



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**GENÉTICA DE POBLACIONES CON BORREGO CIMARRÓN (*OVIS
CANADENSIS*) EN PILARES, COAHUILA, MÉXICO. SU MANEJO Y
CONSERVACIÓN EN CAUTIVERIO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CAROLINA DURÁN ALVAREZ



DIRECTOR DE TESIS:

Biólogo Jaime Gasca Pineda

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

▪ **La presente investigación se realizó bajo la dirección del Biólogo Jaime Gasca Pineda en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, con el apoyo del presupuesto operativo del Instituto de Ecología, UNAM y de los proyectos IN224309- 3 y IN202712, PAPIIT, DGAPA, UNAM, otorgados al Dr. Luis E. Eguiarte Fruns.**

▪

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi casa, por adoptarme, por enriquecer mi vida y generar las mejores condiciones para mi desarrollo humano y profesional.

Al laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, del Instituto de Ecología de la UNAM, en el cual siempre encontré las condiciones optimas durante todo el desarrollo la presente investigación.

Al Biólogo Jaime Gasca Pineda, tutor de esta tesis, por haber sido una parte fundamental para mi desarrollo profesional, por su confianza y apoyo. Por todo el conocimiento teórico y práctico que has compartido conmigo durante todo el tiempo que estuve bajo su tutoría, muchísimas gracias Jaime y gracias por tu amistad.

Al Doctor Luis E. Eguiarte Fruns y a la Doctora Valeria Souza, los jefes y encargados del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, los cuales siempre tuvieron tiempo para atender mis solicitudes. Gracias por recibirme como parte de se equipo de trabajo en el laboratorio y el apoyo incondicional durante todo el proceso de mi titulación, así como durante mi estancia en el laboratorio.

Al Maestro en Ciencias Enrique Scheinvar, el cual me enseñó a entender y usar parte de los programas fundamentales para el desarrollo del presente trabajo, por su amistad y sus comentarios para enriquecer mi trabajo, por sus ánimos y su confianza.

A las “chicas del labo” Nati y Sandris, por su apoyo, su ayuda, sus comentarios y por creer en mi siempre, las quiero.

Al biólogo Santiago Ramírez Barahona por su ayuda durante los análisis mitocondriales, su apoyo para la edición de las imágenes utilizadas en el presente documento, por su apoyo y amistad gracias Santi.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Rafael, Santiago, Roberto, Marco, Jonás, Jorge, Richard, Eria, Morena, German. Los cuales siempre me ayudaron con las dudas que me surgían, por sus comentarios en los seminarios, por su apoyo y amistad.

Gracias a las técnico del laboratorio, M. en I.B.B. Laura Espinosa Asuar y Dra. Erika Aguirre Planter que siempre tuvieron tiempo de asistir mis dudas, por tener todos los reactivos y condiciones del laboratorio para trabajar, por todos los tramites administrativos de los que se encargan para que todo funcione; gracias chicas.

A la señora Silvia Barrientos Villanueva, especiales gracias, por cuidarnos, consentirnos, y generar un espacio en donde nos da gusto trabajar, gracias por su amistad.

Gracias también a todos los profesores que durante mi proceso de formación aportaron en gran medida el que yo llegue a este momento de titulación: Jaime Gasca Pineda, Enrique Scheinvar, Luis Enrique Eguiarte Fruns, Valeria Souza, Daniel Piñero, María Ana Fernandez Alamo , Luis Felipe Jimenez, Rafael Rodríguez Martínez, Zenón Cano Santana, M. Cristina Pérez, Reyes

A todos mis queridos amigos “del cuadro” con los cuales compartí muchas historias, momentos, prácticas de campo, y aventuras: Claudia (chapis), Diana, Joselin (china), Nadia, Nayeli, Daxel, Ferch, Victor, Alejandro, el Oso, José (rey). Y a todos mis amigos de los proyectos (café y barra Ciencias): Jassiel, Rocio, Carmen, Claudia, Paty, Jaime, Daniel.

A mi mamá que me apoyado y ha esperado este momento tal vez más que yo, que la amo; a mi hermano Joel, mi tía Melita y mis primos: Vero, Ale, Gaby, Ana, Carlita y Viri los quiero mucho.

A mis abuelitos que siempre se me interesan y preocupan de mi desarrollo personal y profesional, por todo su amor consejos y apoyo, los amo mucho.

A mi familia adoptiva familia Díaz, señora Elena, Miguel, Rosita, José y Leo, por aguantarme y hacerme sentir parte de su familia, por su apoyo, aguantar mis historias y su cariño.

A Daniel Díaz, por amarme, aceptarme y aguantarme como soy. Por estar conmigo incondicionalmente, por ayudarme a creer, crecer y hacer de mi una mejor persona; por desarrollar mis habilidades ; por ser parte de mi vida. Te amo.

RESUMEN

La genética de poblaciones es un componente central de la teoría evolutiva moderna. Los estudios en este campo ayudan a entender la genética de la conservación y a su vez enriquecen el conocimiento de cómo proteger a poblaciones en peligro de extinción.

Los factores genéticos juegan un papel crítico en el decline de las poblaciones y algunos factores se encuentran identificados son:

- La pérdida de la variación genética (o pérdida del material genético necesario para la adaptación).
- Efectos de depresión por endogamia (apareamientos entre parientes).
- Fragmentación de las poblaciones (inhibición del flujo génico)

Como resultado de la cacería excesiva, la competencia y enfermedades transmitidas por el ganado doméstico, la reducción y fragmentación de su hábitat, las poblaciones de borrego cimarrón (*O. canadensis mexicana*) se encuentran actualmente enlistadas en la NOM-059, 2010 bajo la categoría sujeta a protección especial y en CITES (Appendix II) .

Los programas de conservación que se han desarrollados hasta el momento, sólo se enfocan en el aumento de los tamaños poblacionales. La literatura disponible indica que las poblaciones se han establecido con un número pequeño de fundadores y con un único origen. Dada esta información se busca obtener la variación genética de la población en cautiverio "Rancho Pilares". Ya que ha sido fundada a partir de cuatro ranchos de Hermosillo, Sonora.

El objetivo principal es la estimación y análisis de la diversidad genética de *Ovis canadensis mexicana* (borrego cimarrón) localizada en Coahuila, así como comparar los resultados con otras poblaciones en cautiverio.

La comparación realizada de los valores de diversidad genética nuclear muestran altos valores respecto a los previamente analizados ($H_E:0.535$ y $H_E:0.340$ respectivamente). Y similares a poblaciones silvestres ($H_E:0.535$ y $H_E:0.560$ respectivamente).

Los resultados nos sugieren que la población de Rancho Pilares podría ser utilizada para realizar futuras reintroducciones de borrego cimarrón en México, tomando en consideración los valores genéticos encontrados.

ABSTRAC

Population genetics is a central component of modern evolutionary theory. Studies within this field contribute to an overall understanding of conservation genetics and thus enhance our knowledge of how to protect endangered populations.

Genetic factors play a critical role in the decline of populations, among the genetic factors that have been identified are:

- Loss of genetic variation (or loss of the raw material needed for adaptive evolutionary change)
- Effects of inbreeding depression (mating among relatives)
- Fragmentation of populations (gene flow inhibition)

As a result of the ilegal hunting, the loss and fragmentation of his habitat and the introduction of livestock in mexican populations bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) is now protected. It is considered a conservation priority under mexican laws (NOM-059) and CITES 2010 (Appendix II) .

Some managment strategies, such as breeding programs to establish new populations, are being carried out to increase population size. However, some reports suggest that such populations have been established with only a small number of founders from a single origin. Taking this into account we are resarching Rancho Pilares population, since it has been established by captive individuals from five ranches in Hermosillo, Sonora.

The main objective of this study was to estimate and evaluate the genetic variation within a captive population of bighorn sheep in Coahuila. Following a comparison with other captive populations,

Values of nuclear genetic variation obtained were greater than other previously analysed in captive populations (H_E :0.535 and 0.340 respectively). In addition, this population shared similar genetic diversity to other previously analysed wild populations (H_E :0.535 and 0.560 respectively).

This study suggests that it is posible to use this population for future reintroductions in Mexico, considering that estimates of diversity are higher than for other captive populations and similar to those obtained in wild populations

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El orden Artiodáctila

1.2 Descripción e historia natural

1.3 Área de distribución

1.4 Problemática de la especie

1.5 Población de estudio

1.6 Estado de conservación

1.7 Genética de poblaciones

1.7.1 Ley de Hardy-Weinberg

1.7.2 Estimación de la variación genética

1.7.3 Estructura genética

1.8 Genética de la conservación

1.8.1 Causas de la pérdida de la diversidad genética

1.8.1.a Tamaño poblacional pequeño

1.8.1 b Endogamia

1.8.1 c Cuellos de botella

1.8.1 d Efecto fundador

1.9 Métodos moleculares para la estimación de la diversidad genética

II. ANTECEDENTES

III. HIPÓTESIS

IV. JUSTIFICACIÓN

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

5.2 Objetivos particulares

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras

6.2 Extracción y amplificación de ADN nuclear

6.3 Análisis estadísticos

VII. RESULTADOS

7.1 Diversidad nuclear

7.2 Estructura genética

6.3 Diversidad en ADN mitocondrial (ADNmt)

VIII. DISCUSIÓN

IX. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

X. CONCLUSIONES

XI. REFERENCIAS

XII. APÉNDICES

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El Orden Artiodáctila

Uno de los órdenes más diversos entre los mamíferos es Artiodáctila, que incluye actualmente a 10 familias y alrededor de 220 especies. En México encontramos 10 especies de este orden en cuatro familias: Antilocapridae (berrendos), Bovidae (bisontes y borregos cimarrones), Tayassuidae (pecaríes) y Cervidae (venados). La característica principal del Orden Artiodáctila es la presencia de un número par de dedos, dos o cuatro en las extremidades. Presentan glándulas en diferentes partes del cuerpo, que segregan sustancias importantes en la actividad sexual y social, especialmente desarrolladas en los rumiantes (Ceballos y Miranda, 2000).

La mayoría de las especies son herbívoras y terrestres, habitan en todo tipo de ambientes, desde pastizales y praderas tropicales hasta los páramos de las altas montañas. Son activos durante el día, el crepúsculo y la noche; en general son polígamos y en la época de reproducción son frecuentes los encuentros agonísticos entre machos que se disputan a las hembras. Los machos dominantes acaparan a la mayoría de las hembras, que después de un período de gestación prolongado paren una o dos crías (Ceballos *et al.*, 2005).

La familia Bovidae es una de las más diversas del orden Artiodáctila, con aproximadamente 137 especies distribuidas en todos los continentes, con excepción de Australia (Ceballos *et al.*, 2005). La familia se caracteriza por tener integrantes con cuernos que evolucionaron como armas defensivas para evitar a los depredadores y también para los combates entre los machos durante la etapa reproductiva, en donde existe una fuerte selección sexual (Eisenberg, 1981). Los registros geológicos de la familia Bovidae aparecen en Norte América durante el Plioceno, hace unos 3-5 millones de años (Walker *et al.*,

1964; Wilson *et al.*, 2005; FAO, 2013).

La mayoría de los Bovidae son gregarios, y tienen rebaños de varios tamaños para protección de sus depredadores. En México, la especies nativas de la familia Bovidae están representada por el género *Bison* con el bisonte (*Bison bison*) y por el género *Ovis* con el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) (Ceballos *et al.*, 2005).

Se presume que el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) divergió del muflón asiático (*Ovis ammon*) hace cerca de dos millones de años (Krausman *et al.*, 1999) durante las glaciaciones ocurridas en el Pleistoceno temprano, cuando migró vía Beringia hacia Norte América (Geist, 1985). También se piensa que *Ovis canadensis* sobrevivió en refugios, como Wyoming, durante la última era glacial y que cuando los hielos se retrajeron hace aproximadamente 12 000 años recolonizaron y migraron hacia el sur a Nevada, California (Geist, 1985) y al norte de México (Shackleton, 1985).

1.2 Descripción e historia natural del borrego cimarrón

En los individuos de *O. canadensis* se puede observar una coloración dorsal café claro en general, con tonalidades de color naranja amarillento; la coloración ventral es café pálida o blanquecina, a veces con tonos amarillentos. La parte posterior de las ancas suele ser blanquecina (Walker *et al.*, 1964; Shackleton, 1985), aunque existen variaciones de los tonos según el área geográfica y subespecies (Valdez *et al.*, 1999; Ceballos *et al.*, 2005).

Las siete subespecies reconocidas para *O. canadensis*, incluyendo una extinta, se dividen en las de montaña: *O. c. canadensis*, *O. c. californiana*, (Cowan, 1940). Las de desierto: *O. c. auduboni* (extinta en el sur de Dakota), *O. c. mexicana*, *O. c. cremnobates*, *O. c. nelsoni* y *O. c. weemsi* (Cowan, 1940; Shackleton, 1985; Valdez *et al.*, 1999). La distribución de las subespecies en Norte América (Fig. 1) abarca desde el Sur de Canadá hasta la península de Baja California Sur (Shackleton, 1985; Valdez *et al.*, 1999).



Figura 1. Distribución histórica de las subespecies de *Ovis canadensis* en Norteamérica (modificado de Shackleton, 1985; Valdez *et al.*, 1999 y Espinosa *et al.*, 2006).

Ovis canadensis prefiere terrenos escarpados con áreas de cobertura vegetal relativamente densa para uso de las hembras gestantes y de las crías. Éstas áreas usualmente tienen una orientación adecuada para la comunicación visual dentro de cada grupo familiar y para la detección de depredadores (Ceballos *et al.*, 2005).

Las hembras difieren de los machos en el tamaño y forma de los cuernos, ya que en ellas son pequeños, delgados, de curvatura limitada, dirigidos hacia arriba, hacia atrás y nunca forman espirales (Fig. 2). En los machos adultos se presentan cuernos masivos y recurvados que forman una espiral dirigida hacia atrás y hacia afuera. Los cuernos de los

machos pueden medir cerca de 45 cm de diámetro máximo y más de 66 cm de longitud total. En proporción con su tamaño corporal, *O. canadensis* posee las cornamentas más grandes entre todos los rumiantes (Walker *et al.*, 1964; Shackleton, 1985).



Figura 2. Hembra y macho adulto de borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) en donde se puede apreciar el dimorfismo (tomada de Shackleton, 1985).

Son animales polígamos y aunque los machos menores de dos años pueden hallarse fisiológicamente maduros, es usualmente hasta los dos años y medio que combaten contra otros por la posesión de las hembras (Zeiner *et al.*, 1990). Los combates por los harenes comienzan a finales de otoño y principios del invierno, una vez establecidas las relaciones de dominancia, los machos copulan con las hembras (Walker *et al.*, 1964).

La especie tiene una temporada reproductiva muy extendida (poliéstricas), desde julio hasta diciembre, sin embargo la temporada de celo se da generalmente durante el otoño y parte del invierno, por lo que los nacimientos ocurren en la primavera (Nowak, 1991). Las épocas de nacimiento guardan relación con factores climáticos como la temperatura y también con la disponibilidad de alimento o agua (Lenarz, 1979; Rubin *et al.*, 2000). En poblaciones silvestres de California (USA), Rubin *et al.*, (2000) observaron

que los nacimientos de las crías abarcaban del mes de Febrero hasta Agosto, pero que la mayoría de éstos ocurrían durante Marzo y Abril.

Paren una cría (raras veces mellizos) de manera silvestre después de 150 a 160 días de gestación y en cautiverio después de 170 a 180 días (Shackleton, *et al.*, 1985; Walker *et al.*, 1964). Valdez *et al.* (1999) encontraron que la proporción de machos y hembras observada en poblaciones naturales sin caza, puede ser cercana a 6:10, pero disminuye en poblaciones con altos niveles de cacería a 3:10. Sin embargo éstas proporciones pueden variar, principalmente por la presión de caza ejercida sobre los machos y/o a una sobrevivencia diferencia de las cohortes desde el nacimiento hasta la etapa adulta debida a factores climáticos o de disponibilidad de recursos (Rubin *et al.*, 2000; Valdez *et al.*, 1999).

La esperanza de vida de forma silvestre puede ser de 15 a 20 años (Walker *et al.*, 1964).

