



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

Variabilidad genética y relación filogeográfica de subespecies de venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus*) en la región Golfo de México.

HECTOR ORTIZ CONTLA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

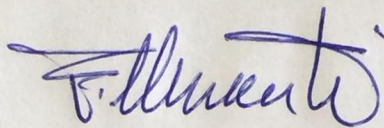
2015

La presente tesis titulada: **Variabilidad genética y relación filogeográfica de subespecies de venado cola-blanca (*Odocoileus virginianus*) en la región Golfo de México**. Realizada por el **C. Hector Ortiz Contla** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

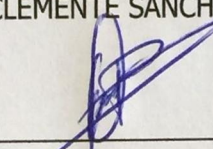
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



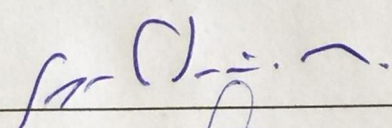
DR. FERNANDO CLEMENTE SÁNCHEZ

ASESOR



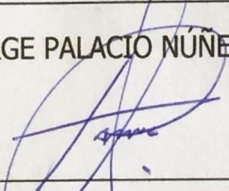
DR. OCTAVIO ROSAS ROSAS

ASESOR



DR. JORGE PALACIO NÚÑEZ

ASESOR



DR. LUIS A. TARANGO ARÁMBULA

ASESOR



DR. JOSÉ HERRERA HARO

Montecillo, Texcoco, México, Noviembre de 2015.



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

Héctor Ortiz Contla, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

RESUMEN

El venado cola blanca presenta distribución en Norte, Centro y Sur América, en México se distribuyen históricamente 14 de las 38 subespecies reportadas, y aunque solo dos tienen importancia cinegética, todas las subespecies son aprovechadas para diferentes fines. A pesar del rol tan importante del venado cola blanca en México, no se tiene suficiente información acerca de la diversidad genética de la especie. El objetivo de la presente investigación fue determinar y describir la variabilidad genética de las subespecies *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis* con distribución en la zona del Golfo de México por medio del uso de un fragmento de la región control (D-Loop) del ADN mitocondrial. Se recolectaron 47 muestras de tejido muscular, cartílago auricular u órganos; 16 de *O. v. texanus*, 17 de *O. v. veraecrucis*, 4 de *O. v. thomasi* y 10 de *O. v. yucatanensis* y se identificaron 46 haplotipos. Las relaciones filogeográficas fueron determinadas con los métodos *Neighbor-Joining* y máxima verosimilitud con secuencias del fragmento de 468 pares de bases. La estructura genética y variabilidad se calcularon por medio de Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), los índices de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π). La relación filogeográfica concuerda por ambos métodos donde las secuencias divergen a partir de *O. v. yucatanensis*. A partir de los Análisis de Varianza Molecular se definió diferenciación genética entre las subespecies en estudio ($F_{ST} = 0.19781$, $P < 0.05$). Los niveles de los índices h (**0.9979**) y π (**0.15129**) sugieren niveles moderados de variación genética. Se realizó una red de haplotipos que vinculó a las subespecies *O. v. texanus* y *O. v. veraecrucis*, las subespecies restantes no presentaron vinculación, ni dentro ni entre subespecies.

Palabras clave: *Odocoileus virginianus*, ADNmt, región control, diversidad genética.

GENETIC VARIABILITY AND PHILOGEOGRAPHIC RELATION OF WHITE-TAILED DEER (*ODOCOILEUS VIRGINIANUS*) SUBSPECIES IN THE GULF OF MEXICO REGION

Héctor Ortiz Contla, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2015.

ABSTRACT

White-tailed deer is found in North, Central and South America, in Mexico there are 14 out of the 38 known subspecies, all Mexican subspecies are of some use by local people and two of them are international-trophy rank; despite the importance of white-tailed deer in México, information on genetic diversity of this species is scarce. The objective of the study was to determine and describe genetic variability of *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. thomasi* and *O. v. yucatanensis* subspecies distributed in the Gulf of Mexico area by means of the use of a mitochondrial ADN fragment from the control region (D-loop). The study was based on 47 samples either of muscle tissue, ear cartilage or internal organ tissue; samples sorted by subspecies were: 17, 16, 10 and 4 of *O. v. veraecrucis*, *texanus*, *yucatanensis* and *thomasi*, respectively. There were 46 different haplotypes. *Neighbor-Joining* and maximum likelihood were used to determine philogeographic relations based on sequences of the fragment of 468 pairs of bases. Genetic structure and variability were calculated by Molecular analysis of variance (AMOVA), indices of haplotype diversity (h) and nucleotide (π). Both methods gave the same philogeographic relations, sequences differ from *O. v. yucatanensis*. Subspecies genetic differentiation was defined from Molecular analysis of variance, $F_{ST} = 0.19781$ ($P < 0.05$). Index values of 0.9979 and 0.15129 for h and π , respectively, allow to indicate a moderate genetic variation. Haplotype net showed some relationship between *O. v. texanus* and *O. v. veraecrucis* subspecies, no within and among subspecies relations were found among the other subspecies.

Key words: *Odocoileus virginianus*, mtDNA, control region, 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: Alicia y Héctor; a mis hermanos: Juan y David. Por ser la base y soporte en este camino, por sus aciertos y errores que marcaron la línea en mi camino.

A mi esposa Ana Victoria y a mis hijas Victoria y Regina. Por ser el inicio y el fin, la fortaleza y fe de cada día.

A mis tíos, primos y sobrinos por ser parte de esto y siempre estar ahí.

A Pedro Arturo, Noel y Neto, mis mejores amigos.

A los que ya no están físicamente conmigo pero que me acompañan en el corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados por ser el medio para dar este gran paso en mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para la realización de la presente investigación.

Al Dr. Fernando Clemente Sánchez por su guía y dirección, sobre todo por la lección de vida que de él aprendí.

A mis asesores y profesores Dr. Luis Antonio Tarango Arámbula, Dr. José G. Herrera Haro, Dr. Jorge Palacio Núñez y Dr. Octavio César Rosas Rosas por su amistad y contribución en la presente investigación.

A Alan Hernández por ser mi compañero de proyecto, guía y sobre todo un gran amigo.

Al Dr. César Cortez Romero por su orientación y excelente amistad.

Al Dr. Amalio Santacruz y a Laura Carrillo por las facilidades otorgadas en el laboratorio de Huella Genética.

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

A Pablo Arenas por su amistad y consejos.

A mis amigos de Xalapa Andrés, Andy, Diego, Facundo, Julio, Luis, Piotrek, Toño y sus familias por tantos años y experiencias juntos.

A la familia Sánchez Arriola por tantos grandes momentos juntos.

A la Familia Arriola Toiber por permitirme ser uno más de ellos, tanto en casa como en la cancha.

A mis amigos del frontón Javier, Tomás, Jacobo, Israel, Raúl, Cesar, Gollo, Gustavo entre otros

A todas las buenas personas y amigos del *Campus* San Luis: Fer Leal, Victor, Dr. Ángel, Juanfe, Dr. Martínez, Dra. Brenda, Dr. Ismael, Dr. Genaro, Lety, Norma, Lidia, Ale Olvera, Susi, Roman, Tocayo.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
SUMMARY	v
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN	2
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
FAMILIA <i>Cervidae</i>	3
VENADOS EN MÉXICO	3
VENADO COLA BLANCA.....	5
SUBESPECIES DE VENADO COLA BLANCA.....	6
<i>O. virginianus yucatanensis</i> (Hays, 1872).....	7
<i>O. virginianus texanus</i> (Mearns, 1898).....	8
<i>O. virginianus thomasi</i> (Merriam, 1898).....	9
<i>O. virginianus veraecrucis</i> (Goldman and Kellog, 1940).....	9
VARIABILIDAD GENÉTICA COMO RESULTADO DE FUERZAS EVOLUTIVAS	10
MUTACIÓN.....	11
SELECCIÓN.....	11
DERIVA GENÉTICA.....	12
MIGRACIÓN.....	12
TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA MEDICIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA	13
MARCADORES MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA MEDIR LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	13
PROTEÍNAS COMO MARCADORES MOLECULARES	14
POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP).....	14
SECUENCIACIÓN DIRECTA DE NUCLEÓTIDOS.....	15
MICROSATÉLITES DE ADN	15
POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP).....	15
POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLPS)	16
MARCADORES DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES	16
MARCADORES DE ADN MITOCONDRIAL (ADNmt)	17
FILOGEOGRAFÍA.....	18

REDES DE HAPLOTIPOS.....	18
USO Y APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS MOLECULARES EN SUBESPECIES DE COLA BLANCA.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
ÁREA DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	21
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	21
AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO D-Loop DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADNmt.....	22
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	23
DIVERSIDAD GENÉTICA.....	23
ÍNDICE DE FIJACIÓN (F_{ST}).....	24
FLUJO GENÉTICO (M).....	25
RED DE HAPLOTIPOS.....	26
RESULTADOS	26
ORIGEN GEOGRÁFICO DE HAPLOTIPOS.....	26
FRAGMENTO D-LOOP DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN MITOCONDRIAL	28
DIVERSIDAD GENÉTICA.....	29
ESTRUCTURA DE LAS POBLACIONES	30
ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	31
RED DE HAPLOTIPOS.....	34
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	39
LITERATURA CITADA	40

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1.- Características fenotípicas de los tres tipos de venados presentes en México	4
Cuadro 2.- Composición nucleotídica de cuatro subespecies de venado cola blanca en la región del Golfo de México. C = citosina, T = timina, A = adenina y G = guanina	29
Cuadro 3.- Diversidad de haplotipos dentro y entre 4 subespecies en la región del Golfo de México	29
Cuadro 4.- Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) de 4 subespecies de la región Golfo de México.	30
Cuadro 5.- Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	30
Cuadro 6.- Valores poblacionales de F_{ST} pareados (debajo de la diagonal) y de flujo genético M (sobre la diagonal) para comparaciones entre cuatro subespecies de <i>Odocoileus virginianus</i>	31
Figura 1.- Distribución histórica de subespecies de venado cola blanca (<i>Odocoileus virginianus</i>) en México.....	6
Figura 2. Origen geográfico de los haplotipos (1-15) dentro del área de distribución de <i>O. v. texanus</i> (verde).	26
Figura 3. Origen geográfico de los haplotipos (20, 29 y 30) de la porción sur del área de distribución de <i>O. v. veraecrucis</i> (Tamaulipas y norte de Veracruz) (gris)....	27
Figura 4. Origen geográfico de los haplotipos (16-19, 21-28, 31 y 32) dentro de la parte centro del área de distribución de <i>O. v. veraecrucis</i> (centro de Veracruz).27	

Figura 5. Origen geográfico de los haplotipos 33 - 36 dentro del área de distribución de *O. v. thomasi* (azul claro) y de los haplotipos 37 – 46 en la distribución de *O. v. yucatanensis* (azul oscuro).28

Figura 6.- Análisis filogenético de los 46 haplotipos obtenido por el método de Máxima verosimilitud32

Figura 7.- Análisis filogenético de los 46 haplotipos obtenido por el método de Neighbor-Joining.....33

Figura 8.- Red de haplotipos de cuatro subespecies de venado cola blanca. Red generada con el programa TCS.....35

INTRODUCCIÓN

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es un mamífero nativo del continente Americano de alto valor cinegético y amplia distribución, con 38 subespecies identificadas a lo largo del continente. En México se han ubicado 14 subespecies identificadas fenotípicamente, su distribución dentro del país podría responder a la capacidad de adaptarse a ambientes físicos y biológicos específicos (Geist, 1998).

Debido a la importancia cultural y económica del venado cola blanca en México, esta especie ha sido objeto de acciones antropocéntricas, entre ellas la dispersión de ejemplares con características de interés hacia zonas ajenas a la distribución natural de los mismos, como ha sido el caso de la introducción de individuos de la subespecie *O. v. texanus* al sur de su distribución original (Logan *et al*, 2007). La migración asistida puede llevar a una depresión genética y eventualmente a reducir la capacidad de adaptación de la especie al mosaico de ambientes en el que ahora se distribuye (Hernández, 2014).

