogspot.mx/2012_02_01_archive.html)
- Renatería, M. 2007. Breve revisión de datos moleculares. En Eguiarte, L., Souza, V. Y Aguirre, X. (Compiladores). *Ecología molecular*. México, CONABIO, INE, UNAM, SEMARNAT.
- Riddle, R. R., Hanna, D. J., Alexander, L. F. & Jaeger, J. R. 2000. Evolutionary biogeography on Mexico's Baja California peninsula: A synthesis of molecules and historical geology. *PNAS*. **97**: 14438 -14443
- Rocha, M y Gasca, J. 2007. Ecología Molecular de la Conservación. En Eguiarte, L., Souza, V. Y Aguirre, X. (Compiladores). *Ecología molecular*. México, CONABIO, INE, UNAM, SEMARNAT. 251-272
- Ruíz-García, M., Randi, E., Martínez, M. y Álvarez, D. 2007. Relaciones Filogenéticas entre géneros de ciervos neotropicales (Artiodactyla: Cervidae) mediante secuenciación de ADN mitocondrial y Marcadores Microsatelitales. *Revista de Biología Tropical* **55**: 723-741
- Sánchez G. y Gallina, S. 2006. La metapoblación del venado bura en la reserva de la biosfera de Mapimí, México: Consideraciones para su conservación. *Cuadernos de Biodiversidad* **22**: 7 - 15
- Sanchez Rojas, G. y Gallina Tessaro, S. 2008. *Odocoileus hemionus*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. Recuperado el 8 de abril de 2012 del vínculo web: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)
- Sartore, J. 2011. Retribuido el 20 de junio de 2012 del vínculo web: <http://www.joelsartore.com/stock/search/?search=front+view>
- Scheinvar, E. 2010. Editor de Cabeceras v 3.0. (sin publicar; Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM)
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; Geneva
- SEMARNAT. 2010. *Plan de manejo tipo para Venado bura*. SEMARNAT, México
- Setchell, J. y Curtis, D. 2003. *Field and Laboratory Methods in Primatology*. Cambridge, R.U.: Cambridge Univeristy Press
- Slatkin, M y Hudson, R. 1991. Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Populations. *Genetics Society of America* **129**: 555-562

- Soulé, M y Frankham, R. 2000. Sir Otto Frankel: Memories and Tributes. *Conservation Biology*. **14**: 582-583
- Soulé, M. 1985. What Is Conservation Biology? *BioScience* **35**: 727-734
- Stanley, W. y Olson, L. 2005. Phylogeny, phylogeography, and geographic variation of *Sylvisorex howelli* (Soricidae), an endemic shrew of the Eastern Arc Mountains, Tanzania. *Journal of Zoology* **266**: 341-354
- Stephen, C., Devos, J., Lee, T., Bickham, J., Heffelfinger, J. y Rhodes, O. 2005. Population genetic analysis of Sonoran pronghorn (*Antilocropa Americana sonoriensis*). *Journal of Mammalogy* **86**: 000-000
- VanDevender, T., y Spaulding, W. 1979. Development of vegetation and climate in the southwestern United States. *Science* **204**: 701 - 710
- Vázquez, E. 2007. Ecología Molecular de la Conservación. En Eguiarte, L., Souza, V. Y Aguirre, X. (Compiladores). *Ecología molecular*. México, CONABIO, INE, UNAM., SEMARNAT. 441-466
- Vinuesa, P. 2011. Introducción a la Filoinformática. Recuperado el 20 de junio de 2012 del vínculo web: [http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/filoinfo\\_IE11/](http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/filoinfo_IE11/)
- Wada, K., Nakamura, M., Nishibori, M. y Yokohama, M. 2005. The complete nucleotide sequence of mitochondrial genome in the reindeer (*Rangifer tarandus*) and red deer (*Cervus elaphus*). En preparación
- Walpole, D., Davis, S. y Greenbaum, I. 1997. Variation in mitochondrial DNA in populations of *Peromyscus eremicus* from the Chihuahuan and Sonoran Deserts. *American Society of Mammalogist*. **78**: 397-404
- Weber, M. y Galindo Leal C. 2005 Venado bura. In: Ceballos, G. y G. Oliva (Coords.) 2005. Los mamíferos silvestres de México. FCE. CONABIO. Col. Sección de obras de ciencia y tecnología. 515-517p
- Zachos F, Hartl GB, Apollonio M, Reutershan T. (2003). On the phylogeographic origin of the Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*): evidence from microsatellites and mitochondrial DNA. *Mamm Biol* **68**: 284–298.
- Zachos, F., Hartl, G., Apollonio, M. y Reutershan, T. 2003. On the phylogeographic origin of the Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*): evidence from microsatellites and mitochondrial DNA. *Mammalian Biology*. **68**: 284 - 298
- Zeng, Y, Zhigang Jiang, Z y Li, C. 2007. Genetic variability in relocated Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) populations -Implications to reintroduction program. *Conservation Genetics*. **8**:1051–1059
- Zink, R., Drovetski, S. y Rohwer, S. 2006. Selective neutrality of mitochondrial ND2

sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **40**: 679–686

## ANEXO I

### Protocolo de Extracción de ADN para muestras de pelo usando CHELEX

1. Usar 30 pelos por extracción. Cortar el pelo lo más cercano a la raíz, de preferencia no dejar más de 5mm de pelo.
2. Colocar las raíces en un tubo con 100  $\mu$ l de solución CHELEX al 5%.
3. Agregar 17  $\mu$ l de Proteinasa K (10mg/ml).
4. Agregar 5  $\mu$ l de solución de DTT 0.5 M.
5. Incubar a 61°C durante 12 hrs
6. Verificar que la solución no contenga sólidos visibles, de lo contrario agregar más Proteinasa K(5  $\mu$ l aproximadamente) e incubar hasta que el pelo se disuelva por completo.
7. Incubar a 95°C durante 10 min, vortex suave cada 2 min.
8. Colocar en hielo durante 10 min.
9. Centrifugar 3 min a 10, 000 rpm.
10. Tomar el sobrenadante cuidando de no tocar el precipitado y colocar en un tubo nuevo.

#### NOTAS:

-Si tras el paso 5 no se han deshecho las raíces, verificar si el contenido del tubo huele a DTT (olor sulfuroso), si no existe dicho olor, agregar 3  $\mu$ l extra. -La resina CHELEX inhibe la reacción de PCR, en caso de haberla tomado accidentalmente, regresar el sobrenadante y repetir desde el paso 9.

Modificado por Gasca, J. a partir de Ceo, C., Kazerouni, R, y Rengan, K. 1993. "Absorption of silver ions by Chelex 100 chelating resin". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. **172**: 43-48.

## ANEXO II

### Precipitación de ADN

1. Agregar 7  $\mu$ l de EDTA 125 mM (pH 8.4).
2. Agregar 7  $\mu$ l de NaOAc 3 M (pH 5.2).
3. Añadir 180  $\mu$ l de Alcohol al 100% (Absoluto).
4. Vortex suave e incubar a TA durante 15 min.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 min.
6. Desechar suavemente y con cuidado el Alcohol.
7. Agregar 100  $\mu$ l de Alcohol al 70 %.
8. Centrifugar a 14,000 rpm durante 15 min.
9. Desechar el Alcohol y dejar secar.
10. Resuspender en 35  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O ultra pura.

#### NOTAS:

-Es importante que NO queden rastros de Alcohol.