1.3 Área de distribución

El borrego cimarrón abarca una gran área geográfica y condiciones climáticas de distribución en Norte América, desde las montañas heladas de Canadá, hasta los cálidos y secos desiertos del suroeste de Estados Unidos y México Fig. 3 (Cowan, 1940; Rubin *et al.*, 2000; Shackleton, 1985; Walker *et al.*, 1964) ocupando altitudes tan bajas como los 450 msnm hasta por encima de los 3300 msnm (Valdez *et al.*, 1999).

En México se encontraba distribuido en terrenos escarpados cubiertos por matorral xerófilo (*sensu* Rzedowski, 1978) y en sitios de interfase entre el matorral xerófilo y pastizales áridos (Ceballos *et al.*, 2005) de los estados de Chihuahua, y Nuevo León (Krausman *et al.* 1999; Espinosa *et al.*, 2006). Actualmente sólo se distribuye en la Península de Baja California (Eaton- Gonzales *et al.*, 2001), el estado de Sonora y Coahuila (Espinosa *et al.*, 2006).

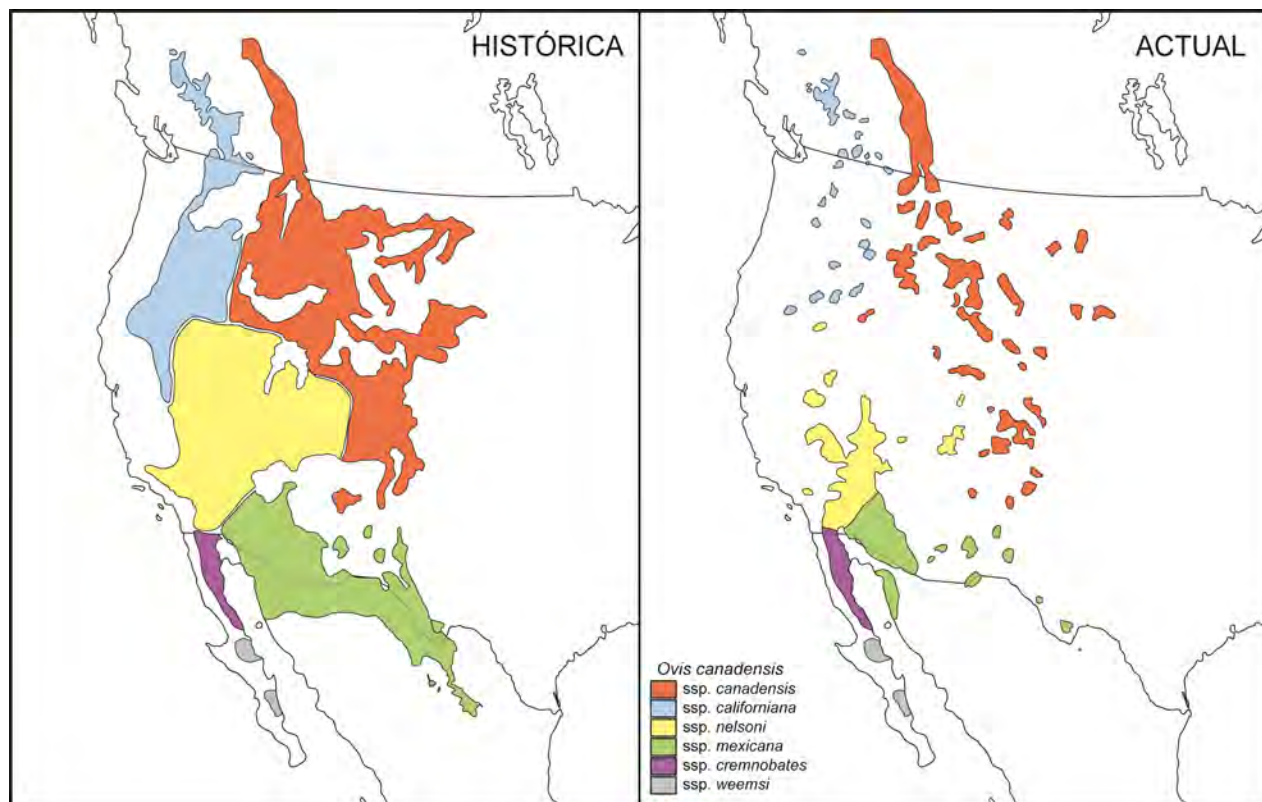


Figura 3. Comparación de la distribución histórica y actual del Borrego cimarrón en Norte América, (modificado de Shackleton, 1985; Espinosa *et al.*, 2006; y Fick, 2011).

1.4 Problemática de la especie

La drástica reducción y fragmentación que han sufrido las poblaciones de borrego cimarrón en el continente y en México (Fig. 3), se debe a cacería excesiva, a la competencia y a las enfermedades transmitidas por el ganado doméstico como ovejas, vacas y cabras. También ha sido importante la degradación de su hábitat, sobre todo durante el siglo XIX (Shackleton, 1997; Bisonette, 1996; Geist, 1971; Krausman *et al.* 1999; Espinosa *et al.*, 2006), debido a lo anterior no es posible hablar de una recuperación en general para la especie, a pesar de que algunas poblaciones han mejorado (Nowak, 1991).

Con el paso del tiempo y el incremento de la actividad cinegética como deporte, el borrego cimarrón ha adquirido gran importancia como trofeo para los cazadores. Esto

representa una importante fuente de ingresos para los propietarios de los terrenos en donde esta especie se distribuye (Eaton- Gonzales *et al.*, 2001). Por esta razón, los programas de manejo en México están basados en ganancias económicas, y no en principios de conservación (Shackleton, 1997).

Otro efecto negativo del uso cinegético podría ser el impacto que sufren las poblaciones, al remover a los machos reproductivos, con mayor cornamenta (Jogerson *et al.*, 1997). Lo anterior promueve la participación activa de los machos juveniles en el celo, ocupando el lugar de los machos adultos, lo cual implica un decline en la esperanza de vida de los machos, provocando un fuerte costo en la sobrevivencia de los machos debido de la reproducción.

1.5 Población de estudio “Rancho Pilares”

Rancho Pilares se encuentra localizado dentro del municipio de Ocampo en las coordenadas 7° 29' 108" N; 31° 93' 729" E (Figura 4), a unos 75 Km. al sur de Parque Nacional Big Bend, Texas y a 200 Km. al noroeste de la población de Melchor Múzquiz, en Coahuila, México. El municipio de Ocampo fue nombrado Área de Protección de Flora y Fauna desde Junio de 2009 (CONANP, 2011a); además, también es parte del sistema de Áreas de Protección de Flora y Fauna “Maderas del Carmen” (CONANP, 2011b).

La población estudiada de Borrego cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) esta contenida en la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) “Rancho Pilares” DGVS-CR-EX-2489-COA (SEMARNAT, 2002). El Rancho consta de 12 000 ha, de las cuales 5 000 ha han sido destinadas para la población en cautiverio, la cual solo es monitoreada cada año o cada dos años. No tiene ningún tipo de seguimiento veterinario o vacunación.

Esta población representa uno de los programas de vida silvestre desarrollados por la compañía cementera CEMEX. Tiene como objetivo principal el incrementar el número de individuos de borrego cimarrón. Sin embargo, busca que estos individuos que posean variabilidad genética, con la finalidad de repoblar posteriormente sitios distribución históricos de *O. c. mexicana* en el estado de Coahuila, en México y el otros sitios en el extranjero (Sandoval *et al.*, 2001), en lugares en donde todavía exista un nicho potencial

para su supervivencia (Espinoza *et al.*, 2007). Otro objetivos del programa también es el aprovechamiento cinegético.

Con dichos objetivos, en 2010 se trasladaron 10 borregos cimarrones (*Ovis canadensis mexicana*) de la población de Rancho Pilares a Nuevo México, EUA, con el propósito de repoblar una localidad de ese estado.

El origen de Rancho Pilares tuvo lugar en el año 2000, concluyendo a mediados del año 2002. Se fundó con individuos de cuatro ranchos en Hermosillo, Sonora (Tabla 1) de la subespecie *O. c. mexicana* (Sandoval *et al.*, 2001). El número poblacional inicial fue de 48 individuos, en la actualidad la poblacional cuenta con 200 individuos.

Se debe resaltar que la población de estudio se generó con individuos de distintos orígenes, a diferencia de otras poblaciones en México y en el extranjero, ya sean en cautiverio y/o reintroducidas, que generalmente se inician con individuos de solo una población; como el caso de Isla Tiburón (Montoya y Gates, 1975) en México y el caso de poblaciones en estado de Oregón en USA (Whittaker *et al.*, 2004).

Tabla 1. Se muestran datos de la población fundadora de Rancho Pilares. N: número de individuos; (H) la proporción de hembras; (M) la proporción de machos; el lugar de origen y fecha de captura.

N	H	M	ORIGEN	DIA/MES/AÑO
5	3	2	Cementos El Yaqui	01/11/00 y 31/11/2000
18	15	3	Bienes comunales Isla Tiburón	12/11/01 y 14/11/01
20	15	5	Punta de Cirios	24/11/01 y 02/07/01
5	4	1	San Ramón	06/06/02
48	37	11	Total	

El tipo de vegetación corresponde a matorral micrófilo y matorral rosetófilo, ecosistemas representativos del desierto Chihuahuense, en donde además existen manchones de zacatal y vegetación rlparia, que en conjunto albergan un acervo representativo de la biodiversidad en ecosistemas de tierra seca. Entre las especies de flora silvestre destacan la biznaga peyotito (*Ariocarpus fissuratus*) y la biznaga blanca chilona (*Epithelantha micromeris*) (CONANP, 2009).



Figura 4. Mapa de la localización de la UMA Rancho Pilares en Coahuila, México. Localizado dentro de el Área de Protección de Flora y Fauna Ocampo (modificado de CONONANP , 2013; Imágenes, 2013).

1.6 Estado de conservación

Actualmente en México *O. canadensis* se encuentra en la lista de la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, bajo la categoría sujeta a protección especial (Pr) (SEMARNAT, 2010). Se considera que la conservación de especies en esta categoría genera un efecto de protección indirecta sobre otras especies, ya que al conservarlas y manejarlas se protege a muchas otras con las que comparten el hábitat (SEMARNAT, 2010).

Debido a que el borrego cimarrón posee una gran relevancia cultural, como especie de gran tradición entre las culturas de los pueblos del norte de México y tiene un gran valor económico debido a la actividad cinegética (SEMARNAP, 2000). Por lo cual se considera que a pesar de que las poblaciones no son abundantes, es posible utilizar algunas de ellas para la actividad cinegética del país, bajo medidas de control estrictas por parte de las autoridades (SEMARNAT, 2010).

Adicionalmente, las poblaciones de borrego cimarrón mexicanas se encuentran protegidas por la Convención Internacional sobre el Comercio de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES) desde 1975 en su Apéndice II (CITES, 2011), el cual incluye a aquellas especies que no necesariamente están amenazadas de extinción, pero cuyo comercio debe controlarse (CONABIO, 2013).

En México los programas de conservación que se hasta el momento desarrollados, sólo se enfocan en el aumento de los tamaños poblacionales. Ejemplo de ello es la población de Isla Tiburón, ubicada en el mar de Cortés en Baja California Norte (Motoya *et al.*, 1975; Gasca-Pineda *et al.*, 2013). Se fundó en el año de 1975 con 20 individuos de *O. c. mexicana* (cuatro machos y 16 hembras) capturados cerca de punta Chueca, Sonora, México. Para el año de 1984 se estimó un número censal de entre 100 y 120 individuos, y en 1999 de 650 individuos. Como resultado de este gran número de individuos, la población ha sido usada desde 1995 para repoblar nueve poblaciones más en el estado de Sonora (Hedrick, 2001), y a partir de ella más de 500 animales han sido reintroducidos en hábitats históricos en los estados de Chihuahua, Coahuila y Nuevo León (Lee, 2009).

Otro ejemplo es el programa de reproducción en cautiverio realizado por dueños de ranchos privados en Sonora en 1994, iniciando una nueva población con 40 individuos de borrego cimarrón . Para el año de 1995 les fueron concedidos seis permisos de cacería libre, en donde cada permiso tuvo un monto en \$40,000 pesos (Festa-Bianchet, 2008), lo cual generó un ingreso de 240 000 pesos para los dueños de estos ranchos, ejemplo del valor económico que puede alcanzar el aprovechamiento de la especie.

Por su parte, la organización privada “Fundación Mexicana OVIS” realizó trasplantes de 30 individuos de borrego cimarrón en un área de 255 km² en Isla del Carmen, Baja California Sur, durante 1995 y 1996. Estimados poblacionales hechos por Lee (2009) registran a más de 300 animales *O. canadensis*, con los cuales se pretende restablecer a las poblaciones extintas de Baja California Sur (Festa-Bianchet, 2008).

En el año 2000 se tiene registros de una reintroducción en el rancho "La Guarida" municipio de Coyamel, ubicado al noreste de Chihuahua (Uranga, 2001) de cuatro borregos cimarrones (1 macho y 3 hembras) provenientes del estado de Sonora, sin embargo se desconoce el destino de dicha reintroducción en la actualidad.

Festa-Bianchet (2008) argumentó que la participación de los dueños de tierras privadas en los programas de manejo de vida silvestre de *O. canadensis* es una iniciativa positiva, debido a que estos poseen fondos para proveer un monitoreo de las poblaciones silvestres, con lo cual sería posible prevenir la caza furtiva en el futuro.

Con dichos ejemplos es posible observar que la protección de esta especie en México puede ser muy redituable económicamente. Pero para lograr una vía de conservación, necesitamos proyectos que den seguimiento a las poblaciones, con números censales, su ecología, su aclimatación a la vida en cautiverio y/o reintroducción y la variación genética que posean, como apoyo en la toma de decisiones del manejo. Debido a esto, la genética de poblaciones es fundamental para la presente investigación.

1.7 Genética de poblaciones

Uno de los puntos centrales de la genética de poblaciones es el estudio de los niveles de variación genética presente en poblaciones naturales (Eguiarte y Piñero 1990). Dicha variación genética está determinada por un conjunto de secuencias de un locus que

difieren entre sí, mejor conocidas como alelos, tratando de explicar en términos cuantitativos y predictivos, el proceso de adaptación (Eguiarte, 1999).

La variación genética ha podido ser estudiada de manera experimental, con análisis moleculares desde los años setenta (Lewontin, 1991) y dicha variación puede generar cambios funcionales en la bioquímica o la morfología de un individuo, y tener impacto en su tasa de reproducción, supervivencia o conducta (Hedrick, 2005). Por tal motivo, la variación genética constituye la materia prima de la evolución, ya que de ella dependen tanto la adaptación como la especiación (Hedrick, 2005; Eguiarte et al., 2007; Vendramin et al., 2008; Frankham et al., 2002).

Para poder entender la influencia de la selección, la endogamia, la deriva génica, el flujo genético, y la mutación en genética de poblaciones, uno debe ser capaz de describir y cuantificar la cantidad de variación genética en una población, así como el patrón de la variación genética entre poblaciones (Hedrick, 2005).

La genética de poblaciones nos permite describir el contenido genético en poblaciones diploides en términos de frecuencias alélicas (Hedrick, 2005), además explora la situación por la que esta pasando la población al momento del muestreo (Beebee et al., 2008).

1.7.1 Ley de Hardy–Weinberg

Los fundamentos de la genética de poblaciones se expresan en la ley de Hardy–Weinberg, la cual realiza dos predicciones (Hedrick, 2005):

- 1) Las frecuencias de los alelos de la poza génica no cambian con el tiempo.
- 2) En el caso de un locus con dos alelos, A_1 y A_2 , después de una generación con apareamiento al azar las frecuencias de los genotipos homocigos (A_1A_1 ; A_2A_2) y heterocigo (A_1A_2) de una población pueden ser calculados como:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

donde p = frecuencia del alelo A_1 y q = frecuencia del alelo A_2 .

Éstas predicciones se cumplen cuando existen apareamientos al azar en el tiempo, un tamaño poblacional infinito y en ausencia de factores que cambien las frecuencias alélicas (selección natural, deriva génica, flujo genético y mutación). Se dice que una población se encuentra en el equilibrio de Hardy–Weinberg sólo cuando cumple estos criterios (Hedrick, 2005).

