



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**VARIABILIDAD GENÉTICA Y RELACIÓN FILOGEOGRÁFICA DE
TRES SUBESPECIES DE VENADO COLA BLANCA (*Odocoileus
virginianus*) EN LA REGIÓN CENTRO-NORTE DE MÉXICO**

ALAN ROBERTO HERNÁNDEZ LLAMAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014


La presente tesis titulada **Variabilidad genética y relación filogeográfica de tres subespecies de venado cola-blanca (*Odocoileus virginianus*) en la región Centro-Norte de México**, realizada por el alumno **Alan Roberto Hernández Llamas** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


MAESTRO EN CIENCIAS

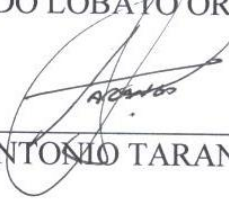
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD


GANADERÍA


CONSEJO PARTICULAR


CONSEJERO: DR. FERNANDO CLEMENTE SÁNCHEZ

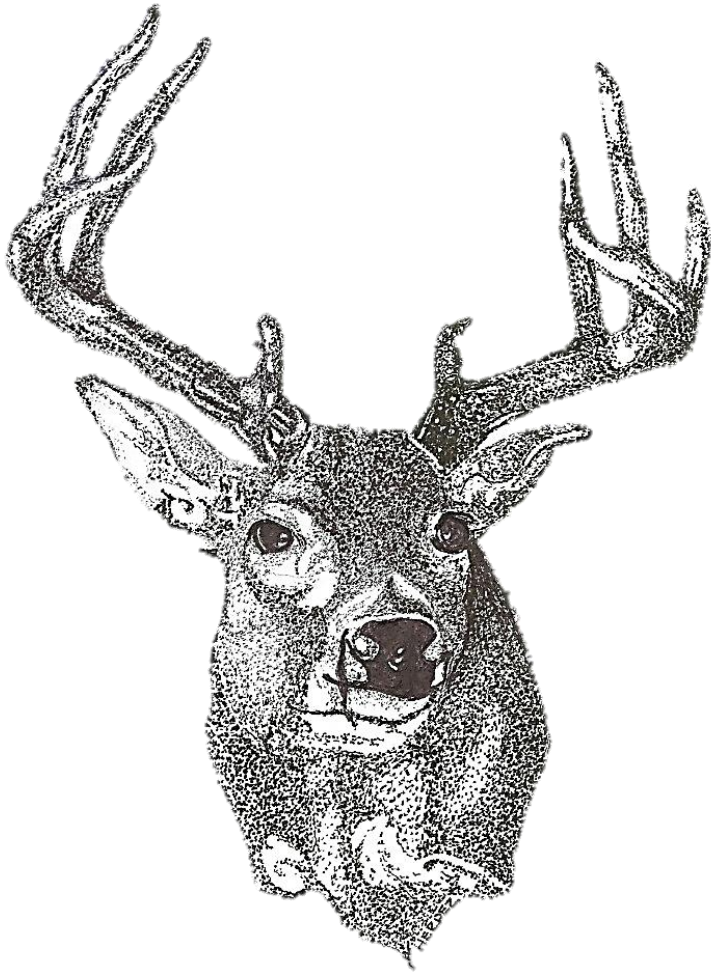

DIRECTOR DR. RICARDO LOBATO ORTIZ


ASESOR: DR. LUIS ANTONIO TARANGO ARÁMBULA


ASESOR: DR. CÉSAR OCTAVIO ROSAS ROSAS


ASESOR: DR. JOSÉ LUIS ALCÁNTARA CARBAJAL

Montecillo, Texcoco, Estado de México.



VARIABILIDAD GENÉTICA Y RELACIÓN FILOGEOGRÁFICA DE TRES SUBESPECIES DE VENADO COLA BLANCA (*Odocoileus virginianus*) EN LA REGIÓN CENTRO-NORTE DE MÉXICO

Alan Roberto Hernández Llamas, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2014.

El venado cola blanca es la especie de mayor importancia en la actividad cinegética en México. En el país se distribuyen 14 de las 38 subespecies reportadas para Norte, Centro y Sur América, a pesar de esto existe poco conocimiento acerca de su diversidad genética. El objetivo de esta investigación fue determinar y describir la variabilidad genética de las subespecies *O. v. miquihuanensis*, *O. v. couesi* y *O. v. mexicanus* en la región Centro-Norte de México por medio del uso de un fragmento de la Región Control (D-Loop) del ADN mitocondrial. Se colectaron 67 muestras de tejido muscular, cartílago auricular u órganos; 4 de *O. v. miquihuanensis*, 43 *O. v. mexicanus*, y 20 *O. v. couesi* de Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosí, Morelos y Puebla. Se identificaron 51 haplotipos diferentes. Para el establecimiento de las relaciones filogenéticas se utilizaron los métodos de Neighbor-Joining y Máxima Parsimonia con las secuencias del fragmento de 489 pb. La estructura genética y variabilidad fueron calculadas por medio del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y los índices de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π). En los resultados de los árboles se observó la separación de la subespecie *O. v. mexicanus* en un clado y la unión de *O. v. miquihuanensis* con *O. v. couesi* en otro. Los análisis de AMOVA resultó una alta diferenciación genética entre las subespecies analizadas ($F_{ST} = 0.32163$, $P < 0.05$). Los niveles de los índices h (0.98598) y π (0.08276) sugieren moderados niveles de variación genética. Con los resultados es posible establecer mejores estrategias de conservación y manejo para el aprovechamiento del venado cola blanca y evitar la pérdida del pool genético original de cada una de las tres subespecies analizadas.

Palabras clave: *Odocoileus virginianus*, ADNmt, Región Control, diversidad genética.

GENETIC VARIABILITY AND PHYLOGEOGRAPHIC RELATIONSHIP BETWEEN THREE WHITE-TAILED DEER (*Odocoileus virginianus*) SUBSPECIES IN MEXICO

Alan Roberto Hernández Llamas, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2014.

The whitetail deer is the species-of greatest importance in hunting in Mexico. Distributed in the country 14 of the 38 subspecies reported for North, Central and South America, despite this there is little knowledge about its genetic diversity. The aim of this research was to determine and describe the genetic variability of the subspecies *O. v. miquihuanensis*, *O. v. couesi* and *O. v. mexicanus* in the Center-North of Mexico by using a fragment of the control region (D-loop) of mitochondrial DNA. 67 samples of muscle tissue, ear cartilage or organs were collected, 4 of *O. v. miquihuanensis*, 43 of *O. v. mexicanus*, and 20 of *O. v. couesi* from Zacatecas, Aguascalientes, San Luis Potosi, Morelos and Puebla. We identified 51 different haplotypes. Methods Neighbor-Joining and Maximum Parsimony for establishing phylogenetic relationships by using sequences of 489 bp fragment were used. Genetic structure and variability were calculated using the Molecular Analysis of Variance (AMOVA) and indices of haplotype diversity (h) and nucleotide (π). In the results of trees subspecies separation was observed *O. v. mexicanus* in one clade and the union of *O. v. miquihuanensis* with *O. v. couesi* in another one. AMOVA analyzes resulted high genetic differentiation among subspecies analyzed ($F_{ST} = 0.32163$, $P < 0.05$). Indices levels h (0.98598) and π (0.08276) suggest moderate levels of genetic variation. With the results it is possible to establish better management and conservation strategies for the use of white-tailed deer and prevent the loss of the original gene pool of each of the three subspecies analyzed.

Key words: *Odocoileus virginianus*, mtDNA, D-Loop, genetic diversity.

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo de las siguientes instituciones:



Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con los recursos otorgados para el proyecto “**Conservación de la Diversidad Genética y Mejora del Venado Cola blanca en México**” con clave de registro **SEP-CONACYT 000000000166903**.



Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí



Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT)

Dedicatoria

A mis padres, Ing. María Guadalupe Llamas Quiñones y M.V.Z. Roberto Antonio Hernández Dávila, por ser mí apoyo y más grande ejemplo. Gracias por darme alas y raíces.

A mis hermanos Fernando y Didier que siempre están conmigo, son una parte importante de esta historia.

A mi sobrina Arianna, mi pequeña maestra de vida y una de mis más grandes motivaciones.

A la familia Esparza Llamas: Pancho, Juanis, Ale, Panchito y Sofi, que siempre me alientan a seguir adelante.

A la familia Llamas Quiñones: Lili y Jared (Chinguno) por su cariño y apoyo.

A la familia Zecua Hernández y Hernández Dávila, que están siempre presentes en cada uno de mis pasos.

A los que ya no están físicamente conmigo pero si en mi corazón y memoria.

Agradecimientos

Al Colegio de Postgraduados por permitirme realizar mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme el apoyo financiero para la realización de mis estudios.

Al Dr. Fernando Clemente Sánchez por darme la oportunidad de ser parte del equipo, la amistad que me brindó, el total apoyo además de toda la experiencia que me transmitió en este tiempo tanto en lo académico, profesional y personal.

Al Dr. Ricardo Lobato Ortiz por la dirección de esta tesis y sus consejos de suma importancia en mi formación en la biología molecular.

A mis asesores y profesores Dr. Luis Tarango Arámbula, Dr. Octavio Rosas Rosas y Dr. José Alcántara Carbajal por sus acertados comentarios y observaciones a lo largo del desarrollo del trabajo.

Al Dr. César Cortez Romero y Dr. Carlos Ramírez Herrera por sus importantes aportaciones a este trabajo en laboratorio y el aula.

Al Lic. Miguel Ángel Espinosa Pérez por su amistad y apoyo en mi estadía en el campus San Luis Potosí.

Al Ing. Giovanni Tonatiuh González responsable técnico de las UMA Rancho Cinegético Huaxtla, El Capire, Cinegético Nexpa, Ejido de Huautla, Ejido Rancho Viejo, Cinegético El Limón de Cuauichinola, Venado Cola Blanca y Animales Silvestres de Pitzotlan, Cinegético El Metate, El Unicornio Los Sauces y Ejido Xochipala del Estado de Morelos.

Al M. en C. Jesús Báez Arellano por su apoyo con muestras de Zacatecas.

A los propietarios y trabajadores de la UMA Rancho El Antrialgo de Aguascalientes.

Al Ing. Ricardo Montañez Lugo responsable técnico de la UMA Agua Nueva y al taxidermista David Moreira de Zacatecas.

Al Dr. Amalio Santacruz y la técnico Laura Carrillo del Laboratorio de Huella Genética por las facilidades otorgadas en el uso de equipo para el análisis de ADN.

A Melina por ser y estar siempre. Por tu amistad, consejos, motivación y el apoyo que me das. Sin ti, gran parte de esto no hubiera sido posible.

A Gmelina, Héctor y Abraham: amigos, fauneros, zoquetes y socios, por compartir todas esas vivencias y un sueño que logró materializarse: Tlalejke. Esto es solo el comienzo de bastantes experiencias.

A la familia Ortiz Sánchez: Héctor, Anavi y las sobrinas Victoria y Regina, por su cariño y hospitalidad con la que siempre fui recibido en su hogar y además permitirme compartir momentos únicos.

A Pablo Arenas quien desde mi llegada al postgrado me apoyó y brindó su amistad.

A los casi salinenses Ale, Gery y Anuar por su amistad y esos momentos de convivencia.

A todo el personal administrativo y de apoyo de los campus Montecillo y San Luis Potosí.

A cada uno de ustedes ¡Gracias!