El avance en la instrumentación y precisión del rastreo de ADN permite establecer la filogeografía de diferentes organismos y así definir la distribución geográfica de linajes de genes dentro de una misma especie (Avice, 2000); por lo que el presente estudio mediante el rastreo de ADN puede representar una herramienta para este seguimiento geográfico al mismo tiempo de poder ratificar o rectificar la identificación fenotípica de las subespecies de venado cola blanca.

Por tanto, el propósito general del presente estudio fue determinar la relación genética entre individuos de poblaciones de venado cola blanca procedentes de la región Golfo de México que permita determinar la filogeografía de la especie en esta región, como contribución a la información que se está generando en otras regiones del país.

JUSTIFICACIÓN

El venado cola blanca es un importante recurso faunístico por su distribución amplia dentro del territorio mexicano y alto valor como trofeo en la actividad cinegética. En la temporada de caza 2009-2010 la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) otorgó 1157 permisos de cacería para venado cola blanca, mientras que para el venado bura fueron únicamente 86.

La distribución tan amplia del venado cola blanca en el continente Americano se asocia con un alto nivel de subespeciación. Para el caso de México, se han propuesto 14 subespecies, con base en rasgos fenotípicos, entre ellos el color del pelaje, tamaño y medidas morfométricas. La identificación y mantenimiento de la variabilidad genética de la población de cola blanca existente en México son factores de importancia en la planificación del manejo y aprovechamiento sostenible de este recurso.

La aplicación de las herramientas de la biología molecular permite un rastreo de la huella genética por medio de la caracterización de las secuencias de ADN, siendo estas técnicas de mayor certeza que las mediciones fenotípicas usadas regularmente. En el presente estudio se establecieron la relación filogeográfica y variabilidad genética como evidencias que fortalecen o modifican las propuestas actuales de subespeciación de las poblaciones de venado cola blanca en México.

REVISIÓN DE LITERATURA

FAMILIA *Cervidae*

Wilson y Reeder (2005) indican que la familia *Cervidae* está conformada por las tres subfamilias: *Capreolinae*, *Cervinae* e *Hydropotinae*, Fernández y Vrba (2005) ubican a géneros de esta familia en Europa, América, Asia y Norte de África.

La subfamilia *Capreolinae* comprende nueve géneros: *Alces*, *Blastocerus*, *Capreolus*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Odocoileus*, *Ozotoceros*, *Pudu* y *Rangifer*; la *Cervinae* también con nueve géneros: *Axis*, *Cervus*, *Dama*, *Elaphodus*, *Elaphurus*, *Muntiacus*, *Przewalskium*, *Rucervus* y *Rusa*; la *Hydropotes*, conformada por un solo género y especie el ciervo de agua chino (*Hydropotes inermis*) que es un grupo monofilético diferente al de los cérvidos de astas (Halls, 1984; Wallmo, 1981; Wilson y Reeder, 2005).

VENADOS EN MÉXICO

Los venados distribuidos en México pertenecen a dos géneros distintos de la subfamilia *Capreolinae*: *Mazama* con dos especies el temazate rojo (*M. temama*) y el café (*M. pandora*) distribuidos en Veracruz y Yucatán, respectivamente; y, *Odocoileus* también con dos especies, el bura (*O. hemionus*) y el cola blanca (*O. virginianus*). El género *Odocoileus* apareció en América hace 3.5 millones de años (Kurtén y Anderson, 1980) con centro de origen en Centroamérica (Geist, 1998); pertenece al orden *Artiodactyla*, suborden *Rumiantia*, familia *Cervidae* y subfamilia *Capreolinae*.

Algunas características fenotípicas que permiten distinguir entre sí a los venados cola blanca, bura y temazate se presentan en el Cuadro 1. La información proviene de lo registrado por Leopold (1977). Resalta que el venado bura es el más robusto de los tres pero también de una distribución más restringida en México. El cola blanca es intermedio en tamaño pero de mayor distribución en el país. El temazate es el cérvido de menor porte, tal vez como una adaptación para moverse fácilmente en una vegetación de selva cerrada.

Cuadro 1. Características fenotípicas de los tres tipos de venados presentes en México (Leopold, 1977)

Característica	ESPECIE		
	Cola blanca	Bura	Temazate
Longitud: cabeza a inserción cola (mm)	1000 a 1300	1300 a 1600	910 a 980
Peso (kg)	M 36 a 57	M 64-114	M 17
	H 27-45	H 45-70	H 17
Coloración	Café grisáceo en invierno Café rojizo en verano.	Gris o café de manera estacional	Café rojizo
Orejas	Más cortas y angostas en relación con el bura	Muy largas y anchas	-----
Astas	Rama central encorvada hacia delante, puntas individuales verticales sin ramificar regularmente 10 puntas	Ramificación dicotómica	Astas espigadas sin ramificar menores a 120mm de longitud
Cola (mm)	180-270 color café al dorso y blanca ventral	115-190 angosta y pequeña, blanca ventral y negra a los costados y porción terminal	Café en parte dorsal y blanca parte ventral
Glándula metatarsal (mm)	25, al centro del hueso tarsal	40 o más, por debajo de las corvas	Sin presencia
Distribución	Todo México excepto la península de Baja California	Frontera norte del país. Coahuila, Sonora y Chihuahua	Selvas tropicales, Yucatán, Ver., Camp. y Tabasco

VENADO COLA BLANCA

El venado cola blanca es una de las especies de fauna silvestre con un amplio historial de investigación (Owen, 2000). Diferentes autores señalan características diversas para el cola blanca, entre ellas: Schmidt y Gilbert (1987) apuntan a la capacidad de adaptación a ambientes físicos contrastantes, desde climas húmedos a semiáridos y de tropicales a templados extremosos; Leopold (1977) enfatiza la capacidad de prosperar aún bajo alta presión de aprovechamiento por cacería; Demarais y Krausman (2000) resaltan la peculiaridad de que la especie abarca una superficie geográfica del continente muy amplia desde provincias norteadas de Canadá hasta las tierras tropicales de Brasil incluyendo amplias diferencias altitudinales en Perú.

De acuerdo con Demarais y Krausman (2000) aunado a su amplia distribución natural, el venado cola blanca ha sido una especie elegida para incrementar la frontera mediante la introducción a nuevas áreas o bien en áreas que contaban con distribución histórica pero con población extinta. Algunos puntos de introducción han sido las Islas Británicas, Bulgaria, República Checa, Finlandia, Yugoslavia, Nueva Zelanda, Cuba, Islas Vírgenes y otras islas del Caribe.

De las 38 subespecies reportadas para el cola blanca en América, México alberga 14 distribuidas en todo el país excepto la península de Baja California (Figura 1).

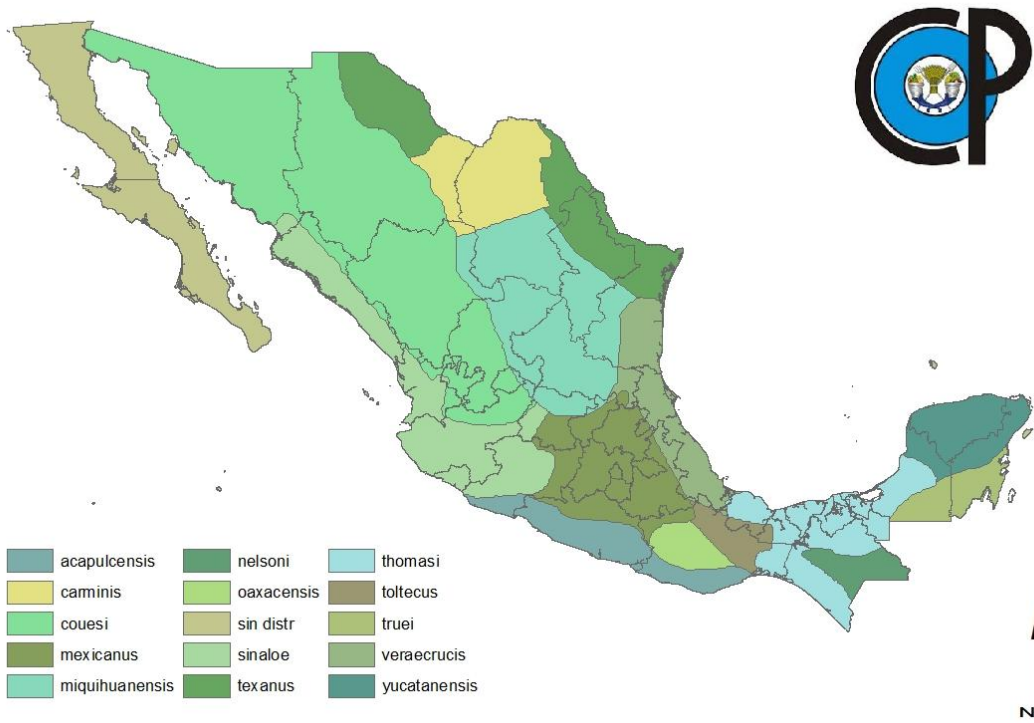


Figura 1. Distribución histórica de subespecies de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en México. Fuente: Elaboración propia con datos de Halls (1980).

SUBESPECIES DE VENADO COLA BLANCA

La formación de subespecies del venado cola blanca en México podría relacionarse a lo señalado por Klug *et al.* (2006) en relación a que una especie animal que ocupa zonas contrastantes ecológicamente y que de manera paralela es sujeta a presiones selectivas dispares puede mostrar una diferenciación de grupos genéticos que evita la extinción o reclusión de dicha especie a un limitado número de ambientes. Wallmo (1981) enfatiza como componentes que conducen a la formación de subespecies, al aislamiento geográfico y a la reproducción exitosa de grupos genéticos dentro de estos ambientes aislados.

Baker, (1984); Brox, (1984) y Geist, (1998) coinciden en resaltar que la diversidad de climas y condiciones geográficas en las que se distribuyó el venado cola blanca originó la formación de subespecies, señalando como ejemplo de ello que la población originaria de las grandes planicies del norte presenta astas de

mayor tamaño en comparación a la población nativa de la selva y matorrales, la cual muestra además una muda mínima de pelaje de verano a invierno.

Los límites fenotípicos para diferenciar entre subespecies son a veces difusos por la inestabilidad en la expresión de estas características y la translocación de algunos individuos de alguna subespecie hacia territorios geográficos propios de otras subespecies. Entre subespecies con área de distribución lejanas entre sí, existe mayor posibilidad de identificar diferencias fenotípicas (Schmidt y Gilbert, 1978). Para la clasificación, la taxonomía se basa principalmente en comparar rasgos fenotípicos, por lo que se puede confundir no solo adaptación y ajuste sino homología y analogía, genotipo y fenotipo, ecotipo y subespecie y finalmente los efectos de la naturaleza y la nutrición (Goldschmidt, 1940; Waddington, 1957; Demarais y Krausman, 2000).

A continuación se presenta la descripción fenotípica de individuos tipo de las subespecies englobadas en el presente estudio y los autores que inicialmente las describieron.

O. virginianus yucatanensis (Hays, 1872)

O. virginianus yucatanensis es descrito como un venado de color grisáceo marrón en la parte posterior y frontal de las patas, los costados más amarillentos haciéndose blanco hacia el vientre, las patas de color amarillo pardusco más claro en la parte interna. La parte interior del muslo e interna del oído, blancas. La barbilla y la parte interior blancas y con manchas blancas a los costados de la nariz y el labio superior. Presenta una línea blanca que va desde la fosa nasal hasta el borde del labio que pasa alrededor de la mandíbula inferior.

Presenta un penacho de pelo en la parte interna del corvejón aunque reporta la ausencia de glándula en los metatarsos. Especifica también que no presenta un cambio estacional en el color del pelaje como otras subespecies. La hembra muestra un color de pelaje semejante al del macho aunque tiene un tamaño menor y no presenta astas. Los cervatos al nacer presentan un color café rojizo oscuro con manchas blancas, las patas con color más hacia el gris, tomando el color de adulto alrededor de los seis meses de edad. Las astas son pequeñas de asta sencilla con dirección hacia arriba y hacia atrás alineada con la cara y que presenta solo una pequeña punta proyectada hacia el interior, las astas se caen hacia Marzo.

Las principales medidas zoométricas (mm) reportadas son: De la punta de la nariz a la base de la cola 914, cola 203, cabeza 266, altura a los hombros (cruz) 609, oreja 139, peso 24.94 kg, longitud de las astas 190.5, longitud de la punta 25.4.