Sin embargo, las poblaciones naturales evolucionan cuando sus frecuencias alélicas y genotípicas fluctúan con el tiempo. Por esta razón, el equilibrio de Hardy–Weinberg constituye una valiosa hipótesis nula, la cual nos permite inferir qué fuerzas evolutivas están ejerciendo presión sobre una determinada población (Hedrick, 2005; Ritland *et al.*, 1981).

1.7.2 Estimación de la variación genética

La variación genética puede medirse como la cantidad de heterócigos presentes en una población, asumiendo el modelo de Hardy–Weinberg (Nei, 1987). A esta medida se le llama heterocigosis esperada (Nei, 1987) y se calcula como:

$$\pi = \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

Donde k es el número de alelos y p_i la frecuencia del alelo i .

Otro parámetro que cuantifica la variación genética es la diversidad nucleotídica, que es equivalente al número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias (Nei, 1987), esto es:

$$\pi = \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

Donde p_i representa la frecuencia de la secuencia i , p_j la frecuencia de la secuencia j y π_{ij} la proporción de nucleótidos que difieren entre ambas secuencias.

La diversidad alélica es también un estimador de diversidad genética. Cuando se analiza más de un locus, la diversidad alélica (A) es el número de alelos en promedio en todo el loci (Hedrick, 2005; Frankham *et al.*, 2002):

$$A = \frac{\text{total de alelos de todos los loci}}{\text{número de loci}}$$

1.7.3 Estructura genética

Determinar la estructura genética en poblaciones naturales forma parte importante de la genética de poblaciones y tiene muchas aplicaciones en la biología evolutiva de plantas y animales, la conservación y las ciencias forenses (Meirmans *et al.*, 2011). También ayuda a revelar las subdivisiones en las poblaciones, permitiendo un mejor entendimiento de la dinámica de la población, incluyendo la identificación de metapoblaciones y la estimación de las tasa de migración de individuos entre diferentes áreas (Beebee *et al.*, 2008).

La mayoría de los enfoques que tiene la investigación de la estructura genética derivan de la aplicación conceptual de los estadísticos F de Wright (1937), los cuales miden la partición de la diversidad genética entre la población y/o entre subpoblaciones (Beebee *et al.*, 2008).

Se pueden proponer tres estadísticos F (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}), de los cuales F_{IS} , y F_{ST} son usados ampliamente, en donde I = individuo, S = subpoblación, T =total de la población. F_{IS} mide el nivel de endogamia (exceso de homócigos relativos a lo esperado bajo Hardy-Weinberg) de individuos dentro de una subpoblación, y es esencialmente un coeficiente de endogamia; F_{IT} mide el nivel de endogamia de un individuo y lo compara con el total de la población; y F_{ST} es un índice de fijación, el cual mide el grado de endogamia de una subpoblación relativo al total de la población, y es un estimador común para ver si existe diferenciación subpoblacional o estructura poblacional. A continuación se definen los estimadores:

$$F_{IS} = (H_S - H_O) / H_S$$

$$F_{IT} = (H_T - H_O) / H_T$$

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

1.8 Genética de la conservación

La genética de poblaciones es una parte central de la teoría evolutiva moderna, sus aportaciones a la biología de la conservación han ido creciendo conforme su teoría y práctica han ido integrándose en la disciplina que ahora se conoce como genética de la conservación (Rocha y Gasca, 2007).

La genética de la conservación se puede definir como la aplicación de la genética para preservar a las especies como entidades dinámicas capaces de enfrentar el cambio ambiental. Ésta investiga a los factores genéticos que se encuentran influenciando el riesgo de extinción así como el manejo requerido para minimizar tal riesgo. Como todos los componentes de la biología de la conservación, la genética de la conservación es motivada por la necesidad de reducir las tasas de extinción y preservar la biodiversidad (Frankham *et al.*, 2002).

En los últimos años se han realizado numerosos estudios para comprender los procesos ecológicos y evolutivos por los que atraviesan las especies, y así tratar de proponer estrategias de conservación que sean exitosas (Eguiarte *et al.*, 2007). El objetivo principal del manejo genético es minimizar la endogamia y la pérdida de diversidad (Frankham *et al.*, 2002), ya que los niveles altos de diversidad pueden dar la habilidad para responder a enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales (Hedrick, 2001). Fue por ello que los primeros trabajos de conservación buscaban simplemente mantener niveles de diversidad altos, aunque en los últimos años el objetivo central ha sido entender y disminuir los problemas genéticos enfrentados por las poblaciones (Rocha y Gasca, 2007).

Frankham *et al.*, (2002) agrupan los problemas que enfrenta la genética de la conservación. A continuación se enlistaran sólo aquellos que resultan relevantes para el presente estudio:

- Pérdida de diversidad genética y la consecuente disminución de la capacidad para evolucionar en respuesta al cambio ambiental.
- Efectos deletéreos de la endogamia en la reproducción y sobrevivencia (depresión por endogamia).
- Fragmentación de las poblaciones y reducción del flujo genético.
- Adaptación genética al cautiverio, y sus efectos adversos en el éxito de la reintroducción.

Existen ejemplos clásicos en donde la reducción de la diversidad genética esta correlaciona con una baja adecuación por endogamia, como la asimetría en los dientes del chita o guepardo (*Acinonyx jubatus*), defectos anatómicos en el linco (*Linx pardinus*), bajo reclutamiento en el trébol (*Trifolium hirtum*) (Baur y Schmid, 1996); decline en el tiempo del tamaño corporal de las crías en el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*) en cautiverio (Hedrick *et al.*, 2008). Finalmente, para *Ovis canadensis* existe una correlación positiva entre el tamaño de cornamenta y la heterocigosis (Fitzsimmons *et al.*, 1995).

1.8.1 Causas de la pérdida de la diversidad

En general se han encontrado patrones para los niveles de diversidad genética con los que se hacen inferencias en los estudios de conservación. Por ejemplo, las poblaciones grandes, que se reproducen de manera aleatoria, tienen altos niveles de diversidad genética, mientras que las poblaciones pequeñas y las asexuales tienen niveles de diversidad bajos (Amos *et al.*, 1998). Por lo cual a continuación se desarrollaran algunos de los factores que causan pérdida de diversidad relevantes para el presente trabajo:

1.8.1.a Tamaño poblacional pequeño

Cuando las poblaciones son pequeñas, son más propensas a la extinción, ya que los factores estocásticos (tanto genéticos, demográficos y ambientales) aceleran su decline (Primack *et al.*, 2001) y las llevan a los llamados vórtices de extinción, que se ilustran en la Fig. 5 (Primack *et al.*, 2001; Frankham *et al.*, 2002). Éstos vórtices se inician cuando las poblaciones son demográficamente inestables, pequeñas y tienen niveles altos de

endogamia. La disminución poblacional reduce la adecuación y se produce una retroalimentación negativa, lo que refuerza el decline, aumenta la depresión por endogamia y la susceptibilidad a eventos estocásticos, reduciendo aún más el tamaño poblacional, con lo que existirá una mayor probabilidad de extinción (Prickman *et al.*, 2001; Eguiarte *et al.*, 2007).

De acuerdo con los estudios realizados por Berger (1990) con 129 poblaciones nativas de *O. canadensis* en Estados Unidos, cuando una población tiene más de 100 individuos censales, persiste por más de 70 años; pero al tener menos de 50 individuos, la población se extingue en menos de 50 años, siendo el único efecto del tamaño poblacional, por lo cual propone que el mínimo requerido para que una población de *O. canadensis* pueda mantenerse en el tiempo es de 50 individuos.

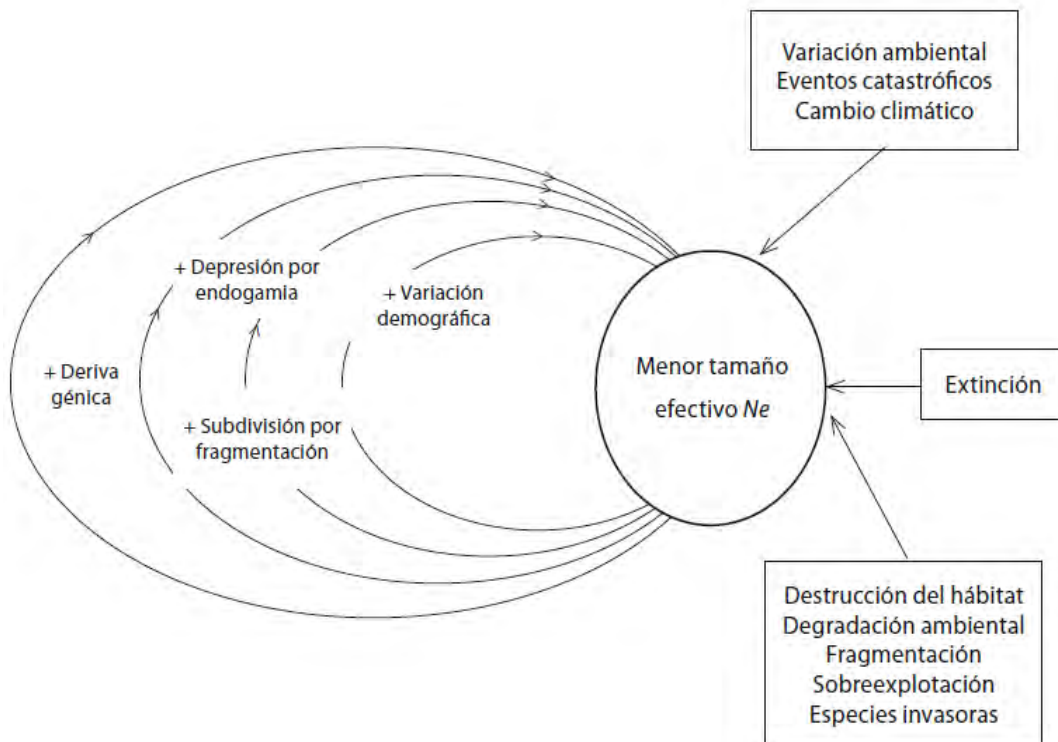


Figura 5. Cuando una población es muy pequeña, los fenómenos estocásticos incrementan el efecto de los problemas genéticos, por lo que la población sufre un vórtice de extinción (tomado de Rocha y Gasca, 2007).

1.8.1.b Endogamia

Es uno de los factores genéticos frecuentemente relacionado con la pérdida de la

diversidad genética en poblaciones pequeñas. La endogamia sucede cuando ocurren reproducciones entre parientes con mayor frecuencia que lo esperado por el azar. Esto genera un exceso de alelos homocigos en la población, con lo cual los individuos portadores de éstos alelos son más susceptibles a la mortalidad debido al ambiente (Reed *et al.*, 2002). Un ejemplo son los individuos homocigos de *Ovis aries*, que son más susceptibles al parasitismo y su sobrevivencia es menor (Coltman *et al.*, 1999).

1.8.1.c Cuellos de botella

Son reducciones drásticas en los tamaños poblacionales efectivos y pueden repercutir en los niveles de variación genética. Si las poblaciones permanecen pequeñas por largos periodos de tiempo, el efecto de error de muestreo es acumulativo. Esto genera cambios al azar en las frecuencias alélicas, lo que se conoce como deriva génica (Hartl *et al.*, 1997). Debido a que en poblaciones de mayor tamaño las fluctuaciones no son tan grandes, se espera que mantengan niveles de variación genética mayores que las poblaciones pequeñas (Beebee *et al.*, 2008).

Los cuellos de botella afectan la diversidad alélica de una manera más intensa que en la heterocigosis, lo cual puede implicar que la historia demográfica reciente puede llegar a tener efectos substanciales en los patrones de diversidad observados (Beebee *et al.*, 2008).

1.8.1.d El efecto fundador

Este efecto ocurre, por ejemplo, cuando un pequeño número de individuos invade un nuevo hábitat y da lugar a una nueva población, lo que da lugar a un tipo de “cuello de botella”. Puede resultar de un proceso de colonización natural o de la translocación de especies hecha por el humano (Beebee *et al.*, 2008).

El efecto fundador puede reducir la cantidad de variación genética y en consecuencia resulta en una reducción de su adecuación con una gran probabilidad de extinción, y reduce también su potencial de adaptación en el futuro (Hedrick *et al.*, 2001).

1.9 Métodos moleculares para la estimación de la diversidad genética

Los métodos moleculares para la estimación de la diversidad genética, se dan a través de los marcadores moleculares, estos son biomoléculas que pueden relacionar con un rasgo genético, tales como las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Cada marcador molecular presenta características particulares (Eguiarte *et al.*, 2007). El principal argumento en favor de la utilización de caracteres moleculares es que son universales (Eguiarte *et al.*, 2007).

Los métodos moleculares son utilizados para el estudio de la diversidad genética, con lo cual es posible realizar la estimación de las frecuencias alélicas y de las relaciones genealógicas de los alelos. Así, se puede analizar el flujo génico histórico y la fragmentación de poblaciones en un marco conceptual histórico y geográfico.

Un ejemplo de lo antes mencionado son los Simple Sequence Repeats (SSR) o Short Tandem Repeats (STR) comúnmente denominados microsatélites, éstos han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los AFLPs, RAPDs, RFLPs; para la estimación de diversidad genética, ya que los microsatélites: i) tienen el más alto grado de polimorfismo; ii) segregan de manera mendeliana y son codominantes (por lo cual se puede distinguir los heterocigos); iii) son fáciles de interpretar (Beebe *et al.*, 2008). Por estas ventajas, los microsatélites han sido ampliamente utilizados en el campo de la genética de poblaciones y en la conservación y manejo de recursos biológicos (Frankham *et al.*, 2002).

Se han realizado estimaciones de las tasas de mutación y se ha llegado a la conclusión de que los microsatélite del ADN nuclear tienen tasas de mutación de 1×10^{-3} a 1×10^{-6} (Wiessenbach *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1993) de mutantes por generación, ventaja muy importante sobre otros marcadores genéticos (Eguiarte *et al.*, 2007), ya que esto es posible detectar variaciones de una generación a otra. El conocer las tasas de mutación nos brinda una base importante para realizar análisis robustos posibles relaciones de ancestría en las poblaciones que nos hablen acerca de la historia evolutiva de las especies (Eguiarte *et al.*, 2007). Vienen en los artículos.

Otro marcador molecular muy utilizado es la Región control mitocondrial, ya que entre las características moleculares que hacen especial al ADN mitocondrial (ADNmt) están, que es una molécula circular covalentemente cerrada, de tamaño pequeño (ca. 16-20 kilobases), conformada por un total de 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia). Además, en vertebrados y equinodermos existe la región control o D-loop (fragmento más pequeño dentro de la región control misma de ca. 1 kb), la cual controla la replicación y transcripción de la molécula, tiene una tasa excepcionalmente alta de sustitución y de polimorfismo en muchos taxones (Frankham *et al.*, 2002; Eguiarte *et al.*, 2007).

El ADNmt muestra un patrón relativamente simple, ya que es de herencia materna en la mayoría de las especies y no tiene proceso de recombinación (Beebee *et al.*, 2008; Frankham *et al.*, 2002). Los haplotipos obtenidos de este marcador y su distribución en una sola población puede proveer de evidencia histórica de los cambios en el tamaño poblacional (Beebee *et al.*, 2008). También puede ser una herramienta para trazar linajes específicos de descendencia madre-descendencia, o patrones de migración (Frankham *et al.*, 2002).

El ADNmt funcionan para la mayoría de las especies de animales, y en los análisis, además de la región control (también conocida como D-loop), es común el uso del citocromo b y del gene del 12s del RNA (Eguiarte *et al.*, 2007). Adicionalmente, estas regiones pueden ser amplificadas mediante PCR y sus productos ser secuenciados y funcionan muy bien para las muestras no invasivas (Frankham *et al.*, 2002).

Las variantes o haplotipos del ADNmt registran la historia matrilineal de eventos mutacionales, y pueden conectarse filogenéticamente en un filograma, el cual puede a su vez sobreponerse a la distribución geográfica del grupo de estudio, a fin de interpretar los procesos evolutivos responsables de la distribución actual de la especie o grupo de especies (Avice, 2000).