“La armonía con la tierra es como la armonía con un amigo, no se puede apreciar su mano derecha y cortarle la izquierda”. **Aldo Leopold**

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	XII
RESUMEN	IV
SUMMARY	V
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Hipótesis.....	3
II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Biodiversidad en México.....	4
2.2. El venado cola blanca.....	5
2.3 Historia evolutiva.....	6
2.3. Subespecies <i>miquihuanensis</i> , <i>couesi</i> y <i>mexicanus</i>	12
2.4. Importancia de los métodos genéticos.....	15
2.5. Subespecies.....	16
2.6. ADN Mitocondrial (ADNmt).....	18
2.7. Filogeografía.....	22
III. MATERIAL Y MÉTODOS	24
3.1. Área de estudio	24
3.2. Colecta de material biológico	25
3.3. Extracción de ADN.....	25

3.4. Análisis de ADN mitocondrial.....	27
3.5. Análisis estadístico.....	27
3.5.1. Diversidad molecular intra-poblacional.....	28
IV. RESULTADOS	30
4.1. Colecta de material biológico	30
4.2. Análisis de las secuencias del fragmento de ADN mitocondrial.....	30
4.3. Diversidad genética.....	31
4.4. Estructura de las poblaciones	32
4.5. Análisis filogenéticos.....	34
V. DISCUSIÓN.....	39
5.1 Obtención de material biológico.....	39
5.2. Diversidad Genética.....	40
5.3. Estructura poblacional.....	42
5.4. Análisis filogenético.....	43
5.5. Implicaciones para la conservación y manejo de la especie.....	44
VI. CONCLUSIÓN.....	46
VII. LITERATURA CITADA	47

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Distribución histórica del venado cola blanca en México.....	10
Figura 2. Macho de venado cola blanca subespecie miquihuanensis.....	13
Figura 3. Hembra de venado cola blanca subespecie couesi.....	14
Figuras 4 Macho de venado cola blanca subespecie mexicanus.....	14
Figura 5. Área de muestreo en el Centro-Norte de México.....	24
Figura 6. Análisis filogenético por Neighbor-Joining.....	35
Figura 7. Análisis filogenético por Máxima Parsimonia.....	37
Cuadro 1. Composición nucleotídica de tres subespecie de venado cola blanca en el Centro-Norte de México.....	30
Cuadro 2. Diversidad de haplotipos dentro y entre 3 subespecies del Centro-Norte de México.....	20
Cuadro 3. Estimación de los valores de diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) de tres subespecies del centro-norte de México.....	28
Cuadro 4. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	29
Cuadro 5. Valores de FST pareados de las frecuencias haplotípicas.....	30
Cuadro 6. Valores de flujo genético entre tres subespecies de <i>Odocoileus virginianus</i>	34

I. INTRODUCCIÓN

La historia de la raza humana en América del Norte ha estado muy relacionada con las especies nativas de cérvidos. Los primeros nativos americanos usaron prácticamente cada parte del animal; las astas y huesos largos fueron usados como utensilios, herramientas, además de puntas de lanza y flecha. De los tendones se hicieron hilos, sedales de pesca y cuerdas para arcos. La grasa se empleó como conservante, jabón y lámparas. El cerebro se utilizó como curtido y las pieles como ropa, mantas, casas y después como moneda de cambio (Demaris *et al.*, 2000).

En América Latina, el venado ha sido un importante animal de caza desde las culturas precolombinas, uno de los 20 días que comprende el calendario Azteca se dedicó al venado. Esta especie tiene más de 30 nombres en diferentes dialectos indígenas en todo su ámbito de distribución (Ortega *et al.*, 2011).

Leopold (1959) señala que el venado cola blanca es el animal de caza deportiva más importante en México, esto debido a su amplia distribución en el país, la cual incluye zonas templadas y tropicales. Asimismo, se le considera un magnífico sujeto para administrarlo y aprovecharlo gracias a su adaptabilidad y persistencia. Los ecosistemas y hábitats ocupados por el venado cola blanca en México varían desde el desierto de Sonora con 100 mm de precipitación anual hasta la selva tropical en Chiapas con más de 3000 mm de precipitación anual. Las características morfológicas del cola blanca en América Latina son variables, desde el majestuoso *O. v. texanus*, subespecie que sobrepasan los 200 puntos de acuerdo con el sistema *Boone and Crocket*, hasta el *O. v. truei* en Costa Rica con menos de 100 puntos en la madurez (Ortega *et al.*, 2011). La

IUCN solo considera como subespecies amenazadas a aquellas del Centro y Sur América; cuyas principales amenazas las constituyen los perros ferales en ciertas áreas, así como la sobre cacería, la pérdida de hábitat y la cacería furtiva. La subespecie *O. v. mayensis* está incluida el Apéndice III de CITES (Gallina y Arévalo, 2008).

Actualmente de las 14 subespecies que existen en México, solo *O. v. texanus*, *O. v. couesi* y *O. v. carminis* son consideradas como trofeos (*Boone and Crocket Club* y *Safari Club International*) (Villarreal, 1999).

Sin embargo, la clasificación taxonómica de subespecies de venado cola blanca ha sido objeto de controversias, principalmente por la falta de estudios moleculares para identificar subespecies tradicionales como filogenéticamente diferentes. La falta de correspondencia entre subespecies definidas fenotípicamente y grupos filogenéticos identificados utilizando métodos moleculares modernos se ha puesto de manifiesto por Phillimore y Owens (2006).

Los estudios sobre el ADN mitocondrial se circunscriben a los animales, ya que estos poseen características que hacen esta molécula el marcador perfecto para estudios evolutivos y poblacionales. Esto es crucial para el entendimiento de la evolución e historia natural de las especies (Buburuzan *et al.*, 2007). Esta designación de poblaciones como subespecies tiene una influencia importante en la biología de la conservación y los planes de manejo de las especies silvestres.

1.1. Objetivo general

Caracterizar genéticamente 3 subespecies de venado cola blanca (*O. v. couesi*, *O. v. miquihuanensis* y *O. v. mexicanus*) en la región Centro-Norte de México por medio del uso de un fragmento de la región control del ADN mitocondrial.

1.2. Objetivo específico

Determinar y describir la variabilidad genética de tres subespecies de venado cola blanca en la región Centro-Norte de México por medio del uso de un fragmento de la región control del ADN mitocondrial.

1.3. Hipótesis

La variabilidad de haplotipos entre las subespecies de venado cola blanca está determinada por su distribución geográfica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Biodiversidad en México

México ocupa la posición 14 en términos de tamaño de territorio: sin embargo, se sitúa en el 4° lugar respecto a la diversidad biológica mundial por lo que es considerado un país “megadiverso”. Específicamente ocupa el 5° lugar en número de mamíferos y 3° en mamíferos endémicos (Vázquez-Domínguez y Vega, 2006).

Esta diversidad biológica de México es producto de la combinación de las variaciones topográficas y climáticas, creando un mosaico de condiciones ambientales e incluso microambientales (Flores-Villela y Gerez, 1994).

La conservación de la biodiversidad requiere de una visión completa de los ecosistemas y su funcionamiento; esto involucra entenderla a niveles de genes, individuos, poblaciones, especies y comunidades, ya que son componentes dinámicos e interconectados (Sánchez *et al.*, 2011).

Se sabe que el esquema de UMA (Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre) en México, a partir del año 2000, ha brindado resultados satisfactorios para la conservación de los ecosistemas y la vida silvestre (Zamorano, 2009) y ha ayudado a que algunos estados manejen la fauna natural y sus hábitats. De acuerdo con la Ley General de Vida Silvestre (SEMARNAT, 2000), las UMA tienen como objetivo principal la conservación del hábitat natural y de las poblaciones e individuos silvestres. De igual manera las UMA encaminan esfuerzos hacia la restauración, protección, mantenimiento, recuperación, reproducción, repoblación, reintroducción, investigación, rescate, resguardo, rehabilitación, exhibición, recreación, educación y aprovechamiento sustentable de la vida silvestre.

2.2. El venado cola blanca

Es un venado de tamaño grande de color con tonalidades que van desde el grisáceo claro a rojizo oscuro. La cola es de color café oscuro en la parte dorsal y blanco en la ventral. Los machos tienen astas digitiformes con una rama principal de la cual emergen las ramas secundarias o velas. El peso de las subespecies de venado que se distribuyen en el país varía entre 25 y 100 kilogramos (Aranda, 2012). El venado cola blanca presenta un patrón de actividad más marcado durante las primeras horas de día y durante el crepúsculo, esto está determinado por el sexo, edad, época reproductiva, depredación, disponibilidad de alimento e influenciado por la actividad humana (Galindo-Leal y Weber, 1998).

Su área de actividad (*home range*) es variable, pero se ha identificado que en Arizona ésta tiene en promedio un tamaño de 5.18 km² para hembras y 10.57 km² para machos, con una zona núcleo de 1.89 km² y 4.47 km² respectivamente (Ockenfels et al., 1991). El área de actividad varía con la subespecie, área de distribución, condición reproductiva, disponibilidad de recursos y en general con la calidad del hábitat.

El periodo de gestación dura en promedio 200 días y normalmente los partos consisten en 1 cría para hembras primerizas y 2 o más crías en los siguientes partos, hechos que dependen de la productividad del área ocupada (Aranda, 2012).

El venado forma grupos sociales constituidos principalmente por la hembra y crías de la misma temporada, los machos se asocian y segregan durante la época no reproductiva en grupos de 1 o 2 machos adultos y 2 o 3 juveniles de 1.5 a 2.5 años. Este comportamiento cambia en la época reproductiva y forman parejas temporales (Galindo-Leal y Weber, 1998). Las asociaciones con mayor número de individuos son poco

frecuentes pero se pueden observar 2 hembras (generalmente madre e hija) con sus crías (Villarreal, 1999). Esta especie sufre depredación por el puma (*Puma concolor*) y jaguares (*Panthera onca*), y los jóvenes son presa de osos (*Ursus americanus*), coyote (*Canis latrans*) y otros pequeños mamíferos carnívoros (Leopold, 1959; Rosas-Rosas *et al.*, 2008)

Los ecosistemas en los que se encuentra a esta especie de venado son muy variados, desde los bosques templados y tropicales, pastizales templados, chaparrales, desiertos, hasta matorrales y bosques tropicales caducifolios. Su dieta consiste en pastos, hongos, bellotas, líquenes y ramas tiernas de arbustos (Halls, 1984).

Leopold (1959) menciona que de acuerdo con su adaptabilidad a los cambios en el uso del suelo y persistencia, el venado cola blanca es un magnífico sujeto para ser administrado en México.

2.3 Historia evolutiva

Artiodactyla contiene alrededor de 247 especies de mamíferos ungulados agrupados en 10 familias: 1) *Bovidae* (es la familia más diversa con 142 especies, están relacionadas con el ganado, cabras y ovejas), 2) *Cervidae* (venados, muntjac, alce, etc.; 54 especies), 3) *Moschidae* (ciervo almizclero; 7 especies), 4) *Giraffidae* (jirafas y okapi), 5) *Antilocapridae* (berrendo; 1 especie), 6) *Tragulidae* (ciervo ratón; 10 especies), 7) *Suidae* (cerdos; 18 especies), 8) *Tayassuidae* (pecaríes; 4 especies), 9) *Hippopotamidae* (hipopótamos; 2 especies) y 10) *Camelidae* (camello, dromedario, llama y vicuña; 7 especies) (IUCN, 2013).

Los artiodáctilos estuvieron originalmente presentes en todos los continentes exceptuando la región de Australia y Antártida. Actualmente, el ganado doméstico, como

ganado vacuno, búfalos, ovejas, cabras, cerdos y camellos, se incluyen en este grupo (Hassanin *et al.*, 2012).

Con 40 especies de venados, la familia *Cervidae*, después de la *Bovidae* constituye la segunda familia de artiodáctilos con más especies (Grubb, 1993). Los Cérvidos, son rumiantes astados, exceptuando el venado acuático (*Hydropotes inermis*) de China y Corea. La familia *Cervidae* se divide en dos subfamilias, de acuerdo con la manera en la cual el segundo y quinto metatarso son retenidos. Los venados del Viejo Mundo, subfamilia *Pleistometecarpalinae*, retiene los extremos superiores de estos metatarsos, el único grupo de rumiantes que lo hace. Los venados del Nuevo Mundo retienen el extremo inferior del segundo y quinto metatarso, la condición común en rumiantes cursoriales. La familia *Cervidae* cuenta con 16 géneros y 44 especies recientes (Geist *et al.*, 1998).

En Norte América se distribuyen cinco especies de cérvidos: alce (*Alces alces*), caribú (*Rangifer tarandus*), elk (*Cervus elaphus*), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y venado bura (*O. hemionus*) (Cronin, 1992).

