



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

Filogeografía de ocho subespecies de *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) del Pacífico Mexicano

RICARDO SERNA LAGUNES

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada *Filogeografía de ocho subespecies de Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) del Pacífico Mexicano, realizada por el alumno Ricardo Sema Lagunes 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. CARLOS MIGUEL BECERRIL PÉREZ



ASESOR: DR. CÉSAR CORTÉZ ROMERO



ASESOR: DR. CARLOS RAMÍREZ HERRERA



ASESOR: DR. JUAN SALAZAR ORTIZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre 2016.

FILOGEOGRAFÍA DE OCHO SUBESPECIES DE *Odocoileus virginianus* (ZIMMERMANN, 1780) DEL PACÍFICO MEXICANO

Ricardo Serna Lagunes, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

Odocoileus virginianus es un cérvido emblemático de los ecosistemas de México con interés económico por el sector cinegético. Sorprendentemente, existe conocimiento limitado de la diversidad genética y filogeografía de las subespecies. El objetivo del estudio fue caracterizar la diversidad y estructura genética, las relaciones filogenéticas y genealógicas de ocho subespecies de *O. virginianus* distribuidas en el Pacífico Mexicano, área donde son escasos los estudios de esta índole. En Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), se recolectó tejido de ocho subespecies de *O. virginianus*, del cual se extrajo ADN y se secuenció la región D-Loop del ADN_{mt} en 105 muestras. La relación de diversidad haplotípica y nucleotídica de las subespecies indicó recientes cuellos de botella, consistente con los valores negativos de la prueba de Tajima's D, mientras que la prueba *Mismatch distribution* evidenció extinción de linajes vía deriva génica. El AMOVA indicó que el 97.1% de la diversidad genética está alojada dentro de subespecies y un 2.9% de la variación genética está dispersa entre subespecies, diferenciando genéticamente a las subespecies ($F_{ST} = 0.02105$, $p < 0.05$), que fue corroborado por la disimilitud del MDS. El filograma de Máxima Parsimonia resolvió como clados monofiléticos a cada subespecie, diferenciando haplogrupos geográficos. La genealogía de genes (red de haplotipos) mostró que *O. v. acapulcensis* y *O. v. couesi* son haplotipos ancestrales que originaron haplotipos de *O. v. sinaloae*. No se detectó un patrón de aislamiento por distancia (Mantel test), esto por el limitado flujo génico entre subespecies. Se concluye que cada subespecie debe considerarse como Unidad Evolutiva Significativa (ESU) y como Unidad de Operativa de Conservación (OCU).

Palabras clave: venado cola blanca; red de haplotipos; cuello de botella; ADN_{mt}.

PHYLOGEOGRAPHY OF EIGHT SUBSPECIES OF *Odocoileus virginianus* (ZIMMERMANN, 1780) OF THE MEXICAN PACIFIC

Ricardo Serna Lagunes, Dr.
Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Odocoileus virginianus is a deer emblematic of Mexico ecosystem with economic interest by the hunting sector. Surprisingly, there is a limited understanding of the genetic diversity and phylogeography of subspecies that support management plans. The aim of the study was to characterize the genetic diversity and structure and the phylogenetic and genealogical relationships of eight subspecies of *O. virginianus* distributed in the Mexican Pacific, area where there have been no studies of this kind. In Management Units for the Conservation of Wildlife, tissue eight subspecies of *O. virginianus* was collected, from which DNA was extracted and the D-loop region of mtDNA in 105 samples was sequence. The ratio of haplotypic diversity and nucleotidic indicate recent bottlenecks, consistent with the test of neutrality Tajima's D, while the test "*Mismatch distribution*" showed the extinction of lineages via genetic drift. AMOVA indicated that over 97% of genetic diversity is housed within subspecies and only 2% of genetic variation is spread between subspecies, resulting genetic differentiation between subspecies ($F_{ST}= 0.02105$, $p < 0.05$), consistent with the dissimilarity reported by multidimensional scaling analysis. Maximum parsimony phylogram resolved as monophyletic groups each subspecies, differing geographical haplogroups. The genealogy of genes (phylogenetic network) showed that *O. v. acapulcensis* and *O. v. couesi* are ancestral haplotypes what originated haplotypes of *O. v. sinaloae*. A pattern of isolation by distance (Mantel test) was not detected, this for genetic flow limited among subspecies. We conclude that each subspecies should be considered as evolutionarily significant unit (ESU) and operative conservation (OCU) units with strategies particulars of conservation.

Key words: white-tailed deer; haplotype network; bottleneck; mtDNA.

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



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

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: 000000000166003**.



Colegio de Postgraduados, Campus San Luis Potosí.

SEMARNAT
SECRETARÍA DE
MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES



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

DEDICATORIA

Quien sobrevive no es el más fuerte ni el más inteligente, sino el que mejor se adapta al cambio (Charles Darwin)

Dedico esta tesis particularmente a mi familia, por todo el apoyo y cariño sincero que me brindan. En especial a mi Madre y Florentino ¡Los quiero!

Para mis amigos y colegas: Carlos Llarena, Aarón Toledo, Diego Gómez, Gabriel Cruz, Ivette Casas, Lázaro Guevara, Oscar Pérez, Pedro Zetina, Juan Salazar, Yolanda Murrieta†, porque siempre me dieron esas “palmaditas” de aliento, para seguir adelante.

A la familia Vega-Vela y a todos en Rancho Los Amigos, quienes han abierto un espacio en su corazón y su familia ¡les estimo!

Para los manejadores de venado cola blanca en México.

In memoriam

A mi abuelo Luis Serna, porque de pequeño, durante mis vacaciones en su rancho, me hizo comprender, la importancia de las especies en la naturaleza.

A Don Juan Vega, por transmitirme el sentimiento hacía la conservación de la vida silvestre.

AGRADECIMIENTOS

A toda la sociedad mexicana, que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), contribuyeron económicamente para mi formación como Doctor en Ciencias en el Colegio de Postgraduados. A estas instituciones y a su personal, brindo un reconocido agradecimiento.

A mi Consejo Particular, que intervino adecuadamente en mi formación, imprimiendo una visión multidisciplinaria para realizar estudios en el área biológico-agropecuaria.

Al Dr. Fernando Clemente Sánchez, que en todo momento guió satisfactoriamente mi plan académico y depositó su confianza en mí, para realizar este trabajo de investigación.

Al Dr. José Dávila, del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (UCLM-España), por enseñarme a “pensar” cómo se estudia la filogeografía y la genética de poblaciones, y por sus atinadas asesorías durante el trabajo de laboratorio.

A los propietarios, asesores técnicos y representantes legales de UMAs de venado cola blanca en México, mi más profundo agradecimiento por su colaboración en este estudio.

A la administración y personal académico del Campus San Luis Potosí 2014-2016, por facilitarme lo requerido para este trabajo.

Aquí debería ir una lista inmensa de amigos del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Campus Montecillo y amigos del Campus San Luis Potosí. Pero todos saben que por razones de formato, no se permite esa lista. Sin embargo, estoy seguro que al leer este párrafo “*podrán visualizar su nombre*”. Mil gracias a todos por brindarme su amistad y haberme hecho más amena mi estancia.

CONTENIDO

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	3
1.4 Preguntas de investigación	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Filogeografía	5
2.2 Concepto de subespecie.....	8
2.3 El ADN _{mt} : marcador molecular para estudios filogeográficos en Cérvidos.....	9
2.4 Estudios genéticos en subespecies de <i>O. virginianus</i>	11
2.5 Filogenia de Cérvidos y su relación con <i>O. virginianus</i>	16
2.5.1 <i>Odocoileus virginianus</i> (Zimmermann, 1780).....	17
2.5.2 Distribución geográfica	18
2.5.3 Subespecies de <i>O. virginianus</i> en América y México	20
2.5.4 Subespecies de <i>O. virginianus</i> sujetas de estudio.....	21
2.6 Manejo de las subespecies de <i>O. virginianus</i> en México	25
2.7 Problemática en el manejo de <i>O. virginianus</i>	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Área de estudio	30
3.2 Muestreo	30
3.3 Material biológico	32
3.4 Extracción de ADN: calidad y cantidad por tipo de tejido	33
3.5 Amplificación por PCR y secuenciación de la región D-loop	34
3.6 Análisis estadístico de datos haplotípicos	35
3.6.1 Análisis y alineamiento de las secuencias	35
3.6.2 Diversidad genética y patrones demográficos históricos de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano	36

3.6.3 Estructura genética entre y dentro de subespecies y por región geográfica de distribución en el Pacífico Mexicano	37
3.6.4 Relaciones filogenéticas de las subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano	38
3.6.5 Genealogía de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano	39
3.6.6 Aislamiento por distancia entre subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano	40
IV. RESULTADOS	41
4.1 Muestreo.....	41
4.2 Calidad y cantidad de ADN de tejidos de subespecies de <i>O. virginianus</i>	44
4.3 Características de las secuencias	45
4.4 Diversidad genética y patrones demográficos históricos de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano	46
4.5 Estructura genética entre y dentro de subespecies de <i>O. virginianus</i> y por región geográfica de distribución en el Pacífico Mexicano	49
4.6 Relaciones filogenéticas entre subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.....	54
4.7 Genealogía entre subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.....	59
4.8 Aislamiento por distancia entre subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.....	61
V. DISCUSIÓN	62
5.1 Muestreo	62
5.2 Calidad y cantidad de ADN	63
5.3 Diversidad genética y patrones demográficos de subespecies de <i>O. virginianus</i>	64
5.4 Estructura genética de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano....	66
5.5 Filogenia de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano	72
5.6 Genealogía en subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.....	73
5.7 Aislamiento por distancia entre subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.....	75
VI. CONCLUSIONES	77
VII. LITERATURA CITADA	78

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Indicadores de diversidad genética reportados en la literatura para <i>O. virginianus</i> analizando la región D-loop del ADN _{mt}	14
Cuadro 2. Características de las subespecies de <i>O. virginianus</i> bajo estudio.	23
Cuadro 3. Subespecies bajo estudio y su distribución en los estados de la región Pacífico Mexicano.	30
Cuadro 4. Material biológico de <i>O. virginianus</i> obtenido por subespecie y Estado.	32
Cuadro 5. Composición nucleotídica de secuencias de la región D-Loop del ADN _{mt} de subespecies de <i>O. virginianus</i>	46
Cuadro 6. Indicadores de diversidad genética de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.	47
Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de subespecies de <i>O. virginianus</i> el Pacífico Mexicano.	49
Cuadro 8. Estructura de la variación geográfica de subespecies de <i>O. virginianus</i> del norte, centro y sur del Pacífico Mexicano explicada por el AMOVA.....	50
Cuadro 9. Matriz de valores F_{ST} pareados (debajo de la diagonal) y de Nm pareados (encima de la diagonal) de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica mundial de <i>O. virginianus</i>	19
Figura 2. Distribución geográfica de subespecies de <i>O. virginianus</i> en México, con base a la propuesta de Hall (1981).	21
Figura 3. Ejemplares machos de subespecies de <i>O. virginianus</i> en UMAs del Pacífico Mexicano.	24
Figura 4. Aleatorización del muestreo de subespecies de <i>O. virginianus</i> en el Pacífico Mexicano.	41
Figura 5. Muestreo aleatorio por subespecie de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.	42
Figura 6. Distribución del muestreo de subespecies de <i>O. virginianus</i> en el Pacífico Mexicano.	43
Figura 7. Cantidad de ADN por tipo de tejido de subespecies de <i>O. virginianus</i>	45
Figura 8. <i>Mismatch distribution</i> que muestra cambios en el tamaño de población de subespecies de <i>O. virginianus</i> , sobre un modelo de crecimiento poblacional.	48
Figura 9. Análisis de escalamiento multidimensional sobre los valores de F_{ST} pareados de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.	52
Figura 10. Análisis de escalamiento multidimensional sobre los valores de flujo genético pareados de subespecies de <i>O. virginianus</i> del Pacífico Mexicano.	53
Figura 11. Análisis de Componentes Principales aplicado sobre la matriz de F_{ST} y Nm	54

Figura 12. Filograma obtenido por el método de Maximum Likelihood (L= -778.8643). El árbol inicial se obtuvo mediante búsqueda heurística del método de Neighbor-Joining a una matriz de distancias pareadas. Porcentajes en ramas evalúan su ajuste derivado de 1000 réplicas de Bootstrap..... 56

Figura 13. Filograma derivado del método de Máxima Parsimonia, obteniendo el árbol consenso a partir de los dos árboles más parsimoniosos. Las ramas fueron colapsadas a un 70% de confiabilidad. IC = 0.478049; IR = 0.682493. 57

Figura 14. Árbol evolutivo con probabilidades de mutaciones entre haplotipos de subespecies de *O. virginianus*. 58

Figura 15. Red de relaciones genealógicas entre subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano. 60

Figura 16. Correlograma de aislamiento por distancia de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano. 61

Figura 17. Hipótesis de la dispersión del flujo genético en subespecies de *O. virginianus* del pacífico mexicano..... 71

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es un componente necesario que se debe conservar para que la población pueda adaptarse a las condiciones ambientales y para el mantenimiento a largo plazo del aprovechamiento. La diversidad genética deriva de cambios espontáneos (mutaciones) en el ADN y su variación (polimorfismo), determina la relación filogenética y evolutiva de las especies (Frankham *et al.*, 2010).