El uso de herramientas moleculares resulta fundamental para la realización del presente trabajo, ya que son las raíces del desarrollo práctico y la inferencia teórica de la

investigación. Con lo cual se busca obtener un nuevo enfoque para la futura conservación del borrego cimarrón en México, pues aun no se ha tomado la importancia de la base genética para su conservación, ni de manera teórica como práctica.

II. ANTECEDENTES

El borrego cimarrón es una especie con la cual se han desarrollado diversos trabajos de investigación. Entre ellos se destacan con mayor número de publicaciones aquellos relacionados con técnicas de manejo de las poblaciones, seguido por enfermedades, estudios de mortalidad, distribución y abundancia. En último lugar se encuentran aquellos trabajos enfocados al estudio de diversidad genética de acuerdo con Eaton- Gonzales *et al.*, (2001).

El estudio de diversidad genética es el tema principal del presente trabajo, por lo cual se detallarán a continuación algunos de los trabajos más relevantes enfocados al estudio de la diversidad genética. La finalidad será sentar las bases de la información disponible para comparar y discutir los resultados del presente trabajo.

Para la obtención de los valores de diversidad existen diversos marcadores moleculares genéticos disponibles. Uno de los más utilizados en genética de poblaciones son los microsatélites, debido a su alta tasa de mutación (10^{-4}), herencia mendeliana y a que es posible discernir individuos heterocigos (Frankham *et al.*, al 2002, Beebee *et al.* 2008, Whitakker *et al.* 2003; Forbes *et al.*, 1995).

Por lo cual trabajos como el de Whittaker *et al.*, (2004) utilizaron nueve loci de microsatélites polimórficos en el estudio de cinco poblaciones de *O. canadensis* del estado de Oregón (86 individuos totales), descendientes de un único evento de trasplante de individuos y compararon los valores genéticos con una población en el estado de Nevada (31 individuos), la cual ha tenido reintroducciones periódicas de organismos a la población. Encontraron baja variación genética en las poblaciones del estado de Oregón con respecto a la población del estado de Nevada. Los valores de H_E más bajos estaban en la población de Aldrich Mountain, con 0.34, con un valor en el coeficiente de endogamia (F_{IS}) 0.20, lo cual indica un exceso de apareamiento entre parientes de lo que se espera por azar, y un promedio de 2.22 alelos de por microsatélite. Para la población de Nevada, Santa Rosa encontraron valores de H_E 0.57 y de F_{IS} 0.06.

Por su parte, Forbes *et al.*, (1995) utilizaron ocho microsatélites para realizar una comparación entre poblaciones de *Ovis aries* (oveja común) y *Ovis canadensis*. Los valores

en los índices de diversidad genética de *Ovis aries* siempre fueron más altos que los *O. canadensis* de H_E (0.641-0.6729) y (0.438-0.650) respectivamente. Sin embargo, al realizar comparaciones entre poblaciones de *O. canadensis*, encontraron que las poblaciones nativas de Sun River (Montana, USA), Whiskey Basin (Wyoming, USA), Tarryall (Colorado, USA) poseían valores de diversidad más altos que la población que había sido fundada en un solo evento. Esto posiblemente se debe a que dichas poblaciones pueden estar en contacto con otras poblaciones. Por ejemplo, la población de Sheep River (Alberta, Canadá) $H_E = 0.607$, mientras que la población de Bison Range (Alberta, Canadá), que se encontraba aislada y que había pasado por procesos de cuellos de botella durante más de 10 años, tiene menor variación genética ($H_E = 0.429$).

Boyce *et al.*, (1996) examinaron y compararon la variación genética de 235 *O. canadensis* de Sonora, el sureste de California y Nevada (14 poblaciones), mediante el uso de microsatélites y el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Encontraron estimados de variación de H_E de 0.142 a 0.766.

En el 2000 Gutiérrez- Espeleta *et al.*, en 13 sitios de estudio en Nuevo Mexico USA; analizaron la variación genética de 297 borregos cimarrones, utilizando 10 microsatélites. Obtuvieron heterocigosis que iban de 0.30 para el valor más bajo a 0.64 para el valor más alto de una población.

En 2001 Hedrick *et al.*, analizaron con 10 microsatélites y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) encargado de la respuesta inmune en mamíferos en cinco poblaciones de *O. canadensis* (cuatro de Estados Unidos: Kofa Mountains, Stewart Mountains, Castle Dome Mountains, Red rock refuge y una de México, la Isla Tiburón) con un total de 77 individuos . Encontraron eterocigosis esperadas (HE) desde 0.30 en el refugio de Red Rock (Nuevo México) hasta 0.64 para Kofa Mountains (Arizona).

Como es posible observar, ningún trabajo previo ha utilizado en conjunto a la Región Control Mitocondrial y microsatélites para los análisis de diversidad genética. Por lo cual la presente investigación es novedosa, y pretende aportar de manera más completa los resultados de la diversidad genética y estructura de la población Pilares, al usar un marcador molecular codominante (microsatélite) y además uno haploide (D-loop).

Fitzsimmons *et al.* (1995) examinaron con isoenzimas a ocho poblaciones de Borrego Cimarrón en Rocky Mountains (USA), obteniendo $H=0.034-0.053$. Encontraron una correlación positiva entre el nivel de heterocigocidad con el tamaño poblacional y con el tamaño de la cornamenta de los borregos cimarrones maduros. Dado que el tamaño de la cornamenta en esta especie es una manera de selección sexual, este estudio muestra que los cazadores ejercen una presión selectiva en los machos reproductivos.

Ramey (1995) estudió a 26 poblaciones de *O. c. californiana* ($n=1$), *O. c. nelsoni* ($n=19$), *O. c. cremnobates* ($n=3$), *O. c. mexicana* ($n=3$), reintroducidas principalmente de California, Arizona y Nuevo Mexico, en Estados Unidos y de Baja California Norte en México. Empleando cinco enzimas de restricción en ADN mitocondrial, obtuvo sólo 10 haplotipos de un total de 244 individuos analizados. Encontró que el haplotipo más frecuente estaba representado en el 67% de los individuos, y que existían dos poblaciones con un haplotipo exclusivo.

Boyce *et al.*, (1999) realizaron análisis con secuencias de ADN de la región control mitocondrial (515 pb) y observaciones conductuales. El objetivo era conocer la demografía de sus ámbitos hogareños, y asimismo averiguar la estructura genética dentro y entre grupos de 124 individuos de *O. canadensis nelsoni*; encontraron en nueve poblaciones analizadas del Sur de California identificaron siete haplotipos.

III. HIPÓTESIS

Debido a que la población borrego cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*) “Rancho Pilares” tiene un origen múltiple, esperamos encontrar valores altos de variación genética.

IV. JUSTIFICACIÓN

La población de Rancho Pilares es un proyecto que busca incrementar el tamaño poblacional de *O. c. mexicana* en México con individuos que posean variabilidad genética, pues se ha observado que ésta juega un papel crítico en la recuperación de poblaciones de borrego cimarrón (Whitakker *et al.* 2004).

Buscamos generar nueva información acerca de la diversidad genética, en una población mexicana de borrego cimarrón (Rancho Pilares) fundada con individuos de distintos lugares de origen.

Adicionalmente, el estudio de este mamífero es relevante debido al papel ecológico que juega en sus paisajes nativos, pues son forrajeros importantes de pastos y arbustos y son presas de depredadores como lobos, coyotes, osos, lince o águilas doradas (que ocasionalmente pueden tomar algunos jóvenes; Valdez *et al.*, 1999; Ceballos *et al.*, 2005). Y también el borrego cimarrón es importante como especie bandera y/o sombrilla, debido al ingreso anual millonario en dólares que este Artiodáctilo genera por el aprovechamiento cinegético en el país (Ceballos *et al.*, 2005; Festa-Bianchet, 2008).

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Estimación y análisis de la diversidad genética de *Ovis canadensis mexicana* (borrego cimarrón) en la población en cautiverio “Rancho Pilares” localizada en Coahuila, México, como una herramienta para su conservación.

Objetivos particulares:

- 1) Tipificación y estimación de la diversidad genética de *Ovis canadensis mexicana* mediante el uso de 10 microsatélites.
- 2) Amplificación y estimación de la diversidad genética mitocondrial, a partir de dos fragmentos de la región control mitocondrial (D-loop) en *Ovis canadensis mexicana*.
- 3) Comparación de la variación genética encontrada en la población “Rancho Pilares” con otras poblaciones en cautiverio y silvestres de *Ovis canadensis*.
- 4) Generación de propuestas para el manejo y conservación de este artiodáctilo, partiendo de la variación genética encontrada en la población “Rancho Pilares”.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras fueron obtenidas a través del programa de restauración del borrego cimarrón desarrollado por la compañía cementera Cemex, con la coordinación de programas de Vida Silvestre de la mencionada empresa.

Las muestras constaban de pelo de borrego cimarrón de 59 individuos (19 hembras, 29 machos y 11 individuos sin identificar). Los individuos fueron muestreados una sola vez, y no se contó con muestras de los individuos fundadores. Los periodos de muestreo corresponden a encierros realizados dentro de la UMA “Rancho Pilares” durante el mes de Noviembre de 2009 y Diciembre de 2010. Se calcula que para el momento de la toma de muestras la población contaba cuando menos con 7 generaciones a partir de la formación original de la población.

Las muestras se almacenaron bajo refrigeración a 80 °C en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM. Durante su manipulación las muestras, estas se mantuvieron con hielo para reducir la degradación de ADN por el cambio de temperatura.

6.2 EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DEL ADN

La extracción del ADN se realizó a partir de los folículos de pelo de las muestras, utilizando el protocolo de extracción Chelex al 5% (*Apéndice 1*). Complementariamente, se realizó la precipitación del ADN (*Apéndice 2*), buscando mejorar la calidad de éste durante la amplificación de los marcadores moleculares.

Para conocer los genotipos de los individuos, se realizó la amplificación del ADN mediante la reacción de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), utilizando 10 juegos de oligonucleótidos de microsatélites (*forward* y *reverse*) previamente reportados para oveja (*Ovis aries*) (Tabla 2). Un oligonucleótido de cada par fue marcado con un tinte fluorescente para poder estimar el tamaño de los fragmentos en un secuenciador automático. Cabe destacar que cada uno de los 10 loci elegidos se encuentran en

cromosomas distintos, no se encuentran ligados. Para cada reacción de PCR se utilizó una concentración variable dependiendo del microsatélite (*Apéndice 3*).

Para la amplificación del ADN mitocondrial se utilizaron dos oligonucleótidos para amplificar dos fragmentos de la D-loop o Región control la mitocondrial (Tabla 3) con un tamaño total de 600pb. Dichos oligonucleótidos provienen de la secuencia de la mitocondria del borrego cimarrón (*Ovis canadensis canadensis*) (Boyce *et al.*, 1999; Gasca-Pineda *et al.*, 2013). Para cada reacción se utilizó una proporción volumétrica variable dependiendo del tipo de marcador usado (*Apéndice 3*).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en termocicladores (Programmable Thermal Controller PTC-100 de MJ Research, Inc.; Gene Amp PCR System 2700 de Applied Biosystem)s. Para cada marcador se programó una condición específica de temperatura de desnaturalización, alineación, amplificación y ciclos de repetición (*Apéndice 4*).

Tabla 2. Los oligonucleótidos de Microsatélites usados para la amplificación de ADN nuclear de la población de *Ovis canadensis* situada en Rancho Pilares, Coahuila, México. Cromosoma: C.

Microsatélite	Secuencia (5´-3´)	Cromosoma para <i>Ovis aries</i>	[Magnesio]	Temp. Alineación	Referencia
MAF209	F TCATGCACTTAAGTATGTAGGATGCTG	17	1mM	56°C	Buchanan, <i>et al.</i> , 1992.
	R GATCACAAAAAGTTGGATACAACCGTGG				
D16S3	F GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA	16	2mM	58 °C	Crawford <i>et al.</i> , 1995.
	R ATCTTCACATGATATTACAGCAGA				
BM848	F TGGTTGGAAGGAAAAGTTGG	15	3mM	55 °C	Bishop <i>et al.</i> , 1994.
	R CCTCTGCTCCTCAAGACAC				
OarFCB266	F GGCTTTTCCACTACGAAATGTATCCTCAC R CACCACATACCAAACACACAG CCTGC	25	1mM	58 °C	Buchanan, <i>et al.</i> , 1993.
BM1818	F AGCTGGGAATATAACCAAAGG R AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	20	3mM	55 °C	Bishop <i>et al.</i> , 1994.
MAF36	F TTGCGAAAAGTTGGACACAATTGAGC R CATATACCTGGGAGGAATGCATTACG	22	3mM	56°6	Steffen and Eggen, 1993.

MGTG4B	F GAGCAGCTTCTTTCTTCTCATCTT R GCTCTTGAAGCTTATTGTATAAAG	4	2mM	56 °C	Kappes <i>et al.</i> 1997.
D12S4	F CCTTTCAAAAACACGGAAATTCGGGGG R CTCAGGCATACCCTACACCACATG	12	3mM	56 °C	Georges and Massey, 1992.
AGLA293	F GTCTGAAATTGGAGGCAATGAGGC R CCCAAGACAACCTCAAGTCAAAGGACC	3	1mM	56 °C	Crawford <i>et al.</i> , 1995.
MAF48	F GGAAACCAAAGCCACTTTTCAGATGC R AGACGTGACTGAGCAACTAAGTACG	5	3mM	56 °C	Kappes <i>et al.</i> , 1997.

Tabla 3. *Primers* empleados para la amplificación de dos fragmentos de la región control mitocondrial de *Ovis canadensis mexicana*, en la población “Rancho Pilares” situada en Coahuila, México.

REGION	Secuencia (5'-3')	[Magnesio]	Temp. Alineación	Autor
MIT-R1 R1-435	F AACCTCCCTAAGACTCAAGG R RGGATACGCATGTTGACTRGRAC	1.5mM	54°C	Boyce <i>et al.</i> , 1999.
F3 -144 R3 -529	F AAARCACACCACCCACGGAC R ACAATGAATGGGCCCGGAGCGA	1.5mM	54°C	Gasca-Pineda <i>et al.</i> , 2013.

Los productos obtenidos en la reacción de PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2 %, utilizando como buffer TAE 0.5 X. En cada gel además de los productos de PCR de los individuos, se cargó un indicador de tamaño (*ladder*) de 100 pb (Nucleic Acid Markers, 100 pb DNA Ladder, Invitrogen) para conocer el largo de los diferentes loci amplificados. Durante la electroforesis, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (100 μ l / 1000 ml de buffer TAE 0.5 X), posteriormente fueron expuestos a luz ultravioleta para ser fotografiados con una cámara Kodak (EDAS 240). Todas las fotografías tomadas a los geles fueron digitalizadas usando el programa Kodak ID 3.6.

Análisis de los marcadores moleculares

Los productos de PCR fueron precipitados utilizando 9 μ l de Hi-Di Formamida (Applied Biosystems), 0.25 μ l de LIZ-600 (Applied Biosystems) y una cantidad de entre 0.2-1 μ l del producto de PCR (Apéndice 5). Una vez precipitadas las muestras, se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95 °C y después se enfriaron durante 2 minutos en hielo antes de ser introducidas y analizadas por un secuenciador automático ABI-Avant 100 en el Instituto de Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México

Para la identificación de los valores de los genotipos se empleó el programa Peakscanner versión 1.0 (Applied Biosystems Corporation, 2006); el cual muestra con electroferogramas los alelos que posee cada individuo con cada uno de los oligonucleótidos Fig. 6. Así es posible identificar específicamente cada alelo, para su posterior captura a partir del peso en pares de bases los alelos, el rango alélico de amplificación y la fluorescencia específica de cada oligonucleótido.