El género *Odocoileus* define el Blancan de Norte América, el periodo geológico más frío en el Plioceno tardío antes de la mayor glaciación en el Pleistoceno. El cola blanca es probablemente la especie de venado más antigua en relación a las otras especies de cérvidos en el continente americano. El primer fósil aparecido en Norte América data de 3.5 millones de años de antigüedad (Smith, 1991). Su rango de distribución es grande, cubriendo los 79° de latitud dentro de Norte y Sur América. Sin embargo su variación geográfica es pequeña, haciendo su taxonomía una cuestión compleja (Demaris *et al.*, 2000).

Las características distintivas genéricas que son comúnmente usadas para separar *Odocoileus* de otros cérvidos del Nuevo Mundo incluyen: de *Rangifer*, la ausencia de astas en las hembras y hocico sin pelo; de *Cervus*, la ausencia de caninos superiores y los extremos superiores de los laterales metacarpianos y el vómer dividiendo la cavidad nasal posterior; de *Alces* la presencia de astas no palmeadas, la ausencia de papada y también la división vomeral de la cavidad nasal posterior: de *Pudu* la presencia de astas largas, glándulas tarsales y podales; de *Ozotoceros*, *Blastocerus*, *Hippocamelus* y *Mazama*, la presencia de glándulas metatarsales (Baker, 1984).

Dentro del género *Odocoileus*, endémico del continente americano, existen dos especies, el *O. virginianus* (venado cola blanca) y *O. hemionus* (venado bura). Estas se diferencian por la forma y configuración de sus astas, por el largo de la rama basal de las astas, el largo de las orejas y glándulas metatarsales, el color del pelo en la parte dorsal de la cola y la condición de la fosa lagrimal (Baker, 1984). El cola blanca es una de las 18 especies de cérvido que se han descrito para el continente Americano y es el animal de caza más popular en Norte América (Méndez, 1984).

Esta especie se distribuye desde el noreste de Estados Unidos y provincias sureñas de Canadá a Perú y Brasil en Sudamérica. Se ha introducido en las Islas Británicas, Bulgaria, República Checa, Finlandia, Yugoslavia, Nueva Zelanda, Cuba, Islas Vírgenes y otras islas del Caribe (Demaris *et al.*, 2000).

Clasificación Taxonómica del venado cola blanca (Zimmerman, 1780)

Orden: *Artiodactyla*

Suborden: *Rumiante*

Familia: *Cervidae*

Subfamilia: *Odocoileinae*

Género: *Odocoileus*

Especie: *O. virginianus*

Por su habilidad de adaptación ha prosperado en una amplia gama de condiciones climáticas y de hábitat. Se reproduce rápidamente y sus astas son altamente apreciadas como trofeo (Halls, 1984).

En el continente Americano, basados en caracteres morfológicos se han identificado 38 subespecies del venado cola blanca; 30 de ellas en la parte norte y centro y ocho en América del Sur. Las 14 subespecies mexicanas identificadas morfológicamente son:

- *Odocoileus virginianus acapulcensis* (Caton 1877).
- *Odocoileus virginianus carminis* (Goldman y Kellogg 1940).
- *Odocoileus virginianus couesi* (Coues y Yarrow 1875).
- *Odocoileus virginianus mexicanus* (Gmelin 1788).
- *Odocoileus virginianus miquihuanensis* (Goldman y Kellogg 1940).
- *Odocoileus virginianus nelsoni* (Merriam 1898).
- *Odocoileus virginianus oaxacensis* (Goldman y Kellogg 1940).

- *Odocoileus virginianus sinaloae* (J. A. Allen 1903).
- *Odocoileus virginianus texanus* (Mearns 1898).
- *Odocoileus virginianus thomasi* (Merriam 1898).
- *Odocoileus virginianus toltecus* (Saussure 1860)
- *Odocoileus virginianus truei* (considerada como subespecie mayensis).
- *Odocoileus virginianus veraecrucis* (Goldman y Kellogg 1940).
- *Odocoileus virginianus yucatanensis* (Hays 1872).

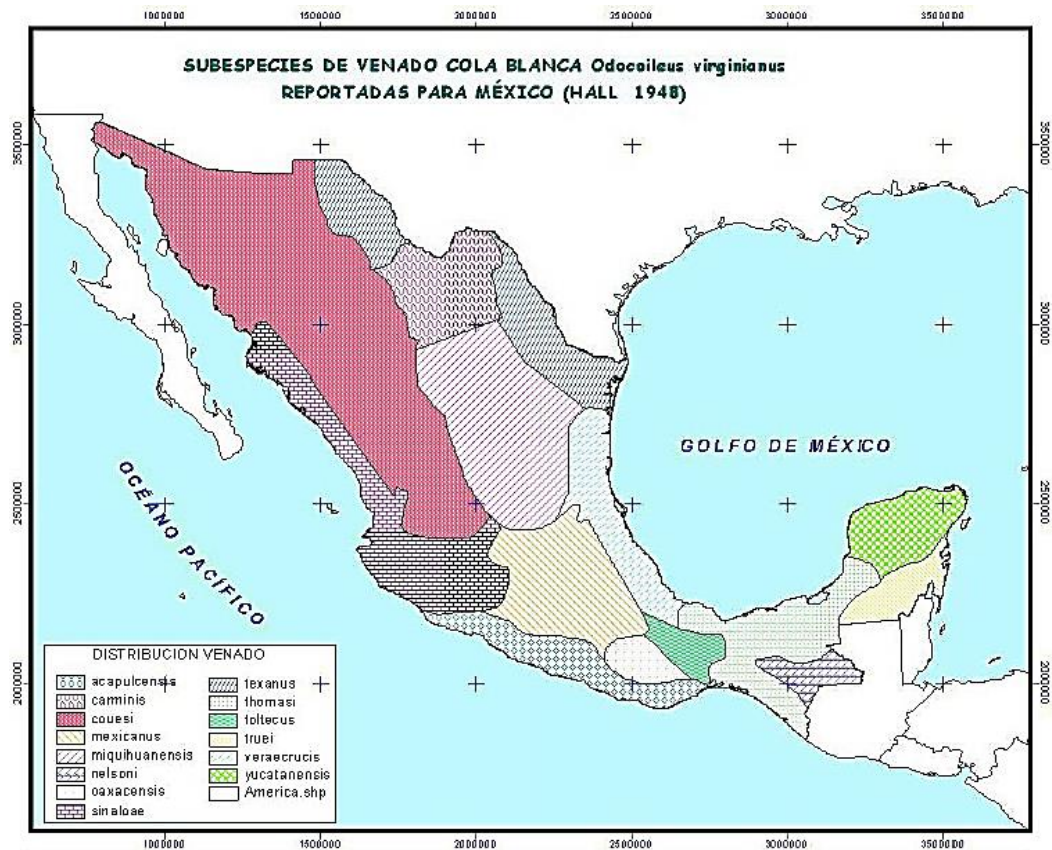


Figura 1. Distribución histórica del venado cola blanca en México (Hall, 1948). Tomado de Plan de Manejo tipo de venado cola blanca en climas áridos y semiáridos de México (SEMARNAT, 2008).

Estas subespecies se distribuyen en la mayor parte del territorio nacional (92.7%), excepto en la Península de Baja California y norte de Sonora (Villarreal, 1999). Pero esta clasificación morfológica no está completamente apoyada por estudios genéticos.

Los individuos de estas subespecies adaptados a un ambiente en particular, adquieren características genéticas particulares, las cuales significan ventajas sobre otros individuos de la misma especie liberados en esos ambientes, los cuales son susceptibles a enfermedades (parásitos, virus, bacterias), a la depredación o factores estocásticos y fracasarían por no estar adaptados (Villarreal, 1999).

El venado cola blanca es importante económica, cultural y ecológicamente para nuestro país; debido a que forma parte de la dieta de las poblaciones rurales e indígenas, por otro lado, es una especie con una alta demanda como trofeo en la actividad cinegética nacional e internacional y que ha aportado grandes beneficios económicos y ecológicos en zonas rurales del norte de México (Leopold, 1959; Villarreal-Espino, 2002; Logan-López *et al.*, 2006).

En México se han realizado estudios sobre esta especie enfocados principalmente a los aspectos de morfología, densidad poblacional, composición de la dieta, dinámica poblacional, patrones reproductivos y métodos de evaluación del hábitat. Los estudios se han enfocado en solo cinco subespecies: *O. v. texanus*, *O. v. couesi*, *O. v. sinaloae*, *O. v. mexicanus* y *O. v. yucatanensis* (Mandujano, 2004). Logan-López *et al.*, (2007) realizaron el primer estudio molecular sobre esta especie, en el cual se analizó la variabilidad genética de las subespecies *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. carminis* y *O. v. miquihuanensis*; usando como marcador molecular la región control (D-Loop) del

ADN mitocondrial. Posteriormente le siguieron Calderón (2009), Hernández (2010), López (2010) y Ambriz (2012).

Las secuencias de ADN son a menudo capaces de proporcionar información adicional necesaria para decidir sobre los límites entre especies y/o el estado de una población de una especie o subespecie (Meier, 2008).

2.3. Subespecies *miquihuanensis*, *couesi* y *mexicanus*

El *O. v. miquihuanensis* (Figura 2) se distribuye en una superficie aproximada de 174 000 km² según lo reportado por Halls (1984). Se le encuentra en zonas semi-desérticas en áreas de vegetación de matorral mediano espinoso, pastizal, matorral alto espinoso así como en los bosques de pino-encino de la Sierra Madre Oriental. Se distribuye en Aguascalientes, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Zacatecas, Guanajuato y Durango. Presenta una coloración café-rojiza y astas abiertas y finas (Galindo-Leal y Weber, 1998), es de tamaño mediano similar al *O. v. couesi* del sureste de Arizona pero con orejas más cortas y posee una cola de coloración negra en la parte superior (Logan-López, 2004).



Figura 2. Macho de venado cola blanca subespecie *O. v. miquihuanensis* en UMA La Huerta, en Salinas de Hidalgo, S.L.P.

El *O. v. couesi* es la subespecie con mayor distribución geográfica en México. Se encuentra a lo largo de la Sierra Madre Occidental en Sonora, Chihuahua, Durango, Sinaloa, Zacatecas, Nayarit, Colima, Aguascalientes y Norte de Jalisco (Villarreal, 1999). Se caracteriza por tener una coloración gris homogénea y no presenta cambios de coloración en la muda (Figura 3). Las astas se caracterizan por ser muy simétricas en su curvatura y desarrollo de puntas, con una canasta cerrada (Galindo-Leal y Weber, 1998).



Figura 3. Hembra de venado cola blanca subespecie *O. v. couesi* en UMA La Huerta, en Salinas de Hidalgo, S.L.P.

O. v. mexicanus (Figura 4), se distribuye principalmente en zonas montañosas del centro de México, en el Estado de México, Querétaro, Guanajuato, Hidalgo, Puebla, Distrito Federal, Tlaxcala, Morelos, este de Michoacán y Guerrero y al norte de Oaxaca (Halls, 1984).

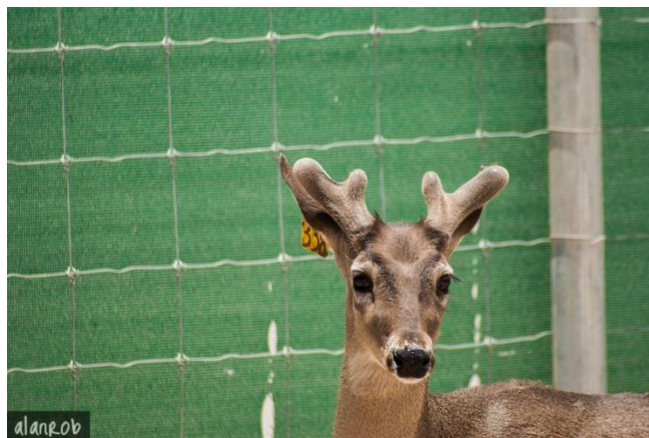


Figura 4. Macho de venado cola blanca subespecie *O. v. mexicanus* en UMA La Huerta, en Salinas de Hidalgo, S.L.P.