Mediante el análisis de la diversidad genética de especies en riesgo y de interés cinegético, por ejemplo de *Odocoileus virginianus*, ha sido posible identificar las relaciones genéticas entre subespecies de una determinada región geográfica, lo cual eventualmente aporta elementos sustanciales para el diseño de planes de conservación y manejo de las subespecies involucradas (Logan-López *et al.*, 2007).

Los marcadores moleculares son herramientas que permiten el análisis del ADN de *O. virginianus*, para el estudio de su diversidad genética. Por sus bases biológicas y genéticas, la región D-loop del ADN_{mt}, se ha usado para inferir las relaciones filogeográficas en subespecies de *O. virginianus* en Sudamérica (Moscarella *et al.*, 2003); este marcador permite inferir, particularmente, sobre la evolución de la diversidad genética y las relaciones filogeográficas a nivel taxa (Awise, 2004). El uso de marcadores moleculares puede contribuir a la restauración de poblaciones, en la toma de decisiones en programas de mejoramiento genético e implementar estrategias de conservación genética más efectivas (Arif y Khan, 2009).

En México se distribuyen geográficamente 14 subespecies de venado cola blanca (*O. virginianus*), de las 38 que se distribuyen en vida silvestre en el continente Americano; ocho de ellas son endémicas del país, juegan un papel importante en el mantenimiento de la diversidad vegetal y son consideradas como indicadores de ecosistemas saludables, con bajo grado de perturbación (Weber, 1993; Villareal, 1999). Las subespecies distribuidas al norte de México son de potencial cinegético y sus poblaciones se encuentran demográficamente estables (IUCN, 2011), pero

genéticamente en riesgo por la translocación de subespecies en áreas de distribución natural de otras subespecies (Logan-López *et al.*, 2007).

Actualmente, el manejo de *O. virginianus* se basa en Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) y bajo el esquema de ganadería diversificada (SEMARNAP 1997; INE 2000), que tienen el objetivo de explotar, asegurar la sobrevivencia y viabilidad de la población de la especie en su entorno natural, conservando siempre sus caracteres genéticos; aunque la Ley General de Vida Silvestre (Art. XXXVII y XXXVIII) no prohíbe el traslado a áreas no nativas, esto repercute en el posible entrecruzamiento entre subespecies y directamente en la pérdida de diversidad genética por exogamia. La exogamia se refiere a la introducción de subespecies a zonas de diferente origen geográfico, que al entrecruzarse con las subespecies locales, se rompen los complejos génicos coadaptados, facilitando la pérdida de eficacia biológica (Storfer, 1999), fenómeno reportado en el Orix de Arabia (*Oryx leucoryx*) (Marshall y Spalton, 2000).

Si lo anterior sigue en continuo, la erosión genética de *O. virginianus* surtirá efectos negativos en los caracteres de historia de vida como la reproducción, desarrollo y adaptación al ambiente. Aunado a esto, no existe conocimiento suficiente y previo sobre el acervo genético de las subespecies de *O. virginianus* distribuidas en el Pacífico Mexicano, que apoyen el diseño de programas de conservación genética. En este sentido, se planteó la presente investigación, la cual tiene como objetivo aportar conocimiento de la diversidad genética y estudiar la estructura genética entre y dentro de las subespecies, para las regiones estudiadas. En aspectos evolutivos, se describen las relaciones filogenéticas que guardan las subespecies de *O. virginianus*. La información obtenida puede sustentar el diseño de estrategias de conservación genética y programas de mejoramiento genético, para lograr un manejo adecuado de las subespecies en México.

1.1 Objetivo general

Caracterizar la diversidad y estructura genética, las relaciones filogenéticas y genealógicas de las subespecies de *Odocoileus virginianus* distribuidas en el Pacífico Mexicano, bajo el concepto de la filogeografía.

1.2 Objetivos específicos

- Describir la diversidad genética y los patrones demográficos históricos de las subespecies de *O. virginianus*.
- Identificar la estructura genética entre y dentro de subespecies y por región geográfica de distribución de las subespecies de *O. virginianus*.
- Elucidar las relaciones filogenéticas entre las subespecies de *O. virginianus*.
- Establecer las relaciones genealógicas entre las subespecies de *O. virginianus*.
- Relacionar la distancia genética con la distancia geográfica entre las subespecies de *O. virginianus*.

1.3 Hipótesis

H₀: La diversidad genética de las subespecies de *O. virginianus* es similar, independientemente de su distribución geográfica.

H_a: La diversidad genética de las subespecies de *O. virginianus* es diferencial, debido a procesos demográficos históricos y por provenir de diferentes linajes, lo cual permite diferenciarlas.

1.4 Preguntas de investigación

¿Cuál es la diversidad genética de las subespecies de *O. virginianus* distribuidas en el Pacífico Mexicano?

¿Cuáles son los patrones demográficos históricos que moldearon la diversidad genética en las subespecies de *O. virginianus*?

¿Cómo es la estructura genética entre y dentro de subespecies y por región geográfica de distribución en el Pacífico Mexicano?

¿Cuál es la relación filogenética entre las subespecies de *O. virginianus* distribuidas en el pacífico mexicano?

¿Cómo son las relaciones genealógicas entre las subespecies de *O. virginianus*?

¿Existe alguna relación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las subespecies de *O. virginianus*?

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Filogeografía

Awise (1987), es el pionero en establecer los conceptos y técnicas de estudio de la filogeografía, definiéndola como una multidisciplina que integra diferentes áreas del conocimiento (técnicas de genética molecular, biogeografía, ecología, demografía, etología, paleontología y genética de poblaciones), encargada del estudio de la micro y macroevolución de las especies, con el objetivo de establecer los patrones históricos de distribución de las especies a través de sus genes, auspiciada por marcadores moleculares (Vázquez-Domínguez, 2002).

En general, la filogeografía se ha utilizado para entender el lugar de origen y dispersión de las especies, su adaptación a condiciones ambientales particulares (especiación), la estructura de la población mediante el seguimiento de la genealogía de genes y su correlación con aspectos geográficos y/o ecológicos, su variación intra e interespecífica a nivel población, subpoblaciones o entre poblaciones, cuya información es básica para el reconocimiento de especies o niveles infraespecíficos e identificación de poblaciones susceptibles de conservación (Vázquez-Domínguez, 2007).

La filogeografía permite además, la identificación de sitios prioritarios para la conservación, como son las Unidades Evolutivas Significativas (ESU por sus siglas en inglés), grupos operativos o unidades de manejo, con base a sus niveles de diversidad y distribución genética, que sirven de apoyo para generar estrategias de manejo eficiente de las poblaciones de fauna, como por ejemplo implicaciones importantes en la conservación de especies (Crandall *et al.*, 2000).

Los niveles de diversidad genética en las poblaciones a lo largo de su distribución y el grado en que genéticamente se encuentra estructuradas (diferenciadas), están determinados por aspectos biológicos propios de la especie (comportamiento, reproducción, principalmente), aspectos ambientales, ecológicos, geográficos, geológicos, históricos y evolutivos (Arbogast y Kenagy, 2001). En síntesis, la

filogeografía como disciplina de estudio, ayuda a comprender los patrones que determinan la heterogeneidad de la distribución genética y sus linajes a lo largo del espacio geográfico de la especie, información indispensable para la aplicación de conceptos de biología de la conservación (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

En un estudio filogeográfico, es importante definir el área de estudio considerando los posibles escenarios históricos, geográficos y ambientales, la especie y sus linajes que allí se distribuyen; así como conocer las características ecológicas de la especie en estudio y finalmente, elegir el marcador molecular más adecuado al tipo de información que se desea obtener, ya que para un análisis filogeográfico se utilizan datos moleculares del ADN de individuos de la especie (o sus linajes) a lo largo de su distribución. En su gran mayoría, los análisis filogeográficos están contextualizados en el análisis de secuencias de ADN mitocondrial (ADN_{mt}), que permiten inferir los aspectos históricos que han modelado la diversidad de los linajes genealógicos de las poblaciones en su distribución geográfica (Avice, 2000).

La reconstrucción filogeográfica clásica se basa en la construcción de un árbol (clúster) filogenético, también llamado filograma o genealogía de genes, que muestra las relaciones genealógicas derivadas de un marcador molecular (secuencias de un gen o región del ADN de interés), y su ubicación en un escenario geográfico (Hall, 2004). Existen protocolos para la construcción de filogramas, necesarios en un análisis filogeográfico. Estos se basan en algoritmos estadísticos como Matrices de Distancia Genética, Máxima Verosimilitud, Máxima Parsimonia y Estimación Bayesiana; su evaluación es mediante “remuestreo” como Jackknife o Bootstrap y están configurados en diversos programas de cómputo especializados (ver software y procedimientos en Hall, 2004; Harrison y Langdale, 2006; Hall, 2013).

Una vez que se obtiene el filograma, este se puede sobreponer sobre el espacio geográfico bajo estudio. Su tipología permite detectar aquellas asociaciones significativas entre haplotipos y su ubicación geográfica, que se pueden explicar con base en tres procesos: a) aislamiento por distancia, debido a flujo génico restringido; b)

fragmentación histórica; y c) expansión del área de distribución de las poblaciones, incluyendo eventos de colonización a distancia (Beebee y Rowe, 2007; Vázquez-Domínguez, 2007).

Para poder establecer genealogías génicas se requiere obligatoriamente, el uso de marcadores genéticos para genes sin recombinación (Lanteri y Confalonieri, 2003). La mayoría de estudios en filogeografía de vertebrados, utilizan marcadores de herencia citoplasmática no mendeliana como el de la mitocondria (ADN_{mt}), ya que en su mayoría el ADN es aportado por el gameto femenino; solo en pocas especies, en insectos principalmente, se ha detectado transmisión del ADN_{mt} a través del espermatozoides (Anderson *et al.*, 1995).

La teoría de la coalescencia provee un marco conceptual para el estudio de la filogeografía y de los procesos evolutivos que históricamente influyeron en las poblaciones, que dieron lugar a la diversidad genética actual. En síntesis, la coalescencia es un modelo que separa linajes (remontado en el tiempo), hasta encontrar el ancestro común (Harding, 1996). El tiempo de coalescencia, es decir, el punto donde los linajes se separan, está influenciado por factores que operan a nivel poblacional, como cambios en el tamaño de la población, selección natural o fluctuaciones del flujo génico. La coalescencia integra, también, el tratamiento matemático y estadístico adecuado para el análisis de las genealogías génicas, dentro y entre especies próximas (Felsenstein, 1971; Griffiths, 1980). La interpretación filogeográfica se piensa y expresa de manera diferente a la de la tradicional teoría de genética de poblaciones, es decir, considera que las mutaciones neutras (teoría de la neutralidad) se acumulan a lo largo de las ramas del filograma, las cuales representan las genealogías génicas (Kimura y Ohta, 1969; Kimura, 1980).