O. virginianus texanus (Mearns, 1898)

El individuo “tipo” de *O. virginianus texanus*, colectado en el estado de Texas en 1897 por el Dr. Edgar A. Mearns presentó pelaje de invierno como una mezcla de blanco sal y pimienta, blanco amarillento y gris. Un área distintivamente negra anterior a la corona entre las astas y las orejas, extendiéndose posteriormente hasta la base de la cola, el color palidece gradualmente a amarillento en los lados. Todos los pelos blancos en la base, cenizos en la parte media y blanco en la parte apical, con un anillo subterminal amarillento anterior. En la parte interna, un color blanco para las axilas, las extremidades y abdomen; tono “humo” para el pecho. La cola blanca por el interior y negra por encima, el negro de la parte superior mucho más oscuro por los anillos marrón amarillento subterminales de los pelos. La almohadilla de la nariz desnuda y color blanco cenizo en la parte frontal del labio inferior.

La parte superior de la cabeza negra más oscurecido en la frente, órbita y base de las orejas blanquecina y en la parte posterior gris humo. Extremidades beige rojizo más o menos mezclado con gris y negro en la parte anterior, gris alrededor de los cascos y entre los dedos. La glándula metatarsal mide alrededor de 15 mm y está rodeada por un mechón de pelo invertido el cual es blanco al centro y café oscuro alrededor.

Para especímenes de hembras tanto adulta como joven y un macho juvenil, la descripción anterior es la misma salvo por la coloración de las orejas y la corona que fueron más oscuras.

Las astas con dos protuberancias basales, una hacia arriba y hacia atrás (75 mm de longitud) y la otra hacia enfrente (37 mm de longitud), con cuatro puntas adicionales para cada asta (12 puntas en total), con una longitud de 440 mm siendo simétricas entre ellas y con una longitud de 175 mm para la punta más larga. La rama principal está fuertemente curvada hacia arriba, hacia delante y hacia adentro, la circunferencia de la rama principal en su base es de 80 mm.

Los patrones observados en el individuo “tipo” fueron similares en los individuos a los observados en individuos a lo largo de la distribución de esta subespecie,

variando únicamente en el peso que fue menor en individuos de la parte más al sur de la región de la distribución natural de esta subespecie.

O. virginianus thomasi (Merriam, 1898)

El individuo 'tipo' de *O. virginianus thomasi* proviene de Huehuetan, Chiapas, destacando su tamaño relativamente grande y color rojo durante de todo el año, un pequeño punto para la glándula metatarsal en la parte posterior del metatarso a la mitad entre el calcáneo (tarso) y los cascos.

El pelaje de invierno del espécimen tipo: color "aleonado" (marrón amarillento) en las partes superiores, el vientre, la parte media del pecho y alrededor del cuello, haciéndose cano brillante hacia la parte de atrás. El hocico cano oscuro, la frente mezclada entre aleonado y negro haciéndose negro sólido hacia la altura de las orejas con una mancha aleonada sobre la parte posterior de cada ojo, barbilla blanca con una mancha blanca a la mitad de cada lado del labio. La parte interior de los muslos, la parte media del abdomen y el aspecto de la parte posterior de las patas delanteras, blanco. La superficie de la cola de color aleonado brillante y blanco para la parte interior. El color del pelaje de verano para un individuo proveniente de Tonalá, Chiapas fue similar al descrito, aunque con ligeras variaciones: las partes superiores simplemente aleonadas, carece de la apariencia cana dorada del pelaje de invierno, la frente del mismo tono que el resto de las partes superiores, el hocico grisáceo oscuro con pequeñas manchas oscuras detrás del cojín de la nariz.

La conformación de cráneo y hocico de *O. virginianus thomasi* es similar a la de *O. virginianus truei*. El asta alcanza 240 mm de longitud inclinándose hacia atrás casi en línea con la cara, la curvatura de las puntas es hacia adentro y un poco hacia delante. Las astas son simétricas en ambos lados.

O. virginianus veraecrucis (Goldman y Kellog, 1940)

O. virginianus veraecrucis es descrito de tamaño medio con cola más o menos negruzca distintiva en la parte superior subterminal. Las partes superiores del cuerpo son casi uniformes café-ocre el cual oscurece cada vez más a lo largo de la línea de la espalda y palidece a los costados del cuello y a lo largo de los costados del cuerpo, la parte superior de la cabeza es café-ocre mezclado con negro. Las

superficies anteriores y externas de las patas delanteras color canela, una línea blanquecina estrecha se extiende hasta las partes posteriores cerca de las pezuñas. El mentón, la garganta, las zonas abdominales e inguinal mediana y los lados interiores de las patas traseras hacia abajo hasta cerca de la pezuña blancos. La parte baja del cuello y pecho los lados de la piel del tórax de ante de color rosado; mechones en glándula tarsal y metatarsal blanco opaco; labio inferior con una mancha negruzca en cada lado; lados del hocico y las mejillas grisáceas amarillentas; parte superior del hocico y media de cara hasta la frente escasamente cubierto con pelos muy cortos, de color marrón oscuro, mezclados con un pocos y esparcidos pelos blancos; áreas orbitales amarillento-blanquecinas; parte superior de la cola , medianamente canela en la base haciéndose canela pálida haciéndose parda hacia la punta.

El cráneo un poco más pequeño que para *O. virginianus texanus*, con maxilar más corto, el cráneo es más grande que para *O. virginianus toltecus* y *O. virginianus thomasi*.

Las principales medidas zoométricas (mm) reportadas para el individuo “tipo” (hembra) longitud total 1500, cola 225, pata trasera 375, altura al hombro 760. En general el venado cola blanca del norte de Veracruz se distingue por tener una coloración más pálida en comparación con sus vecinos geográficos del norte y oeste que presentan coloraciones más oscuras y opacas.

La literatura científica asociada a la descripción original de subespecies de venado cola blanca de hace ya más de un siglo se ha basado en características cualitativas y algunas cuantitativas pero siempre fenotípicas y en ocasiones sobre un reducido número de ejemplares. Esta situación presenta una gran oportunidad para consolidar y validar la clasificación de subespecies utilizando herramientas genéticas moleculares.

VARIABILIDAD GENÉTICA COMO RESULTADO DE FUERZAS EVOLUTIVAS

La variación genética a partir de la recombinación de genes puede llevar a características fenotípicas distintivas entre individuos pero no a la formación de nuevos alelos. La mutación, que da lugar a la presencia de nuevos alelos capaces de generar recombinación de genes totalmente nuevos, es el medio por el que se pueden formar nuevas especies. La incidencia de mutaciones y su continuidad en

una población, son fenómenos esporádicos, por lo que esta fuerza evolutiva solo se presenta en magnitud reducida en tiempo y espacio aunque su persistencia como nuevos alelos, da lugar a la formación de especies (Klug *et al.*, 2006).

Además de la mutación, existen otras fuerzas evolutivas a partir de las cuales se puede esperar tanto cambios en la integración de alelos como la desaparición de otros en una población determinada y son: selección, deriva genética y migración, las cuales se describen a continuación y pueden variar en la magnitud de expresión o permanencia por la interacción de factores demográficos, ambientales y de historia de vida (Frankham *et al.*, 2002; DeYoung *et al.*, 2005).

MUTACIÓN

La mutación es considerada como responsable de toda la diversidad genética y por ende, el camino para la regeneración de la pérdida de esta diversidad; se puede definir como el cambio genético repentino en los alelos o cromosomas que engloba modificaciones en las secuencias de ADN, en el orden de un loci a través de los cromosomas y el cambio en el número de estos. Las mutaciones surgen a partir de errores espontáneos tanto en la replicación del ADN como en la meiosis que pueden generarse por sustitución de bases, adiciones y deleciones a partir de la duplicación de genes, siendo las mutaciones más importantes aquellas que afectan a los loci para rasgos de aptitud y las más notables las letales y deletéreas (Frankham *et al.*, 2002). Los cambios debido a mutación son constantes a través del tiempo y pueden incrementarse por factores de estrés, y debido a agentes químicos mutagénicos y ambientales particulares como la radiación (Klug *et al.*, 2006).

SELECCIÓN

La selección es la principal fuerza que desplaza las frecuencias alélicas y puede ser definida como cualquier proceso a favor de ciertos genotipos o su expresión fenotípica por sobre otros a raíz de diferencias en sobrevivencia y reproducción entre individuos; la selección influencia la diversidad genética de poblaciones debido a la desviación de las frecuencias genotípicas esperadas en los adultos con base en ciertas combinaciones de genes que pueden resultar menos viables como por ejemplo la homocigosis (DeYoung *et al.*, 2005). Otra manera de influencia de la selección es el barrido selectivo que ocurre cuando surge una mutación ventajosa o

cuando las condiciones ecológicas cambian abruptamente a favor de ciertos genotipos en un término conocido como “*hitchhiking*” (Hedrick, 2000).

DERIVA GENÉTICA

La deriva genética es la fluctuación aleatoria de las frecuencias alélicas entre generaciones, tiene lugar cuando el número de individuos que se reproducen en una población es demasiado pequeño para asegurar que todos los alelos del conjunto de genes mantendrán sus frecuencias al pasar a la siguiente generación y presenta una correlación negativa con el tamaño efectivo de población (Wright, 1931; Klug *et al.*, 2006).

MIGRACIÓN

La migración tiene lugar cuando los individuos se desplazan entre las poblaciones ocasionando un flujo genético de nuevos alelos resultado de la reproducción satisfactoria entre individuos de distintas poblaciones, esta movilidad se puede ver afectada principalmente por la calidad y continuidad del hábitat y resultar en patrones de dispersión y comportamiento reproductivo alterados, lo que puede ocasionar el aislamiento de una población y con ello la fijación de diferentes combinaciones alélicas para múltiples loci (Hedrick, 2000; DeYoung *et al.*, 2005).

La respuesta en las frecuencias alélicas a partir de las fuerzas evolutivas descritas anteriormente depende de la variabilidad genética inicial de una población y de los individuos que la transmiten por lo que se define al tamaño efectivo de población como el número de individuos reproductores que tienen la misma probabilidad de contribuir con gametos a la siguiente generación, y es considerada una de las más importantes determinantes de variabilidad genética en poblaciones silvestres (Crandall *et al.*, 1999; Klug *et al.*, 2006).

En sinergia con las fuerzas evolutivas descritas se ha identificado una condición que puede influir sobre la variabilidad genética de una población; esta condición se da con base en las prácticas de manejo para la restauración de poblaciones en decremento. Una de estas prácticas es la incorporación a poblaciones en riesgo de extinción de algunos individuos provenientes de poblaciones viables; sin embargo, la variabilidad genética de estos individuos insertos es menor a la de su población de origen (Broders *et al.*, 1999). Si para este fin se utilizan poblaciones altamente

disímiles, la viabilidad de la población puede ser amenazada por un fenómeno conocido como depresión por exogamia (Templeton, A. R., 1986).

TÉCNICAS MOLECULARES PARA LA MEDICIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA

Las técnicas moleculares utilizadas para determinar la variabilidad genética a partir de la secuenciación de ADN han probado ser una herramienta de mayor certeza respecto a los acercamientos con base en mediciones fenotípicas, ya que estas solamente son una aproximación debido a que no determinan de forma directa la variabilidad alélica sino tan solo la manifestación de ella.

El estudio del ADN permite entender mejor los procesos poblacionales como la dispersión de individuos mediante marcadores moleculares heredados de forma uniparental, tal es el caso del ADN mitocondrial (ADNmt) o aquellos asociados al cromosoma Y; el grado de hibridación entre especies o subespecies con traslape en su rango de distribución y la reconstrucción de la historia evolutiva en especies aisladas, estos entre otros usos (DeYoung *et al.*, 2005; Klug *et al.*, 2006).

MARCADORES MOLECULARES COMO HERRAMIENTA PARA MEDIR LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN heredados por los progenitores a su descendencia y son clasificados según la forma de herencia, ubicación en el genoma y el método aplicado para la identificación de los mismos (Awise, 1994; DeYoung *et al.*, 2005). Hedrick (2000) señala a los marcadores genéticos como una herramienta para determinar la variabilidad genética entre individuos aislados, dentro de una población y entre poblaciones, a partir del porcentaje de *loci* heterocigotos y combinaciones alélicas para cada *locus*.