2.4. Importancia de los métodos genéticos

Los métodos genéticos no son la panacea de la investigación en las ciencias biológicas, la mayoría de las técnicas tienen fortalezas, debilidades y limitaciones. Sin embargo, cuando se utilizan de manera correcta, proporcionan información valiosa para inferir ante una diversidad escenarios (DeYoung y Honeycutt, 2005).

La biología molecular ofrece grandes ventajas mediante el uso de las técnicas de análisis de ADN, las cuales permiten determinar la diferenciación genética entre especies, subespecies, poblaciones e individuos sobre la base del estudio directo del gen (Álvarez-Ortí, 1999), esta información a la vez puede ser usada en combinación con información geográfica, demográfica y ecológica para la conservación de la biodiversidad (Anderson *et al.*, 2002).

Al igual que la radiotelemetría, los métodos genéticos en sus inicios fueron crudos, costosos y útiles en casos muy limitados, con el tiempo, el desarrollo de otras técnicas permitió que se volvieran más útiles, costeables y su uso se extendió conforme la tecnología las fue perfeccionando (DeYoung y Honeycutt, 2005). Estos métodos son claves debido a que son el único medio para proporcionar información biológica fiable, sobre todo en aquellos casos en que los enfoques tradicionales son insuficientes o incapaces de abordar las cuestiones claves o probar y verificar hipótesis. Sin embargo, la información genética será más valiosa si se combina con otros estudios (etología, demografía, hábitat), ya que permiten obtener un conocimiento más acertado acerca de la población o especie bajo estudio.

Más recientemente, los marcadores de ADN mitocondrial y ADN del cloroplasto han sido utilizados para estudiar la filogeografía, análisis geográfico de los linajes

filogenéticos que infieren acerca de refugios glaciales, expansiones y otras características importantes en la evolución de las especies (Mitton *et al.*, 2000).

Los estudios genético-moleculares son guías importantes para describir la diversidad biológica y para obtener conocimiento básico para la elaboración de políticas en el ámbito del manejo y conservación de las especies (Avice, 1994).

2.5. Subespecies

El estado taxonómico de varios *taxa* no ha sido resuelto aún. Esto es concretamente cierto para las plantas inferiores y animales invertebrados, pero también se aplica a los animales mayores como ciervos (*Cervus spp*), canguros (*Macropus spp*) y lobos (*Canis lupus*) (Frankham *et al.*, 2004).

La descripción taxonómica tradicional ha sido y sigue siendo la base para el manejo y elegibilidad de protección de especies, aunque los resultados de los análisis moleculares contradicen la integridad o distinción de especies o subespecies (O'Brien y Mayr, 1991).

Baker y Bradley (2006) definen una especie desde el punto de vista genético como un grupo genéticamente compatible de poblaciones entrecruzadas que están genéticamente aisladas de otros grupos.

Mayr (1963) define una subespecie como un conjunto de poblaciones en una subdivisión geográfica de la distribución de la especie que difiere taxonómicamente de otras poblaciones. Por otro lado, Frankham *et al.* (2004) puntualiza que las subespecies son grupos de poblaciones de una misma especie, que comparten una única distribución geográfica o del hábitat y se distinguen de otras subdivisiones de la especie por múltiples

rasgos independientes, de base genética. Como característica, cabe resaltar que los miembros de diferentes subespecies normalmente no exhiben un marcado aislamiento reproductivo pudiendo producir descendencia fértil, aunque puede presentarse la reducción en la fertilidad o supervivencia en el producto de esta cruce. Desde el punto de vista taxonómico, la categoría intraespecífica que representa a los linajes divergentes dentro de una especie es a menudo la subespecie (Mulcahy, 2008).

El concepto de subespecie es más subjetivo que el de especie. Estas pueden ser consideradas más parcialmente como poblaciones a través de un proceso evolutivo de divergencia hacia una especiación completa (Frankham *et al.*, 2004).

Anteriormente los criterios para la definición de subespecies en el venado cola blanca se basaron en las características morfológicas y la zona geográfica en la que se encuentran dentro de la distribución natural de la especie (Logan-López, 2004).

El reconocimiento actual de las especies, subespecies y la variabilidad a nivel de población dentro de los *taxa* refleja el nivel de refinamiento de nuestro conocimiento de la biología y sistemática de los diferentes grupos de organismos (Gippoliti y Amori, 2007).

Las subespecies representan un patrimonio biológico importante de la biodiversidad que posee un país, por lo que deberían de ser consideradas dentro de la temática del manejo y conservación de fauna silvestre como especies “endémicas” y no ser translocadas o introducidas a otras áreas donde serían consideradas como “exóticas” y perder el potencial genético original (Villarreal, 1999).

También es necesario en la designación del término subespecie reconocerla como una categoría taxonómica formal, siendo la filogenia la base de la clasificación

taxonómica y por lo tanto esta debe ser la que haga este designio y establecimiento (Awise y Ball, 1990).

La clasificación en subespecies en el venado cola blanca es algo confuso debido a la integración entre las subespecies, la inestabilidad de las características y el amplio trasplante de subespecies en rangos geográficos que pertenecen a otros (Méndez, 1984). La mayor diferencia entre las subespecies propuestas es el tamaño corporal y las proporciones relacionadas con el tamaño. Otras diferencias taxonómicas encontradas son, el tamaño de las glándulas metatarsales, son grandes en animales del norte pero pequeñas o ausentes en los del sur; los venados adaptados a las planicies pueden mejorar el desarrollo de las astas y alargar la cola, los venados en latitudes tropicales pueden presentar un pelaje de verano casi permanente mientras aquellos adaptados a altitudes mayores pueden tener un pelaje de invierno casi permanente, indudablemente una distinción genética (Demaris *et al.*, 2000).

2.6. ADN Mitocondrial (ADNmt)

Este ADN deriva del material hereditario bacteriano, como consecuencia de la incorporación de estos microorganismos en las células eucariotas precursoras, los cuales no son digeridos en este proceso (teoría endosimbiótica) (Buburuzan *et al*, 2007).

Esta molécula tiene la ventaja de presentar un alto número de copias (entre 1,000 y 10,000), ya que una mitocondria puede contener entre 2 y 10 moléculas de ADN y está conformado por 37 genes (13 ARN mensajeros, 2 ARN ribosomales y 22 ARN de transferencia) además de una región control o D-Loop que es la encargada de controlar la replicación y transcripción, cuenta además con una alta tasa de sustitución y

polimorfismo (Vázquez, 2007). Esta región se divide en tres partes: una región control conservada que es flanqueada por dos dominios periféricos altamente divergentes (5' o izquierdo y 3' o derecho). El dominio derecho contiene promotores de cadenas H- y L- de iniciación de transcripción. La transcripción del L-cadena se corta en bloques de secuencias conservadas (CSB-1 y CSB 2 + 3) que en los cérvidos se encuentran en las dos cadenas (-L y -H) y hacia el dominio izquierdo se encuentra la región RS2 de 75 pb de longitud. En el dominio derecho se encuentra la región RS3 y el origen de replicación del ADN mitocondrial (Purdue *et al.*, 2006).

El ADNmt ha sido, con mucho, el marcador más popular de la diversidad molecular en animales en las últimas tres décadas. Esto debido a que experimentalmente es relativamente fácil de amplificar porque está presente en múltiples copias en la célula, a diferencia del nuclear. Los genes mitocondriales son fuertemente conservados a través de generaciones, con muy pocas repeticiones, no existen intrones y regiones intergénicas muy cortas (Galtier *et al.*, 2009).

Es altamente variable en poblaciones naturales debido a su elevada tasa de mutación, lo cual puede generar alguna señal acerca de la historia poblacional a través de plazos de tiempo cortos (Frankham *et al.*, 2004).

El ADNmt tiene varias propiedades biológicas que lo hacen apropiado como marcador para el estudio de la biodiversidad molecular. Primero, es de herencia clonal (maternal) lo que se traduce en que todo el genoma se comporta como un solo locus (Moritz *et al.*, 1987); no es recombinante, todos los sitios comparten una genealogía común.

Por otro lado, se supone que el ADNmt evoluciona de una forma casi neutra. Está involucrado en algunas funciones metabólicas básicas (respiración), los genes mitocondriales codificados han sido considerados menos propensos que otros genes que intervienen en los procesos adaptativos. Por último, la tasa evolutiva del ADNmt ha sido con frecuencia supuesta como reloj, en ausencia de cualquier mutación propagada a través de la selección positiva, solo las mutaciones neutrales (y ligeramente deletéreas) se acumulan en el tiempo, de tal modo que los niveles de divergencia del ADNmt deben de indicar aproximadamente los tiempos de tal divergencia (Galtier *et al.*, 2009).

En relación con el genoma mitocondrial restante, la región control D-loop es hipervariable, ya que muta hasta cinco veces más rápido (Wu *et al.*, 2005). Por ello, esta región es frecuentemente usada para delimitar poblaciones que se han separado recientemente, como en el caso de las subespecies. Las subespecies no tienden a diferir de manera significativa en el gen Cyt b, por lo que este marcador no se suele utilizar en las descripciones de las subespecies. La región control D-loop ha sido secuenciada para identificar la identidad de las subespecies y por lo tanto identificar los productos ilegalmente obtenidos de los animales en vida libre (McGraw *et al.*, 2012).

En la familia *Cervidae* la región control tiene en promedio 1099 pares de bases de longitud y se subdivide en tres regiones, una región central conservada (RCC) y dos dominios periféricos divergentes flanqueando la RCC en los extremos 5' y 3'. La secuencia de la región control completa ha sido usada para determinar la relación entre miembros de la familia *Cervidae* y una población de bisonte americano (*Bison bison*); así como la región variable 5' también ha sido empleada para examinar variación en la

secuencia de nucleótidos en muchas especies de grandes mamíferos incluyendo borrego, bovino, venado, oso y alce (Demaris *et al.*, 2000).

Logan-López *et al.*, (2007) utilizaron la técnica BESS-T, la cual permite observar mutaciones en la base timina; en otro estudio, Calderón (2009) analizó la misma región de la secuencia D-Loop utilizando la técnica de secuenciación del ADN mitocondrial. En una comparación de estas dos técnicas Charrel *et al.* (1999) observaron que la diferencia de resultados al calcular la distancia genética fue menor en un 10.2% con la técnica BESS-T, esto se corrobora con los resultados obtenidos por Logan-López *et al.* (2007) quienes caracterizan 24 haplotipos en cuatro subespecies, mientras que Calderón (2009) identifica 58 haplotipos en cinco subespecies.

En los estudios citados se observó que la región conservada CSB-B de la D-Loop, no presentó ningún polimorfismo entre subespecies. CSB-1, CSB 2+3 y RS3 fueron los sitios polimórficos entre subespecies, los cuales fueron informativos con 21 transiciones y 20 transversiones. La región RS3 es una inserción nucleotídica de 47pb que ha permitido diferenciar genéticamente a los cérvidos del nuevo mundo con los del viejo (Douzery y Randi, 1997). Logan-López *et al.* (2007) y Calderón (2009) consideraron el dominio periférico derecho donde se encuentra la inserción RS3, debido a que en ninguna de las subespecies del estudio se presentó duplicado de este VNTR (número variable de repeticiones en tándem), como ocurre en la región RS2 donde Douzery y Randi (1997) encontraron hasta cuatro repeticiones. Además se observó que la región RS3 y CSB-1 fueron las regiones más variables entre las subespecies en análisis. Las

altas tasas de sustitución observada en los dominios periféricos de la región D-Loop se ha usado en estudios evolutivos (Vázquez, 2007).

2.7. Filogeografía

Avise (2000) define la filogeografía como “un campo de estudio relativo a los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, especialmente aquellos dentro y entre especies estrechamente relacionadas”.