En filogeografía se aplican algoritmos estadísticos de parsimonia, máxima verosimilitud o método de momentos, los cuales se pueden implementar en diversos programas de cómputo, para la construcción de filogramas (Excoffier y Heckel, 2006). En un filograma, la longitud de las ramas expresan la cantidad de cambio evolutivo. Otra serie

de análisis complementarios son los propuestos por Templeton y Sing (1993), Templeton (1998) y Templeton (2001), denominado “análisis cladístico anidado”, que permite detectar y probar estadísticamente, los mecanismos evolutivos responsables de la distribución espacial de los patrones de la diversidad genética. Básicamente es convertir el filograma en una red de “clados anidados”, es decir, la red de genes incluirá clados, donde de cada nivel sucesivo de jerarquía se considera más antiguo, que los niveles inferiores. Para mayores detalles de “*estadística filogeográfica y evolutiva*” revisar los trabajos de Knowles y Maddison (2002) y Templeton (2004).

2.2 Concepto de subespecie

Cuando una población se ha expandido y aislado de la población de origen, ésta se encontrará sujeta a presiones de selección, de tal manera que el ambiente influirá para moldear sus formas biológicas, determinando caracteres biológicos particulares (p. ej. épocas reproductivas diferentes) y formas especializadas (p. ej. tamaño, coloración). La selección permitirá paso a la evolución, y en consecuencia a la adaptación de la población, de esto dependerá el éxito o no de su perpetuidad en el tiempo. Los caracteres se fijarán al cabo de n generaciones, logrando diferenciar a la población (subespecie) de la población original (especie), pero que aún mantiene ciertos rasgos que las ligan morfológicamente y en consecuencia taxonómicamente, pero a un nivel infraespecífico conocido como subespecie (Olrog, 1967).

En aves, el concepto de subespecie genera una fuente de controversia entre los investigadores, ya que algunos las denominan variedades geográficas (Mayr, 1982). Una definición biológica de subespecie es un grupo de poblaciones que forman parte de una especie biológica y que tienen características diagnósticas que las separan de otros grupos de poblaciones de ese tipo (Patten y Unitt, 2002).

En genética, se considera subespecie a aquellas formas independientes en evolución, también llamadas ESU. Es decir, es un linaje con flujo génico restringido con relación a otros linajes filogenéticamente muy cercanos y que tiene una estructura evolutiva propia (Fraser y Bernatchez, 2001). El ADN_{mt} ha ayudado a diferenciar ESU distintas,

ya que permite esclarecer la identidad genética de las subespecies, lo cual tiene implicaciones en los esfuerzos de conservación y de identificación de la diversidad biológica (Zink, 2004).

El concepto de subespecie es la definición más aceptada en el manejo de poblaciones de fauna silvestre, porque tiene sus raíces en biología evolutiva e incorpora conceptos genéticos, demográficos y geográficos. En tales casos, la aplicación de distintos conceptos como ESU, unidades operativas de conservación (OCU), metapoblaciones, segmentos de población distintos y/o subpoblaciones, pueden conducir al reconocimiento y delimitación de las áreas de distribución para la especie, siendo más fácilmente interpretadas por los encargados de formular las políticas públicas de conservación (Cronin, 2006).

En este estudio, el concepto de subespecie está contextualizado a una categoría taxonómica inferior que se ha diferenciado (ya sea morfológica o genéticamente) de la población original, cuyos individuos que componen las poblaciones tienen caracteres morfológicos particulares pero en común con la especie. Se considera una subespecie a aquellas poblaciones que presentan caracteres fenotípicos particulares en ecosistemas particulares donde se distribuyen geográficamente.

2.3 El ADN_{mt}: marcador molecular para estudios filogeográficos en Cérvidos

En vertebrados, el ADN mitocondrial (ADN_{mt}) representa un marcador genético que se caracteriza por ser una molécula circular de 37 genes (13 genes codifican proteínas) y una región control conocida como D-loop (no codificante; Hatzoglou *et al.*, 1995; Moritz y Hillis, 1996), de fácil obtención y análisis; con una estructura genética simple sin repeticiones, ni presencia de pseudogenes e intrones, con transmisión exclusivamente vía matrilineal; sin recombinación genética ni arreglos genéticos y por ende, con tendencia a la homoplasmia y alta tasa de sustitución nucleotídica. En este sentido, los genes del ADN_{mt}, y en particular la región D-loop, es muy variable genéticamente y provee información valiosa para inferir relaciones filogeográficas entre diversas taxa y poblaciones (Avise *et al.*, 1987; Avise, 2004).

Los primeros estudios de la región D-loop en Cérvidos, sentaron las bases para describir dicha molécula y el polimorfismo en seis especies de ciervos. Douzery y Randi (1997), dividen en tres dominios a la región D-loop del ADN_{mt} de Cérvidos: una región central conservada, flanqueada por los dominios izquierdo y derecho, y que tiende a ser polimórfica. Un dato relevante es que los venados de la familia *Odocoileinae* tienen una secuencia más larga de la región D-loop, debido a la presencia de una repetición adicional de 75 pb en tándem.

Después de describir la región D-Loop del ADN_{mt}, los estudios en el grupo de Cérvidos se incrementaron con el fin de establecer relaciones filogeográficas entre taxones de especies relacionadas o grupos infraespecíficos de ciervos (Zhang y Zhang, 2012). Por ejemplo, en *Cervus elaphus* se comparó la filogeografía de las poblaciones de China con aquellas distribuidas en Asia, Europa y Norte América, cuyo estudio concluye que existen distintos linajes (las del Este son diferentes al Oeste), lo cual es congruente con su distribución histórica, identificando que la migración de este cérvido fue desde el Norte de Eurasia a Norteamérica (Mahmut *et al.*, 2002). Otro estudio realizado en *C. elaphus* en Europa demostró que los efectos del cambio climático ocurridos durante el Pasado Glaciar Máximo (PGM), llevaron a restringir geográficamente a las poblaciones al Sureste de Europa y al Este de Asia, lo cual hace consistente las divergencias genéticas entre estas dos áreas (Meiri *et al.*, 2013).

En el caso del ciervo Pudú (*Pudu puda*), endémico de Chile y parte de Argentina, se encontró una clara divergencia entre la población de la Isla Chiloé con respecto a las poblaciones distribuidas en el continente (Chile), debido, supuestamente, al aislamiento geográfico durante el PGM; esto ha conllevado a proponer dos subespecies: una insular y otra continental y a considerar programas de conservación específicos para ellas (Fuentes-Hurtado *et al.*, 2011).

También se ha investigado el polimorfismo del ADN_{mt} de *Capreolus pygargus* (distribuida en Siberia) y *C. capreolus* (distribuida en Europa), encontrando divergencia genética que permitió separar ambas especies, información que fue de utilidad para

proponer planes de conservación para la sobrevivencia de estas especies en riesgo (Randi *et al.*, 1998). Un estudio realizado en el alce (*Alces alces*), en la que se considera que existían dos razas geográficas, los datos rechazan esa hipótesis: la divergencia entre las supuestas razas se debe a recientes cuellos de botella, reducido tamaño efectivo de población y una expansión de la población con linajes extintos (Hundertmark *et al.*, 2002).

Sin embargo, el grupo *Odocoileus* presenta características especiales en su ADN_{mt}. Por ejemplo, estudios evidenciaron que la región D-loop del ADN_{mt} presenta repeticiones de más de dos copias de 75 pb en los géneros *Mazama* y *Odocoileus*. Particularmente *O. virginianus*, presenta de tres a cuatro repeticiones de 75 pb en dicha región, asumiendo que una repetición deriva de una repetición anterior. Estas repeticiones pueden darse en poblaciones aisladas, sometidas a deriva genética, por un pequeño número de hembras del cual se expandió la población y por la limitada dispersión de hembras (Purdue *et al.*, 2006).

2.4 Estudios genéticos en subespecies de *O. virginianus*

En distintos países se han realizado estudios analizando la región D-loop del ADN_{mt} de *O. virginianus*. Carr *et al.* (1986), utilizaron patrones de restricción del ADN_{mt} para reportar la hibridación de poblaciones simpátricas de *O. virginianus* y *O. hemionus* en Texas, EE.UU.; posteriormente esto fue corroborado por Bradley *et al.*, (2003). Ellsworth *et al.* (1994), investigaron la historia biogeográfica de poblaciones de *O. virginianus* del sureste de EE.UU, encontrando diferenciación entre las poblaciones, debido a la historia geográfica de la región que posiblemente aisló a las poblaciones. Otros estudios se han enfocado a describir la diversidad genética de *O. virginianus*; como resultado se ha inferido que las diferencias de diversidad genética entre poblaciones es debido a efectos ecológicos y demográficos, pero principalmente por un manejo inadecuado de la especie (Darrell *et al.*, 1994).

En Venezuela, se evaluó la filogeografía de tres subespecies de *O. virginianus* (*O. v. margaritae*, *O. v. goudotii* y *O. v. gymnotis*), obteniendo cuatro linajes, donde *O. v.*

gymnotis parece ser polifilética; lo que sugiere que estas subespecies son ESU y que requieren estrategias de conservación particulares (Moscarella *et al.*, 2003).

Según el análisis bibliográfico elaborado por Mandujano (2004), reporta 501 estudios hasta el año 2001, hechos en cérvidos distribuidos en México, que versan sobre morfología, densidad de población, hábitos alimenticios y composición de la dieta, incidencia de enfermedades y parámetros reproductivos. Este análisis da luz sobre la falta de estudios en los tópicos de diversidad genética de *O. virginianus* y más aún, sobre el escaso conocimiento de las relaciones filogeográficas de las subespecies distribuidas en México.

En México, ya se han realizado estudios en subespecies de *O. virginianus* partiendo del análisis de la región D-loop del ADN_{mt}. El trabajo pionero fue el elaborado por Molina (2002), quien estudio las subespecies *O. v. miquihuanensis*, *O. v. texanus* y *O. v. veraecrucis*, reporta 54 haplotipos diferentes, sugiriendo una gran diversidad genética para cada subespecie estudiada.

Del estudio realizado por Logan-López (2004), del cual se derivó la publicación de Logan-López *et al.* (2007), estudiaron las subespecies *O. v. carminis*, *O. v. miquihuanensis*, *O. v. texanus* y *O. v. veraecrucis*; sin embargo, no reportan la diversidad haplotípica ni nucleotídica por subespecie; reportan la diversidad genética por Estado (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas), información que eventualmente explicó el *status* de la diversidad genética que guarda cada subespecie, independiente de la entidad en la que se distribuye cada una.

En estudios recientes, Calderón (2009), estudió las subespecies *O. v. carminis*, *O. v. sinaloae*, *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis* y *O. v. yucatanensis*, aunque no reporta la diversidad haplotípica por subespecie, no obstante que es necesaria si se implementa un programa de mejora genética. Ambriz (2010) estudia las subespecies *O. v. acapulcensis*, *O. v. mexicanus* y *O. v. sinaloae* amplificando el genoma completo y determinando las diferencias genómicas de 9 de las 14 subespecies que se distribuyen

en México, identificando separación filogenética entre las subespecies del sureste, norte, centro y sur del país (Ambriz-Morales *et al.*, 2016). Recientemente, Hernández-Llamas (2014) analiza las subespecies de *O. v. mexicanus*, *O. v. couesi* y *O. v. miquihuanensis*, determinando que estas dos últimas, forman un solo clado filogenético, lo cual está asociado a la cercanía geográfica de estas dos subespecies.