DeYoung *et al.* (2005) indican que los marcadores moleculares aplicados en fauna silvestre han permitido estudios a profundidad en temas como: definición de unidades de manejo con base en diferencias en frecuencias alélicas; asignación de individuos de origen desconocido a una población de origen más probable por pruebas de asignación; estimar la abundancia de algunas especies silvestres a partir de heces y pelos colectados en campo; identificación del género de individuos específicos a partir de la presencia de marcadores propios a cromosomas género

específico en células de tejidos diversos. A continuación se desglosa la naturaleza de estos marcadores moleculares.

PROTEÍNAS COMO MARCADORES MOLECULARES

La electroforesis de proteínas es aplicando una carga eléctrica en una muestra cargada en un gel principalmente de acrilamida que da como resultado la visualización de variantes teñidas de manera histoquímica y cada una de estas representa una mutación resultado de un reemplazo de aminoácidos. La principal desventaja es que se subestima la variación genética debido a que las mutaciones no siempre resultan en reemplazamiento de aminoácidos o no alteran la carga neta de la proteína, haciéndola indetectable. En promedio la heterocigosis detectada de esta forma es solamente del 4-5% para mamíferos (Honeycutt, 2000).

POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFPL)

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFPL) se generan de la digestión del ADN genómico o fragmentos de ADN, con endonucleasas de restricción que reconocen combinaciones de bases específicas. Los fragmentos son llevados a electroforesis en gel y visualizados mediante tinción. Los RFPL permiten medir la variación genética dentro y entre poblaciones, una de las mayores desventajas de su uso es la subestimación de la variación genética debido a que sólo se reconocen mutaciones en los fragmentos reconocidos por la enzima de restricción o aquellas mutaciones que cambian la longitud del fragmento de restricción (DeYoung *et al.*, 2005).

SECUENCIACIÓN DIRECTA DE NUCLEÓTIDOS

Con la secuenciación directa de nucleótidos se alcanza una medición más exacta de la variación genética en comparación a otros marcadores moleculares debido a que todos los nucleótidos pueden ser visualizados. Los datos de la secuenciación directa de nucleótidos pueden ser aplicados a un amplia gama de problemas que van desde el nivel de individuos hasta entre especies (Nei y Kumar, 2000).

MICROSATÉLITES DE ADN

Los microsatélites son secuencias cortas de ADN en tándem (2-5 pares de bases) que se encuentran a través de los genomas de la mayoría de los eucariontes (Tautz, 1989). Ellegren (2000) propone, que la variación de los *loci* de microsatélites es el resultado del deslizamiento de la cadena de ADN, proceso que agrega o elimina unidades repetidas en la replicación del ADN, teniendo como resultado una elevada tasa de mutación (10^{-3} a 10^{-4} por generación)

Los microsatélites de ADN son ideales para estudios de estructura genética poblacional, relaciones genéticas, patrones de flujo genético, deriva genética y cambios en el tamaño de población debido a altos niveles de polimorfismo.

De acuerdo con Honeycutt (2000), la estimación de heterocigosis mediante este método es diez veces mayor que mediante el uso de proteínas en grandes mamíferos.

POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP)

Los *loci* SNP se caracterizan tanto por sustituciones de nucleótido simple como por eventos de inserción-delección sencilla (Primmer *et al.*, 2002). Aunque los SNP pueden brindar mucha información relacionada con la variación genética dentro y entre poblaciones, presenta limitantes respecto a la amplitud de estudios para especies de fauna silvestre (Brumfield *et al.*, 2003). Algunas de las limitantes de los SNP enunciadas por DeYoung *et al.* (2005): primero, la detección de alelos en un locus se dificulta en individuos heterocigotos. Segundo, dado que la variación en locus SNP es generalmente bialélica, el uso de este marcador está limitado a estudios de filiación y parentesco. Tercero, la caracterización y genotipo de un gran número de SNP puede ser muy caro y tardado.

POLIMORFISMOS EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLPS)

Los AFLPs provienen de la digestión del ADN genómico mediante endonucleasas de restricción para ligarse a adaptadores en los extremos digeridos, los cuales representan los “*primers*” o cebadores para la amplificación mediante PCR (Vos *et al.*, 1995), logrando de esta manera producir un gran número de fragmentos con los que se puede analizar la variación genética en toda la amplitud del genoma entre y dentro de individuos, poblaciones y especies con base en los patrones de bandeo (Rivera-Ocasio *et al.*, 2002). La desventaja principal de los AFLPs radica en que los patrones de bandeo no siempre son reproducibles y deben analizarse con precaución.

MARCADORES DE LOS CROMOSOMAS SEXUALES

En los mamíferos, los cromosomas sexuales son diferenciados como X y Y, el macho es heterogámico (XY); en el caso de las aves los cromosomas sexuales son Z y W y la hembra es la heterogámica (ZW). En los humanos, el cromosoma Y tiene cerca de 20 genes, la secuencia restante consta principalmente de elementos repetidos salvo por la región pseudoautosomal del cromosoma “Y” de los mamíferos, este cromosoma es escasamente homólogo con el “X” y no presenta recombinación. El cromosoma Y en el macho es referido como el equivalente al ADNmt en términos de herencia (Marshall y Shetty, 2001).

MARCADORES DE ADN MITOCONDRIAL (ADNmt)

La mitocondria es un organelo celular con genoma propio, de función y organización semejantes al genoma de las bacterias, situación que dio lugar a la suposición que las mitocondrias son descendientes de organismos procariontes de vida libre que se convirtieron en simbioses intracelulares de células huéspedes nucleadas (eucarionte amitocondriado) con un pobre desarrollo de endomembranas y ausencia de otros organelos, supuesto que se denominó como teoría endosimbiótica (Lang *et al.*, 1999; Klug *et al.*, 2006).

El ADN de la mitocondria (ADNmt) es una molécula cerrada de forma circular de longitud aproximada a los 17,000 pares de bases, consta de dos genes de ARN ribosomal (ADNr), 22 genes de ARN de transferencia (ARNt), 13 genes de proteínas codificantes y una región control (D-loop) no codificante la cual controla la replicación y transcripción de la molécula; no presenta recombinación y tiene una tasa excepcionalmente alta de sustitución y polimorfismo (estimada en 2% de divergencia de secuencias por cada millón de años en mamíferos y de cinco a diez veces mayor que en ADN nuclear) debido a que es replicado muchas más veces y su reparación es menos eficiente que para el ADN nuclear además que el organelo se encuentra en un ambiente corrosivo rico en oxígeno; por tanto se considera la molécula adecuada para definir líneas específicas de descendencia materna (Douzery y Randi, 1997; Frankham *et al.*, 2002; DeYoung *et al.*, 2005).

El ADNmt en vertebrados es una molécula de herencia materna que presenta mínima recombinación, evoluciona de manera más rápida que el ADN nuclear y es la molécula ideal para comparaciones dentro y entre especies. Ha servido para realizar estudios de filogeografía que revelan patrones de variación genética resultado de barreras para el flujo genético (Avise, 2000) los cuales se usan para identificar regiones geográficas de alta divergencia y proveer así, una excelente herramienta para el manejo y la conservación de unidades genéticamente distintas (Proudfoot *et al.*, 2006).

FILOGEOGRAFÍA

La filogeografía es una disciplina de reciente creación que permite relacionar los linajes de genes dentro y entre especies estrechamente relacionadas, basándose en su distribución geográfica aplicando marcadores moleculares. Una de las premisas en que se basa la filogeografía es que el flujo genético a través del tiempo deja patrones que pueden reconocerse y que son marcas de historias poblacionales particulares. Lo anterior con el fin de resolver preguntas y problemas en ecología y microevolución relacionados con factores demográficos, de fragmentación y la dinámica de barreras geográficas que hayan influenciado el patrón actual de diversidad genética y similitud (Avise, 2000, 2009; Vázquez, 2007).

La filogeografía se desarrolla con base en la teoría de coalescencia la cual determina que todos los miembros de una población están genealógicamente ligados a ancestros comunes en algún momento de la historia; para lograr definir ese ancestro común, la filogeografía requiere de un rastro directo transmitido de generación en generación y de manera unilateral, siendo el ADNmt y los genes ligados al cromosoma Y (en mamíferos) las moléculas adecuadas para el estudio; algunos aspectos fundamentales del estudio filogeográfico son: la unidad de estudio es el individuo, y más estrictamente el haplotipo; se evalúan polimorfismos que son únicos (no se repiten) y definen claramente la filogeografía de los mismos; utiliza árboles de genes con base en haplotipos y no arboles de especies con los que puede trazarse la filogenia (Vázquez, 2007; Avise, 2009).

REDES DE HAPLOTIPOS

La reconstrucción de filogenias es una herramienta para establecer las relaciones genealógicas entre grupos de organismos; la estimación de las relaciones a nivel de una población, conlleva distintas dificultades al utilizar los métodos tradicionales para esta reconstrucción. Los métodos tradicionales tales como parsimonia, *neighbour-joining* y máxima verosimilitud, de acuerdo con lo mencionado por Clement *et al.* (2000) asumen que no es posible la recombinación de secuencias en una misma población y que los haplotipos ancestrales ya no se encuentran presentes en ella, los cuales, de acuerdo con la teoría de coalescencia, serán los más frecuentes. Por lo anterior, es necesaria una

aproximación alternativa que estime la genealogía de genes a nivel de población, tomando en cuenta los fenómenos a nivel poblacional.

Las genealogías con niveles de divergencia a nivel poblacional que no presentan bifurcación por los métodos tradicionales, pueden analizarse con un mayor detalle mediante las redes de haplotipos, esto gracias a la metodología desarrollada por Templeton *et al.* (1992) la cual emplea las secuencias de nucleótidos para inferir genealogías dentro de una población cuando las divergencias son pequeñas. Las redes de haplotipos pueden dar origen a los árboles multibifurcantes a nivel intraespecífico con secuencias con poca recombinación, donde un único haplotipo puede originar varios haplotipos para formar lo que se conoce como red de haplotipos.

USO Y APLICACIÓN DE LOS MÉTODOS MOLECULARES EN SUBESPECIES DE COLA BLANCA

La aplicación de los métodos moleculares en especies silvestres aunque relativamente reciente, son bastos y se han desarrollado bajo el uso de distintas herramientas; la amplitud en su uso engloba estudios entre y dentro de taxones, siendo el mayor interés en estudios de vertebrados, los mamíferos y peces en quienes se ha centrado la atención (Vázquez, 2007); algunos estudios de amplio alcance delimitan las relaciones entre vertebrados (Johns y Avise, 1998) otros más específicos entre especies como es el caso del estudio de Randi *et al.* (2001) donde se obtuvo la relación entre veinticinco taxones de la familia de los cérvidos y se refuta la monofilia actual de los venados con astas.

Anderson *et al.* (2002) refieren que los primeros estudios genéticos en cola blanca emplearon tanto la electroforesis de proteínas como el ADNmt para el estudio de patrones de estructura genética de poblaciones y variación geográfica; siendo desde entonces que la filogeografía ha permitido refutar descripciones históricas de caracterizaciones fenotípicas, tal es el caso del estudio de Ellsworth *et al.* (1994) que objeta las subdivisiones taxonómicas de subespecies de venado cola blanca del sureste de Estados Unidos basadas en morfología. Otro estudio similar es el conducido por Moscarella *et al.* (2003) en el que se encontró mayor divergencia genética entre subespecies de cola blanca distribuidas en Venezuela

que las de Norte América, inclusive mayor que dentro de poblaciones de venado bura.

La variabilidad genética y relación filogeográfica del venado cola blanca en México cuenta con estudios poco concluyentes pero que permiten esbozar la situación de las subespecies distribuidas hacia el norte y centro de México; la estructura genética entre subespecies está bien definida excepto para la subespecie *O. v. texanus* (Logan *et al.*, 2007) y algunas subespecies con distribución adyacente que presentan haplotipos compartidos. Otras subespecies estudiadas no comparten haplotipos entre ellas de acuerdo con lo señalado, en los estudios de De la Rosa-Reyna *et al.*, (2012); Ambriz, (2012) y Hernández, (2014).