Esta disciplina relaciona las genealogías de genes y la distribución de los linajes con la geografía en tiempo y espacio determinados. Este enfoque se utiliza para abordar patrones geográficos actuales de la variación genética teniendo en cuenta acontecimientos históricos, biogeográficos y demográficos, estos estudios proporcionan una perspectiva temporal de los cambios ecológicos recientes como explicación de la distribución actual de los organismos (Avise, 2000).

El uso del ADNmt para el estudio de patrones de variación geográfica dentro de una especie es referido como un estudio de filogeografía intraespecífica. Un patrón filogeográfico de variación de ADNmt refleja la relación entre haplotipos de ADNmt (árbol gen o filogenia) obtenido dentro y entre poblaciones muestreadas o bien un subconjunto o la totalidad de las especies (Demaris *et al.*, 2000).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en la región Centro-Norte de México (Figura 5), de acuerdo a la distribución histórica de las subespecies *coues*, *mexicana* y *miquihuana* de venado cola blanca reportada por Halls (1984). En esta región se obtuvieron muestras de tejido de venado cola blanca muertos vía cacería deportiva en UMA's (Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre) en Aguascalientes y Zacatecas para la subespecie *O. v. couesi*; Zacatecas y San Luis Potosí para la subespecie *O. v. miquihuanensis*; y Puebla, Querétaro y Morelos para la subespecie *O. v. mexicanus*.

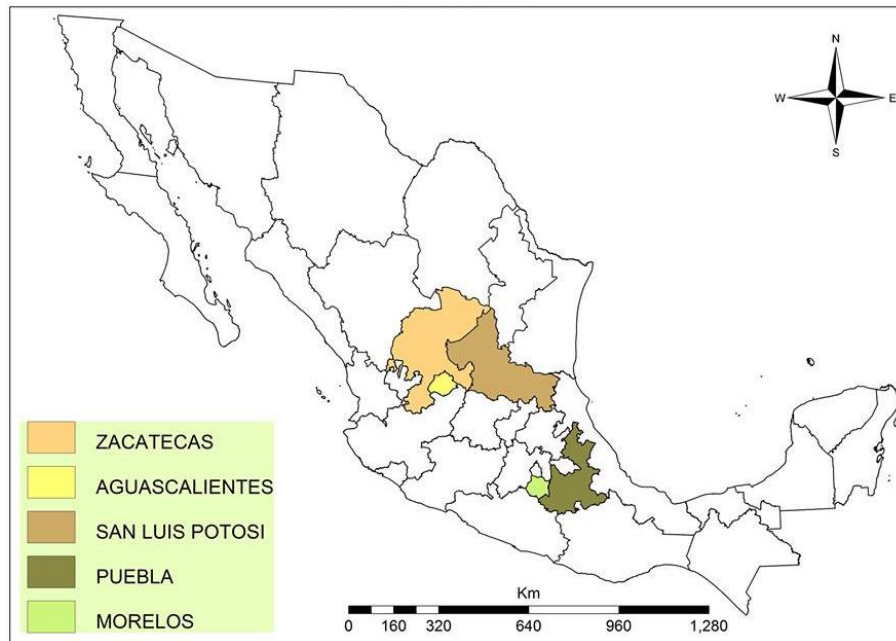


Figura 5. Región de estudio en el Centro-Norte de México.

3.2. Recolecta de material biológico

Las muestras de tejido de venado cola blanca se obtuvieron de animales muertos a través de la cacería deportiva y con el apoyo de responsables técnicos de UMAs y taxidermistas. Dichas muestras consistieron en 1 cm² de tejido muscular, cartílago auricular u órgano, se conservaron en tubos eppendorf con alcohol al 95% y se almacenaron en el laboratorio a temperatura ambiente hasta su análisis.

Se recolectaron muestras de las subespecies: *O. v. couesi*, *O. v. miquihuanensi* y *O. v. mexicana*.

3.3. Extracción de ADN

El ADN se extrajo de las muestras de tejido (músculo, cartílago auricular u órganos) usando dos kits comerciales: uno marca Bio Basic y el otro DNeasy Blood & Tissue Kit de la marca QIAGEN.

Extracción de ADN a través del Kit Bio Basic

El procedimiento para el kit Bio Basic fue el siguiente: Se cortaron 30 mg de tejido y se colocaron en un tubo de 1.5 ml. Añadiendo 300 µl de Solución ACL al tubo de 1.5 ml y 20 µl de Proteinasa K, después se incubó a 55° C hasta que el tejido estaba completamente lisado. Se enfrió a temperatura ambiente, aplicando agitación con vortex por 20 segundos y se centrifugó a 10000 x g (12000 rpm) por 5 minutos. Se pipetearon 300 µl del sobrenadante en un tubo de columna (EZ-10 Spin Column) y se añadieron 300 µl de Solución AB. Mezclando ocasionalmente por inversión del tubo y manteniéndolo por 2 minutos. Se centrifugó a 2000 x g (4000 rpm) por 2 minutos y se descartó el líquido que pasó a través de la membrana. Añadiendo 500 µl de Solución de lavado y

centrifugando a 8000 x g (10000 rpm) por 2 minutos. Se repitió este paso y se descarta el líquido que pasó a través de la membrana. Se volvió a centrifugar a 8000 x g (10000 rpm) por un minuto adicional para remover residuos de la Solución de lavado. Después se colocó la columna en un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml y se agregaron de 30 a 50 µl de Buffer de Elución (Elution Buffer) en el centro de la membrana de la columna. Se incubó el tubo de 37 a 50° C por 2 minutos. Por último, se centrifugó a 8000 x g (10000 rpm) por 1 minuto para eluir el ADN de la columna.

Extracción de ADN a través del Kit DNeasy Blood & Tissue Kit de la marca QIAGEN

La extracción de ADN por medio del estuche comercial DNeasy Blood & Tissue Kit de la marca QIAGEN (Cat. No. 69506) se realizó mediante los pasos que a continuación se anotan. Se pesaron 25 mg de tejido, se cortaron en pequeños pedazos y fueron recolectados en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se adicionaron 180 µl de buffer ATL. También se agregaron 20 µl de proteinasa K agitando en vortex y se incubó a 56° C hasta que el tejido estuvo lisado. Se agitó en vortex por 15 segundos, adicionando 200 µl de buffer AL a la muestra agitando de nuevo en vortex. Después se añadieron 200 µl de etanol (96-100%) y mezclando de nuevo en vortex. Se pipeteó la mezcla en un tubo nuevo y se centrifugó a 8000 rpm. Posteriormente se colocó en un tubo nuevo y se añadieron 500 µl de buffer AW1 y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm. Se colocó la columna en un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de buffer AW2 para centrifugarse por 3 minutos a 14000 rpm para secar la membrana. Finalmente en un tubo nuevo de 1.5 ml se pipetearon 200 µl de buffer AE directamente sobre la membrana para pasar de incubación a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm para diluir el producto.

3.4. Análisis de ADN mitocondrial

Para la amplificación del fragmento de ADN se usó el protocolo descrito por Logan-López *et al.* (2007) y Calderón (2009) que se refiere a la amplificación de la región D-Loop por medio de PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa), el cual consiste en mezclar para su reacción en 25 µl de volumen total, usando 14.3 µl de agua ultrapura, 5 µl de buffer (1X), 2 µl de MgCl (2.0 mM), 0.5 µl de dNTPs (0.2 mM), 0.5 µl de cada iniciador (DLF 5' ATCGCCCACTCTTTCCTCTT'3 y DLR 3' TCAGTGCCTTGCTTTATTGT5'), 0.2 µl de Taq polimerasa (1U) y se agrega 2.5 µl de ADN (125 ng). La reacción PCR se realizó usando el siguiente programa: un paso de activación de la polimerasa de 95° C por 3 minutos. Desnaturalización 95° C por 30 seg. Alineamiento 55°C por 30 seg. Polimerización 72° C por 30 seg. Se observó la amplificación en un gel de agarosa al 1.5% que se corrió en una cámara de electroforesis a 100 volts por 40 min. Como resultado se obtuvo un fragmento de 550 pb.

Los productos de PCR fueron enviados a la empresa MacroGen (Corea) para la secuenciación de los fragmentos de la región control de ADNmt obtenidos de las muestras de tejido de venado cola blanca.

3.5. Análisis estadístico

La relación filogenética se determinó por medio del método de distancia genética Neighbor-Joining y el de Máxima Parsimonia (Castillo, 2007). La diversidad haplotípica (h, probabilidad de encontrar dos haplotipos diferentes en la muestra) se estimó dentro de cada una de las poblaciones por medio del Índice de Diversidad Haplotípica y la

Diversidad Nucleotídica (número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar) (Höglund, 2009).

3.5.1. Diversidad molecular intra-poblacional

Para determinar la estructura filogeográfica se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando los haplotipos en dos niveles: entre las subespecies y dentro de las subespecies (Excoffier et al., 1992).

Para describir la diversidad dentro de cada población, se estimó el índice de diversidad haplotípica (h). Este tipo de diversidad se expresa en términos de P_i con la siguiente fórmula:

$$P_i = \frac{X_i}{n}$$

Donde X_i es el número de copias que contiene un gen en una muestra, n es el número de muestras y P_i es la frecuencia haplotípica. Con este índice se calcula la frecuencia de las variantes haplotípica en una población (Schneider *et al.*, 2000). Este análisis se realizó usando el programa Arlequín versión 3.5.1.3 (Excoffier, 2005).

También se calculó la diversidad nucleotídica esta diversidad se expresa en términos de π con la siguiente fórmula:

$$\hat{\pi} = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j \hat{d}_{ij}$$

Donde π es un estimador del número de mutaciones ocurridas, desde la divergencia haplotípica i y j , k es el número de haplotipos, P_i es la frecuencia del haplotipo i , n es el tamaño de muestra. Este análisis se realizó usando el programa Arlequín versión 3.5.1.3 (Excoffier, 2005).

IV. RESULTADOS

4.1. Colecta de material biológico

Se colectaron 67 muestras de músculo, órganos y cartílago auricular de tres subespecies de venado cola blanca; *O. v. miquihuanensis* (n=4), *O. v. mexicanus* (n=43), y *O. v. couesi* (n=20).

4.2. Análisis de las secuencias del fragmento de ADN mitocondrial

Se obtuvieron 67 secuencias del fragmento de la región control del ADNmt, de estas de la subespecie *O. v. mexicanus* (n=43), *O. v. couesi* (n=20) y *O. v. miquihuanensis* (n=4). La longitud de las secuencias -después del alineamiento y edición en el programa MEGA 5.2 por medio del método ClustalW- fue de 489 pb, de las cuales en promedio 155 correspondieron a sitios polimórficos.

Cuadro 1. Composición nucleotídica de tres subespecie de venado cola blanca del Centro-Norte de México. C = citosina, T = timina, A = adenina y G = guanina

Subespecie	C (%)	T (%)	A (%)	G (%)	Total
<i>O. v. miquihuanensis</i>	17.59	27.96	31.84	22.61	462
<i>O. v. couesi</i>	18.92	28.35	31.33	21.4	471
<i>O. v. mexicanus</i>	18.55	27.4	30.52	23.53	472

La composición nucleotídica se analizó con el software Arlequin ver 3.5.1.2 y se observaron un promedio de 88 transiciones, 103 transversiones y 176 sitios parsimoniosamente informativos. Las secuencias de las subespecies estudiadas están compuestas en su mayoría por timinas y en menor porcentaje de citosinas (**Cuadro 1**).

4.3. Diversidad genética

Se determinó un total de 51 haplotipos para las 67 secuencias analizadas. No se identificaron haplotipos compartidos entre subespecies. *O. v. couesi* solo compartió un haplotipo entre la misma subespecie mientras que *O. v. mexicanus* presentó 7 y *O. v. miquihuanensis* ninguno (**Cuadro 2**). Los valores estimados de *h* fueron cercanos a 1. Los valores de π parten desde 0.01926 a 0.12371, el valor más bajo lo obtuvo *O. v. miquihuanensis* con un valor *h* de 1 (**Cuadro 3**).

Cuadro 2. Diversidad de haplotipos dentro y entre 3 subespecies del Centro-Norte de México.