En el Cuadro 1 se resumen los reportes de los estudios de diversidad genética de las subespecies distribuidas en México, incluyendo los reportados para las subespecies estudiadas en Venezuela por Moscarella *et al.* (2003). En dicho cuadro se aprecia el vacío de conocimiento sobre la diversidad genética en las subespecies: *O. v. nelsoni*, *O. v. thomasi*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. toltecus* y *O. v. truei*; también se hace evidente el estudio de las relaciones filogeográficas, analizando en conjunto las 14 subespecies, para elucidar cómo ha sido la evolución de los linajes reconocidos de *O. virginianus* a través de la distribución de sus haplotipos en el espacio geográfico y la interpretación de la dispersión de los genes con base en su genealogía.

La mayoría de los autores citados en el Cuadro 1, indican que las inferencias sobre las relaciones filogeográficas entre las subespecies de *O. virginianus* no son concluyentes en su totalidad, afirmando que se debe generar información de la diversidad genética en las demás subespecies, para llegar a conclusiones consistentes sobre la filogeografía del complejo de subespecies de *O. virginianus*. Otro aspecto que resulta interesante de estos estudios, es que las subespecies son genéticamente diferenciables de acuerdo a su área de distribución geográfica, al menos en la mayoría de los trabajos revisados. Es decir, subespecies geográficamente distantes tienen una constitución genética diferente (o procedencia genealógica diferente o de diversos orígenes), *versus* las subespecies geográficamente cercanas, que tienden a agruparse, posiblemente porque tienen un origen genealógico en común, lo cual representa una hipótesis interesante para ser puesta a prueba.

Cuadro 1. Indicadores de diversidad genética reportados en la literatura para *O. virginianus* analizando la región D-loop del ADN_{mt}.

Subespecie	n	H	h	π	Referencia
<i>O. virginianus</i>	370	15	0.41	Nr	Purdue <i>et al.</i> (2000)
<i>O. v. texanus</i>	29	30	0.978	Nr	Molina (2002)
<i>O. v. miquihuanensis</i>	18	16	0.894	Nr	Molina (2002)
<i>O. v. veraecrucis</i>	3	8	1	Nr	Molina (2002)
<i>O. v. margaritae</i>	6	6	1	0.016	Moscarella <i>et al.</i> (2003)
<i>O. v. gymnotis</i>	16	13	0.967	0.029	Moscarella <i>et al.</i> (2003)
<i>O. v. goudi</i>	4	4	1	0.005	Moscarella <i>et al.</i> (2003)
<i>O. v. texanus</i>	93	13	Nr	Nr	Logan-López <i>et al.</i> (2007)
<i>O. v. veraecrucis</i>	6	Nr	Nr	Nr	Logan-López <i>et al.</i> (2007)
<i>O. v. carminis</i>	2	Nr	Nr	Nr	Logan-López <i>et al.</i> (2007)
<i>O. v. miquihuanensis</i>	4	Nr	Nr	Nr	Logan-López <i>et al.</i> (2007)
<i>O. v. texanus</i>	39	17	Nr	0.6 a 0.88	Calderón (2009)
<i>O. v. sinaloae</i>	3	3	Nr	0.533	Calderón (2009)
<i>O. v. yucatanensis</i>	16	14	Nr	0.71 a 0.86	Calderón (2009)
<i>O. v. carminis</i>	12	9	Nr	0.9636	Calderón (2009)
<i>O. v. veraecrucis</i>	20	15	Nr	0.57 a 0.86	Calderón (2009)
<i>O. v. sinaloae</i>	42	32	0.970	0.08039	Ambriz (2010)
<i>O. v. mexicanus</i>	7	7	1	0.11017	Ambriz (2010)
<i>O. v. acapulcensis</i>	8	8	1	0.12523	Ambriz (2010)
<i>O. v. miquihuanensis</i>	4	4	1	0.01926	Hernández (2014)
<i>O. v. couesi</i>	20	19	0.99474	0.12371	Hernández (2014)
<i>O. v. mexicanus</i>	43	28	0.96678	0.04117	Hernández (2014)

n= tamaño de muestra; H= número de haplotipos; h= diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; Nr= no reportado.

Por otra parte, pero en paralelo a los estudios del ADN_{mt}, los microsatélites son una herramienta diseñada principalmente, para estudios de caracterización genética de

poblaciones de *O. virginianus* (Anderson *et al.*, 2002); identificación de paternidad múltiple (DeYoung *et al.*, 2002) y asignación de paternidad (Sorin, 2004); para estudios de exclusión genética (DeYoung *et al.*, 2003); para el diagnóstico genético de poblaciones restauradas y sometidas a programas de conservación (DeYoung *et al.*, 2003); análisis de la estructura genética, organización social de hembras (Comer *et al.*, 2005) y estructura social de la población (Miller *et al.*, 2010); y la evaluación del sistema de apareamiento (DeYoung *et al.*, 2009). Otros estudios en subespecies de *O. virginianus* usando microsatélites se han enfocado a indagar cómo las técnicas de selección de reproductores y de reproducción asistida, determinan cambios en la estructura genética (Hernández, 2010); y para la caracterización de la diversidad genética y diferenciación genética de subespecies (López, 2010; De la Rosa-Reyna, 2012).

Ya se ha reportado pérdida de diversidad genética en mamíferos (p. ej. en monos; Ruiz-García *et al.*, 2010), y en aquellas especies que presentan clados inferiores (subespecies). Es decir, sí existen poblaciones con rasgos particulares o adaptados a ciertas condiciones ambientales y sí estas tienen un reducido tamaño efectivo de población, es de particular interés entender la historia filogeográfica distintiva y las co-adaptaciones de las poblaciones involucradas. También la hibridación (intraespecífica e interespecífica), disminuye la diversidad genética por la presencia de exogamia, eliminando complejos genéticos ya adaptados a las características singulares del ambiente en el que se distribuye (Templenton, 1989).

Al darse cruzamientos entre ejemplares de diferentes orígenes genéticos o linajes, es probable que en las primeras generaciones se presente heterosis positiva para características cuantitativas (p.ej. incremento en el tamaño corporal). Pero en generaciones subsecuentes, se observan descensos en la adaptabilidad de la progenie, como resultado de la disminución de la diversidad genética (Lynch, 1991).

2.5 Filogenia de Cérvidos y su relación con *O. virginianus*

El orden *Artiodactyla* está representado por nueve familias de mamíferos ungulados, cuyo carácter distintivo es que las extremidades están apoyadas en dos dedos cubiertos por la pezuña. Este orden agrupa las familias *Tylopoda* (camélidos), *Suidae* (cerdos domésticos, jabalíes y parientes cercanos silvestres), *Hippopotamidae* (hipopótamo común y pigmeo), *Tragulidae* (ciervos “ratón”), *Moschidae* (ciervos almizcleros), *Antilocapridae* (berrendo), *Giraffidae* (jirafa y okapi), *Bovidae* (bovinos, caprinos, ovinos, antílopes, bisonte) y *Cervidae* (venados) (Groves y Grubb, 2011).

La familia *Cervidae* tiene un amplio rango de distribución, desde el hemisferio norte, así como en América del Sur y Asia sur-oriental. Existe cierto dilema sobre el número de especies que la componen. Según Clément *et al.* (2006), ésta familia incluye 40 especies, mientras que la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) propone 55 especies, de las cuales *Elaphurus davidianus* se encuentra extinta en vida silvestre y *Rucervus schomburgki* se extinguió totalmente; las otras especies se encuentran en alguna categoría de riesgo de extinción (IUCN, 2012); por su amplia distribución en diferentes ecosistemas, cuenta con una diversidad de 197 subespecies a nivel mundial (Whitehead, 1993; Nowak, 1999).

La familia *Cervidae*, está constituida por una subfamilia extinta (*Procervulinae*) y tres subfamilias de ciervos y venados del nuevo mundo: subfamilia *Cervinae* contiene 20 géneros y 37 especies (de las cuales 13 especies están extintas); subfamilia *Hydropotinae* representado por un género y una especie; y subfamilia *Capreolinae* (antes *Odocoileinae*) que incluye a 10 géneros y 22 especies (Wilson y Reeder's, 2005).

La subfamilia *Capreolinae* agrupa al alce (americano y europeo), reno o caribú y corzo, y a los cérvidos distribuidos en el continente Americano, en el que se encuentra incluido el género *Odocoileus*, representado por dos especies: *O. hemionus* y *O. virginianus*; esta última especie tiene una de las distribuciones geográficas más amplias, abarcando desde el círculo Polar Ártico hasta por debajo de la línea del

Ecuador (Hall, 1981); se considera el cérvido más antiguo del nuevo mundo, según su registro fósil que data en 3.5 millones de años (Pitra *et al.*, 2004).

El origen de las especies de la subfamilia *Capreolinae* es desconocido, ya que no se cuenta con fósiles primitivos. Estudios moleculares revelan que esta subfamilia divergió de la subfamilia *Cervinae*, en el transcurso del Mioceno medio (Hernández-Fernández y Vrba, 2005; Kuznetsova *et al.*, 2005). Sin embargo, el fósil más antiguo, evidencia su aparición en América del Norte y Eurasia, hace aproximadamente unos 5 millones de años; es probable que las especies de dicha subfamilia, hayan alcanzado América del Sur mediante la franja terrestre de Panamá (Geist, 1998). Su capacidad adaptativa propinó a que rápidamente se adaptaran a formas especializadas de acuerdo al nicho que habitan; a pesar de la inexistente información fósil, se ha sugerido que todas las especies de cérvidos de América del Sur son descendientes de *Odocoileus* (Merino y Viera, 2010).

En el continente Americano se distribuye *O. virginianus*, representada por una diversidad de 38 subespecies. En México, excepto en la península de Baja California, está representada por 14 (37%) subespecies; ocho de ellas (21%) son endémicas del país (Aranda 2000); juegan un papel importante en el mantenimiento de la biodiversidad vegetal y son consideradas como indicadores de ecosistemas con bajo grado de perturbación (Halls, 1984); fueron y son importantes para la subsistencia alimentaria de culturas prehispánicas y comunidades rurales; y recientemente están cobrando auge para su aprovechamiento cinegético y como platillo exótico (Weber, 1993).

2.5.1 *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780)

El cérvido de nombre común: venado cola blanca o white-tailed deer (*O. virginianus*), es considerada una especie politépica por su capacidad adaptativa a diversos ambientes. La selección natural, al parecer, es la responsable de moldear la diversidad fenotípica en esta especie, ya que dependiendo del ecosistema donde se distribuye, se presentan fenotipos con diferente peso y dimensiones corporales, distintas formas de

cornamenta y comportamientos variables. El color del pelaje parece tener un gradiente: en zonas desérticas de matorral abierto, el pelaje es más claro en comparación con aquellas que habitan áreas boscosas densas, donde la tendencia de coloración va desde el café oscuro, rojizo y gris marrón (Smith, 1991).

Datos sobre caracterización cariotípica; genética de poblaciones en EEUU, Venezuela, Costa Rica y Suriname usando *loci* de microsatélites; conocimiento del estado de las poblaciones *in situ* y *ex situ*; tamaño de población y densidad; hábitat; ámbito hogareño y uso espacial; ecología alimenticia; biología reproductiva; comportamiento; y estatus de conservación de *O. virginianus* puede consultarse a profundidad en la publicación de Gallina *et al.*, (2010), quienes realizan una explicación completa de estos temas en esta especie.

Para México, Mandujano (2004), compiló 501 estudios de venados entre los años de 1850 y 2001, siendo la mayoría (75%) estudios publicados sobre *O. virginianus*, en temas de biología, ecología y manejo. Por otra parte, existe una extensa bibliografía compilada sobre estudios realizados en cérvidos y particularmente de las subespecies de *O. virginianus* que se distribuyen en México (Mandujano, 2011). Un aspecto importante de ambas recopilaciones, es que reconocen la urgencia de estudios sobre genética y filogeografía para el reconocimiento cuantitativo de las subespecies.