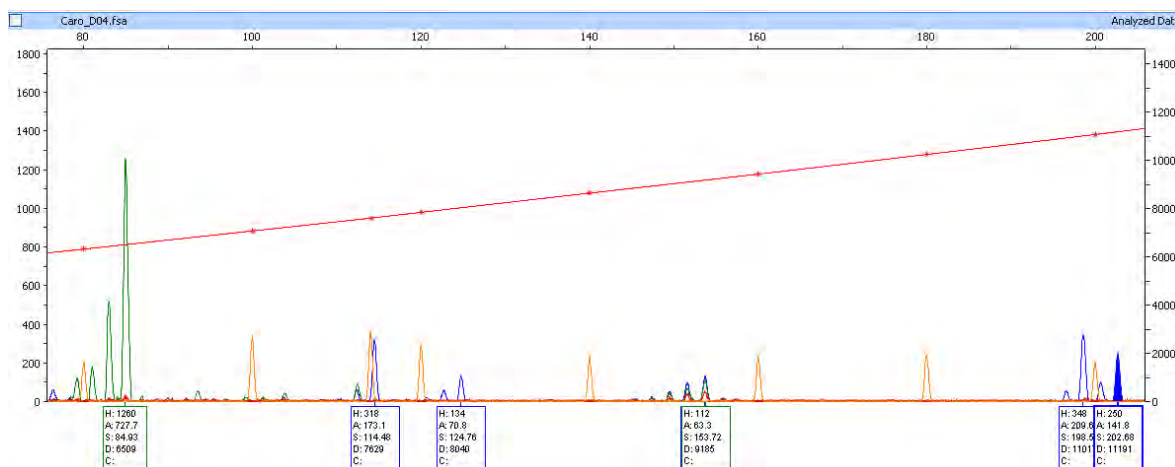


Figura 6. Electroferograma que ejemplifica la visualización de los alelos amplificados con los loci de microsatélite. Los recuadros debajo de cada pico contienen datos para conocer el valor de cada alelo.

La identificación de los haplotipos obtenidos de la región control mitocondrial se realizó mediante la secuenciación de los fragmentos en la Universidad de Washington, en el “High- Throughput Genomic Unit” ubicado en Washington (USA), mediante el método de Sanger con purificación previa de los productos. Para verificar la autenticidad de las

secuencias obtenidas, se efectuó un análisis de BLAST con la base de datos del GenBank (NCBI, 2012).

Los electrofenogramas obtenidos fueron verificados y ensamblados haciendo uso del programa Consed v. 19.0 (Gordon *et al.*, 1998), *Phred* (Ewing *et al.* 1998, Ewing y Green 1998) y *Phrap*. La alineación de las secuencias se realizó con el programa BioEdit v. 7.0.5.3 (Hall, 1999) y para la estimación de la diversidad de las secuencias mitocondriales se utilizó el programa DnaSP (Librado *et al.*, 2009).

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se calculó la heterocigosis observada (H_O), esperada (H_E), el coeficiente de endogamia (F_{IS}) y la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg con los programas Genepop v4 (Rousset, 2008) y Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2007).

Durante el uso de los oligonucleótidos de microsatélite es posible encontrar errores en el bandedo, deserción de alelos grandes o alelos nulos, que afecten las frecuencias alélicas y el cálculo de la heterocigosis (Hajji *et al.*, 2006). Lo anterior, aunado a la posibilidad de tener ADN degradado por el tipo de muestra, incrementa el riesgo de obtener genotipos incorrectos (Maldonado, 2006). Para evitar realizar cálculos incorrectos se utilizó el programa MICRO-CHECKER v.2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004), el cual identifica y corrige errores de genotipificación de los datos de microsatélite, con lo cual se minimiza la posibilidad de trabajar con valores falsos en los genotipos encontrados.

Para probar si existía alguna señal de estructura genética, se analizaron los datos obtenidos de la amplificación de los oligonucleótidos de microsatélite con el programa Structure v.2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Adicionalmente, se empleó el programa Structure Harvester v 0.6.91 (Earl *et al.* 2011) para la detección del número de grupos genéticos que mejor se ajustaban a los valores probabilísticos obtenidos con el programa Structure, para poder ser considerados como una población.

Con base en los haplotipos mitocondriales encontrados, se elaboró una filogenia molecular con el método Neighbor-Joining (NJ), con el programa MEGA 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). La distancia genética que se usó fue de Kimura 2 parámetros. Se obtuvieron dos

secuencias del GeneBank (NCBI, 2012) de la región control mitocondrial de *Ovis nivicola* (No. DQ249914.1) y de *Ovis ammon* (No. AJ238298.1) como se usaron como grupos externos. Asimismo, a cada nodo se le asignó un valor de bootstrap (BS; Felsenstein, 1985) para 1000 réplicas, para evaluar la topología obtenida.

Usando el mismo algoritmo, programa y valores de BS, se reconstruyó otra filogenia molecular para realizar una comparación entre los haplotipos obtenidos en el presente trabajo y algunas subespecies de *O. canadensis*. Se emplearon nueve haplotipos de la región control mitocondrial previamente reportados y uno aún no reportado (Tabla, 4).

Tabla 4. Datos de las secuencias empleadas para la reconstrucción de la filogenia molecular con algunas de las subespecies de *O. canadensis*.

Subespecie	No. en GenBank	Nombre de Haplotipo
<i>O. c. nelsoni</i>	AY904010.1	(HQ);
<i>O. c. nelsoni</i>	AY904008.1	(HO);
<i>O. c. nelsoni</i>	AY904004.1	(HK);
<i>O. c. nelsoni</i>	AY903998.1	(HE);
<i>O. c. nelsoni</i>	AY904017.1	(HX);
<i>O. c. nelsoni</i>	AY904015.1	(HV);
<i>O. c. nelsoni</i>	AF076913.1	(H1);
<i>O. c. nelsoni</i>	AF076912.1	(H5);
<i>O. c. nelsoni</i>	AF076916.1	(H6),
<i>O. c. mexicana</i>	AY116622.1	(T2)
<i>O. c. mexicana</i>	AY116621.1	(T1),
<i>O. c. weemsi</i>	AY116623.1	(Weemsi H1)
<i>O. c. weemsi</i>	no reportado	(Weemsi H2)
<i>O. c. canadensis</i>	AY091486.1	(Californiana_RC)

VII. RESULTADOS

7.1 Diversidad nuclear

Los 10 loci de microsatélites resultaron polimórficos en la población analizada, sin embargo durante el proceso de análisis sólo fue posible estimar la diversidad genética en 41 individuos de los 59 iniciales.

El resumen de los valores genéticos obtenidos como heterocigosis (H_O y H_E), el estimador de endogamia (F_{IS}) y los valores de probabilidad para la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg se presentan en la Tabla 4. El valor más bajo encontrado para la H_O fue 0.1795 y el más alto de 0.6667, para los microsatélites MAF36 y D12S4 respectivamente. Para la H_E , el valor más bajo obtenido fue de 0.1976 y el más alto de 0.7925, en los microsatélites OarFCB266 y D12S4 respectivamente. Para el coeficiente de endogamia, se obtuvieron valores positivos en ocho de los diez loci y una F_{IS} promedio de 0.15. El número mínimo de alelos por locus fue 2 (MAF209) y el máximo de 7 (D16S3 y D12S4), con un promedio de alelos de 4.6 (Tabla 5).

De los 10 loci de microsatélites usados, como se esperaba, dado que están en diferentes cromosomas en *Ovis aries*, ningún par mostró un valor significativo de desequilibrio de ligamiento, por lo cual todos fueron incluido en los análisis. El programa MICRO-CHECKER no encontró posibles errores causados por el bandeo o deserción de alelos grandes, por lo que es posible inferir que la interpretación de los electrofenogramas durante la captura de datos fue correcta. Sin embargo, el programa si encontró una potencial ocurrencia de alelos nulos en dos locus (D16S3 y D12S4), sugiriendo ajustes en las frecuencias genotípicas, lo cual se realizó para poder analizar los datos.

Tabla 5. Valores obtenidos con los 10 loci de microsatélites. Heterocigosis observada H_o , heterocigosis esperada H_E , los valores de endogamia F_{IS} , valor de P corresponde la significancia de la desviación con respecto al equilibrio de HW (la significancia estadística se marcó con un asterisco).

Locus	N	No. alelos	No. Alelos efectivos	H_o	H_E	F_{IS}	P
MAF209	36	2	1.909	0.4167	0.4762	0.1250	0.49245
D16S3	23	7	3.240	0.6087	0.6914	0.1200	0.00063*
BM848	28	6	2.759	0.5357	0.6376	0.1598	0.06603
OarFCB266	23	2	1.246	0.2174	0.1976	-0.1000	1.00000
MAF48	38	4	2.193	0.6053	0.5441	-0.1124	0.11296
BM1818	19	3	2.478	0.3684	0.5965	0.3824	0.08372
MAF36	39	5	1.756	0.1795	0.4305	0.5831	0.00000*
MG TG4B	40	3	1.877	0.3750	0.4673	0.1975	0.04032
D12S4	30	7	4.819	0.6667	0.7925	0.1588	0.00000*
AGLA293	41	3	2.263	0.5610	0.5582	-0.0044	0.74028
TOTAL	43	4.6	--	0.4543	0.5351	0.1510	--

7.2 Estructura genética

El análisis de la estructura genética de Rancho Pilares dividió a la población en dos grupos, a partir de la variación genética encontrada. En la Figura 7 se muestra un gráfico en donde el eje de las "X" muestra a los individuos de la población, con color rojo se señala a las hembras, con color azul a los machos y en color negro a los individuos sin registro de sexo. En el eje de las "Y" muestra el valor del porcentaje de correspondencia para los grupos genéticos. Los resultados estadísticos del análisis sugieren a dos grupos genéticos dentro de la población, por lo cual marca dos colores, el color naranja claro, en donde se

encuentra a la mayoría de los individuos de la población, y en color café oscuro en donde podemos ver a algunos individuos de la población. En la parte media de la Fig. 7 es posible observar a algunos individuos con una combinación de ambos colores, por lo cual se puede decir pertenecen que son mezcla o individuos de ambos grupos genéticos.

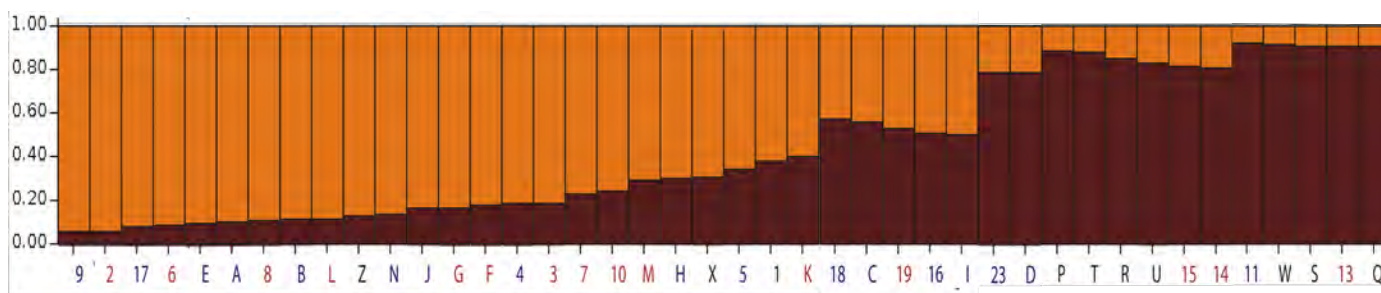


Figura 7. La asignación de genotipos para la población de Rancho Pilares con el programa Structure. Cada línea en el eje de las "X" representa a un individuo de la población. El color rojo describe el sexo femenino, el azul el masculino, el negro individuo sin sexo identificado. En el eje de las "Y" se muestra la probabilidad de pertenencia a cada grupo genético.

7.3 Diversidad ADN mitocondrial (ADNmt)

Fue posible amplificar a 58 de los 59 individuos con los dos fragmentos de la Región Control mitocondrial. Una vez secuenciados los 600 pb de cada fragmento, fue posible alinear un total de 550 pb de ésta región. Con éste fragmento de la Región Control mitocondrial se obtuvieron los valores de diversidad genética resumidos en la Tabla 6. Se encontraron 14 sitios polimórficos, una diversidad haplotípica (H_d) de 0.440 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.00714 y tres haplotipos (h) para la población.

Tabla 6. S: Sitios segregantes; h : Haplotipos; H_d : Diversidad haplotípica; P_i : Diversidad nucleotídica; D : D de Tajima, estadísticamente no significativa $P > 0.10$

N	S	h	H_d	π	D
58	14	3	0.440 (0.00454)	0.00714	0.87828NS

Las secuencias de la región control mitocondrial agruparon a los individuos dentro de tres haplotipos, los cuales fueron denominados Pilares_H1, Pilares_H2 y Pilares_H3. El haplotipo más recurrente (*Pilares_H1*) estuvo representado por 42 individuos, el segundo haplotipo más común (*Pilares_H2*), incluyó a 11 individuos, y el haplotipo más raro (*Pilares_H3*) sólo agrupó a 5 individuos (Tabla 7).

Con los haplotipos se realizó una filogenia molecular NJ (Fig. 8), la cual mostró que el haplotipo más raro (*Pilares_H3*) está más relacionado genéticamente con el haplotipo más abundante (*Pilares_H1*), con valores de BS relativamente altos (entre 86 y 99%).

Tabla 7. Haplotipos de la región control mitocondrial presentes en la población Rancho Pilares.

Haplotipo	Individuos	Total
Pilares_H 1	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 36, BA, BB, BC, BD, BE, BF, BJ, BK, BN, BQ, BS, BW, BX, BZ.	42
Pilares_H 2	09, 25, 35, BG, BH, BL, BM, BP, BR, BT, BY	11
Pilares_H 3	15, 23, 24, 33, BI	5

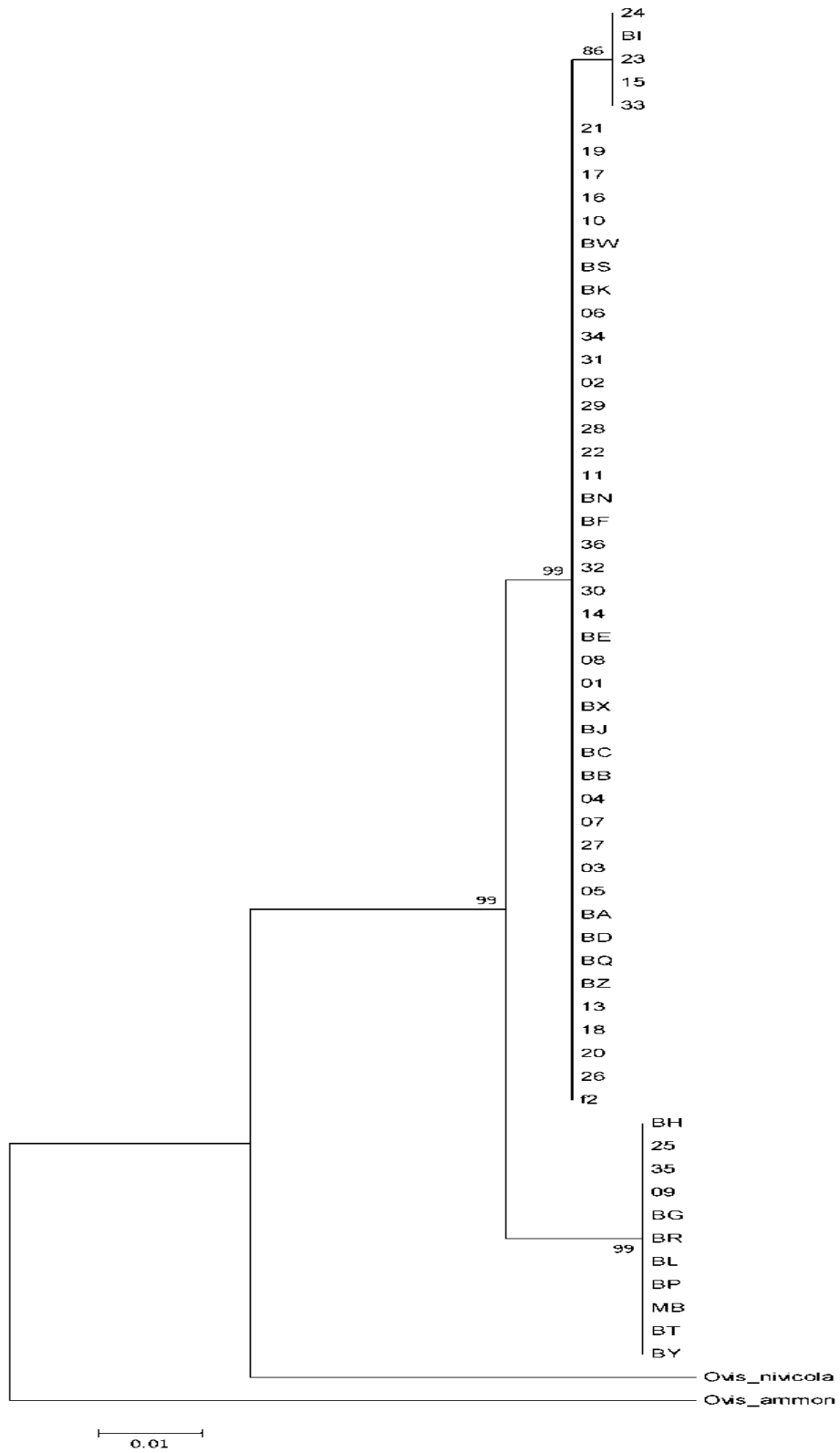


Figura 8. Árbol de la filogenia obtenida a partir de los haplotipos de la región control mitocondrial (550 pb) encontrados en la población de Rancho Pilares, Coahuila.