Subespecie	<i>O. v. miquihuanensis</i>	<i>O. v. couesi</i>	<i>O. v. mexicanus</i>
Secuencias analizadas	4	20	43
Haplotipos identificados	4	19	28
Haplotipos compartidos entre subespecies	0	0	0
Haplotipos compartidos dentro de subespecies	0	1	7

Cuadro 3. Estimación de los valores de diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) de 3 subespecies del centro-norte de México.

Subespecies	N	Haplotipos	h	π
<i>O. v. miquihuanensis</i>	4	4	1	0.01926
<i>O. v. couesi</i>	20	19	0.99474	0.12371
<i>O. v. mexicanus</i>	43	28	0.96678	0.04117
Total	67	51	0.98598	0.08276

4.4. Estructura de las poblaciones

Los análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizados con el paquete Arlequin versión 3.5.1.3 indican que existe un 32.16% de variación genética entre subespecies y 67.84% de variación dentro de las subespecies. El valor de F_{ST} es significativo (0.3216, $P < 0.05$) lo que indica diferenciación genética entre las subespecies (**Cuadro 4**).

Cuadro 4 Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Porcentaje de variación
Entre subespecies	2	332.446	32.16
Dentro de subespecies	64	1199.479	67.84
Total	66	1531.925	100

Al parear los valores de F_{ST} (**Cuadro 5**) indicó que las subespecies más cercanas entre sí son *O. v. couesi* y *O. v. miquihuanensis* (0.003) y las más distantes son *O. v. miquihuenensis* y *O. v. mexicanus* (0.020). La diferencia de la relación entre *O. v. couesi* y *O. v. mexicanus* (0.01972) es cercana a la anterior. Lo anterior se comprueba con los valores de flujo génico obtenidos por medio del paquete estadístico Arlequin ver 3.5.1.2 (**Cuadro 6**), los cuales indican un mayor intercambio de genes entre las subespecies *O. v. couesi* y *O. v. miquihuenensis* (156.42) en comparación con las dos anteriores y *O. v. mexicanus* (24.85 y 23.67 respectivamente). Los valores son estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Valores de F_{ST} pareados de las frecuencias haplotípicas.

Subespecies	<i>O. v. couesi</i>	<i>O. v. miquihuanensis</i>	<i>O. v. mexicanus</i>
<i>O. v. couesi</i>	*		
<i>O. v. miquihuanensis</i>	0.00319	*	
<i>O. v. mexicanus</i>	0.01972	0.02068	*

Cuadro 6. Valores de flujo genético entre 3 subespecies de *Odocoileus virginianus*.

Subespecies	<i>O. v. couesi</i>	<i>O. v. miquihuanensis</i>	<i>O. v. mexicanus</i>
<i>O. v. couesi</i>	*		
<i>O. v. miquihuanensis</i>	156.4285	*	
<i>O. v. mexicanus</i>	24.8558	23.6784	*

4.5. Análisis filogenéticos

Como se muestra en las figuras 6 y 7, se realizaron los análisis filogenéticos por dos métodos (Neigbor-Joining y Máxima Parsimonia) aplicándolos a las 67 secuencias obtenidas de 489 nucleótidos. Los valores en los nodos corresponden al porcentaje de representación por *bootstrapping* de 1000 repeticiones. Se tomaron como grupos externos a las especies de venado bura (*Odocoileus hemionus crooki*), venado gamo (*Dama dama*) y una subespecie de venado cola blanca de Venezuela (*O. v. gymnotis*), las secuencias para estas fueron obtenidas del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Los resultados obtenidos por ambos métodos concuerdan entre sí, se muestra la formación de un clado monofilético de la subespecie *O. v. mexicanus* y otro clado diferente conformado por los individuos de *O. v. couesi* y *O. v. miquihuanensis*.

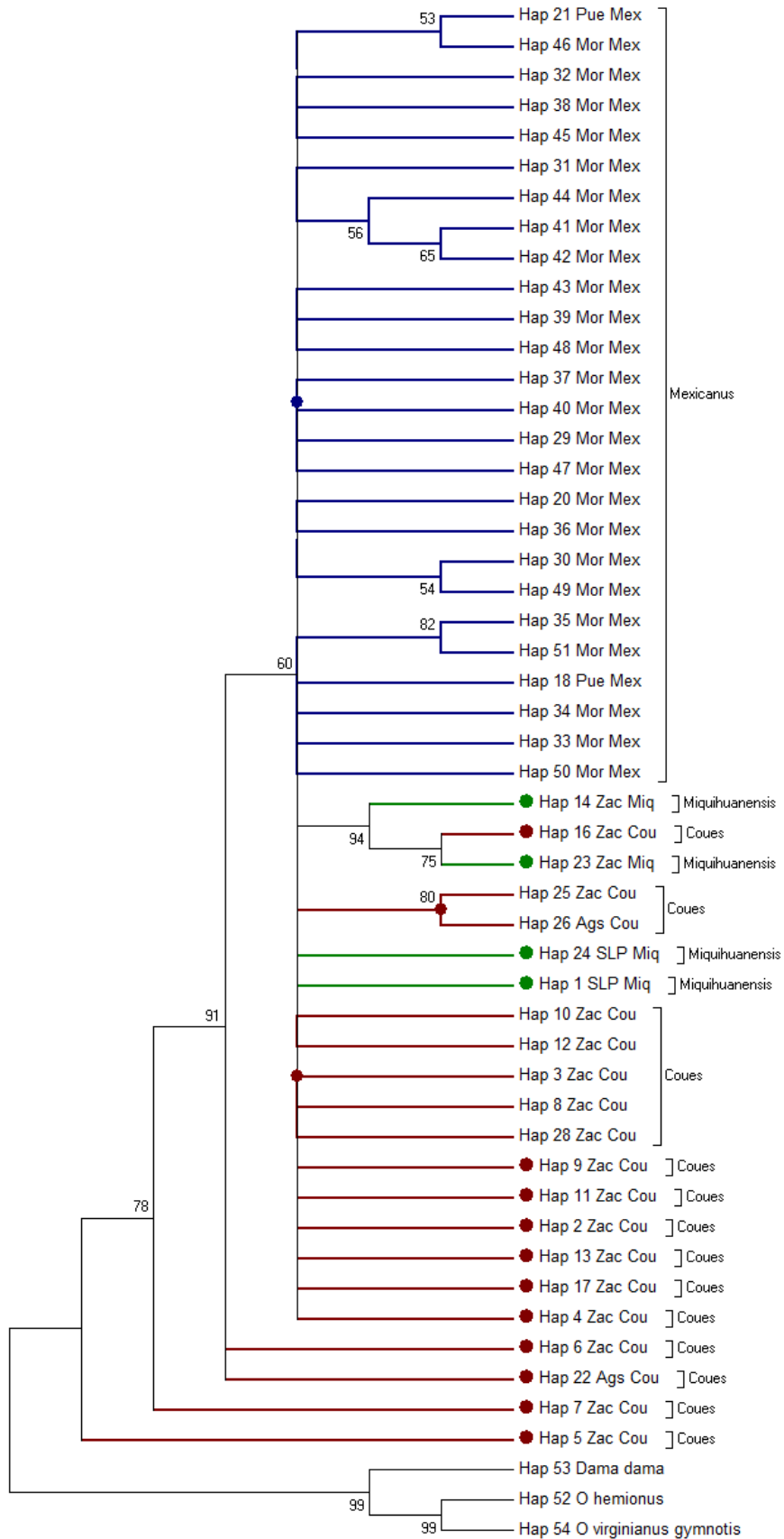


Figura 6. Análisis filogenético obtenido por el método de Neighbor-Joining con los 51 haplotipos identificados. Los números en las ramas representan los porcentajes de 1000 réplicas de *bootstrap*, solo se muestran los valores >50%.

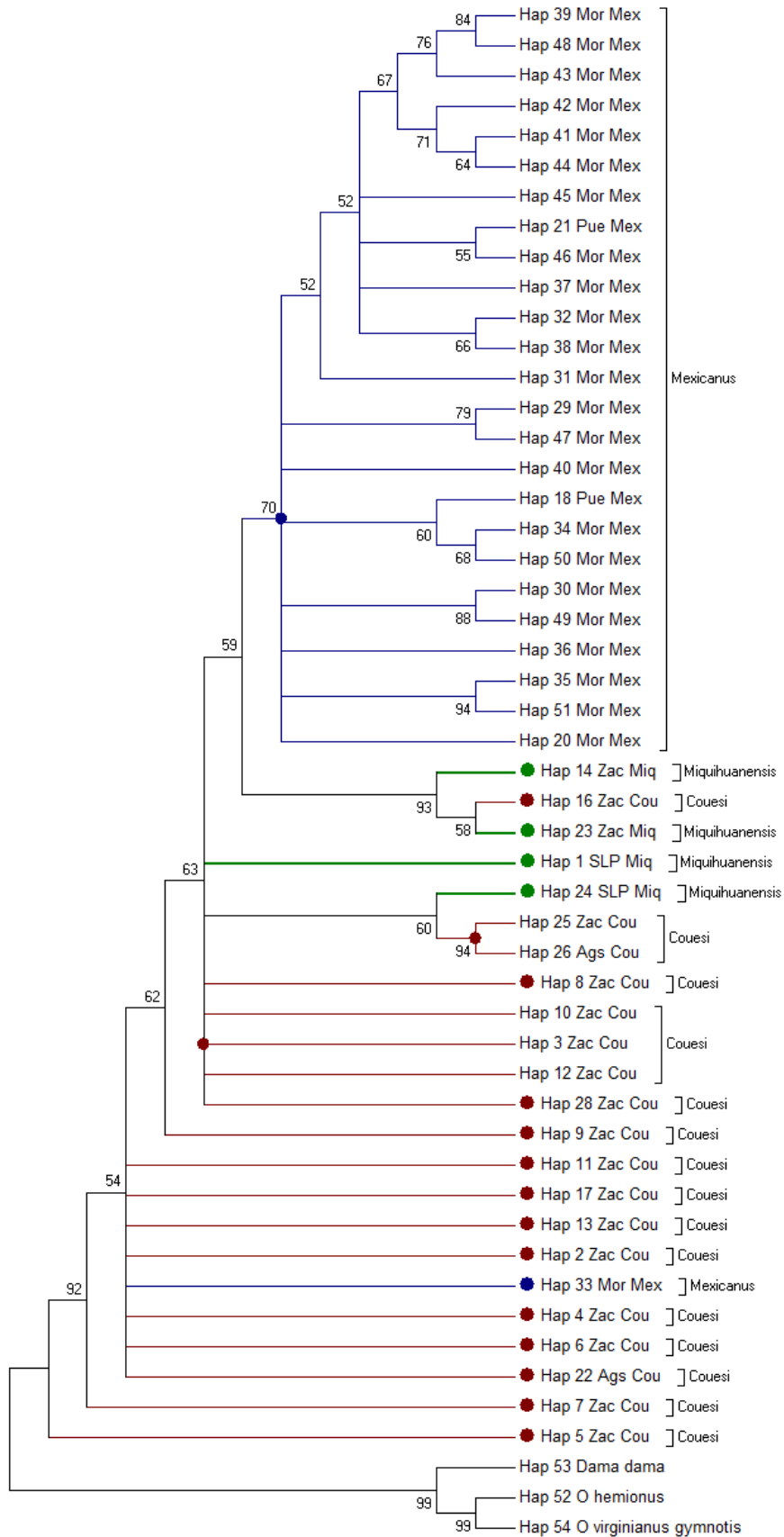


Figura 7. Análisis filogenético obtenido por el método de Máxima Parsimonia. L = 952, IC = 0.6018, IR = 0.7163 para todos los sitios y sitios parsimoniosamente informativos. Los números en las ramas representan los porcentajes de 1000 réplicas de *bootstrap*, solo se muestran valores >50%.

V. DISCUSIÓN

5.1. Obtención de material biológico

La colecta del material fue heterogénea en la forma y número de muestras obtenidas debido a las limitantes logísticas y forma de manejo de la especie en México. En el presente trabajo se realizó la extracción de ADN de animales producto del aprovechamiento (cacería) a partir del tejido muscular, terciopelo de las astas y de órganos internos (corazón, hígado, bazo); y del tejido de cartílago de la oreja de animales vivos.