2.5.2 Distribución geográfica

Conjuntando la información sobre la distribución de *O. virginianus* reportada por Kellogg (1956), Hall (1981) y Smith (1991), esta especie se extiende desde el sur de Canadá y casi todo Estados Unidos (ausente en Utah, escasamente frecuente en Nevada y California), con presencia en el territorio mexicano a excepción de la Península de Baja California. En Suramérica se distribuye en Colombia, Venezuela, Guayanas; al norte de Brasil, norte y oeste de Perú y Bolivia. A nivel mundial, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) la ubica en la categoría “preocupación menor”, ya que no se cuentan con datos demográficos suficientes para determinar el estatus real de la especie.

Se solicitaron los metadatos de la distribución mundial de *O. virginianus* a la IUCN (<http://www.iucnredlist.org/>), y nos enviaron una base de datos con los registros de la distribución geográfica actual de *O. virginianus*, con coordenadas de la especie, recopiladas al año 2010; con la cual graficó la distribución geográfica sobre la capa de clima y vegetación descargadas de Natural Earth (<http://www.natureearthdata.com/>), se elaboró el mapa de la distribución actual de *O. virginianus* (Figura 1).

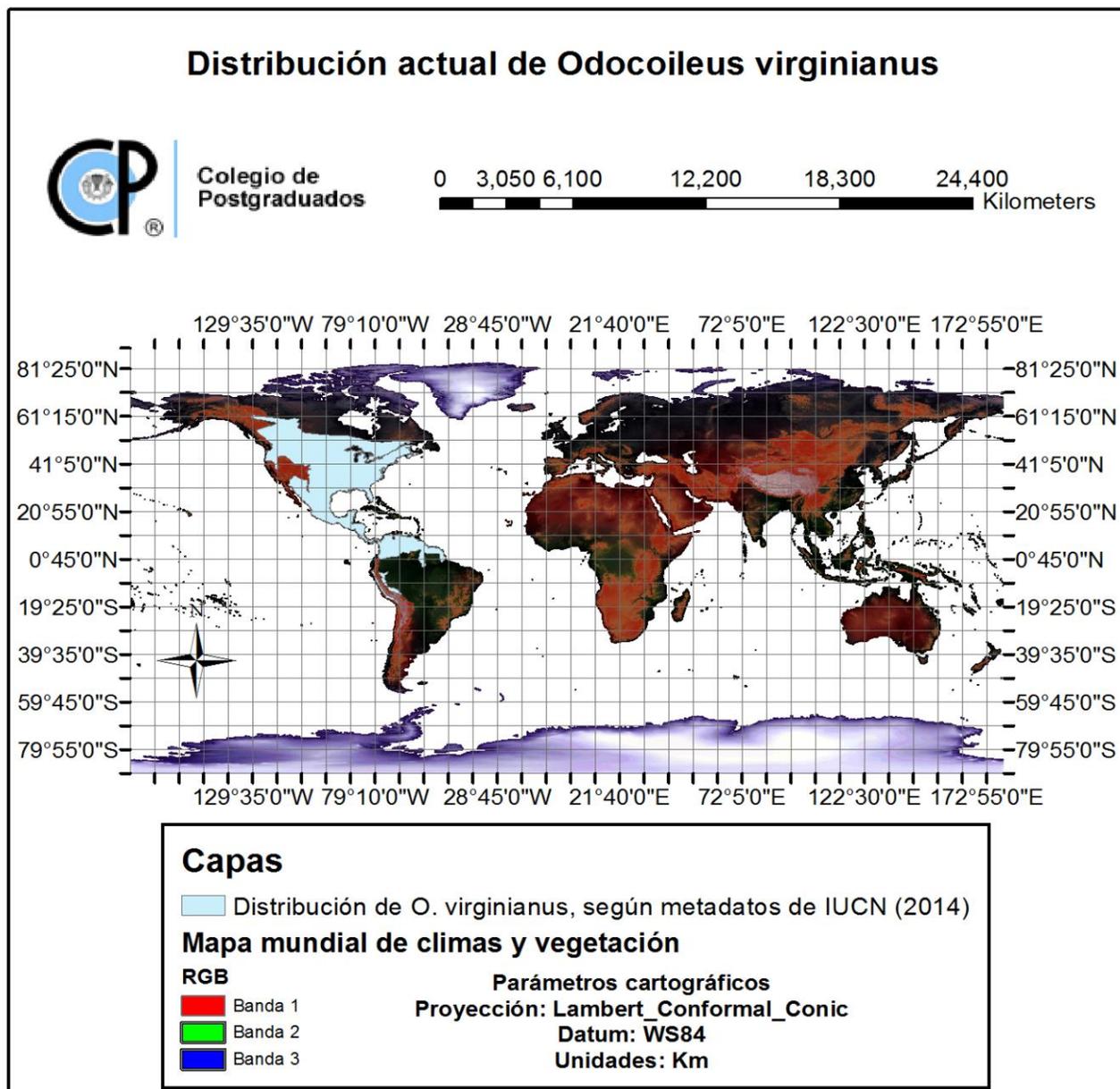


Figura 1. Distribución geográfica mundial de *O. virginianus*.
(Elaboración propia con metadatos obtenidos de IUCN y Natural Earth).

2.5.3 Subespecies de *O. virginianus* en América y México

Los géneros endémicos de América del sur (*Ozotoceros*, *Blastocerus*, *Hippocamelus* y *Pudu*) son resultado de una radiación adaptativa muy clara, con tamaños mayores que los del género *Mazama* de Centro y Sudamérica, que están más relacionados con el género *Odocoileus*. *O. hemionus* tiene 7 subespecies, encontrándose en Canadá, Estados Unidos y noroeste de México. Por su parte, *O. virginianus*, considerada como una especie con mayor variabilidad fenotípica, tiene 38 subespecies reconocidas, distribuidas en diferentes nichos (Smith 1991, citado en Gallina *et al.*, 2010). Treinta subespecies se distribuyen en la parte norte-centro del continente Americano y ocho subespecies tienen distribución restringida a Suramérica.

Smith (1991, citado en Gallina *et al.*, 2010), indica que las 38 subespecies de *O. virginianus* fueron descritas por diversos investigadores, en diferentes localidades tipo en el continente americano. La identificación a nivel de subespecie está dada utilizando criterios cualitativos arbitrarios como tamaño, color del pelaje y forma y tamaño de las astas en los machos (Kellogg, 1956). Con base a estos caracteres y asociado a los límites de distribución de los ecosistemas donde se observaron ejemplares de las subespecies, Hall (1981), delimitó las zonas de distribución para cada subespecie, cuyos límites geográficos de cada subespecie corresponde con los límites de los ecosistemas donde se distribuyen.

Catorce subespecies de *O. virginianus* se distribuyen en México: *O. v. acapulcensis*, *O. v. carminis*, *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus*, *O. v. miquihuanensis*, *O. v. nelsoni*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. sinaloae*, *O. v. texanus*, *O. v. thomasi*, *O. v. toltecus*, *O. v. truei*, *O. v. veraecrucis* y *O. v. yucatanensis* (Figura 2), distribuidas en distintos tipos de ecosistemas de México (Mandujano *et al.*, 2010), por lo que el esclarecimiento de su filogeografía es de particular interés para su manejo (Mandujano, 2004).

Distribución geográfica de subespecies de *O. virginianus* en México



Figura 2. Distribución geográfica de subespecies de *O. virginianus* en México, con base a la propuesta de Hall (1981).

2.5.4 Subespecies de *O. virginianus* sujetas de estudio

En el Cuadro 2, se presenta información resumida de las subespecies de *O. virginianus* objeto de estudio en esta investigación y se muestran ejemplares de las subespecies bajo estudio (Figura 3); destacando la variedad de ecosistemas en las que se distribuyen y el tipo de manejo al que están sujetas.

Quizá la falta de estudios genéticos en estas subespecies se debe a la difícil consecución de material biológico para realizar estudios moleculares, por ser subespecies que tienen aprovechamiento restringido por parte de las UMAs que elaboran el Plan de Manejo con fines de conservación (ver Cuadro 2). Pero existe un método no invasivo propuesto por López y Beier (2012), sobre el uso de cornamentas de 1 a 7 años (a pesar de haber estado a la intemperie), y que a partir de estos se puede obtener ADN amplificable, representando una oportunidad para el desarrollo de estudios de esta índole en la especie. Sin embargo, buscar cornamentas de *O. virginianus* silvestres en su ámbito hogareño, que varía entre 59 a 63 ha en el norte de México (Fulbright y Ortega-Santos, 2006), aumentaría el esfuerzo humano, los costos y tiempo para el muestreo.

En genética para la conservación, se hace imperante la necesidad de estudios de genética y relaciones filogeográficas entre las subespecies que aún no se han estudiado. Las principales implicaciones de manejo que podrían revelar estos estudios, es la validez de los límites biogeográficos de las subespecies, que conlleve a la restricción legal sobre la translocación de las subespecies a localidades donde no se han reportado históricamente, pero donde se distribuyen otras subespecies. Cuando se haga esto, se tendrá información de la evolución de los haplotipos entre estas subespecies a través de la reconstrucción filogeográfica, contemplando haplotipos de las 14 subespecies reconocidas para México y siendo más objetivos, abarcando toda su área de distribución en el continente Americano, para entender la evolución histórica de las mismas y la descripción de los patrones de diversidad genética que guardan estos “ecotipos”, también llamados subespecies, incluso para implementar programas de conservación que eviten la pérdida de diversidad genética por exogamia.

Cuadro 2. Características de las subespecies de *O. virginianus* bajo estudio.

Subespecie	Descriptor ¹	Localidad tipo ¹	Ecosistema ²	Tipo de Manejo ³
<i>O. v. acapulcensis</i>	Canton, 1877	Acapulco, Guerrero.	Bosque de coníferas y encinos; selva tropical caducifolia.	Cinegético; conservación
<i>O. v. couesi</i>	Coues y Yarrow, 1875	Rancho Santuario, Durango.	Matorral xerófilo; matorral espinoso; bosque de coníferas y encinos; pastizales; selva tropical caducifolia.	Cinegético; conservación
<i>O. v. mexicanus</i>	Gmelin, 1788	Valle de México, México.	Selva tropical caducifolia; bosque templado; matorral xerófilo.	Cinegético; conservación
<i>O. v. nelsoni</i>	Merriam, 1898	Montañas de Chiapas.	Bosque templado; selva tropical subcaducifolia; selva tropical perennifolia.	Conservación
<i>O. v. oaxacensis</i>	Goldman y Kellogg, 1940	Montañas de Oaxaca,	Bosque templado; selva tropical caducifolia.	Cinegético; conservación
<i>O. v. sinaloae</i>	Allen, 1903	Escuinapa, Sinaloa.	Matorral espinoso; bosque tropical caducifolio; matorral xerófilo.	Cinegético; conservación
<i>O. v. thomasi</i>	Merriam, 1898	Huehuetán, Chiapas.	Selva tropical perennifolia; bosque templado; selva tropical caducifolia.	Cinegético; conservación
<i>O. v. toltecus</i>	Saussure, 1860	Orizaba, Veracruz.	Selva tropical perennifolia; bosque templado.	Conservación

¹Gallina *et al.*, 2010, con información recopilada de diversas fuentes.

²Mandujano *et al.*, 2010, con información de la vegetación propuesta por Rzedowski y Reina-Trujillo (1990).

³Subespecies de venado cola blanca mexicanos, clasificadas por International Safari Club (sci-mty.com).