Para la comparación de la diversidad genética mitocondrial, se obtuvo otro árbol NJ, usando algunos haplotipos de la subespecies (obtenidos en GenBank) y los haplotipos obtenidos en presente trabajo, teniendo finalmente para *O. c. mexicana*: Rancho Pilares (n=3) e Isla Tiburón (n=2), *O. c. nelsoni* : (n=4), *O. c. weemsi*: (n=2) y *O. c. canadensis*: (n=1). En la Fig. 9 se muestra este árbol filogenético de las subespecies, así como un mapa con la distribución de las subespecies. Es posible apreciar que los haplotipos de *O. c. mexicana* (Isla Tiburón y Rancho Pilares) se agrupan con haplotipos compartidos y que ambos pertenecer a las llamada “subespecie de desierto”. Adicionalmente también se agrupan de manera más cercana a la subespecie *O. c. nelsoni* “subespecie de montaña” y *O. c. weemsi* “subespecie de desierto” con dos haplotipos representados se encuentra menos relacionado con *O. c. mexicana*, lo cual no se esperaría encontrar en la topología del árbol. Por su parte, la secuencia del haplotipo de *O. c. canadensis* se encuentra totalmente separada de las demás secuencias.

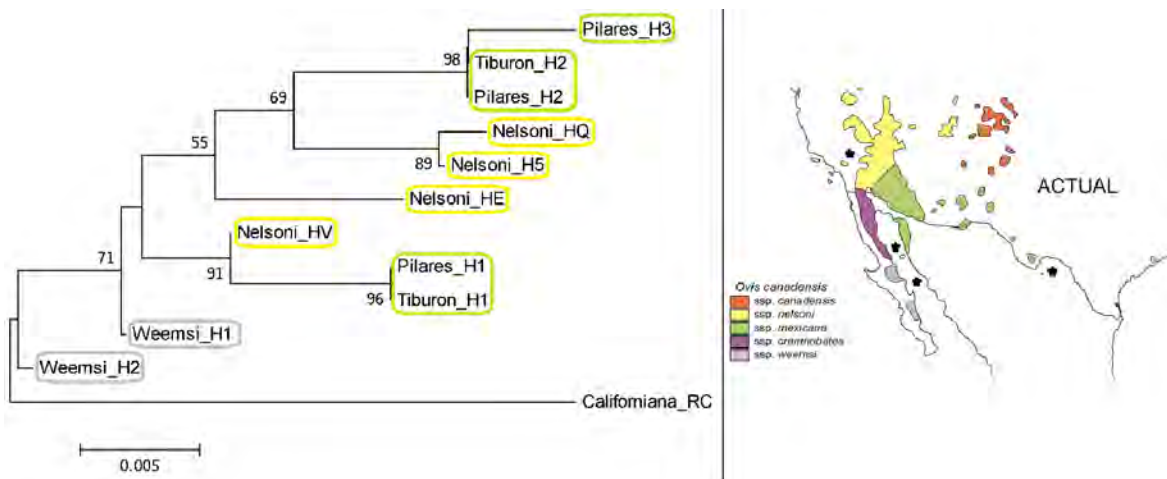


Figura 9. Filogenia molecular de la región control mitocondrial (530 pb) para las subespecies de borrego cimarrón *O. c. mexicana* (verde), *O. c. nelsoni* (amarillo), *O. c. weemsi* (gris) y *O. c. canadensis* (naranja), con los haplotipos encontrados en Rancho Pilares y algunos haplotipos de trabajos previos.

VIII. DISCUSIÓN

VARIACIÓN GENÉTICA NUCLEAR (MICROSATÉLITES)

Para poder realizar una adecuada interpretación y comparación de los resultados obtenidos, sólo se tomaran en cuenta los trabajos previos que utilizaron microsatélites y la región control mitocondrial como marcadores genéticos.

Al comparar los valores de variación genética estimada con microsatélites encontrada en Rancho Pilares y en trabajos previos con *O. canadensis* (tabla 8), es posible ver que los valores de variación genética en Rancho Pilares son similares a las poblaciones silvestres y a poblaciones con algún programa de manejo genético (como la población de Santa Rosa, Nevada, USA (Whittaker, 2004)) y mayores a los reportados en las poblaciones en cautiverio. Esto puede deberse al tipo de fundación de Rancho Pilares con individuos provenientes de cuatro lugares distintos. Lo anterior sugiere que la variación genética de nuestra población es alta, a pesar de estar en cautiverio.

Para las diferencias encontradas entre los 10 loci de microsatélite con los índices de diversidad (H_O ; H_E) y de endogamia (F_{IS}) obtenidos, puede deberse a que cada loci es independiente, ya que se encuentran en cromosomas distintos. Lo anterior es de gran utilidad para evitar sobreestimaciones positivas o negativas en los valores obtenidos en la población.

Tabla 8. Comparación de los resultados de la heterocigosis observada H_O , heterocigosis esperada H_E y los valores de endogamia F_{IS} obtenidos en trabajos previos. Tipo de vida: poblaciones reintroducidas R, silvestres S y en cautiverio C.

Año	Autor	Micro-satélites	Población	Tipo de Vida	N	H_O	H_E	F_{IS}
1995	Forbes <i>et al.</i> ,	8	National Bison Range (Alberta, Canadá)	R	20	0.438	0.429	
1996	Boyce <i>et al.</i> ,	3	California, Arizona, Nuevo Mexico	S	235		0.56	
2000	Gutiérrez-Espeleta	10	Nuevo México	S	25		0.360	
		1	Alberta Canadá	S	55		0.590	
2001	Hedrick <i>et al.</i> ,	10	Isla Tiburón (Sonora)	C	14		0.420	
		1	Arizona	S	43		0.573	
2004	Whittaker <i>et al.</i> ,	11	Leslie Gulch (Oregón)	R	23	0.290	0.340	0.100
		1	Santa Rosa (Nevada)	R	31	0.530	0.570	0.060
2013	Gasca-Pineda <i>et al.</i> ,	12	Isla Tiburón	C	63		0.505	0.070
2013	Durán-Alvarez	10	Rancho Pilares	C	43	0.454	0.535	0.150

Hedrick (2001) analizó 10 loci de microsatélites con borrego cimarrón en la Isla Tiburón, de los cuales cuatro coincidieron en esta investigación (MAF48, MAF209, MAF36 y FCB266). Al realizar una comparación (Tabla 9), encontramos que la población “Rancho Pilares” se puede observar mayor variación alélica para los loci MAF36 y MAF48, un nuevo alelo para MAF209 y los mismos alelos en FCB266. Lo cual nos indica que la población de Rancho Pilares posee alelos únicos (hasta el momento), alelos que no están presentes y alelos compartidos con los individuos de Isla Tiburón.

Tabla 9. Comparativo de los alelos encontrados en la presente investigación y los encontrados por Hedrick, 2010.

Autor	Loci	Numero de alelos						
		1	2	3	4	5	6	7
Hedrick (2010)	MAF36	--	--	93	--	--	107	109
Duran(2013)		83	85	93	97	99	--	--
Hedrick (2010)	MAF48	--	--	122	--	126		
Duran(2013)		118	120	122	124	126		
Hedrick (2010)	FCB266	87	99					
Duran(2013)		87	99					
Hedrick (2010)	MAF209	--	109	113	115	119		
Duran(2013)		107	--	113	--	--		

Ya que en los estudios realizados por Whitakker et al., (2004) y Hogg et al., (2006) se observó que la fundación con pocos individuos ocasionó un decremento en la diversidad genética, lo cual causó un decremento en el tamaño poblacional, fecundidad y sobrevivencia de las crías. Por lo cual es posible sugerir que la variación genética es fundamental para la recuperación de las poblaciones mexicanas de *Ovis canadensis mexicana*

Los valores de diversidad genética sugieren que la manera de fundar la población de *O. c. mexicana* en Rancho Pilares resultó positiva para la variación genética. Esto se ajusta a lo reportado por Fitzsimmons et al. (1995), de que la heterocigosidad en esta especie se encuentra correlacionada positivamente con el tamaño de la cornamenta, lo cual es el carácter morfológico que define su éxito reproductivo. En poblaciones de *O. canadensis* del estado de Oregón, EUA, se encontró que la baja diversidad genética en cinco poblaciones estaba jugando un papel relevante en el drástico declive del nacimiento

de corderos (Whitakker *et al.* 2004). Por su parte Hogg *et al.*, (2006) encontraron una reducción en la adecuación de poblaciones que tenían poca variación genética. En ambos trabajos no existía evidencia alguna de enfermedades por patógenos o eventos ambientales explicando la disminución en estas poblaciones.

Los valores obtenidos para el estadístico F_{IS} , que corresponde al coeficiente de endogamia, nos indica dos posibles escenarios. Posiblemente, la población tenga más apareamientos entre parientes de lo que se esperaría por azar, ya que la endogamia es más probable cuando las poblaciones se encuentran en cautiverio, como es el caso de Rancho Pilares. Por otra parte, es posible que exista algo de estructura poblacional, y entonces el exceso de homocigos se deba en parte al efecto Wahlund, ya que la subestructuración en la población resulta en una sobrestimación de los heterocigos esperados para el total de la población (Wahlund, 1928; Hedrick, 2005).

Los valores que puede tomar F_{IS} (el índice de endogamia) van menos uno a más uno. Para la población estudiada los valores no son altos, aunque varían entre loci de -0.1124 (exogamia) a 0.5831 (endogamia), con un promedio de 0.1510. Hay que recordar que solo en tres de los 10 microsatélites analizados se encontró un valor significativo diferente a lo esperado bajo Hardy-Weinberg, y que existió una gran variación de valores. En general los resultados se encuentran cercanos al rango previamente reportado por Whitakker *et al.*, (2004) de 0.10 a 0.60, el cual es el único trabajo previo que reporta este índice en la especie. Existen evidencias de que las reproducciones endógamas bajan algunos componentes de la adecuación en *O. canadensis*, como es el caso del éxito reproductivo en la competición reproductiva entre machos, o en el reclutamiento por año en el caso de hembras (Hogg *et al.*, 2006).

Los resultados obtenidos con el programa Structure nos permiten evaluar de manera indirecta que tanto intercambio de material genético ha sucedido dentro de la población desde su fundación, con lo cual se detectó dos grupos genéticos, que nos hablan de diferencias en su origen o subestructuración actual. Con los datos obtenidos de la estructura genética sería posible eventualmente pensar en como intervenir en el

manejo y tratar de prevenir reproducciones entre parientes o tratar de desplazarlos a otros grupos familiares.

Estos resultados pueden indicar que la información genética que posee la población no se ha homogenizado, por lo cual, se podría decir que en los procesos reproductivos que ha tenido esta población desde su fundación han existido ciertos aislamientos de ciertos individuos. Sin embargo, otra posibilidad es el hecho de que esta población es muy nueva y no habido tiempo suficiente para poder observar una homogeneidad en los valores genéticos.

VARIACIÓN GENÉTICA MITOCONDRIAL

Los resultados obtenidos a partir de las secuencias de la región control mitocondrial muestran valores similares a lo reportado en trabajos previos para la misma especie. Ramey (1995) reportó 10 haplotipos con enzimas de restricción en ADN mitocondrial de cuatro subespecies de *O. canadensis*, en 244 individuos (Tabla 8); este el número máximo de haplotipos reportados hasta el momento para la especie. Posteriormente Boyce et al., (1999) encontraron siete haplotipos en nueve poblaciones, con un total de 124 individuos de *O. canadensis*. Recientemente, Gasca- Pineda et al. (2013) encontraron dos haplotipos en 62 individuos en *O. c. mexicana* en la Isla Tiburón. En el presente trabajo se encontraron tres haplotipos en 57 individuos de una población (Tabla 10).

Tabla 10. Comparación de los resultados obtenidos para la Región Control Mitocondrial. **Vida:** C- cautiverio y L-libre; **N:** tamaño de muestra; **π :** Diversidad nucleotídica; **h:** Haplotipos; **H_d :** Diversidad haplotípica.

Año	Autor	Marcador	Población	Vida	N	π	h	H_d
2013	Durán-Alvarez	550 pb	Rancho Pilares	C	58	0.0113	3	0.426
2013	Gasca-Pineda et al.,	550 pb	Isla Tiburón	C	62	0.005	2	-
1999	Boyce et al.,	515 pb	Sur de California	L	124	-	7	-
1995	Ramey et al.,	23 enzimas de restricción	California, Nevada, Utah, Nuevo México	L	224	0.0006	10	0.540

Al comparar a nuestra población con otras poblaciones en cautiverio de *O. canadensis*, es posible sugerir que hasta el momento en Rancho Pilares se ha evitado la pérdida de la diversidad genética nuclear. A pesar de que los valores obtenidos de las secuencias de la Región Control Mitocondrial son bajos comparados con otras especies, no son similares a lo reportado para *O. canadensis* diferentes estudios (; Boyce et al., 1999; Gasca-Pineda et al., 2013).

Según Ramey (1995), hay dos escenarios posibles para explicar la baja diversidad mitocondrial de la especie. El primero dice que la baja diversidad puede deberse a eventos de extinción y recolonización, lo cual afectó severamente la variación genética mitocondrial. El segundo propone que durante las glaciaciones del Pleistoceno expliquen haplotipos distintos, dependiendo de la región. Al comparar el número de haplotipos de la Región Control Mitocondrial de Rancho Pilares con otras especies de artiodáctilos, es posible corroborar la baja diversidad genética, como en el caso del berrendo (*Antilocapra americana*) que posee 21 haplotipos en análisis hecho por Ramírez (2011). Lo cual apoya que efectivamente que las poblaciones de *O. canadensis* pasaron por grandes cuellos de botella. Valdez et al., (1999) sugieren que un importante cuello de botella sucedió durante las glaciaciones, cuando llegaron al continente y se dispersaron. Otra posible razón puede ser por los grandes declines en sus poblaciones por causas genéticas (Hedrick et al., 2001a, Whitakker et al., 2004; Hogg et al., 2006). Otro posible cuello de botella fue la caza excesiva durante el siglo pasado (Krausman et al., 1999; Espinosa et al., 2006; Eaton-Gonzales et al., 2001).

En filogenia con las subespecies fue posible distinguir una separación en el árbol filogenético entre las subespecies *O. c. mexicana* y *O. c. californiana* (consideradas como borrego cimarrón del desierto y de montaña, respectivamente; Krausman et al., 1999). Lo cual sugiere que la clasificación de subespecies previamente propuesta podría tener una correspondencia genética, al menos para las subespecies analizadas. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela debido a que el número de muestras por subespecie es muy bajo, como en *O. c. weemsi* con solo dos individuos.

De igual forma, el resultado del árbol de la filogenia de las subespecies, en la

separación entre las ramas de *O. c. mexicana* y *O. c. nelsoni* con las ramas de *O. c. weemsi*, resulta interesante, ya que las tres pertenecen a las llamadas “de desierto” (Krausman *et al.*, 1999; Shackleton, 1985), bajo este argumento se podría esperar que no existiera tal separación entre ramas. Esto podría explicarse esencialmente por el aislamiento geográfico que separa a *O. c. weemsi* de las otras subespecies, pues ésta se sitúa en la península de Baja California Sur, al contrario de las otras que son continentales. Sin embargo nuevamente con las pocas secuencias empleadas resulta difícil poder establecer alguna inferencia totalmente certera.