Para la extracción de ADN a partir de tejido de músculo, órganos internos u oreja se modificó el protocolo indicado por las marcas comerciales. Con estas medidas se obtuvo mayor cantidad y calidad del ADN genómico.

El número de muestras obtenido fue variable debido a la forma de manejo de cada una de las subespecies y la entidad federativa de procedencia. Las muestras obtenidas de Puebla, Morelos y Zacatecas fueron producto de la cacería y las de Aguascalientes y San Luis Potosí de UMAs de semi-cautiverio o cautiverio.

En este estudio se obtuvieron 67 muestras; al respecto Hale *et al.* (2012) concluyen que el muestreo de 25 a 30 individuos es el número idóneo en estudios genéticos debido a que con un número mayor de muestras disminuye la variabilidad en la frecuencia y diversidad alélica. Por esta razón se tomó como 30 el número de muestras por subespecie en este estudio. Moscarella *et al.* (2003) emplean 26 muestras de 3 subespecies diferentes para Venezuela, teniendo como mínimo 4 muestras y máximo 16, lo que dio como resultado la diferenciación genética de estas. Esta reducción en el tamaño de la muestra es un problema común en especies silvestres y aún más en

mamíferos de gran tamaño como el venado cola blanca. En el presente se tuvo la menor cantidad de muestras de *O. v. miquihuanensis* con 4 individuos de los estados de Zacatecas y San Luis Potosí y 43 muestras como máximo de la subespecie *O. v. mexicanus* de Puebla y Morelos.

5.2. Diversidad Genética

El primer estudio molecular de *O. virginianus* en México se realizó usando la técnica de BESS-T (Base Escision Sequence Scanning) en base a la escisión de timina en la secuencia analizada, la cual dio como resultado la identificación de 24 haplotipos en cuatro subespecies (Logan-López, 2004). Por otro lado Calderón (2009) y Ambriz (2012) identificaron 58 y 57 haplotipos, analizando cinco y tres subespecies diferentes respectivamente para ello emplearon la técnica de secuenciación. En el presente estudio se reportan 51 haplotipos de tres subespecies mediante el uso de la misma técnica.

En este estudio no se detectaron haplotipos compartidos entre las subespecies objeto de estudio, a diferencia de Logan-López *et al.* (2007) quienes identificaron haplotipos compartidos entre *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis* y *O. v. miquihuanensis* pero no con *O. v. carminis*. Posteriormente Calderón (2009) y Ambriz (2012) obtuvieron resultados similares al presente, encontrando este patrón de no compartir haplotipos entre las subespecies pero si entre las poblaciones de cada subespecie.

Los resultados de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) de las secuencias de la región control en las tres subespecies de venado cola blanca del centro-norte de México sugieren moderados niveles de variación genética. Por una parte fueron

observados altos valores de h , los cuales se traducen en casi un 99% de diversidad. *O. v. miquihuanensis* presenta una alta h de 1 pero una baja π de 0.01926, resultados similares fueron reportados para *O. v. margaritae* (Moscarella *et al.*, 2003) donde $h = 1$ y $\pi = 0.016$. Estos valores son indicativos de que las poblaciones pueden estar en un proceso de cuello de botella como lo señalan Wiehler y Tiedemann (1998) para el corzo europeo (*Capreolus capreolus*) al analizar la región control del ADNmt. Valores similares de h y π fueron también reportados en otras subespecies de venado cola blanca; por ejemplo Moscarella *et al.* (2003) los estiman en Venezuela para *O. v. goudotti*, *O. v. margaritae* y *O. v. gymnotis* ($h = 0.988$ y $\pi = 0.026$) y Ambriz (2011) en México para *O. v. mexicanus*, *O. v. sinaloe* y *O. v. acapulcensis* ($h = 0.984$ y $\pi = 0.09735$). En otras especies de mamíferos se han reportado valores similares en la región control; por ejemplo en el rebeco (*Rupicapra rupicapra*) se estimó $h = 0.9799$ y $\pi = 0.0845$ (Rodríguez *et al.*, 2010), en panda rojo (*Ailurus fulgens*) $h = 0.95$ y $\pi = 0.0961$ (Li *et al.*, 2005), en la gacela tibetana (*Procapra picticaudata*) $h = 0.98$ y $\pi = 0.08$ (Zhang y Jiang, 2006) y gacela de Mongolia (*Procapra gutturosa*) $h = 0.998$ y $\pi = 0.050$ (Okada *et al.*, 2012). Por otra parte se han obtenido valores superiores de π comparados con otros cérvidos pero valores similares de h ; tal es el caso del venado sika (*Cervus nippon*) $h = 0.98$ y $\pi = 0.014-0.022$ (Nagata *et al.*, 1999); el del venado de las Pampas (*Ozotoceros bezoarticus*) $h = 0.99$ y $\pi = 0.011-0.025$ (González *et al.*, 1998) y el del corzo (*Capreolus capreolus*) $h = 0.97$ y $\pi = 0.0097$ (Wiehler y Tiedemann, 1998).

Los niveles altos tanto de los índices h y π obtenidos en el presente trabajo indican que las tres subespecies de venado cola blanca han persistido de manera estable sin cambios genéticos significativos a través del tiempo y el área de distribución. Cabe

resaltar que la subespecie *O. v. miquihuanensis* tuvo una diversidad nucleotídica de 1.9% lo que indica que puede haber presentado un reciente proceso de cuello de botella, alternativamente también podría ser debido al reducido número de muestras que se obtuvo.

5.3. Estructura poblacional

En cuanto al análisis de estructura poblacional, los resultados obtenidos sugieren que las tres subespecies del venado cola blanca en el centro-norte de México se encuentran diferenciadas de manera significativa. Con base al valor obtenido de F_{ST} ($F_{ST} = 0.32163$ $P < 0.05$) se considera que existe una alta diferenciación, valor más alto a los obtenidos por Ambriz (2012) en tres subespecies del Pacífico y centro de México ($F_{ST} = 0.22607$), Calderón (2009) en cinco subespecies ($F_{ST} = 0.1894$) y Moscarella *et al.*, (2003) para tres subespecies en Venezuela ($F_{ST} = 0.26678$) en la misma región control del ADNmt.

Por otro lado, en los análisis pareados de F_{ST} demuestran la diferenciación genética entre las subespecies, las más cercanas entre sí son *O. v. miquihuanensis* y *O. v. couesi* (0.00319) con un alto flujo génico (156.42), pero también sugieren la existencia de migración entre éstas dos y *O. v. mexicanus* sin descartar los movimientos influidos por acción humana como lo reportado por Moscarella *et al.*, (2003). Los resultados obtenidos por medio de AMOVA indican una diversidad genética entre subespecies de 32.16% y 67.84 dentro de las poblaciones; en subespecies venezolanas se obtuvo 26.68 y 73.32% (Moscarella *et al.*, 2003) y en Michoacán, México se reportan 22.61 y 77.39% respectivamente (Ambriz, 2012).

5.4. Análisis filogenético

Por medio de los análisis realizados por los métodos de Máxima Parsimonia y Neighbor Joining dieron como resultado la formación de dos clados principales: en ellos se observa la cercanía –sin una clara diferenciación- entre las subespecies *O. v. miquihuanensis* y *O. v. couesi* y la separación de *O. v. mexicanus*, el cual forma un clado aparte.

La agrupación obtenida en este estudio, de las subespecies *O. v. couesi* y *O. v. miquihuanensis* podría deberse a la similitud de sus hábitats y a la carencia de barreras geográficas entre sus áreas de distribución (Zacatecas, Aguascalientes el primero y San Luis Potosí el segundo) y en contraste la distancia que hay entre estos y *O. v. mexicanus* (Morelos y Puebla).

Por su parte la subespecie *O. v. mexicanus* presenta las características que Moritz (1994) reconoce a una población con divergencia significativa de la frecuencia de los haplotipos, independientemente del carácter distintivo filogenético de los haplotipos, por lo tanto esta subespecie puede considerarse como una Unidad de Manejo, dentro de la clasificación de Unidades de Conservación Genética propuestas por el mismo autor.

Los grupos externos se usaron para la inferencia genealógica y se confirma lo encontrado por Moscarella *et al* (2003), quienes usaron haplotipos norteamericanos de venado cola blanca y bura. Así hay una mayor similitud entre los haplotipos del *O. virginianus* norteamericano y *O. hemionus* que con los haplotipos del cola blanca de

procedencia sudamericana. Lo anterior se suma a las pruebas encontradas previamente y que sugieren que el venado cola blanca de Venezuela sea considerado un linaje independiente, es decir, una especie distinta a las subespecies de *O. virginianus* de Norte América (Molinari, 2007). Hassanin et al., (2012) realizan un análisis con el genoma mitocondrial de varios géneros de artiodáctilos y concluyen que el venado cola blanca de América del Sur necesita grandes revisiones taxonómicas a nivel de género y especie.

La genealogía intraespecífica de este cérvido conjuntamente con los resultados de distancias genéticas en la región bajo estudio, se corresponden con el patrón esperado de una población subdividida recientemente y que refleja un polimorfismo ancestral (Avice, 2000).

5.5. Implicaciones para la conservación y manejo de la especie

Los gestores e involucrados en el uso y aprovechamiento de la especie deben tener conocimiento de las diferencias entre las subespecies y que éstas están adaptadas a un hábitat en particular por medio de procesos evolutivos específicos dando como resultado características fenotípicas particulares, las cuales pueden ser “mejoradas” hasta el punto que la genética misma lo permita.

Se debe fomentar y dar a conocer particularmente en el ámbito cinegético y cría intensiva, las características fenotípicas de cada subespecie de venado cola blanca para remarcar la importancia de cada una *per se* y evitar la introducción de subespecies “exóticas” con fines de “mejora”, ya que a largo plazo la falta de adaptación a cambios en el ambiente y la pérdida del pool genético original.

Es necesario un tamaño de muestra mayor para la subespecie *miquihuanensis* y el uso de otros marcadores moleculares para mayor resolución de los análisis genéticos y mayor representación geográfica de la subespecie.

VI. CONCLUSIONES

1. El uso de un fragmento de la Región Control del ADNmt permitió determinar y describir la variabilidad genética de las subespecies Miquihuana, Coues y Mexicana en la región del Centro-Norte de México.

2. Los métodos filogenéticos de los haplotipos demostró que las subespecies no se agrupan según la clasificación actual basada en la morfometría reportada por Halls (1984).

3. Se encontró una alta diferenciación genética entre las tres subespecies, concluyendo que existe una estructura filogeográfica y alta diferenciación genética entre ellas.

4. *O. v. miquihuanensis* y *O. v. couesi* presentan una relación filogeográfica, esto debido a un gradiente genético entre subespecies nortañas vecinas pero que no se puede observar en este estudio por falta de representación de éstas.

5. *O. v. mexicanus* de Puebla y Morelos debe ser considerada como una Unidad de Manejo Genético.

6. El presente trabajo establece las bases para el diseño de mejores estrategias de conservación y manejo del venado cola blanca en la región bajo estudio así como el impacto en políticas públicas para evitar la pérdida del acervo genético original con la introducción de subespecies exóticas.

VII. LITERATURA CITADA

- Álvarez-Ortí, M., J. Escribano, J. Garde, A. García, N. Ortiz, L. Gallego, y J.A. Fernández. 1999. Evaluación de la variabilidad genética en poblaciones cinegéticas de ciervo ibérico, *Cervus elaphus hispanicus*, mediante métodos moleculares. *Galemys*. 11(1): 27-39.
- Ambriz, P. 2012. Evolución de polimorfismo mitocondrial en subespecies de venado cola blanca *Odocoileus virginianus* del estado de Michoacán México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. Morelia, Michoacán. 73 pp.
- Anderson, J.D., R.L. Honeycutt, R.A. Gonzáles, K.L. Gee, L.C. Skow, R.L. Gallagher, D.A. Honeycutt y R.W. DeYoung. 2002. Development of microsatellite DNA markers for the automated genetic characterization of white-tailed deer populations. *Journal of Wildlife Management*. 66: 67-74.
- Aranda, J.M.S. 2012. Manual para el rastreo de mamíferos silvestres de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio). México, D.F., México. 255 pp.
- Arita, T.H. y G. Ceballos. 1997. Los mamíferos de México: Distribución y estado de conservación. *Revista Mexicana de Mastozoología*. 2: 33-71.
- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall. New York, N.Y. 9: 361-399.
- Avise, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.