O. v. acapulcensis en la UMA Granja Amojileca, Guerrero.



O. v. couesi cobrado en Sonora, México.



O. v. mexicanus en la UMA La Huerta, San Luis Potosí.



O. v. nelsoni en la UMA Villa Acacia, Chiapas.



O. v. oaxacensis abatido en la UMA El Bastón, Oaxaca.



O. v. sinaloae cazado en la UMA Cahuinahuato, Sinaloa.



O. v. thomasi en la UMA El Iguanero, Mazatán, Chiapas.



O. v. toltecus en la UMA Sta. María Huitepec, Oaxaca.

Figura 3. Ejemplares machos de subespecies de *O. virginianus* en UMAs del Pacífico Mexicano.

2.6 Manejo de las subespecies de *O. virginianus* en México

Los ciervos en general tienen importancia sociocultural, y en particular, *O. virginianus* ha sido objeto de aprovechamiento desde tiempos precolombinos, ya que proveen carne, piel, huesos, aceite, grasa, cebo, pigmentos, propiedades medicinales y de índole afrodisíaco (Naranjo *et al.*, 2010).

El aprovechamiento mal planificado de *O. virginianus* provoca un impacto selectivo desfavorable hacia ciertos ejemplares de mayor talla y morfometría de astas (gracias a su mayor facilidad de caza), causando disminución en la diversidad genética en la población (Cienfuegos-Rivas, 2011), que se traduce en afecciones biológicas como reducción en la tasa de crecimiento y su longevidad promedio en vida libre (Galindo-Leal y Weber, 1998). En ungulados, el apareamiento exitoso de machos tiene una estrecha correlación con el tamaño del individuo y la estructura de su cornamenta, ya que la selección sexual favorece el desarrollo de astas de gran tamaño, lo cual es reflejo de su expresión genética (Monteith, 2013). La selectividad en el aprovechamiento no solamente afecta a la población de estos mamíferos, sino también a los beneficios que generan a las comunidades rurales que se benefician de ellos (Wright *et al.*, 2000).

A la fecha, no se cuenta con estudios demográficos de *O. virginianus* en México, que brinden información sobre el estatus de sus poblaciones. Por tanto, la UICN (2014) la considera de bajo riesgo de extinción y la NOM-SEMARNAT-2010 no la clasifica en alguna de sus categorías de riesgo. Sólo Guatemala ha solicitado la inclusión de *O. v. mayensis* al apéndice III de la CITES, que inculca la protección de esta subespecie en el país y controla su comercio internacional; si se requiere aprovechamiento, el permiso debe ser expedido por la Autoridad Administrativa del país.

A pesar que en México *O. virginianus* no se considera en riesgo, cada vez es evidente la pérdida de su hábitat (Delfín-Alfonso *et al.*, 2009), su cacería no controlada (Morales y Villa, 1998), y aprovechamiento controlado pero mal planificado ha llevado a la extinción local de poblaciones. Aunado a esto, estudios de diversidad genética indican

que algunas subespecies de *O. virginianus* se encuentran genéticamente en riesgo por la introgresión de genes de otras subespecies, debido a la translocación de individuos a zonas donde naturalmente no pertenecen (Logan-López *et al.*, 2007).

Fue a partir de los años 80's, que el Gobierno Federal Mexicano incrementó esfuerzos para la conservación de las especies silvestres del territorio mexicano, implementando lineamientos (Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, 1988; Ley General de Vida Silvestre, 2000) y normas (NOM-SEMARNAT-059-2010) que rigen medidas pertinentes para el diseño de los planes de manejo de las UMAs; convirtiéndose en el único medio para el comercio y aprovechamiento regulado de la vida silvestre (SEMARNAT, 2000). Este aprovechamiento de la vida silvestre en México, permite no solamente obtener ingresos económicos al propietario de la UMA a través del turismo cinegético y/o comercialización de bienes y servicios de la biodiversidad, sino que también permite a la vida silvestre distribuirse y mantener poblaciones viables, llegando a repoblar zonas en las que ya no era habitual observarlas.

El propósito de las UMAs es generar esquemas alternativos de producción, compatibles con el cuidado del medio ambiente, mediante el uso sustentable de los recursos naturales, creando oportunidades de empleo complementarias a la práctica agrícola, ganadera y silvícola. Anteponiendo a la educación ambiental como una herramienta fundamentada en una nueva visión de conservación-aprovechamiento de la vida silvestre, se busca de manera paralela generar divisas para las comunidades locales, a la par de realizar acciones como el mantenimiento de la diversidad biológica a largo plazo (SEMARNAP, 1997).

Las UMAs funcionan como sistemas de producción de pie de cría, bancos de germoplasma, alternativas de conservación y reproducción, educación ambiental y capacitación. Recientemente, la investigación es parte fundamental para generar estrategias de manejo de la vida silvestre que conlleven a mejorar la productividad sin alterar la identidad genética de *O. virginianus* (Mandujano, 2011). Las subespecies *O.*

v. texanus y *O. v. couesi* son las de mayores tasas de aprovechamiento vía cacería deportiva. Las restantes 12 subespecies distribuidas en México, no están considerados como trofeos por cazadores nacionales y extranjeros, por presentar un menor tamaño corporal y astas pequeñas. Sin embargo, cada vez se incrementa el aprovechamiento regulado de estas subespecies, ya que su conservación y aprovechamiento trae otros beneficios paralelos en el rubro de la prestación de servicios ambientales.

La operación de las UMAs está sustentada en la Ley General de Vida Silvestre y su Reglamento, además de la autorización por SEMARNAT del Plan de Manejo de la UMA. Para el caso de *O. virginianus*, ya existe el Plan de Manejo Tipo Venado Cola Blanca para zonas templadas y tropicales, que plantea acciones generales de manejo de las subespecies en función de las características particulares del ecosistema. La tasa de aprovechamiento, está fundada en estudios de monitoreo de las poblaciones realizados por un asesor técnico; el informe del estudio se presenta ante SEMARNAT, que a su vez dictaminan la tasa de cosecha de ejemplares que se deben cazar en la UMA, en las épocas establecidas (SEMARNAT, 2007). El monitoreo de la población está basado en diferentes técnicas de campo, para estimar atributos poblacionales como densidad, tamaño de la población o abundancia; estructura poblacional; capacidad de carga y calidad del hábitat (Mandujano, 2011), lo que permite tener un estimado del tamaño actual de la población y con base en esto, poder extraer una cantidad de ejemplares que oscila entre el 1 y 10% del tamaño de la población.

Casos exitosos de UMAs (extensivas) son los ranchos cinegéticos que han demostrado ser una actividad económica rentable, siendo la zona norte de México, la que recibe más turismo cinegético. Para el Noreste de México se reporta que la actividad cinegética generó 43,685 empleos y tuvo un impacto económico de \$2,882 millones de pesos en una sola temporada (Guajardo-Quiroga y Martínez-Muñoz, 2004). La clave del éxito es la adición de un valor económico a las especies cinegéticas (venados principalmente), incrementando los ingresos de la ganadería bovina en un 80% más, en comparación con la obtenida con sólo el ganado doméstico. Otros casos son algunas UMAs donde los ingresos por ganadería bovina productora de carne representan sólo

el 40% del total de ingresos y el porcentaje restante proviene de la actividad cinegética (Retes, 2010).

Se estima que un productor puede llegar a obtener hasta \$2,500 USD (\$32,500 pesos mexicanos) por la organización de la cacería (guía, hospedaje, alimentación, uso de armas, transporte al lugar de caza) de un ejemplar de *O. virginianus* en su UMA, cantidad que equivaldría a los ingresos por la venta de 13 becerros (becerros de 170 kg a \$24,00 kg en pie). Bajo este esquema, el estado de Sonora durante el ciclo cinegético 2007-2008, se obtuvieron ingresos alrededor de los \$40,000 millones de USD en el rubro de la cacería deportiva (Retes *et al.*, 2010).

En Nuevo León, se han aprovechado alrededor de 8,000 ejemplares de *O. virginianus* en 2 millones de hectáreas bajo el esquema de UMAs, que generó una derrama económica de \$200 millones de pesos mexicanos. Parte de estos ingresos se reinvierten en las UMAs para el pago de sueldos y salarios a empleados rurales, en la construcción y mantenimiento de fuentes de agua para la fauna silvestre y el ganado doméstico, el manejo y mejoramiento del hábitat, suplementación de alimento en épocas críticas, entre otras (Villareal, 2013).

2.7 Problemática en el manejo de *O. virginianus*

La ganadería diversificada en conjunto con las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA), son un sistema de producción propuesto para la explotación y conservación de *O. virginianus*, entre otras especies de interés cinegético o con fines comerciales (SEMARNAP, 1997; INE, 2000). Para lograr los objetivos de dicho sistema, es necesario manejar adecuadamente las poblaciones, donde el componente genético juega un papel preponderante para el mantenimiento a largo plazo de las poblaciones y para mejorar los parámetros de productividad. Sin embargo, los planes de manejo autorizados para las UMAs de venado cola blanca, no cuentan con programas de conservación de la diversidad genética ni con planes de mejora genética que coadyuven a obtener ejemplares con características fenotípicas demandadas por el sector cinegético. Para lograr lo anterior, es importante caracterizar

la diversidad genética de las poblaciones y subespecies de *O. virginianus*, que eventualmente permitirá tomar decisiones para el manejo genético como: el diseño de programas de mejoramiento genético y la aplicación de conceptos de biología de la conservación genética para el rescate de poblaciones y/o subespecies identificadas con baja diversidad genética.

La actividad cinegética se ha convertido en la principal fuente de aprovechamiento de *O. virginianus*, que genera empleos e ingresos económicos a los involucrados en el manejo de las UMAs. Recientemente, se ha propiciado la introducción de individuos de una subespecie de una región diferente a zonas donde no son nativos, pero donde habitan otras subespecies (De la Rosa-Reyna *et al.*, 2012); esto representa un incremento en la probabilidad de mezcla entre subespecies y la consecuente erosión de la diversidad genética por exogamia. Por tanto, resulta necesario conocer el estatus de la diversidad genética en el rango de distribución de las subespecies de *O. virginianus*, identificando poblaciones genéticamente viables para considerar a sus individuos como potenciales para la recuperación de la diversidad genética en otras poblaciones identificadas con baja diversidad genética.

Son escasos los estudios realizados sobre filogeografía de las subespecies de *O. virginianus* distribuidas en el Pacífico Mexicano. Sin embargo, se incentiva a esclarecer la filogeografía de las subespecies de *O. virginianus*, para por un lado, discernir la existencia o no de ecotipos o razas geográficas (subespecies), y por otro, ofrecer el diagnóstico de la relación genealógica que guardan las subespecies en función del espacio geográfico; ajustar la distribución geográfica con la que morfológicamente se conoce para las subespecies, es preponderante para realizar acciones de manejo más efectivas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El área de estudio se denominó región Pacífico Mexicano: comprende nueve de los 32 estados de la República Mexicana y en esta región se distribuyen ocho de las 14 subespecies de *O. virginianus* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Subespecies bajo estudio y su distribución en los estados de la región Pacífico Mexicano.

Estado	Subespecie distribuida en el estado	UMAs registradas al año 2007 por estado*
Colima	<i>O. v. sinaloae</i>	25
Chiapas	<i>O. v. nelsoni</i> ; <i>O. v. thomasi</i>	6
Guerrero	<i>O. v. acapulcensis</i> ; <i>O. v. mexicanus</i>	4
Jalisco	<i>O. v. sinaloae</i> ; <i>O. v. couesi</i>	96
Michoacán	<i>O. v. acapulcensis</i> ; <i>O. v. mexicanus</i> ; <i>O. v. sinaloae</i>	54
Nayarit	<i>O. v. couesi</i> ; <i>O. v. sinaloae</i>	25
Oaxaca	<i>O. v. acapulcensis</i> ; <i>O. v. mexicanus</i> ; <i>O. v. oaxacensis</i> ; <i>O. v. thomasi</i> ; <i>O. v. toltecus</i>	20
Sinaloa	<i>O. v. sinaloae</i> ; <i>O. v. couesi</i>	21
Sonora	<i>O. v. couesi</i> ; <i>O. v. sinaloae</i>	976

Fuente: Elaboración propia, con datos reportados por Chillopa (2008).