Por otra parte la cercanía encontrada para los haplotipos de Isla Tiburón y Rancho Pilares, seguramente es causada por su origen continental similar (Sonora), perteneciendo ambas poblaciones a la subespecie *O.c. mexicana*.

Las áreas pequeñas de distribución son uno de los factores de riesgo de extinción más importantes, tanto para mamíferos pequeños como grandes (Davies *et al.*, 2008); además de que se ha observado una pérdida de alelos más rápida en comparación con poblaciones grandes (Beebee *et al.*, 2008). Por lo cual para la adecuada preservación y conservación de la población de Rancho Pilares podría ser necesario realizar introducciones periódicas y también liberaciones de individuos en otras áreas, para que éstos aumenten el rango de distribución de la población.

Es en este sentido que se piensa que la introducción posterior de algunos individuos a la población de Rancho Pilares, seguramente aumentará la diversidad genética, ya que existen trabajos previos reportados, como la población de Santa Rosa Mountain en el estado de Nevada E.U.A. (Whitakker *et al.*, 2004) y en otras poblaciones de el estado de Montana E.U.A. (Hogg *et al.*, 2006), en donde se observó un aumento en los valores de variación genética en comparación con poblaciones que no tuvieron introducciones adicionales.

El tamaño poblacional también juega un papel importante en las poblaciones. Berger (1990) estudiando 129 poblaciones nativas de borrego cimarrón en Estados Unidos encontró que cuando una población tiene más de cien individuos censales ésta puede sobrevivir por más de 70 años; pero al tener menos de 50 individuos, la población se

extingue en menos de 50 años. Así, es posible inferir que el número mínimo requerido para que una población de borrego cimarrón pueda mantenerse en el tiempo es de 50 individuos; un dato esencial de ser tomado en cuenta para las futuras reintroducciones de la especie.

PROPUESTAS DE MANEJO

En el caso de la población de Rancho Pilares, se contó con 48 individuos en su fundación original, estando en el límite para asegurar su persistencia en el tiempo. Dado que en este momento el número censal es de 200 individuos, podría decirse que es una población que tiene altas posibilidades de persistir en el tiempo. El aumento censal en poblaciones de borrego cimarrón puede considerarse como una señal de recuperación demográfica, debida principalmente a que se mantiene la variación genética bajo condiciones naturales (Hogg *et al.*, 2006). En el caso de Rancho Pilares este aumento demográfico ha sido paulatino y constante y puede ser que este relacionado con los valores diversidad genética encontrados.

Otro ejemplo similar es la población de Isla Tiburón, que posee un número censal grande, debido principalmente que se encuentra en un ambiente con bastas oportunidades de nicho y sin depredadores naturales que controlen el crecimiento su población, la cual también tuvo individuos de muchos lugares, con una alta variación genética (Gasca-Pineda *et al.*, 2013).

Todos los resultados obtenidos nos permiten sugerir que, con una buena planeación, individuos de la población de Rancho Pilares puedan ser utilizados para realizar futuras reintroducciones de borrego cimarrón en México en áreas cercanas con clima similar.

IX. PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

Los resultados obtenidos y el manejo realizado en la población generan bases teóricas para la conservación de *Ovis canadensis mexicana*, para que durante el futuro manejo y conservación se tome en cuenta el lugar de origen, el número de individuos inicial y que los fundadores sean de distintas fuentes. Esta información puede ser aplicada para el manejo de esta y otras especies vulnerables o en peligro de extinción. Por lo cual se sugiere para la fundación de nuevas poblaciones de borrego cimarrón como mínimo censal de 50 individuos, que sean estos genéticamente diversos y en proporciones sexuales lo más parecidas posibles, para que una población de borrego cimarrón pueda mantenerse en el tiempo.

Este trabajo es un acercamiento a la genética de poblaciones del borrego cimarrón de Rancho Pilares, pero es recomendable realizar estudios más finos (con más marcadores genéticos, de preferencia estudios genómicos con miles de marcadores) a lo largo de varias generaciones, y contemplando todos o la mayoría de los individuos y que se lleve a cabo una evaluación paralela de la sobrevivencia a largo plazo (tomando en cuenta sus padres y su genotipo) y la respuesta de los organismos en vida libre, así como un monitoreo continuo de la población.

Considero que esta investigación podría mejorarse realizando una comparación más fina, idealmente con las tres subespecies correspondientes a las poblaciones mexicanas, analizándolas con los mismos microsatélites, la región control mitocondrial utilizados en esta investigación, con lo cual, junto con análisis estadísticos e inferencias usando la teoría de la coalescencia podrían utilizarse para la toma de decisiones en las poblaciones mexicanas de borrego cimarrón (*Ovis canadensis mexicana*).

X. CONCLUSIONES

- 1) La investigación realizada sugiere que la fundación con cuatro poblaciones es la causa principal de los relativamente elevados valores de variación genética encontrados en la población de Rancho Pilares.
- 2) Los valores de endogamia obtenidos no son considerablemente altos, ya que sólo desvía significativamente para tres de 10 loci, dos de los cuales tenían excesos de nullos, estos se pueden deber principalmente a tres factores: a) La endogamia previa. b) Aislamiento de algunos individuos durante las reproducciones. c) El confinamiento.
- 3) Los haplotipos mitocondriales encontrados con algunas de las subespecies, podrían sugerir que la clasificación ya establecida es parcialmente correspondiente con los haplotipos conocidos, sin embargo sólo un estudio a profundidad nos acercara a la clasificación subespecífica de la especie.
- 4) La población de Rancho Pilares puedan ser utilizados para realizar futuras reintroducciones de borrego cimarrón en México, pero con mucha precaución tanto en términos ecológicos como genéticos.
- 5) El conocer la variación genética y como se distribuye ésta en la población, nos acerca un poco más a entender la ecología evolutiva de nuestra especie de trabajo, y en conjunto con la ecología de la especie, nos acercamos a desarrollar información que puede ayudar a la preservación de las especies o poblaciones vulnerables y/o en peligro de extinción.
- 6) La presente investigación es una prueba más de cómo el uso de herramientas moleculares nos permite acercarnos a la genética de la conservación, a evaluar la efectividad de los planes y programas de manejo aplicados en poblaciones bajo peligro de extinción. Y estimar la diversidad genética, un elemento fundamental para la conservación y reintroducción de esta especie en el futuro.

XI. REFERENCIAS

Avice, J.C. 2000. Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, EUA.

Amos W. y A. Balmford. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87:257-265

Beebee T. y G. Rowe. 2008. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press. New York. 400 p.

Berger J. 1990. Persistence of different-sized populations: an empirical assessment of rapid extinctions in Bighorn sheep. *Conservation biology* Vol.4 No. 1. pp. 91-98.

Bishop M. D.; Kappes S. M. y W. J. Keele. 1994. A genetic-linkage map for cattle. *Genetics*, 136, 619–639.

Bisonette J. A. y Melanie J., Stainkamp. 1996. Bighorn sheep response to ephemeral habitat fragmentation by cattle. *Great Basin Naturalist* 56 (4), e 1996, pp. 319-325.

Boyce W. M., Hedrick P. W., Muggli-Cockett N. E., Kalinowski S., Penedo T., Ramey II R. R. 1996. Genetic Variation of Mayor Histocompatibility complex and microsatellite loci: a comparasion in bighorn sheep. *Genetics Society of America* 145:421-433.

Boyce W. M.; Ramey II R. R.; Rodwell C. T.; Rubin S. E. y R. S. Singer. 1999. Population subdivision among desert bighorn sheep (*Ovis canadensis*) ewes revealed by mitochondrial DNA analysis. *Molecular Ecology* 8, 99-106.

Buchanan, F. C., Swarbrick, P.A. and Crawford, A.M. 1991. Ovine dinucleotide repeats polymorphism at the MAF48 locus. *Anim. Genet.* 22 (4), 379-380.

Buchanan, F. C. and Crawford, A.M. 1992. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF209 locus. *Anim. Genet.* 23 (2), 183.

Buchanan, F.C. and Crawford, A.M. 1993. Ovine microsatellites at the OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266 and OarFCB304 loci. *Journal Anim. Genet.* 24 (2), 145.

Ceballos, G y A. Miranda. 2000. Guía de campo de los mamíferos de la costa de Jalisco, México. Fundación Cuixmala, A.C. México.

Ceballos G. y Oliva G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Fondo de Cultura Económica. P 507-509.

CITES 2013. Convention on International Trade In Endangered Species Of Wild Fauna And Flora. Apéndices I, II and III. Valid from 12 June 2013. International Environment House, <http://www.cites.org>

Coltman D.W., J.G. Pilkington, J. A. Smith y J. M. Pemberton. 1999. Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* 53:1259-1267.

CONABIO. 2013. <http://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/cites/especies.html>

CONANP. 2011a. Sistema de Información, Monitoreo y Evaluación para la Conservación Ficha general del Área Natural Protegida.

http://simec.conanp.gob.mx/Info_completa_ext.php?id_direccion=188

CONANP. 2011b. Sistema de Información, Monitoreo y Evaluación para la Conservación Ficha general del Área Natural Protegida.

http://simec.conanp.gob.mx/Info_completa_ext.php?id_direccion=40

CONANP. 2013. Mapa de la región Noreste y Sierra Madre Oriental, Fuentes de Información Cartográfica, Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática.

http://www.conanp.gob.mx/sig/imgmapoteca/map_regiones/region_noreste.jpg

Cowan I. M. 1940. Distribution and Variation in the Native Sheep of North America. *American Midland Naturalist*, Vol. 24, No. 3: 505-580.

Crawford AM, Dodds KG, Ede AJ, Pierson CA, Montgomery GW, Garmonsway HG, Beattie AE, Davies K, Maddox JF, Kappes SW, et al. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*. 1995 Jun;140(2):703–724.

Eaton-Gonzales R. B y Martínez G. R. 2001. Análisis de la situación actual del conocimiento sobre borrego cimarrón peninsular (*Ovis canadensis cremnobates*) y sus implicaciones para la conservación y el manejo en el estado de Baja California. *DBC Volumen 45*: 37-48.

Earl, Dent A. and vonHoldt, Bridgett M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* doi: 10.1007/s12686-011-9548-7. WEB

Eguiarte, L. E. y D. Piñero. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias*. Número especial 4. Ecología y conservación en México: 34–47.

Eguiarte, L. E. y J. Núñez. 1999. La Evolución Biológica. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 457.

Eguiarte, L. E., Souza V. y Aguirre X. 2007. Ecología molecular. SEMARNAT, INE, CONABIO y UNAM.

Eisenberg, John Frederick. 1981. The mammalian radiations: An analysis of trends in evolution, adaptation.

Espinosa T. A., A. V. Sandoval y Contreras-B A. J. 2006. Historical distribution of desert bighorn sheep (*Ovis canadensis mexicana*) in Coahuila, México. *The Southwestern Naturalist* 51: 282-288.

Espinosa-T. A., Sandoval A., García-A. M., y A. J. Contreras- B. 2007. Evaluation of historical desert bighorn sheep habitata in Coahuila, México. *Desert Bighorn Council Transactions* 49: 30-39.

Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2007. Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.

FAO 2013. <http://www.fao.org/docrep/v8300s/v8300s14.htm>

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

Festa-Bianchet, M. 2008. *Ovis canadensis*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2011.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 18 October 2011.

Fick S. 2011. Mapa de la distribución histórica y actual en América del Borrego cimarrón. Canadian Geographic; Sources: British Columbia ministry of forest; Alberta fish and game division; Big game of north america, wildlife management institute. En: http://www.canadiangeographic.ca/kids/animal-facts/images/bighorn_sheep_range.jpg

Fitzsimmons N. N.; Buskirk S. W. y M. H. Smith. 1995. Population History, Genetic Variability, and Horn Growth in Bighorn Sheep . *Conservation Biology*, Vol. 9, No. 2 pp. 314-323.

Gasca-Pineda J, Cassaigne I, Alonso RA, Eguiarte LE (2013) Effective Population Size, Genetic Variation, and Their Relevance for Conservation: The Bighorn Sheep in Tiburon Island and Comparisons with Managed Artiodactyls.

Forbes S., H., Hogg J. T., Buchanan F. C., Crawford A. M. y Allendorf F. W. 1995. Microsatellite Evolution in Congeneric Mammals: Domestic sheep and Bighorn Sheep. *Mol. Bio. Evol.* 12 (6):1106-1113.

Frankham R., J. D. Ballou, y D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, Reino Unido.

Geist, V. 1971. Mountain sheep. A study in Behavior and Evolution. The university of chicago press. Chicago and London.

Geist, V. 1985. On Pleistocene bighorn sheep: some problems of adaptation, and relevance to today's American megafauna. *Will. Soc. Bull.* 13:351-359.

Hajji G. M., Zachos F. E., Charfi-Cheikrouha F., y Hartl G. B. 2006. Conservación genetics of the imperilled Barbary red deer in Tunisia. *Animal Conservation* 10: 229-235.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Hartl, D.L. and Clark, A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Hedrick P.W. 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends. Ecol. Evol.* 16:629-636.

Hedrick P. W.; Gutierrez- Espeleta A.; Lee R. N. 2001. Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Molecular Ecology* 10, 851-857.

Hedrick P. 2005. Genetics of populations. Jones and Bartlett publishers. Arizona state university. Jogerson T. J.; Festa-Bianchet M.; Jean-Michel G.; Wishart D. W. 1997. Effectsof age, sex, desease, and density on survival of Bighorn sheep. *Ecology*, Vol. 78, No. 4(Jun) pp.1019-1032.

Hedrick P. y R Fredrickson.2008. Captive breeding and the reintroduction of Mexican and red wolves. *Molec. Ecol.* 17(1):344-50.

Hogg T. J; Forbes H. S.; Steele M. B. y Luikart G. 2006. Genetic rescue of an insular population of large mammals. *Proc. R. Soc.* 273, 1491-1499.

Imágenes 2013. TerraMetrics, Datos del mapa ©2013 Google, INEGI.

Kappes S. M.; Keele J. W. ; y Stone R. T. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7: 235-249.

Krausman, P.R., A.V. Sandoval, y R.C. Etchberger. 1999. Natural history of desert bighorn sheep. Pp: 139-208. In: R. Valdez, and P.R. Krausman, eds. Mountain sheep of North America. Univ.of Arizona Press.

Lee R. 2009. Mexico's wild sheep. *Desert Bighorn Council Transactions.* Vol. 50 (61-65).

Lenarz M. S. 1979. Social Structure and Reproductive Strategy in Desert Bighorn Sheep (*Ovis canadensis mexicana*). *Journal of Mammalogy.* Vol. 60, No. 4 pp. 671-678.

Librado, P. y Rosas, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Maldonado J.E. 2006. Monitoreo de especies raras y amenazadas de mamíferos utilizando análisis genéticos y muestreos no invasivos. New Mexico museum of natural history and science. Bulletin No. 32. pp 37- 44.

Medellín, R.A. 2005. Venado temazate café, *Mazama pandora* Merriam, 1901. In: Los Mamíferos Silvestres de México, Ceballos, G. and Oliva, G. (Eds.), pp. 514-515, CONABIO y Fondo de Cultura Económica, México, D. F.

Meirmans P. G. and P. W. Hedrick. 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular ecology Resources.* 11, 5-18.

Montoya B y G Gates. 1975. Bighorn capture and transplant in Mexico. *Desert Bighorn Council Transactions,* 19, 28 – 32.

NCBI, 2012. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. Pp 505.

Nowak, R.M. 1991. *Walker's mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland, EUA.

Piñero, D. et al. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital natural de México*, Vol I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 415-435.

Pickman R., R. Rozzi, P. Feisinger, R. Dirzo y F. Masardo. 2001. *Fundamentos de conservación biológica*. Fondo de cultura económica, México.

Pritchard J.K., Stephens M. and P. J. Donnelly, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Reed D.H., D.A. Briscoe y R. Frankham. 2002. Inbreeding and extinction: The effect of environmental stress and lineage. *Cons. Gen.* 3:301-307.