A pesar de los estudios realizados para las subespecies de venado cola blanca, los resultados aún no son concluyentes, distintos autores hacen hincapié en realizar estudios más profundos incluyendo algunas variaciones, por ejemplo el uso de distintos marcadores moleculares simultáneos para determinar la situación filogeográfica de las 14 subespecies identificadas en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de tejido de venado cola blanca provinieron de UMA's registradas con aprovechamiento cinegético en la región Golfo de México (Tamaulipas, Veracruz, Campeche y Yucatán) además de Coahuila y Nuevo León dada la distribución de *O. v. texanus*. Con propietarios y técnicos de las UMA's se definió el protocolo de obtención, manejo y envío de las muestras. Para efecto del manejo *in situ* de cada muestra se proporcionó un *kit* elaborado por los integrantes y colaboradores del laboratorio de reproducción de venados del *Campus* San Luis Potosí del Colegio de Postgraduados.

Los tejidos colectados fueron: hígado, corazón, cartílago auricular y músculo. Las muestras de tejido fueron identificadas, registrando su origen geográfico y preservadas individualmente en alcohol a 95° dentro de un congelador a -30° C en el laboratorio de Reproducción de venados del *campus* San Luis Potosí del Colegio de Postgraduados.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio al menor tiempo transcurrido de recibidas para evitar cualquier degradación posible, el paso inicial fue la extracción de ADN genómico mediante el *kit* comercial DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN (Cat. No. 69506) apegándose al instructivo y especificaciones correspondientes. El protocolo para la preparación de las muestras consistió de las acciones siguientes:

De cada muestra se pesaron 25 mg de tejido que fueron troceados con bisturí y aguja de disección sobre un portaobjetos. Los 25 mg de la muestra se depositaron en un tubo de 2 ml, agregando 180 µl del buffer ATL y 20 µl de proteinasa K agitando en vortex, e incubando a 56°C hasta que el tejido estuvo lisado. Posteriormente se agregaron 200 µl de buffer AL con una nueva agitación, añadiendo 200 µl de etanol (96-100%) agitando nuevamente. A la mezcla obtenida se le colocó en una columna con tubo de colecta, se centrifugó a 8000 rpm, la columna se transfirió en un nuevo tubo colector y se añadieron 500 µl de buffer AW1, se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 8000 rpm. La columna se colocó en

un tubo nuevo y se agregaron 500 µl de buffer AW2, se centrifugó por 3 minutos a 14000 rpm. Para obtener el ADN genómico se colocó la columna en un tubo nuevo de 2 ml, se le agregaron 100 µl de buffer AE directamente sobre el centro de la columna, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm (dos pasos) para obtener el ADN genómico en un volumen aproximado de 200 µl.

AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO *D-Loop* DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADNmt

A partir del ADN genómico obtenido de cada muestra, se realizó la amplificación del fragmento D-Loop de la región control del ADNmt mediante el protocolo descrito por Logan-López *et al.* (2007) y Calderón (2009) a través del procedimiento PCR (Reacción en Cadena de Polimerasa) el cual se describe a continuación.

En un volumen total de 25 µl:

- 13.8 µl de agua ultra pura
- 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' ATCGCCCACTCTTTCCTCTT3' y DLR 3' TCAGTGCCTTGCTTTATTGT5')
- 0.2 µl de Taq polimerasa (1U)
- 2.5 µl de ADN genómico (125 ng aprox.).

La PCR se realizó bajo la siguiente programación en el termociclador:

- Activación de la polimerasa a 95° C por 3 minutos
- Desnaturalización 95° C por 30 seg
- Alineamiento 55°C por 30 seg
- Polimerización 72° C por 30 seg

La correcta ejecución de la PCR se verificó mediante gel de agarosa al 1.5% con marcador de peso molecular de 1000 pares de bases en cámara de electroforesis a 100 volts por 40 min.

Previo a la secuenciación de los productos de PCR, éstos fueron cuantificados mediante un espectrofotómetro *Thermo Scientific NanoDrop ND-2000 1-position Spectrophotometer* del laboratorio de Huella Genética, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, campus Montecillo.

Los productos de PCR cuantificados se enviaron a la empresa MacroGen (Corea) para obtener la secuencia del fragmento de la región control de ADNmt de cada una de las muestras de tejido de venado cola blanca.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La diversidad genética se definió dentro y entre subespecies (poblaciones) por medio del cálculo de los índices de diversidad haplotípica (***h***) y de diversidad nucleotídica (***π***). La estructura genética se definió mediante la estimación del índice de fijación (***F_{ST}***) y el flujo genético (***M***). La relación filogenética se determinó por medio del método de distancia genética máxima verosimilitud y *Neighbor-Joining* (Castillo *et al.*, 2007).

DIVERSIDAD GENÉTICA

Para determinar la diversidad genética 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 subespecie (población), se estimó el índice de diversidad haplotípica (***h***, probabilidad de encontrar dos haplotipos diferentes en la muestra). 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 tamaño de muestra y ***P_i*** es la frecuencia haplotípica. Con este índice se calcula la frecuencia de las variantes haplotípicas en una población (Schneider *et al.*, 2000).

Este análisis se realizó usando el programa Arlequín versión 3.5.1.3 (Excoffier *et al.*, 2007).

También se calculó la diversidad nucleotídica (probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes) (Excoffier *et al.*, 2007), 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 $\hat{\pi}$ 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 *et al.*, 2007).

ÍNDICE DE FIJACIÓN (F_{ST})

El índice de fijación, F_{ST} ó Φ_{ST} , es una medida de estructura o diferenciación genética que representa como se encuentra distribuida la variabilidad genética y toma valores de 0 a 1. Si F_{ST} es igual o muy cercano a cero, indica que las frecuencias alélicas son idénticas en todas las poblaciones o que no ha existido diferenciación entre ellas, en otras palabras, la variabilidad genética se encuentra distribuida de forma homogénea en todas las poblaciones. Si por el contrario, F_{ST} es igual o cercano a uno, las poblaciones se encuentran fijadas en alelos diferentes, las frecuencias alélicas son totalmente distintas, en otras palabras, la variabilidad se encuentra de forma heterogénea entre las poblaciones (Chassin, 2000; Eguiarte *et al.*, 2007). F_{ST} se puede definir como:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

Donde F_{ST} es el índice de fijación; σ_a^2 es la covarianza entre grupos y σ_T^2 es la covarianza total (Excoffier *et al.*, 2007).

FLUJO GENÉTICO (M)

El flujo genético se define como el número de migrantes entre dos poblaciones por generación. Asume que dos poblaciones intercambian una fracción de migrantes en cada generación. Si el flujo entre poblaciones es alto, entonces todas ellas evolucionan de manera conjunta, pero si es muy bajo, estas poblaciones comienzan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y a la divergencia en linajes evolutivamente independientes (Slatkin, 1994; Eguiarte *et al.*, 2007; Excoffier *et al.*, 2007).

$$M = \frac{1 - F_{ST}}{2F_{ST}}$$

Donde M es el número de migrantes entre la población en una generación y F_{ST} es el índice de fijación.

RED DE HAPLOTIPOS

La red de haplotipos se desarrolló mediante el programa de computo TCS “*Phylogenetic network estimation using statistical parsimony*” (Clement *et al.*, 2000), utilizando el algoritmo de Templeton *et al.* (1992), el cual estima el número máximo de diferencias de pares de bases entre secuencias, atribuibles a una serie de mutaciones únicas en cada sitio de la secuencia; el programa no conecta a la red los haplotipos que difieren por un número de pares de bases que exceda dicho límite; el algoritmo conecta los haplotipos que difieren por una sola mutación, enseguida los que difieren por dos, luego tres y así sucesivamente, hasta que se alcance el límite o hasta que se unan todos los haplotipos (Vázquez *et al.*, 2009).

RESULTADOS

ORIGEN GEOGRÁFICO DE HAPLOTIPOS

La distribución de los puntos de origen geográfico de las muestras a partir de las cuales se obtuvieron los haplotipos fue como se muestra en la serie de Figuras 2 a 5. A partir del análisis de las 47 secuencias de las muestras originales (*O. v. texanus* (n=16), *O. v. veraecrucis* (n=17), *O. v. thomasi* (n=4) y *O. v. yucatanensis* (n=10)) se obtuvieron mediante el programa DNAsp5, 46 haplotipos para las cuatro subespecies.

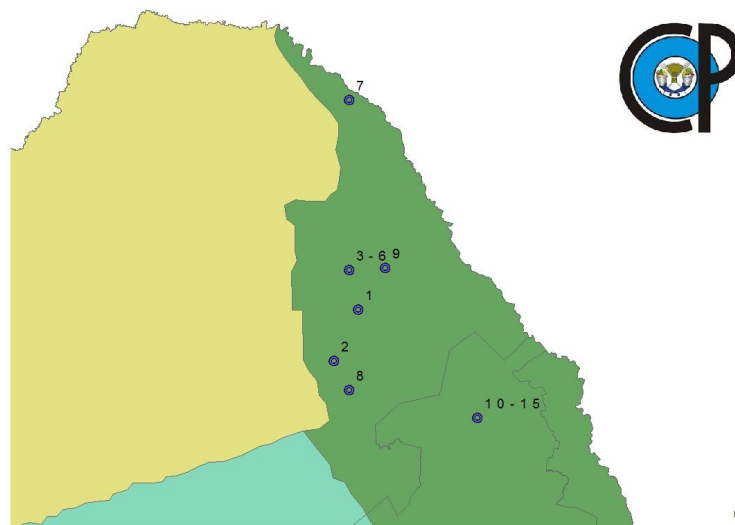


Figura 2. Origen geográfico de los haplotipos (1-15) dentro del área de distribución de *O. v. texanus* (verde).

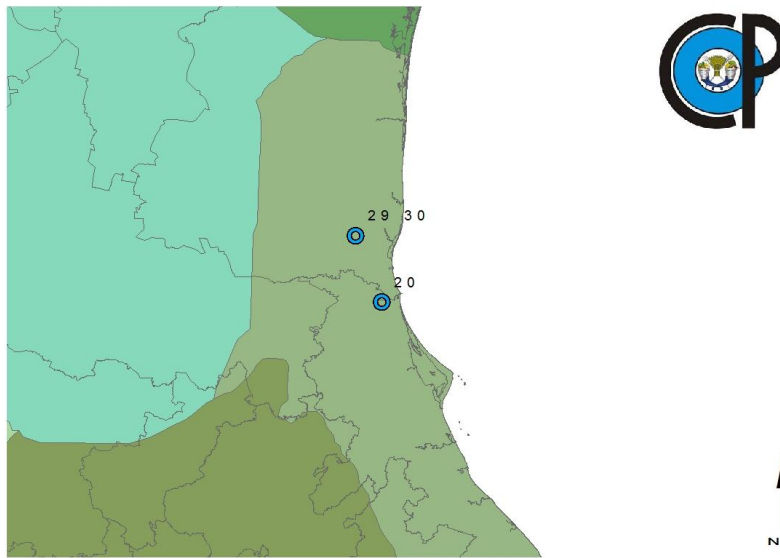


Figura 3. Origen geográfico de los haplotipos (20, 29 y 30) de la porción sur del área de distribución de *O. v. veraecrucis* (Tamaulipas y norte de Veracruz) (gris).

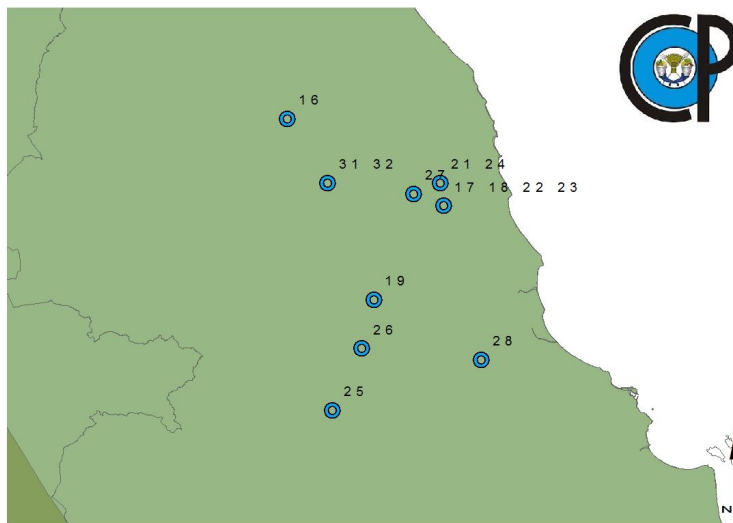


Figura 4. Origen geográfico de los haplotipos (16-19, 21-28, 31 y 32) dentro de la parte centro del área de distribución de *O. v. veraecrucis* (centro de Veracruz).