*Valores relativos ya que anualmente se incorporan UMAs y otras dejan de operar.

3.2 Muestreo

Para el conocimiento de la historia evolutiva, la estructura poblacional y filogeografía no se requiere un número elevado de muestras, sobre todo de especies crípticas y de aquellas que se desconoce su estatus poblacional (Desalle y Amato, 2004). Es decir, con que se tenga al menos tres muestras de ejemplares diferentes (Awise, 1987, 2000, 2009, Premoli *et al.*, 2011) de las categorías taxonómicas reconocidas dentro de su

rango de distribución, se captura información confiable del espectro de la diversidad genética de las subespecies bajo estudio, aunado a la característica del ADN_{mt} que es heredado vía materna, por tanto la reconstrucción genealógica de las subespecies, mostrará patrones de dispersión histórica relevantes y dispersión microgeográfica (Awise *et al.*, 1987).

La subespecie manejada en las UMAs que enviaron muestras, se corroboró al sobreponer el punto de georreferencia de la UMA sobre el mapa de la distribución geográfica de *O. virginianus* reportada por Hall (1981). También se corroboró la subespecie manejada con la información proporcionada por el técnico de la UMA, que a su vez está especificada en el Plan de Manejo autorizado por la SEMARNAT para esa UMA (Rojo-Curiel *et al.*, 2007; SEMARNAT, 2014).

Para determinar si el muestreo quedó aleatoriamente representado en el mapa de la distribución de las subespecies de *O. virginianus* en México, se aplicó un análisis de correlación espacial a las coordenadas geográficas de las UMAs, usando la estadística del índice de G, para el diagnóstico de la cohorte de los datos de longitud y latitud; dicho análisis calcula si los puntos tienen un esquema de muestreo al azar (Diggle, 2002); este análisis fue implementado en el software R (R Core Team, 2013), con los paquetes Spatstat y Gstat, los cuales están programados según la metodología propuesta por Bivand *et al.* (2013), que usa la función gráfica G de Diggle (2013). Previamente, las coordenadas geográficas de los puntos de muestreo fueron convertidas a UTM (Universal Transversa Mercator), y se les aplicó un análisis de control de calidad de puntos georreferenciados para determinar su correspondencia dentro del territorio mexicano mediante el servidor gratuito de Google Fusion Tables (disponible en: tables.googlelabs.com/).

Los puntos de muestreo fueron sobrepuestos sobre el mapa digitalizado del Plan de Manejo Tipo Venado Cola Blanca (Rojo-Curiel *et al.*, 2007), señalando con un punto la localidad de colecta (donde se ubica la UMA) y el número de muestras obtenidas en cada UMA. El mapa se realizó con ArcMap v. 10.1 (ESRI, 2011).

3.3 Material biológico

Las muestras de tejido se recibieron y conservaron en un ultracongelador a -30 °C instalado en el Laboratorio de Genética y Reproducción de Fauna Silvestre, Campus San Luis Potosí, Colegio de Postgraduados, hasta la posterior extracción de ADN. A cada muestra se le asignó un código de identificación y con base a dicho código, se elaboró una base de datos que contuvo: subespecie, procedencia de caza del animal (Estado y UMA), coordenadas geográficas de la UMA, el sexo y el tipo de tejido.

Se recolectaron un total de 105 muestras de tejido de *O. virginianus*. Las muestras recolectadas por subespecie y Estado se presentan en el Cuadro 4. La proporción de muestras recibidas estuvo compuesta en la siguiente proporción: corazón (1%); hígado (3%); músculo (40%); oreja (19%); piel (35%); riñón (1%); y terciopelo de asta (1%).

Cuadro 4. Material biológico de *O. virginianus* obtenido por subespecie y Estado.

Subespecie	Estado	Número de muestras
<i>O. v. acapulcensis</i>	Guerrero	8
<i>O. v. acapulcensis</i>	Michoacán	3
<i>O. v. acapulcensis</i>	Oaxaca	5
<i>O. v. couesi</i>	Jalisco	2
<i>O. v. couesi</i>	Sonora	24
<i>O. v. mexicanus</i>	Guerrero	3
<i>O. v. mexicanus</i>	Michoacán	2
<i>O. v. mexicanus</i>	Oaxaca	3
<i>O. v. nelsoni</i>	Chiapas	14
<i>O. v. oaxacensis</i>	Oaxaca	6
<i>O. v. sinaloae</i>	Colima	1
<i>O. v. sinaloae</i>	Michoacán	10
<i>O. v. sinaloae</i>	Sinaloa	9
<i>O. v. thomasi</i>	Chiapas	11
<i>O. v. toltecus</i>	Oaxaca	4

3.4 Extracción de ADN: calidad y cantidad por tipo de tejido

Se pesaron entre 10 y 15 mg de tejido blando cortado en trozos lo más finamente posible; las muestras de piel y oreja, fueron afeitadas y cortadas finamente con un bisturí y fueron depositados en tubos de 2 mL. A cada muestra se agregó 180 μ L de buffer ATL y 20 μ L de *proteínasa K* (Qiagen®), dejándose en incubación a 56 °C por más de dos horas para completar el proceso de digestión, hasta observar que el tejido se encontrara completamente lisado. Se prosiguió a aplicar el protocolo de extracción de ADN de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit comercial DNeasy Tissue Kit de Qiagen®. Una vez finalizado el procedimiento de extracción, se usó una alícuota de 3 μ L de la extracción de ADN mezclada con 1 μ L Green DNA Dye (BioBasic®), para verificar la extracción exitosa del ADN en geles de agarosa (Promega®) al 1.5%, corriéndolos en una cámara para electroforesis vertical a 80 Volts durante 40 min.

La cuantificación de las extracciones se realizó en un NanoDrop (modelo 2000 Thermo Scientific®), el cual se estandarizó con un blanco para obtener 0 (cero) en las variables a medirse. De cada extracción de ADN, se usaron 2 μ L para cuantificar los valores de las variables: concentración de ácidos nucleicos (cantidad de ADN en ng/ μ L) y la calidad y pureza del ADN (relación 260/280 nm). Para esta última variable se tomó como criterio: una relación de 1.8 generalmente es considerada como aceptable en la pureza del ADN; a una relación sensiblemente menor o superior indica la presencia de proteínas, fenoles u otros contaminantes que absorben cerca de 280 nm.

Con la finalidad de identificar qué tipo de tejido recolectado proporcionó mayor cantidad y calidad de ADN, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilks para contrastar la normalidad del conjunto de datos y la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la bondad y ajuste de las distribuciones entre sí para las variables cantidad y calidad de ADN. Dada la naturaleza de los datos, las variables no presentaron una distribución normal (Shapiro-Wilks test: concentración de ADN: λ de Wilks: 0.7384, $p = 2.171e^{-12}$; relación 260/280: λ de Wilks: 0.9584, $p = 0.002287$), y tampoco cumplieron con los supuestos de la prueba de bondad y ajuste (Kolmogorov-Smirnov test: concentración de ADN = Ajuste: Normal (0,1); media = 68.15; varianza = 3658.28; $n=105$; Estadístico D = 1.00,

$p < 0.0001$; Relación 260/280 = Ajuste: Normal (0,1); media = 1.78; varianza = 0.04; $n = 105$; Estadístico D = 0.90, $p < 0.0001$), por tanto se decidió aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias en la concentración y calidad del ADN, seleccionando la comparación de rangos de Wilcoxon para determinar en qué tipo de tejido se obtuvo una mejor integridad del ADN. Los análisis estadísticos se realizaron en el software R (R Core Team, 2013) e Infostat versión estudiantil (INFOSTAT, 2008).

3.5 Amplificación por PCR y secuenciación de la región D-loop

Enseguida de la extracción del ADN se realizó la PCR, a un volumen final de 25 μL con los siguientes componentes:

- 14.3 μL de agua grado biología molecular (Invitrogen®).
- 5 μL de buffer 10X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl; Biorad®).
- 2 μL de MgCl_2 (50 mM; Biorad®).
- 0.5 μL de dNTPs (10 mM de cada dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Biorad®).
- 0.5 μL de cada Primer's (2 μM): DLF 5'-ATC GCC CAC TCT TTC CTC TT-3' y DLR 3'-TCA GTG CCT TGC TTT ATT GT-5' (Invitrogen Custom Primer®).
- 0.2 μL de iTaq polimerasa (5 U/ μL) (Biorad®).
- 2.5 μL de ADN (~125 ng).

Las PCR's se realizaron siguiendo los cuidados para evitar contaminación, manejo adecuado y uso eficiente de reactivos (Espinosa, 2007).

La amplificación se realizó en un termociclador (modelo T100, marca Biorad®) y se programaron las siguientes condiciones: activación de la polimerasa a 95 °C por 3 min y desnaturalización a 95 °C por 30 s, seguido por 31 ciclos de PCR, los cuales incluyeron: 95 °C por 30 s (desnaturalización); 55 °C por 30 s (alineamiento) y 72 °C por 30 s (polimerización); se agregó un paso adicional de 72 °C por 7 min (extensión final) para terminar de sintetizar aquellos fragmentos que pueden haber quedado

incompletos; al finalizar los ciclos, se programó un ciclo de conservación a 4°C hasta retirar las muestras.

Una alícuota de 3 µL del producto de PCR se tiñó con 1 µL de Green DNA Dye (BioBasic®) para verificar la amplificación exitosa en geles de agarosa (Promega®) al 1.5 %, corriéndolos en una cámara para electroforesis horizontal (Biorad®) a 100 Volts durante 40 min. En el carril inicial del gel, se colocó un marcador de peso molecular de 100 pb (Biorad®), que sirvió como referencia visual para determinar el tamaño aproximado en pb del fragmento amplificado y de esta manera identificar el producto de PCR esperado. Se obtuvo un fragmento entre 400 y 600 pb, con referencia al marcador.

Los productos de PCR se cuantificaron en un Nanodrop (modelo 2000 Thermo Scientific®) y cada muestra se llevó a la concentración de 50 ng/µL, que es la concentración requerida por el servicio de secuenciación estándar de Macrogen (Corea), empresa a la cual se enviaron las muestras para ser secuenciadas. En Macrogen se utiliza la técnica de Sanger, la tecnología capilar y el secuenciador Applied Biosystems 3730XLs para realizar la secuenciación simple de nucleótidos (www.macrogen.com).

3.6 Análisis estadístico de datos haplotípicos

3.6.1 Análisis y alineamiento de las secuencias

Se realizó la inspección visual de las secuencias usando el programa Chromas v. 2.1.1 (Technelysium, 2012) y las secuencias se compararon con un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information), para comparar las secuencias obtenidas con las depositadas para *O. virginianus* en ese sistema.

Se generó una base de datos con las secuencias obtenidas, agrupándolas por subespecie. Con esta base de datos se estimaron los indicadores de diversidad y estructura genética y las redes de haplotipos. En otra base de datos se agregaron las

secuencias únicas (haplotipos diferentes) que fueron identificadas en el software DNACollapser (Villensen, 2007) y además, como grupos externos, se agregaron las secuencias de la región D-loop del ADN_{mt} del venado bura *O. hemionus* (acceso GenBank: JN040716.1), del venado gamo *Dama dama* (acceso GenBank: JF505631.1) y del ciervo pudú *Pudu puda* (acceso GenBank: gb|GU190827.1), para fijar la raíz del filograma.

Se realizaron alineamientos independientes para cada base de datos de secuencias (las secuencias obtenidas y donde se encuentran los grupos externos), con el algoritmo Clustal W, instalado en el programa MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2013).