Ramey II R. R. 1995. Mitochondrial DNA variation, population structure, and evolution of mountain sheep in the south-western United States and México. *Molecular Ecology* 4, 429- 439.

Ramírez A. S. R. 2011. Tesis de Licenciatura. Genética de poblaciones de una especie en peligro de extinción: caso de estudio del Berrendo (*Antilocapra americana*, Ord. 1815) en Valle de Colombia, Coahuila, México.

Ritland, K., y Jain, S. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci. *Heredity* 47: 35-52.

Rocha M. y Gasca J. 2007. En: Eguiarte, L. E., Souza V. y Aguirre X. *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, CONABIO y UNAM.

Rousset, F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux . *Molecular Ecology Resources* (2008) 8, 103–106.

Rubin E.S., Boyce W. M. and Bleich V. C. 2000. Reproductive strategies of desert bighorn sheep. *Journal of mammalogy*, 81(3):769-786.

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México, D.F.

Sandoval V. A. y Espinosa T. A. 2001. Status of bighorn sheep management programs in Coahuila, México. *Desert Bighorn Council Transactions*. Vol. 45 (53-57).

SEMARNAP, 2000. Proyecto para la conservación, manejo y aprovechamiento sustentable del borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) en México. Instituto Nacional de Ecología y Dirección General de Vida Silvestre, Febrero.

SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010, que determinan las especies y subespecies de flora y fauna silvestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. *Diario Oficial de la Federación*. Jueves 30 de Diciembre 2010. Segunda sección.

SEMARNAT. 2002.

<http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/vidasilvestre/Aprovechamientos/UMA%20con%20Tasas%20de%20Aprovechamiento%20de%20Palomas%20Autorizadas%202001-2002.pdf>

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Shackleton, M. D. *Ovis canadensis*. *Mamalian species*. No. 230, pp 1-9.

Shackleton, M. D. 1997. *Wild sheep and goats and their relatives : status survey and conservation action plan for caprinae*. IUCN Gland, Switzerland. pp. 296- 317.

Steffen P. y A. Eggen. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Anim. Genet.*, 24. pp. 121–124.

Swarbrick, P.A. Buchanan, F.C. and Crawford, A.M. 1991. Ovine dinucleotide repeats polymorphism at the MAF36 locus. *Anim. Genet.* 22 (4), 377-378.

Uranga R. T. 2001. Situación actual del borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) en el estado de Chihuahua, México. *DBC* 45: 51-52.

Valdez R. y P. R. Krausman. 1999. *Mountain sheep of North America*. The University of Arizona Press.

Vendramin G. G., Fady B, Gonzáles-Martínez S. C., Sheng- Hu F., Scotti I., Sebastiani F., Soto A. and R. J. Petit. 2008. Genetically depauperate but widespread: the case of an emblematic mediterranean pine. *Evolution* 62-3:680-688.

Van Oosterhout C.; Hutchinson W. F.; Wills P. M. D. y P Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535– 538.

Wahlund, S. 1928. Zusammensetzung von populationen und korrelationserscheinungen vom standpunkt der vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11: 65-106. En: Hajji G. M., Zachos F. E., Charfi-Cheikrouha F., y Hartl G. B. 2006. Conservación genetics of the imperilled Barbary red deer in Tunisia. *Animal Conservation* 10: 229-235.

Walker P. E. 1964. *Mammals of the world*. Blatimore.

Weber L. y C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2:1123-1128.

Whitakker D. G.; OSTERMANN D. S. ; BOYCE M. W. . 2004. Genetic variability of reintroduced California bighorn sheep in Oregon. *Journal Of Wildlife Management* 68(4):850–859

Whittaker C. J.; Harbord M. R.; Boxall N. ; Mackay I. ; Dawson G.; Sibly M. R. 2003. Likelihood-Based Estimation of Microsatellite Mutation Rates. *Genetics* 164: 781–787.

Wiessenbach, J. y G. Dib. 1992. A second-generation link-age map of the human genome. *Nature* 359: 794-801.

Wilson, D. E., and D. M. Reeder. 2005. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed). Johns Hopkins University Press, Washington, D.C. EUA.

Zeiner, D.C., Laudenslayer, W.F., Mayer, K.E. & White, M. 1990. *California's Wildlife. Volume III: Mammals*. Sacramento, California: California Statewide Wildlife Habitat Relationships System, Department of Fish and Game. En: Ceballos G. y Oliva G. 2005. Los mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Fondo de Cultura Económica. P 507-509.

XII. APÉNDICES

- 1) Extracción de ADN
- 2) Precipitación ADN
- 3) Precipitación de fragmentos
- 4) Condiciones de PCR
- 5) Condiciones de termociclador
- 6) Genotipos Y Valores De Diversidad Genética Por Locus
- 7) Frecuencias Alélicas Por Locus

Apéndice 1

Protocolo de extracción de DNA para muestras de pelo usando Chelex al 5%

Usar de 15 a 20 pelos por extracción, no obstante pueden usarse menos (mínimo uno).

- 1) Cortar el pelo lo más cercano posible a la raíz, de preferencia no dejar más de 5mm de pelo.
- 2) Colocar las raíces en un tubo con 100µl de solución Chelex al 5%.
- 3) Agregar 15µl de Proteinasa K (10mg/ml).
- 4) Agregar 5µl de solución de DTT 0.5M.
- 5) Incubar a 61° C por 4 hrs con agitación periódica (1000RPM cada 5 min) 1 min agitación: 5 minutos sin agitación.
- 6) Verificar que la solución no contenga sólidos visibles, de lo contrario agregar más proteinasa y/o más DTT (en caso de que no huela y por tanto se haya evaporado) e incubar hasta que el pelo se disuelva por completo.
- 7) Incubar a 95° C por 10 minutos, agitar periódica (500RPM cada 2 min) 30 seg agitación: 1.5 minutos sin agitación.
- 8) Colocar en hielo durante 10 minutos.
- 9) Centrifugar 3 minutos a 10 000 r.p.m.
- 10) Tomar el sobrenadante cuidando de no tocar el precipitado y colocar en un tubo nuevo. NOTA: la resina Chelex inhibe la reacción de PCR, en caso de haberla tomado accidentalmente, regresar el sobrenadante y repetir desde el paso 9.

Apéndice 2

Precipitación De ADN

- 1) Agregar 7µl de EDTA 125 mM (pH 8.4).
- 2) Agregar 7µl de NaOAc 3M (pH 5).
- 3) Añadir 180 µl de Alcohol al 100% (filtrado).
- 4) Agregar el ADN obtenido del protocolo de extracción.
- 5) Agitar e incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 6) Centrifugar a 14 000 r.p.m. por 15 minutos.
- 7) Desechar con cuidado el Alcohol.
- 8) Agreagr 100µl de Alcohol al 70% (filtrado).
- 9) Centrifugar a 14 000 r.p.m. por 15 minutos.
- 10) Desechar con cuidado el Alcohol y dejar secar. NOTA: Es importante que no queden rastros de Alcohol.
- 11) Resuspender en 35 µl de H₂O ultra pura.

Apéndice 3

Tablas De Concentraciones Para La Reacción De PCR De Los 10 Microsatélites.

Tabla de concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para una reacción de PCR con los microsatélites MAF36; MAF48; MAF209; y AGLA293.

	[] Inicial	[] Final	Volumen por reacción
Buffer	10 X	1 X	1µl
Mg	30 mM	1 mM	0.33µl
dNtp	2.5 mM	0.2 mM	0.1µl
primer F	10 mM	0.53 mM	0.2µl
primer R	10 mM	0.53 mM	0.2µl
Taq	5 U/ul	1 U/ul	0.2µl
DNA	40 ng	80 Ng	2µl
Agua	-	-	5.97µl
Total			10µl

Tabla de concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para una reacción de PCR con el microsatélite OarFCB266.

	[] Inicial	[] Final	Volumen por reacción
Buffer	10 X	1 X	1µl
Mg	30 mM	1 mM	0.33µl
dNtp	2.5 mM	0.2 mM	0.1µl
primer F	10 mM	0.53 mM	0.3µl
primer R	10 mM	0.53 mM	0.3µl
Taq	5 U/ul	1 U/ul	0.2µl
DNA	40 ng	80 ng	2µl
Agua	-	-	5.97µl
Total			10µl

Tabla de concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para una reacción de PCR con el microsatélite D12S4.

	[] Inicial	[] Final	Volumen por reacción
Buffer	10 X	1 X	1µl
Mg	30 mM	3 mM	1µl
dNtp	2.5 mM	0.2 mM	0.1µl
primer F y R	10 mM	0.53 mM	0.2µl
Taq	5 U/ul	1 U/ul	0.2µl
DNA	40 ng	80 Ng	2µl
Agua	-	-	5.5µl
Total			10µl

Tabla de concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para una reacción de PCR con el microsatélite D16S3.

	[] Inicial	[] Final	Volumen por reacción
Buffer	10 X	1 X	1µl
Mg	30 mM	2 mM	0.66µl
dNtp	2.5 mM	0.2 mM	0.1µl
primer F y R	10 mM	0.53 mM	0.2µl
Taq	5 U/ul	1 U/ul	0.2µl
DNA	40 ng	80 Ng	2µl
Agua	-	-	5.84µl
Total			10µl

Tabla de concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para una reacción de PCR con los microsatélites MB1818 y MB848.

	[] Inicial	[] Final	Volumen por reacción
Buffer	10 X	1 X	1µl
Mg	30 mM	3 mM	1µl
dNtp	2.5 mM	0.2 mM	0.15µl
primer F	10 mM	0.53 mM	0.4µl
primer R	10 mM	0.53 mM	0.4µl
Taq	5 U/ul	1 U/ul	0.2µl
DNA	40 ng	80 Ng	2µl

Agua	-	-	-	-	4.85µl
Total					10µl

Tabla de concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para una reacción de PCR con el microsatélite MGTB4B.

	[] Inicial	[] Final	Volumen por reacción	
Buffer	10 X	1 X	1µl	
Mg	30 mM	2 mM	0.66µl	
dNtp	2.5 mM	0.2 mM	0.1µl	
primer F	10 mM	0.53 mM	0.2µl	
primer R	10 mM	0.53 mM	0.2µl	
Taq	5 U/ul	1 U/ul	0.2µl	
DNA	40 ng	80 Ng	2µl	
Agua	-	-	-	5.64µl
Total				10µl

Tabla de concentraciones iniciales, finales y volumen de reacción para una reacción de PCR para los dos primers de la Región Control Mitocondrial.

	[] Inicial	[] Final	Volumen por reacción	
Buffer	10 X	1 X	1.5µl	
Mg	20 mM	1.5 mM	0.75µl	
dNtp	2.5 mM	0.2 mM	0.3µl	
prim F	10 mM	0.53 mM	0.6µl	
prim R	10 mM	0.53 mM	0.6µl	
Taq	5 U/ul	1 U/ul	0.2µl	
DNA	40 ng	80 Ng	3µl	
Agua	-	-	-	8.05µl
Total				15µl

Apéndice 4

Condiciones Para La Amplificación De Los 10 Microsatélites Nucleares Y La Región Control Mitocondrial.

Microsatélites: D16S3 (58°C); BM848 (55°C); OarFCB266 (58°C), BM1818 (55°C); D12S4 (56°C)

Fase	Temperature	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	15 segundos	28
Alineación	Variable	33 segundos	
Extensión	72°C	1 minutos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Microsatélites: MAF209 , MAF48, MAF36.

Fase	Temperature	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	15 segundos	28
Alineación	56°C	27 segundos	
Extensión	72°C	1 minutos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Microsatélites: MGTG4B, AGLA293

Fase	Temperature	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C	15 minutos	1
Desnaturalización	94°C	45 segundos	28
Alineación	56 °C	45 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1

Primers Mit-R1/R1-435 y F3 144 R3 529

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

Apéndice 5

Precipitación De Productos De PCR

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

Apéndice 6

Genotipos Y Valores De Diversidad Genética Por Locus

Tablas de los genotipos encontrados para cada uno de los 10 microsatélites. Y los valores de heterocigocis (H_o ; H_E) y el valor para el coeficiente de endogamia (F_{IS}).

209			Total
107	107	113	
107	113	113	
15	15	6	36
H_o	H_E	F_{IS}	
0.4167	0.4762	0.1250	

D16S3								Total
134	134	138	134	154	144	146	154	
134	138	138	152	154	156	156	156	
6	9	2	1	1	1	1	2	23
H_o	H_E	F_{IS}						
0.6087	0.6914	0.1200						

BM848									Total
229	221	231	221	231	231	233	237	239	
229	231	231	233	233	239	239	239	239	
1	1	7	1	1	10	1	1	5	28
H_o	H_E	F_{IS}							
0.5357	0.6376	0.1598							

OarFCB266		Total
87	99	
99	99	
5	18	23
HO	HE	FIS
0.2174	0.1976	-0.1000

MAF48						Total	
118	118	120	122	118	122	124	
118	122	122	122	124	124	124	
2	18	3	12	1	1	1	38
HO	HE	FIS					
0.6053	0.5441	-0.1124					

BM1818						Total
253	253	255	253	255	257	
253	255	255	257	257	257	
2	4	8	1	2	2	19
HO	HE	FIS				
0.3684	0.5965	0.3824				

MAF36						Total	
83	85	85	83	85	85	99	
83	85	87	97	97	99	99	
5	26	2	1	1	3	1	39
HO	HE	FIS					
0.1795	0.4305	0.5831					

MGTG4B

Total

114	114	114	124	
114	120	124	124	
4	3	12	21	40

HO	HE	FIS
0.3750	0.4673	0.1975

D12S4											Total
134	134	138	144	144	144	154	156	146	154	156	
134	138	138	144	154	156	156	156	158	158	158	
1	4	1	1	1	3	2	7	1	5	4	30

HO	HE	FIS
0.6667	0.7925	0.1588

AGLA293						Total
198	198	200	198	200	202	
198	200	200	202	202	202	
16	8	1	10	5	1	41

HO	HE	FIS
0.5610	0.5582	-0.0044

Apéndice 7

Frecuencias Alélicas Por Locus

209	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
107	45	0.6250	0.1250	
113	27	0.3750	0.1250	
Total	72		0.1250	0.1270

D16S3	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
134	22	0.4783	0.1506	
138	13	0.2826	0.0571	
144	1	0.0217	0.0000	
146	1	0.0217	0.0000	
152	1	0.0217	0.0000	
154	4	0.0870	0.4699	
156	4	0.0870	-0.0732	
Total	46		0.1200	0.0829

BM848	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
221	2	0.0357	-0.0189	
229	2	0.0357	1.0000	
231	26	0.4643	0.1563	
233	3	0.0536	-0.0385	
237	1	0.0179	0.0000	
239	22	0.3929	0.1196	
Total	56		0.1598	0.2208

OarFCB266	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
87	5	0.1087	-0.1000	
99	41	0.8913	-0.1000	

Total	46	-0.1000	-0.1020
-------	----	---------	---------

MAF48	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
118	23	0.3026	-0.1717	
120	3	0.0395	-0.0278	
122	46	0.6053	-0.1988	
124	4	0.0526	0.4825	
Total	76		-0.1124	0.0796

BM1818	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
253	9	0.2368	0.2969	
255	22	0.5789	0.3757	
257	7	0.1842	0.4953	
Total	38		0.3824	0.4097

MAF36	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
83	11	0.1410	0.8967	
85	58	0.7436	0.6049	
87	2	0.0256	-0.0133	
97	2	0.0256	-0.0133	
99	5	0.0641	0.3702	
Total	78		0.5831	0.3185

MGTG4B	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
114	23	0.2875	0.0972	
120	3	0.0375	-0.0263	
124	54	0.6750	0.3276	
Total	80		0.1975	0.0764

D12S4	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
134	6	0.1000	0.2750	
138	6	0.1000	0.2750	
144	6	0.1000	0.2750	
146	1	0.0167	0.0000	
154	8	0.1333	-0.1373	
156	23	0.3833	0.3800	
158	10	0.1667	-0.1837	
Total	60		0.1588	0.1204

AGLA293	Conteo en muestra	Frecuencia	FIS (W&C)	R&H
198	50	0.6098	0.0898	
200	15	0.1829	-0.0484	
202	17	0.2073	-0.1009	
Total	82		-0.0044	-0.0427