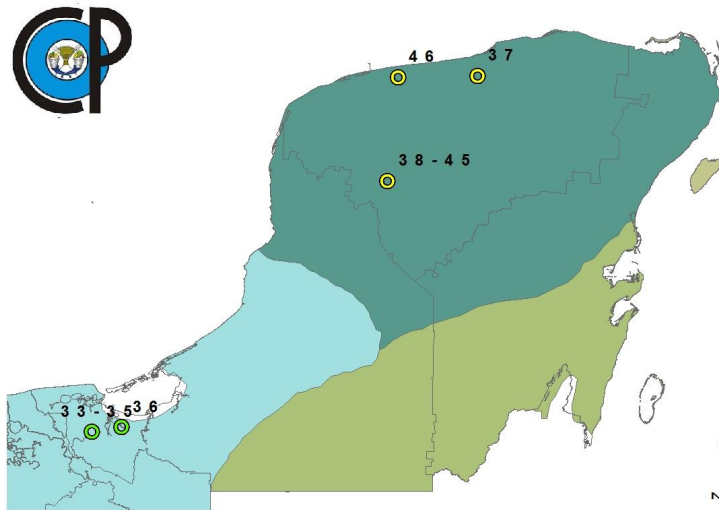


Figura 5. Origen geográfico de los haplotipos 33 - 36 dentro del área de distribución de *O. v. thomasi* (azul claro) y de los haplotipos 37 – 46 en la distribución de *O. v. yucatanensis* (azul oscuro).

FRAGMENTO *D-Loop* DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADN MITOCONDRIAL

El fragmento obtenido a partir de la amplificación por PCR de cada una de las 47 muestras después del alineamiento y edición en el programa MEGA 6, por medio del método ClustalW fue de 468 pares de bases, con 73 sitios conservados.

La composición de nucleótidos de las 47 secuencias, existieron en promedio 93.7 transiciones y 96.2 transversiones. Las secuencias del fragmento *D-Loop* del ADNmt de las subespecies estudiadas estuvieron compuestas en mayor porcentaje por timinas y adeninas, en menor por guaninas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición nucleotídica de cuatro subespecies de venado cola blanca en la región del Golfo de México. C = citosina, T = timina, A = adenina y G = guanina.

Subespecie	Nucleótido (%)			
	C	T	A	G
<i>O. v. texanus</i>	22.37	31.27	30.36	16.00
<i>O. v. veraecrucis</i>	22.99	31.23	30.23	15.55
<i>O. v. thomasi</i>	23.33	29.86	30.46	16.36
<i>O. v. yucatanensis</i>	23.80	29.34	29.79	17.07

DIVERSIDAD GENÉTICA

De las 47 secuencias obtenidas a partir de las muestras originales se obtuvieron los haplotipos, de los cuales únicamente uno fue compartido dentro de la subespecie *O. v. texanus*, por lo que el análisis fue con base a 46 haplotipos en total. Entre subespecies no se comparten haplotipos. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diversidad de haplotipos dentro y entre 4 subespecies en la región del Golfo de México.

Subespecie	<i>O. v. texanus</i>	<i>O. v. veraecrucis</i>	<i>O. v. thomasi</i>	<i>O. v. yucatanensis</i>
Secuencias analizadas	16	17	4	10
Haplotipos identificados	15	17	4	10
Haplotipos compartidos entre subespecies	0	0	0	0
Haplotipos compartidos dentro de subespecies	1	0	0	0

El valor estimado de h es muy cercano a uno, los haplotipos son distintos tanto dentro como entre subespecies excepto para *O. v. texanus* que es de 0.9917 ya que como se mencionó se comparte únicamente un haplotipo en esta subespecie. La diversidad nucleotídica (π) es variable entre las subespecies, existiendo una mayor variabilidad de nucleótidos en *O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) de 4 subespecies de la región Golfo de México.

Subespecies	N	Haplotipos	h	π
<i>O. v. texanus</i>	16	15	0.9917	0.050091
<i>O. v. veraecrucis</i>	17	17	1	0.086381
<i>O. v. thomasi</i>	4	4	1	0.120715
<i>O. v. yucatanensis</i>	10	10	1	0.347973
Total	47	46	0.9979	0.15129

ESTRUCTURA DE LAS POBLACIONES

Del análisis de Varianza Molecular (AMOVA) se obtuvo 19.78 % de variación genética entre subespecies y 80.22 % de variación dentro de las subespecies. El índice de fijación (F_{ST}) fue significativo y diferente de cero (0.19781, $P < 0.05$) lo que indicó diferenciación genética entre las subespecies (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma Cuadrados	Porcentaje de Variación
Entre subespecies	3	336.860	19.78
Dentro de subespecies	43	1302.395	80.22
Total	46	1639.255	

Las subespecies con mayor cercanía genética de acuerdo con el F_{ST} fueron *O.v. thomasi* y *O.v. yucatanensis* y las más alejadas entre sí fue la primera con *O.v. texanus*, con valores de F_{ST} de 0.00058 y 0.36635, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores poblacionales de F_{ST} pareados (debajo de la diagonal) y de flujo genético M (sobre la diagonal) para comparaciones entre cuatro subespecies de *Odocoileus virginianus*.

Subespecie	<i>O.v. texanus</i>	<i>O.v. veraecrucis</i>	<i>O.v. thomasi</i>	<i>O.v. yucatanensis</i>
<i>O.v. texanus</i>		2.57069	0.86481	1.45378
<i>O.v. veraecrucis</i>	0.16283		1.89683	1.81682
<i>O.v. thomasi</i>	0.36635	0.20861		infinito
<i>O.v. yucatanensis</i>	0.25591	0.21581	0.00058	

Las subespecies con mayor flujo genético ($P < 0.05$) fueron *O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis* y aquellas con menor flujo compartido *O. v. texanus* y *O. v. thomasi*; con valores de M en el primer caso hacia el infinito y para las de menor flujo 0.64888 (Cuadro 6).

ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los análisis filogenéticos mediante los métodos de máxima verosimilitud y *Neighbor-Joining* mostraron un agrupamiento similar, siendo las subespecies de más al sur (*O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis*), las secuencias más conservadas y a partir de las cuales se diverge hacia las demás secuencias analizadas. Con respecto a las subespecies *O. v. texanus* y *O. v. veraecrucis*, la agrupación de ambas es compartida dentro y entre clados.

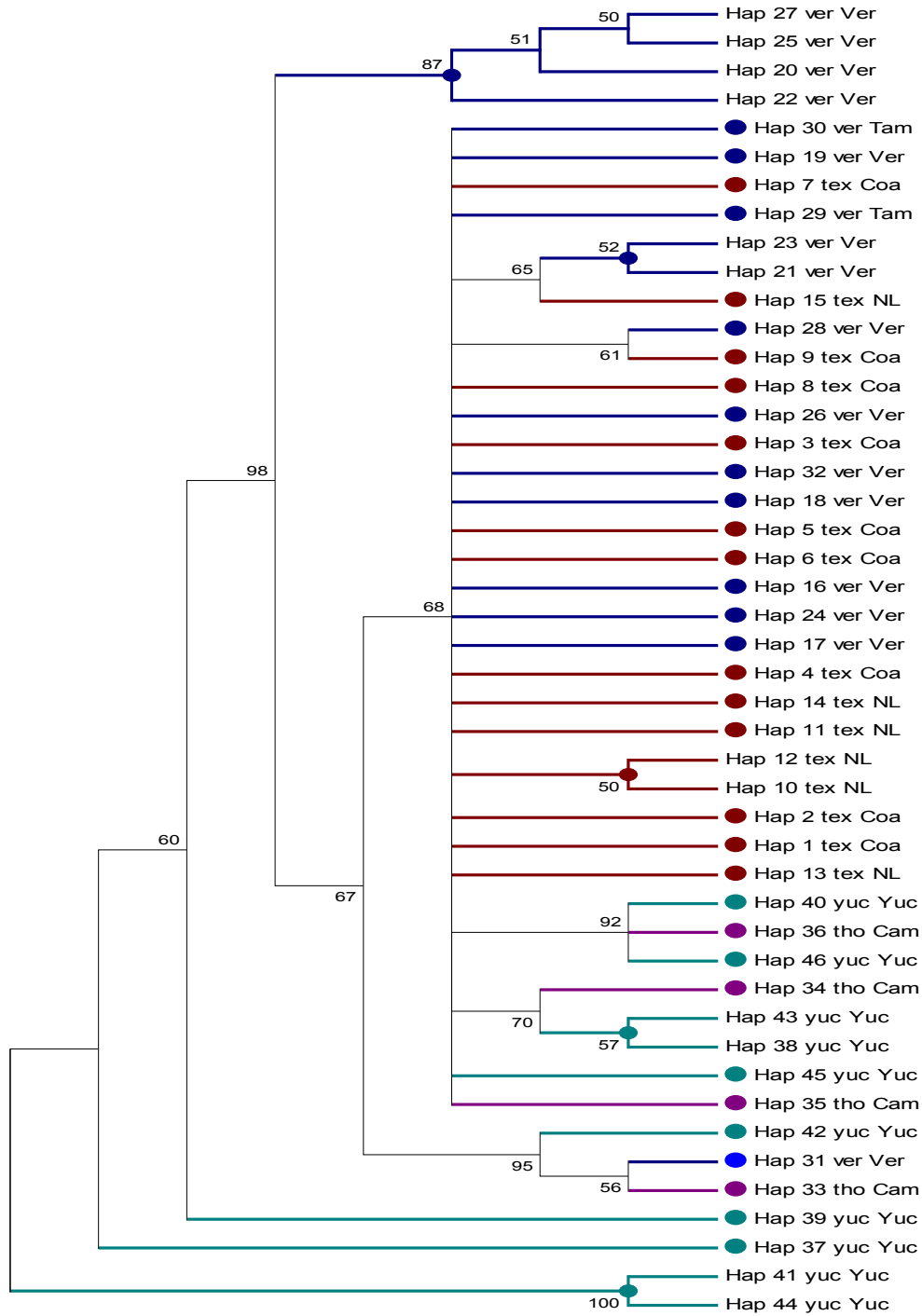


Figura 6. Análisis filogenético de 46 haplotipos obtenido por el método de Máxima verosimilitud. Las distancias evolutivas fueron calculadas con base en el modelo Tamura 3-parámetros. La tasa de variación entre sitios fue modelada con la distribución *Gamma*. Los números en las bifurcaciones representan los porcentajes de 1000 réplicas de *bootstrap*, sólo se muestran los valores mayores a 50 %. Las posiciones que contenían datos perdidos fueron eliminadas.