- Avise, J.C. y R.M. Ball. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxf Surv Evol Biol.* 7: 45–67.
- Baker, R. H. 1984. Origin, classification, and distribution. Pages 1-19 in L. K. Halls (ed.). *White-tailed deer: ecology and management.* Stackpole Books, Harrisburg, Pennsylvania.
- Baker, R.J. y R.D. Bradley. Speciation in mammals and the genetic species concept. *J. Mammal.* 2006;87:643–662.
- Buburuzan, L., Goran, L.D. y I. Ibara. 2007. Types of DNA used in speciation and phylogeny studies. *Analele Stiintifice ale Universitatii "Alexandru Ioan Cuza" din Iasi Sec. II a. Genetica si Biologie Moleculara.* 3:25-30
- Calderón, R.D. 2009. Análisis genético para la conservación y manejo de subespecies de *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) en México. Tesis de Maestría. Centro de Biotecnología Genómica. Instituto Politécnico Nacional. Tamaulipas, México. 87 pp.
- Castillo, C. 2007. La selección natural a nivel molecular. En: Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre, X. (eds). *Ecología molecular.* México, D.F. 11-48 pp.
- Cronin, M. A. 1992. Intraspecific variation in mitochondrial DNA of North American cervids. *Journal of Mammalogy* 73:70–82
- Charrel, R. N., N. Lévy, R.B. Tesh, y L.J. Chandler. 1999. Use of base excision sequence scanning for detection of genetic variations in St. Louis encephalitis virus isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37:1935-1940.

- Demaris, S., Miller, K.V. y H.A. Jacobson. 2000. White-tailed Deer. En: Ecology and Management of Large Mammals in North America. S. Demaris and P.R. Krausman eds. PP. 601-628.
- DeYoung, R. W., y R. L. Honeycutt. 2005. The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management* 69:1362-1384.
- Douzery, E. y E. Randi. 1997. The Mitochondrial Control Region of Cervidae: Evolutionary Patterns and Phylogenetic Content. *Molecular Biology and Evolution*. 14(11): 1154:1166.
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, y Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479-491.
- Flores-Villela O. y P. Gerez. 1994. Biodiversidad y Conservación en México: Vertebrados, Vegetación y Uso de Suelo. CONABIO, UNAM.
- Frankham R, J.D. Ballou, and Briscoe D.A. 2004. *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge
- Galindo-Leal, C. y M. Weber. 1998. El venado de la Sierra Madre Oriental. *Ecología, manejo y conservación*. EDICUSA-CONABIO. México. 272 pp.

- Galtier, N., R. W. Jobson, B. Nabholz, S. Gle´min y P. Blier. 2009. Mitochondrial whims: metabolic rate, longevity, and the rate of molecular evolution. *Biology Letters*, 5: 413-416.
- Gallina, S. y H. L3pez Ar3valo. 2008. *Odocoileus virginianus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. www.iucnredlist.org
- Geist, V. 1998. *Deer of the world: their evolution, behaviour, and ecology*. Stackpole Books, Mechanicsburg, Pennsylvania.
- Gippoliti S. y G. Amori. 2007. Beyond threatened species and reintroduction: establishing priorities for conservation and breeding programmes for European rodents in zoos. *Int. Zoo Yb.*, 41: 194–202.
- Gonz3lez, S, Maldonado J.E. y J.A. Leonard. 1998. Conservation genetics of the endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*, 7, 47-56.
- Grubb, P. 1993. Family Bovidae. In: Wilson D. E. and D. M. Reeder (Eds). *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference*. Smithsonian Inst. Press, Washington. pp. 393-414.
- Hale, M.L., Burg T.M. y T.E. Steeves. 2012. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLoS ONE* 7(9):
- Halls, L.K. 1984. *White-tailed Deer: Ecology and Management: A Wildlife Management Institute Book*, Stackpole Books.
- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammere, C., Vuuren, B. J., Matthee, C. y A. Couloux. 2012. Pattern and timing of diversification of *Cetartiodactyla*

(Mammalia, *Laurasiatheria*), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies*, 335, 32-50.

Hernández, P.M. 2010. Dinámica espacio temporal del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) en el norte de México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional (IPN). Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, Tamaulipas. 133 pp.

Höglund, J. 2009. *Evolutionary Conservation Genetics*. Oxford University Press. U. K. 18-36 pp.

IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.2. <www.iucnredlist.org>.

Leopold, A.S. 1959. *Fauna Silvestre de México Aves y Mamíferos de Caza*. Pax-INIREB. Segunda edición. México. 560-588 pp.

Li, M., F. Wei, B. Goossens, Z. Feng, H. B. Tamate, M. W. Bruford y S. M. Funk. 2005. Mitochondrial phylogeography and subspecific variation in the red panda (*Ailurus fulgens*): implications for conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 78–89.

Logan-López, K., E. Cienfuegos-Rivas, F. Clemente-Sanchez, G.D. Mendoza-Martínez, A.M. Sifuentes-Rincón, y L.A. Tarángo-Arámbula. 2007. Patrones de variación genética en cuatro subespecies de venado cola blanca del noreste de México. *Agrociencias*. 41: 13-21.

Logan-López, K.G. 2004. Caracterización genética y morfométrica de cuatro subespecies de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en la zona centro-

- norte del noreste de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. 111 pp.
- López, J.A. 2010. Diversidad y diferenciación genética en tres subespecies de venado cola blanca *Odocoileus virginianus* del estado de Michoacán, México analizada con microsatélites nucleares. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Biología. Morelia, Michoacán. 70 pp.
- Mandujano, S. 2004. Análisis bibliográfico de los estudios de venados en México. *Acta Zool. Mex.* 20(1): 211-251.
- Mayr, E. 1963. *Populations, Species, and Evolution*. Cambridge, Massachusetts: Belknap Press, Harvard University Press.
- McGraw, S.N., Keeler, S.P. y J.E. Huffman. 2012. Forensic DNA analysis of wildlife evidence. En: *Wildlife Forensic. Methods and Applications*. Huffman J.E. y Wallace (Eds).
- Meier, R. 2008. DNA sequences in taxonomy: opportunities and challenges. In: Wheeler Q. (ed). *The new taxonomy*. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Méndez, E. 1984. Origin, classification and distribution. En: Halls, L.K. (ed). *White-Tailed Deer: Ecology and Management*. Stackpole Books. Harrisburg, Pennsylvania. 513-524.
- Mitton, J. B., B. R. Kreiser y R. G. Latta. 2000. Glacial refugia of limber pine (*Pinus flexilis James*) inferred from the population structure of mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.* 9: 91–97.
- Molinari, J. 2007. Variación geográfica en los venados de cola blanca (*Cervidae*, *Odocoileus*) de Venezuela, con énfasis en *O. margaritae*, la especie enana de

- la Isla de Margarita. Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales. 167: 29-72
- Moritz, C. 1994. Defining “evolutionarily significant units” for conservation. Trends in Ecology and Evolution 9:373–375.
- Moritz, C., T. E. Dowlin y W. M. Brown. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Annual Review of Ecology and Systematics, 18: 269–292.
- Moscarella, R.A., M. Aguilera, y A.A. Escalante. 2003. Phylogeography, population structure, and implications for conservation of White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Venezuela. Journal of Mammalogy. 84: 1300-1315.
- Mulcahy., D.G. 2008. Phylogeography and species boundaries of the western North American Nightsnake (*Hypsiglena torquata*): Revisiting the subspecies concept. Mol Phylogenet Evol 46: 1095-1115.
- Nagata J, R. Masuda, H.B. Tamate, S. Hamasaki, K. Ochiai, M. Asada, S. Tatsuzawa, K. Suda, H. Tado y M.C. Yoshida. 1999. Two genetically distinct lineages of the sika deer, *Cervus nippon*, in Japanese islands: comparison of mitochondrial d-loop sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 13, 511-519.
- O'Brien S.J. y E. Mayr. 1991 Bureaucratic mischief: recognizing endangered species and subspecies. Science. 251, 1187–1188.
- Ockenfels, R.A., D.E. Brooks y C.H. Lewis. 1991. General ecology of Coues white-tailed deer in the Santa Rita Mountains. Arizona Game & Fish Department Technician Report 6:1-73.

- Okada, A., T. Y. Ito, B. Buuveibaatar, B. Lhagvasuren y A. Tsunekawa. 2012. Genetic Structure of Mongolian Gazelle (*Procapra gutturosa*): The Effect of Railroad and Demographic Change. *Mongolian Journal of Biological Sciences*. 10: 1-2.
- Ortega, J. A., S. Mandujano, J. Villarreal, M. I., DiMare, H. López-Arévalo, M. Molina y M. Correa-Viana. 2011. Managing White-tailed deer: Latin America. In: Hewitt, D. G. (Ed). *Biology and management of White-tailed deer*. Taylor and Francis Group. Bacon Raton. FL. Pp. 565-597.
- Phillimore, A. y I.P.F. Owens. 2006. Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology? *Proc. R. Soc. B*. 273(1590): 1049-1053.
- Purdue, J.R., T. K. Oleksiyk y M.H. Smith. 2006. Independent occurrences of multiple repeats in the control region of mitochondrial DNA of white-tailed deer. *Journal of Heredity*. 97(3): 235-243.
- Rodríguez, F., T. Pérez, S. Hammer, J. Albornoz y A. Domínguez. 2010. Integrating phylogeographic patterns of microsatellite and mtDNA divergence to infer the evolutionary history of chamois (genus *Rupicapra*). *BMC Evolutionary Biology*. 10:222.
- Rosas-Rosas, O.C., L.C. Bender y R. Valdez. 2008. Jaguar and puma predation on cattle calves in northeastern Sonora, Mexico. *Rangeland Ecology and Management*. 61:554–560.
- Sánchez, O., Zamorano, P., Peters, E. y H. Moya. 2011. Temas de conservación de vertebrados silvestres en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México, D.F. 389 pp.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Software ARLEQUIN version 2000.

- Smith, W.P. 1991. Mammalian Species. *Odocoileus virginianus*. Am. Soc. Of Mamm. 388: 1-13.
- Vázquez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: Eguiarte, L.E., Souza, V. y Aguirre, X. (eds). Ecología molecular. México, D.F. 442-466.
- Vázquez-Domínguez, E. y R. Vega. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos? En: Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro. Vázquez-Domínguez, E. y D.J. Hafner, eds. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin. 32: 67-73.
- Villareal-Espino, O. 2002. El grand-slam de venado cola blanca mexicano, una alternativa sostenible. Archivos de Zootecnia. 31: 187-193.
- Villarreal, J.G. 1999. Venado cola blanca, Manejo y aprovechamiento cinegético. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. Monterrey, N.L., México. 471 pp.
- Wiehler, J. y R. Tiedemann. 1998. Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control region. Acta Theriologica Supplement. 5: 187-197.
- Wiehler, J. y R. Tiedemann. 1998. Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control region. Acta Theriologica Supplement, 5, 187-197.
- Wu, H., Q.H. Wan, S.G. Fang, y S.Y. Zhang. 2005. Application of mitochondrial DNA sequence analysis in the forensic identification of Chinese sika deer subspecies. Forensic Science International, 148: 101–105.
- Zamorano, P. 2009. La flora y fauna silvestre en México y su regulación. Estudios Agrarios 40: 159-167.

Zhang, F. y Z. Jiang.2006. Mitochondrial phylogeography and genetic diversity of Tibetan gazelle (*Procapra picticaudata*): Implications for conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 313-321.