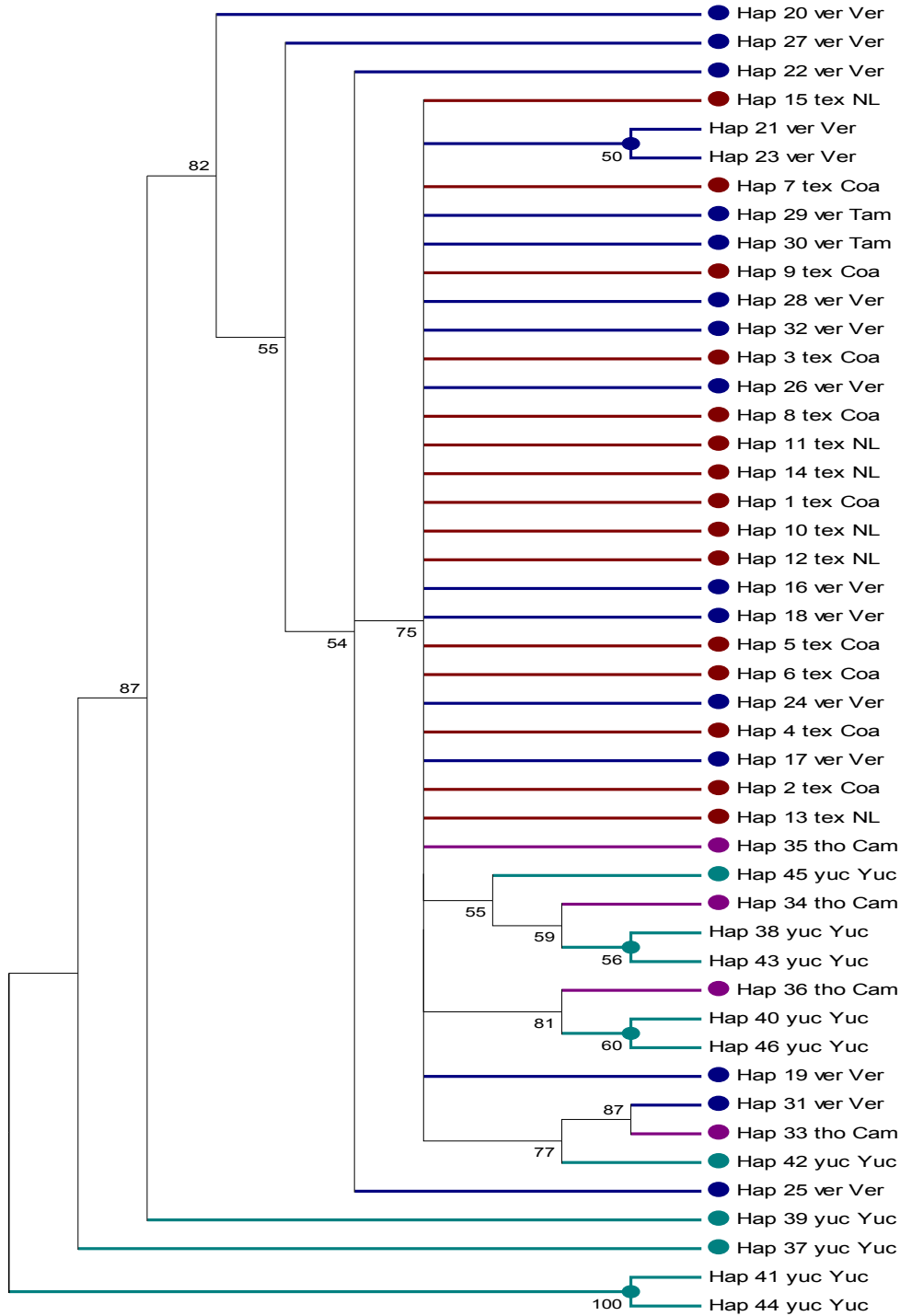


Figura 7. Análisis filogenético de 46 haplotipos obtenido por el método de *Neighbor-Joining*. Las distancias evolutivas fueron calculadas con base en el modelo Tamura 3-parámetros. La tasa de variación entre sitios fue modelada con la distribución *Gamma*. Los números en las bifurcaciones representan los porcentajes de 1000 réplicas de *bootstrap*, sólo se muestran los valores mayores a 50 %. Las posiciones que contenían datos perdidos fueron eliminadas.

RED DE HAPLOTIPOS

En total se ligaron 14 haplotipos, el haplotipo 17 (subespecie *O. v. veraecrucis*) fue el nodo convergente de cinco haplotipos de la misma subespecie y de ocho de la subespecie *O. v. texanus*. Los haplotipos 1 y 2 de la subespecie *O. v. texanus* están unidos por una ligadura con tres pasos mutacionales (Figura 8). Aquellos haplotipos ligados en la red que presentan pocas mutaciones, son muy cercanos en distribución y/o el número de muestra es suficiente para el espacio geográfico. Los haplotipos con varios pasos mutacionales puede ser indicativo de que los mismos tuvieron un intervalo de tiempo muy amplio que permitió la dispersión en varias poblaciones (Vázquez *et al.*, 2009).

En la red de haplotipos desarrollada no se registró conexión en entre 5 y 11 haplotipos de *O. v. texanus* y de *O. v. veraecrucis*, respectivamente; prácticamente ninguno de los haplotipos de *O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis* registraron conexión entre ellos ni entre subespecies. Una red con haplotipos sin conexiones con otros puede responder a diferentes factores entre ellos: a una muestra de tamaño reducido, los individuos colectados son de zonas geográficamente aisladas y sin aporte en la muestra de individuos de zonas geográficas aledañas a esta zonas extremas, ocasionando la ausencia de información genética intermedia o bien presencia de huecos geográficos en la distribución del taxón; y, el número de mutaciones supera el límite de parsimonia (Vázquez *et al.*, 2009).

La red de haplotipos de la Figura 8, presenta un arreglo que podría interpretarse de la forma siguiente: hacia el cuadrante superior izquierdo se agrupan los haplotipos de la subespecie *O. v. texanus*; en el cuadrante superior derecho los haplotipos de *O. v. veraecrucis*; y, en el cuadrante inferior derecho en dos subgrupos, las subespecies *O. v. thomasi* con 4 haplotipos y *O. v. yucatanensis* con 10 haplotipos.

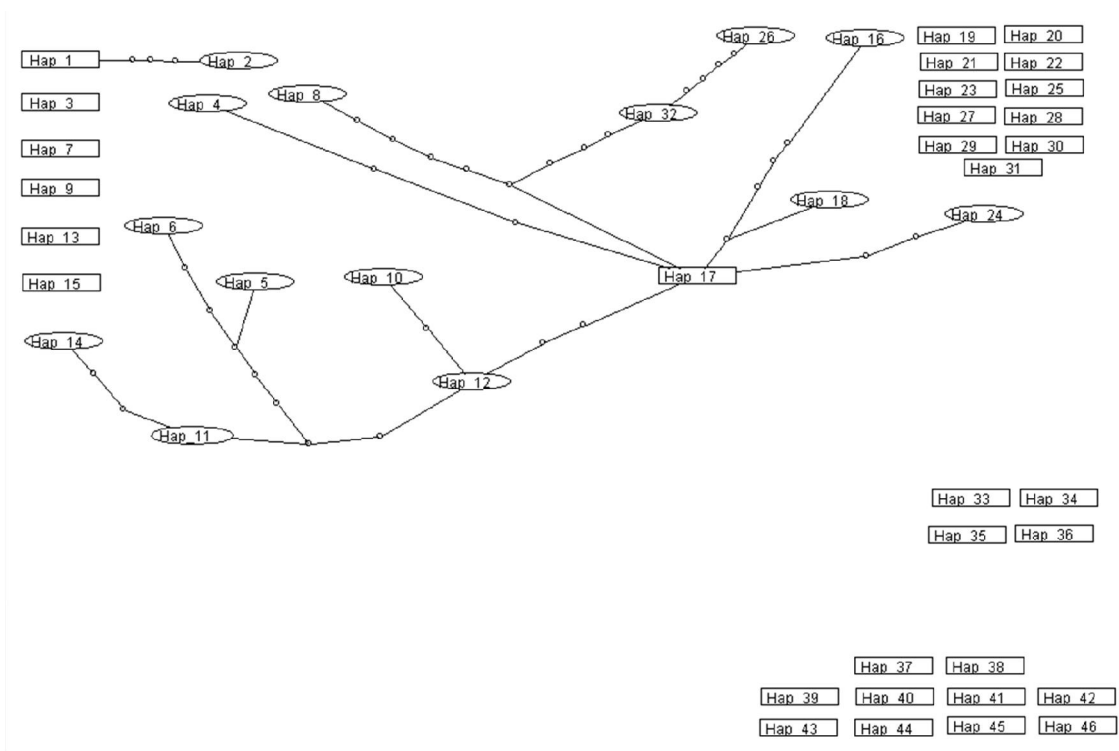


Figura 8. Red de haplotipos de cuatro subespecies de venado cola blanca. Red generada con el programa TCS.

DISCUSIÓN

La cantidad de muestras analizadas para la presente investigación supera lo indicado por Hale et al., (2012) para definir estudios genéticos de una población animal, por lo que las observaciones presentan un grado de certidumbre adecuado. En otras investigaciones con un menor (Moscarella et al., 2003) o similar (Hernández, 2014) número de muestras analizadas han propuesto tesis sobre la diversidad genética del venado cola blanca para regiones distintas a la que se realizó en la presente investigación. Ambos autores advierten que una limitación en la obtención de resultados confiables puede ser el número de muestras para cada una de las subespecies analizadas.

La distribución geográfica de las subespecies tratadas en esta investigación según lo indicado por Hays, (1872), Mearns, (1898), Merriam, (1898) y Goldman y Kellog, (1940) coincide con el origen de las muestras colectadas. El grado de semejanza y disimilitud fenotípica coincide en la cercanía geográfica de las subespecies según lo indicado por Schmidt y Gilbert, (1978) la cual sugiere que entre subespecies más lejanas hay una mayor posibilidad de identificar diferencias fenotípicas.

La diversidad genética del venado cola blanca es homogénea, tanto entre las subespecies de la región del Golfo de México estudiadas en la presente investigación así como en otras investigaciones en México, tal es el caso de Ambriz, (2012) quien obtuvo $h=0.984$ y $\pi=0.09735$ para *O. v. mexicanus*, *O. v. sinaloe* y *O. v. acapulcensis*; Hernández, (2014) reportó $h=0.98598$ y $\pi=0.08276$ para *O. v. miquihuanensis*, *O. v. couesi* y *O. v. mexicanus*. Para la misma especie pero en Venezuela, Moscarella et al., (2003) estiman $h=0.988$ y $\pi=0.026$ para *O. v. goudotti*, *O. v. margaritae* y *O. v. gymnotis*.

La menor diversidad nucleotídica de *O. v. texanus* en la presente investigación puede deberse como es referido por Logan et al., (2007) a que la diversidad genética de esta subespecie se ha erosionando debido a la fuerte presión de selección de individuos con características superiores para fines cinegéticos.

La diversidad genética para otros cérvidos es variable aunque conserva la tendencia de altas en h y más bajas en π , citando por ejemplo: el ciervo almizclero enano (*Moschus berezovskii*) en china, en su población más diversa $h=0.836$ y $\pi=0.0568$ (Peng et al., 2009); el venado sika (*Cervus nippon*) $h=0.98$ y $\pi=0.014$ (Nagata et al.,

1999); Wiehler y Tiedemann, (1998) para el corzo europeo (*Capreolus capreolus*) informan $h = 0.94$ y $\pi = 0.097$ subrayando que esto puede deberse a que las poblaciones se encuentran pasando por un cuello de botella iniciado durante la glaciación del pleistoceno.

Para otras especies de fauna silvestre los valores son más variables, por ejemplo: el cóndor de california $h = 0.524$ y $\pi = 0.00333$ (Adams y Villablanca, 2007); el bonobo (*Pan paniscus*) en el Congo $h = 0.694 - 0.980$ y $\pi = 0.0116 - 0.0256$ (Kawamoto *et al.*, 2013).

La distribución homogénea y el alto intercambio genético en cada generación entre *O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis* con base en los índices de fijación y migración indican que estas subespecies históricamente distintas, pueden considerarse como una unidad evolutiva significativa, aunque no existe un claro soporte para conjuntar a estas dos subespecies en una sola. Es conveniente realizar investigaciones más puntuales con esfuerzos exhaustivos con el fin de poder discernir las diferencias o similitudes para realizar aseveraciones como es el caso de Ellsworth *et al.*, (1994) quienes objetan las divisiones taxonómicas para las subespecies de venado cola blanca del sureste de Estados Unidos.

El análisis filogenético sitúa a las secuencias de *O. v. yucatanensis* como ancestrales de entre las secuencias para las cuatro subespecies, su posición al origen y a partir de donde diverge el cladograma, permite apoyar la tesis de Geist, (1998) que el centro de origen del venado cola blanca es Centro América. El resultado de la red de haplotipos es consistente en relación a que las subespecies más entrecruzadas son las del centro y más al norte de la distribución estudiada. El análisis filogenético refiere a *O. v. yucatanensis* y *O. v. thomasi* como las subespecies más agrupadas y a partir de las cuales se diverge a las siguientes dos subespecies, lo cual puede deberse a que la especiación en mamíferos requiere en promedio dos millones de años y las condiciones presentes en el periodo del Pleistoceno (1.5 millones de años) jugaron un papel importante en el inicio de la diferenciación filogeográfica (Johns y Avise, 1998), por lo que las subespecies no han divergido para poder diferenciarse.

Tanto las instancias encargadas de la vida silvestre en México como es el caso de la Dirección General de Vida Silvestre, además de los propietarios de UMAS y gestores, deben reconocer y valorar la importancia del hábitat particular como

moldeador para el desarrollo de características particulares y distintivas de cada subespecie, esto como medio para la reglamentación que impida la translocación de organismos entre distribuciones geográficas naturales, entendiendo que cada organismo tiene un potencial genético *per se* que debe ser expresado y aprovechado sólo mediante un manejo ambiental óptimo.

Los gestores para la actividad cinegética en México deben buscar opciones para validar como trofeo a cada subespecie y crear incentivos que las hagan atractivas con el fin de que los exhaustivos trabajos de mejora para trofeos se encuentren enfocados para cada subespecie la cual ya no sería desplazada por individuos únicamente de la subespecie *texanus*, sin perder de vista que la mejora no debe contemplar la eliminación de material genético mediante la extirpación de individuos que no cumplan con los estándares establecidos para la cacería.

CONCLUSIÓN

1. La variabilidad genética de las subespecies *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis* en la región Golfo de México, fue descrita a partir de la región control del ADNmt.
2. Las subespecies de venado cola blanca en la región Golfo de México presentaron relación filogeográfica y diferenciación genética.
3. Con base en los resultados de la presente investigación, *O. v. thomasi* y *O. v. yucatanensis* pueden considerarse como una Unidad Evolutiva Significativa.
4. La subespecie *O. v. texanus* tiene un grado de erosión genética ocasionada por factores antropocéntricos.
5. La presente investigación contribuye al establecimiento de las bases que definan nuevas y mejores estrategias para la conservación y el manejo del venado cola blanca en México y que permitan además la preservación del material genético original de cada subespecie, evitando primordialmente la translocación de individuos fuera de su distribución original.

LITERATURA CITADA

- Adams, M.S., Villablanca, F.X., 2007. Consequences of a genetic bottleneck in California condors: a mitochondrial DNA perspective. *Ser. Ornithol. Condors 21st Century* 2, 35.
- Ambriz, P., 2012. Evolución del polimorfismo mitocondrial en subespecies de venado cola blanca *Odocoileus virginianus* del Estado de Michoacán México. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Anderson, J.D., Honeycutt, R.L., Gonzales, R.A., Gee, K.L., Skow, L.C., Gallagher, R.L., Honeycutt, D.A., DeYoung, R.W., 2002. Development of Microsatellite DNA Markers for the Automated Genetic Characterization of White-Tailed Deer Populations. *J. Wildl. Manag.* 66, 67–74. doi:10.2307/3802872
- Avise, J.C., 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Avise, J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* 36, 3–15. doi:10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
- Baker, R.H., 1984. Origin, classification and distribution, in: Halls, L.K. (Ed.), *White-Tailed Deer: Ecology and Management*. Stackpole Books, Harrisburg, PA, pp. 1–18.
- Broders, H.G., Mahoney, S.P., Montevecchi, W.A., Davidson, W.S., 1999. Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada. *Mol. Ecol.* 8, 1309–1315.
- Brokx, P.A., 1984. South America, in: Halls, L.K. (Ed.), *White-Tailed Deer: Ecology and Management*. Stackpole Books, Harrisburg, PA, pp. 525–564.
- Brumfield, R.T., Beerli, P., Nickerson, D.A., Edwards, S.V., 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol. Evol.* 18, 249–256. doi:10.1016/S0169-5347(03)00018-1

- Castillo, C., Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X., Instituto Nacional de Ecología (Mexico), U.N. de M., Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (México), 2007. La selección natural a nivel molecular, in: Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Universidad Nacional Autónoma de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y la Biodiversidad, México, D. F.
- Chassin, o. N., 2000. Estructura genética y conservación de la tortuga negra *Chelonia agassizi* en el Pacífico mexicano (nforme final SNIB- CONABIO proyecto No. L166 No. L116). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología., México D. F.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657–1659.
- Crandall, K.A., Posada, D., Vasco, D., 1999. Effective population sizes: missing measures and missing concepts. *Anim. Conserv.* 2, 317–319.
- De la Rosa-Reyna, X.F., Calderón-Lobato, R.D., Parra-Bracamonte, G.M., Sifuentes-Rincón, A.M., Deyoung, R.W., García-De León, F.J., Arellano-Vera, W., 2012. Genetic diversity and structure among subspecies of white-tailed deer in Mexico. *J. Mammal.* 93, 1158–1168. doi:10.1644/11-MAMM-A-212.2
- Demarais, S., Krausman, P.R. (Eds.), 2000. Ecology and management of large mammals in North America. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- DeYoung, R.W., Honeycutt, R.L., Brennan, 2005. The Molecular Toolbox: Genetic Techniques in Wildlife Ecology and Management. *J. Wildl. Manag.* 69, 1362–1384. doi:10.2193/0022-541X(2005)69[1362:TMTGTI]2.0.CO;2
- Douzery, E., Randi, E., 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Mol. Biol. Evol.* 14, 1154–1166.
- Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X., Instituto Nacional de Ecología (Mexico), U.N. de M., Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (México), 2007. Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Universidad Nacional

Autónoma de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y la Biodiversidad, México, D. F.

- Ellegren, H., 2000. Microsatellite mutations in the germline:: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16, 551–558.
- Ellsworth, D.L., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Klimstra, W.D., Silvy, N.J., 1994. Historical biogeography and contemporary patterns of mitochondrial DNA variation in white-tailed deer from the southeastern United States. *Evolution* 48, 122+.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2007. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinforma.* 1, 0–0. doi:10.4137/EBO.S0
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Fernández, M.H., Vrba, E.S., 2005. A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. *Biol. Rev.* 80, 269–302. doi:10.1017/S1464793104006670
- Frankham, R., Briscoe, D.A., Ballou, J.D., 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK; New York.
- Geist, V., 1998. *Deer of the World: Their Evolution, Behaviour, and Ecology.* Stackpole Books.
- Goldman, E.A., Kellog, R., 1940. Ten New White-Tailed Deer From North and Middle America, in: *Proceedings of the Biological Society of Washington.* Biological Society of Washington, Washington, pp. 81–90.
- Goldschmidt, R., 1940. *The Material Basis of Evolution.* Yale University Press.
- Hale, M.L., Burg, T.M., Steeves, T.E., 2012. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies: 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLoS ONE* 7, e45170. doi:10.1371/journal.pone.0045170

- Halls, L.K. (Ed.), 1984. White-tailed deer: ecology and management. Stackpole Books, Harrisburg, PA.
- Hays, W.J., 1872. Description of a Species of Cervus, in: Annals of the Lyceum of Natural History of New York. New-York :, pp. 218, 219.
- Hedrick, P.W., 2000. Genetics of populations, 2nd ed. ed. Jones and Bartlett Publishers, Boston.
- Hernández, A.R., 2014. Variabilidad Genética y Relación Filogeográfica de tres subespecies de Venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus*) en la Región Centro-Norte de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados.
- Honeycutt, R.L., 2000. Genetic Applications for Large Mammals, in: Demarais, S., Krausman, P.R. (Eds.), Ecology and Management of Large Mammals in North America. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, pp. 233–259.
- Johns, G.C., Avise, J.C., 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1481–1490.
- Kawamoto, Y., Takemoto, H., Higuchi, S., Sakamaki, T., Hart, J.A., Hart, T.B., Tokuyama, N., Reinartz, G.E., Guislain, P., Dupain, J., Cobden, A.K., Mulavwa, M.N., Yangozene, K., Darroze, S., Devos, C., Furuichi, T., 2013. Genetic Structure of Wild Bonobo Populations: Diversity of Mitochondrial DNA and Geographical Distribution. *PLoS ONE* 8, e59660. doi:10.1371/journal.pone.0059660
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., Ménsua Fernández, J.L., 2006. Conceptos de genética. Prentice Hall, Madrid [etc.].
- Kurtén, B., Anderson, E., 1980. Pleistocene mammals of North America. Columbia University Press, New York.
- Lang, B.F., Gray, M.W., Burger, G., 1999. Mitochondrial Genome Evolution and the Origin of Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 33, 351–397. doi:10.1146/annurev.genet.33.1.351

- Leopold, A.S., 1977. Fauna silvestre de México: aves y mamíferos de caza. Editorial Paz Mexico: Ediciones del Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, Mexico, D.F.
- Logan, K., Cienfuegos, E., Sifuentes, A., Gonzáles, M., Clemente, F., Mendoza, G., Tarango, L., 2007. Patrones de variación genética en cuatro subespecies de venado cola blanca del noreste de México. *Agrociencia* 41, 13–21.
- Marshall, J.A.M., Shetty, S., 2001. Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J. Exp. Zool.* 290, 449–462. doi:10.1002/jez.1088
- Mearns, E.A., 1898. Description of a new deer (*Dorcelaphus texanus*) from Texas and northern Mexico, in: *Proceedings of the Biological Society of Washington*. pp. 23–26.
- Merriam, C.H., 1898. The Earliest Generic Name for the North American Deer, With descriptions of Five New Species and Subspecies, in: *Proceedings of the Biological Society of Washington*. Biological Society of Washington, Washington, pp. 99–104.
- Moscarella, R.A., Aguilera, M., Escalante, A.A., 2003. Philogeography, Population Structure, and Implications for Conservation of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) in Venezuela. *J. Mammal.* 84, 1300–1315. doi:10.1644/BRB-028
- Nagata, J., Masuda, R., Tamate, H.B., Hamasaki, S., Ochiai, K., Asada, M., Tatsuzawa, S., Suda, K., Tado, H., Yoshida, M.C., 1999. Two Genetically Distinct Lineages of the Sika Deer, *Cervus nippon*, in Japanese Islands: Comparison of Mitochondrial D-Loop Region Sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 511–519.
- Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Owen, O.S., 2000. *Conservación de recursos naturales*. : Editorial Pax-México, México.

- Peng, H., Liu, S., Zou, F., Zeng, B., Yue, B., 2009. Genetic diversity of captive forest musk deer (*Moschus berezovskii*) inferred from the mitochondrial DNA control region. *Anim. Genet.* 40, 65–72. doi:10.1111/j.1365-2052.2008.01805.x
- Primmer, C.R., Borge, T., Lindell, J., Sætre, G.-P., 2002. Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Mol. Ecol.* 11, 603–612. doi:10.1046/j.0962-1083.2001.01452.x
- Proudfoot, G.A., Honeycutt, R.L., Slack, R.D., 2006. Mitochondrial DNA Variation and Phylogeography of the Ferruginous Pygmy-Owl (*Glaucidium brasilianum*). *Conserv. Genet.* 7, 1–12. doi:10.1007/s10592-005-5080-1
- Randi, E., Mucci, N., Claro-Hergueta, F., Bonnet, A., Douzery, E.J., 2001. A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Anim. Conserv.* 4, 1–11.
- Rivera-Ocasio, E., Aide, T.M., McMillan, W.O., 2002. Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinalis* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Mol. Ecol.* 11, 675–683.
- Schmidt, J.L., Gilbert, D.L. (Eds.), 1978. *Big game of North America: ecology and management*. Stackpole Books, Harrisburg, Pa.
- Slatkin, M., 1994. Flujo génico y estructura de las poblaciones. *Ecol. Genet.* 1–11.
- Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17, 6463–6471. doi:10.1093/nar/17.16.6463
- Templeton, A. R., 1986. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A., Sing, C.F., 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132, 619–633.
- Vázquez, E., 2007. Filogeografía y vertebrados, in: Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X. (Eds.), *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y

- Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología: Universidad Nacional Autónoma de México: Comisión Nacional para el Conocimiento y la Biodiversidad, México, D. F., pp. 441–466.
- Vázquez, E., Castañeda, S., Garrido, T., Gutiérrez, T.A., 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 82, 277–297.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., others, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414.
- Waddington, C.H., 1957. *The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical biology.* Allen & Unwin, London.
- Wallmo, O.C. (Ed.), 1981. *Mule and black-tailed deer of North America.* University of Nebraska Press, Lincoln.
- Wiehler, J., Tiedemann, R., 1998. Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial control region. *Acta Theriol. Suppl.* 5, 187–197.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.), 2005. *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*, 3rd ed. ed. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 97.