3.6.2 Diversidad genética y patrones demográficos históricos de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

Se estimó la composición nucleotídica (proporción de cada base nitrogenada) de las secuencias por subespecie. Se calculó el número de sitios polimórficos (S); número de haplotipos identificados (H_i), el número de haplotipos compartidos dentro (H_c) y entre subespecies, la diversidad haplotípica (H), y diversidad nucleotídica (π) por subespecie. Se aplicó la prueba de neutralidad Tajima's D (Tajima, 1989), como indicador de los cambios de expansión poblacional ocurridos en las subespecies. Estos indicadores fueron implementados en el software Arlequín v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Para medir el efecto que tuvieron los cambios demográficos históricos en el tamaño poblacional de las subespecies y que dieron origen a la diversidad genética observada, se aplicó la prueba "Mismatch distribution" que se basa en la comparación de la distribución de las diferencias de las frecuencias nucleotídicas pareadas (observado vs. esperado) usando un gráfico de histograma de frecuencias que compara los valores observados vs esperados (Roger *et al.*, 1994); el ajuste de esta prueba se comprobó con los valores de R^2 , theta inicial (θ) y tau (τ) (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Este test fue desarrollado en el software DnaSP v. 5 (Librado y Rozas, 2009).

3.6.3 Estructura genética entre y dentro de subespecies y por región geográfica de distribución en el Pacífico Mexicano

Para determinar la diferenciación (estructura) de la diversidad genética entre y dentro de subespecies de *O. virginianus*, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), que permite probar la hipótesis de diferenciación genética (F_{ST} con un $\alpha = 0.05$, obtenido a partir de 1023 permutaciones) entre los niveles jerárquicos de variación; en el primer AMOVA se agruparon a todas las subespecies para obtener los valores de la partición de la variación genética entre y dentro las subespecies. Otro AMOVA se realizó considerando tres niveles de variación genética: entre grupos de subespecies (F_{SC}), entre subespecies dentro de grupos (F_{ST}), y dentro de subespecies (F_{CT}). Para esto, se agruparon a las subespecies del norte del país (*O. v. couesi* y *O. v. sinaloae*), a las del centro (*O. v. mexicanus* y *O. v. acapulcensis*) y a las del sur (*O. v. nelsoni*, *O. v. oxacensis*, *O. v. thomasi* y *O. v. toltecus*) para comparar su diversidad genética con base en su región geográfica (Weir y Cockerham, 1984; Excoffier *et al.*, 1992; Weir, 1996). El AMOVA se basa en la construcción de una matriz de distancias euclidianas pareadas entre muestras (es una matriz que resume las diferencias entre las frecuencias haplotípicas), arreglada en una matriz subdivida en matrices que corresponden a cada subespecie, a partir de las cuales se estiman la suma de cuadrados para los diferentes niveles de información jerárquica de la variación genética. Los AMOVAs se obtuvieron a partir de una significancia estadística de 1023 permutaciones aleatorias y fueron implementados en el software Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

También se obtuvieron los índices de diferenciación genética pareados (F_{ST}) y los valores de flujo genético (Nm) pareados para las subespecies de *O. virginianus* según el método basado en las frecuencias haplotípicas (Slatkin, 1981; 1985; 1995), pruebas que se realizaron en Arlequin v. 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Se usó el criterio de Nelson (1993) para considerar un Nm alto con $Nm \geq 40$ venados por generación y Nm restringido con $Nm \leq 40$ venados por generación. Con los valores obtenidos de F_{ST} y Nm , se aplicó un análisis de escalamiento multidimensional (MDS; Multidimensional Scaling) de 2 x 2 dimensiones, para esclarecer la similitud (o disimilitud) entre las

subespecies. Este análisis es una prueba de interdependencia, el cual calcula una matriz de distancias euclidianas pareadas, cuyo resultado es un gráfico con un espacio geométrico de dos dimensiones (Lessa, 1990), donde se representan las proximidades existentes entre los valores F_{ST} y N_m de cada subespecie; el ajuste del gráfico se evaluó con los valores de “Stress” (>0.2 bueno o >0.7 muy bueno) y R^2 (>0.3 buen ajuste o >0.7 muy buen ajuste). Se desarrolló una matriz con los valores de F_{ST} y N_m para cada par de subespecie pareada y se aplicó un Análisis de Componentes Principales (APC) con el método de rotación *Varimax* a la matriz de los eigenvalues. Ambos análisis se implementaron en el software SPSS 15.0 (SPSS, 2004).

3.6.4 Relaciones filogenéticas de las subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

Antes de realizar los filogramas, se identificó el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajusta a las secuencias de las subespecies de *O. virginianus* (Nei y Kumar, 2000). El modelo de Jukes-Cantor (JC; ver Anexo), fue el modelo que mejor describió el patrón de sustitución de nucleótidos por presentar un menor número de parámetros (197), bajo coeficiente del Criterio de Información Bayesiana (BIC= 3191.8639), con valor promedio del Criterio de Información Akaike (AICc= 1989.5709) y mayor valor del parámetro de Maximum Likelihood (lnL= -786.6472), en contraste con los restantes 23 modelos de sustitución de nucleótidos probados (Nei y Kumar, 2000; Tamura *et al.*, 2013).

Los filogramas arrojan luz sobre los eventos evolutivos en las secuencias que han generado la actual diversidad genética en las subespecies. Se realizaron dos filogramas aplicando el modelo de JC; el primer filograma se generó con el método de Máximo Likelihood (ML) que está basado en la prueba de Neighbor-joining como un método de evaluación de las ramas del árbol. Otro filograma se generó con el método de Máxima Parsimonia (MP), que está basado en el algoritmo branch-and-bound que se utiliza para encontrar el árbol más parsimonioso (Nei y Kumar, 2000). La evaluación del ajuste de las ramas de cada filograma se evaluó con 1000 réplicas de Bootstrap

(Felsenstein, 1985). Los filogramas fueron realizados en el software MEGA v. 6 (Tamura *et al.*, 2013), siguiendo el protocolo mencionado por Hall (2004) y Hall (2013).

Adicionalmente se construyó un árbol evolutivo genético usando Median-Joining Network basado en el criterio de Máxima Parsimonia, para generar una red de haplotipos con estimaciones de pasos mutacionales entre haplotipos; el valor de ϵ fue por defecto cero. Este análisis se realizó con el programa Network© v. 5 (Fluxus Technology Ltd, 1999-2016).

3.6.5 Genealogía de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

Se usó el programa TCS v. 1.21 (Clement *et al.*, 2000) para estimar la genealogía de genes entre las subespecies de *O. virginianus*, a través de una red multifurcada y reticulada aplicando los principios de parsimonia estadística (Templenton *et al.*, 1992; 2004; Templenton y Sing, 1993). Este análisis, que considera los principios de coalescencia, describe las relaciones genealógicas entre los haplotipos, en la cual, un haplotipo pudo dar origen a muchos haplotipos, mediante la conexión del mínimo número posible de mutaciones entre ellos. El algoritmo de parsimonia estadística estima el número máximo de diferencias de pares de bases entre las secuencias, atribuidas a mutaciones únicas en cada sitio de la secuencia, con un límite de parsimonia del 95% (Posada y Crandall, 2001). La red se explica con las siguientes predicciones: a) los haplotipos con mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser genes ancestrales; b) los haplotipos que tienen múltiples conexiones muy probablemente son ancestrales; c) dentro de la red, los haplotipos ancestrales son de interior y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de ser periféricos; d) se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica, básicamente porque los individuos que tienen esos haplotipos han tenido mucho tiempo para dispersarse; e) los haplotipos con una única conexión se prevé estén unidos a haplotipos de la misma población, dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto sin tiempo para dispersarse (Clement *et al.*, 2000).

3.6.6 Aislamiento por distancia entre subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

Con la herramienta para calcular distancias en el programa Google Earth™ se midieron las distancias promedio de la distribución geográfica de cada subespecie, información con la cual se construyó una matriz de distancias geográficas pareadas de las subespecies, cuyos valores fueron transformadas a logaritmo base 10. La matriz de diferenciación genética F_{ST} (obtenida con el software Arlequín v. 3.11, como se explica en el apartado 7.7.3 de esta sección; ver resultado del Cuadro 9), fue normalizada usando la ecuación propuesta por Cullingham *et al.* (2010): distancia genética = $F_{ST} / (1 - F_{ST})$. Con ambas matrices, se aplicó la prueba de Mantel (Mantel, 1967) para probar la correlación, mediante el coeficiente de correlación de Pearson, entre la matriz de distancias geográficas y la matriz de distancias genéticas; el *p-value* se calcula utilizando la distribución de las dos matrices estimada a partir de 10000 permutaciones. El sentido biológico de esta prueba indica la existencia de una estructura genética espacial que puede explicarse por la distancia geográfica (Guillot *et al.*, 2009). El test de Mantel fue implementado en el software XLSTAT, que se instala como complemento en Excel® (XLSTAT, 2015).

IV. RESULTADOS

4.1 Muestreo

El muestreo global, usando las coordenadas geográficas para todas las subespecies, indicó una desviación significativa de la dispersión completamente aleatoria entre los puntos de muestreo (Figura 4). De manera particular, el análisis de correlación espacial individual (por subespecie) mostró que para siete de las ocho subespecies estudiadas, el muestreo presentó una distribución aleatoria; solo para *O. v. nelsoni* no se tuvo un muestreo aleatorio (Figura 5). La aleatoriedad del muestreo se asume cuando la línea continua (G_{obs}), que representa los datos reales de los puntos de muestreo, se sale de la envoltura límite (banda en color gris que representa el límite de las 99 funciones calculadas a partir de simulaciones Monte Carlo: G_{hi} y G_{lo}), lo cual indica la completa aleatoriedad entre los puntos del muestreo, respecto a lo esperado (G_{theo}) (Figura 5).

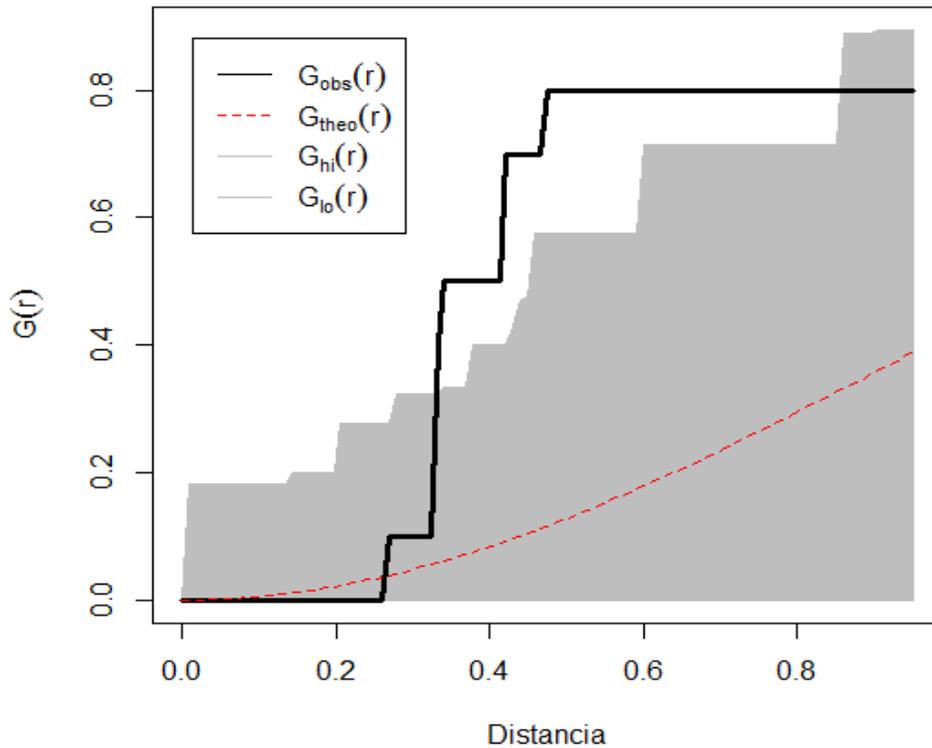


Figura 4. Aleatorización del muestreo de subespecies de *O. virginianus* en el Pacífico Mexicano.

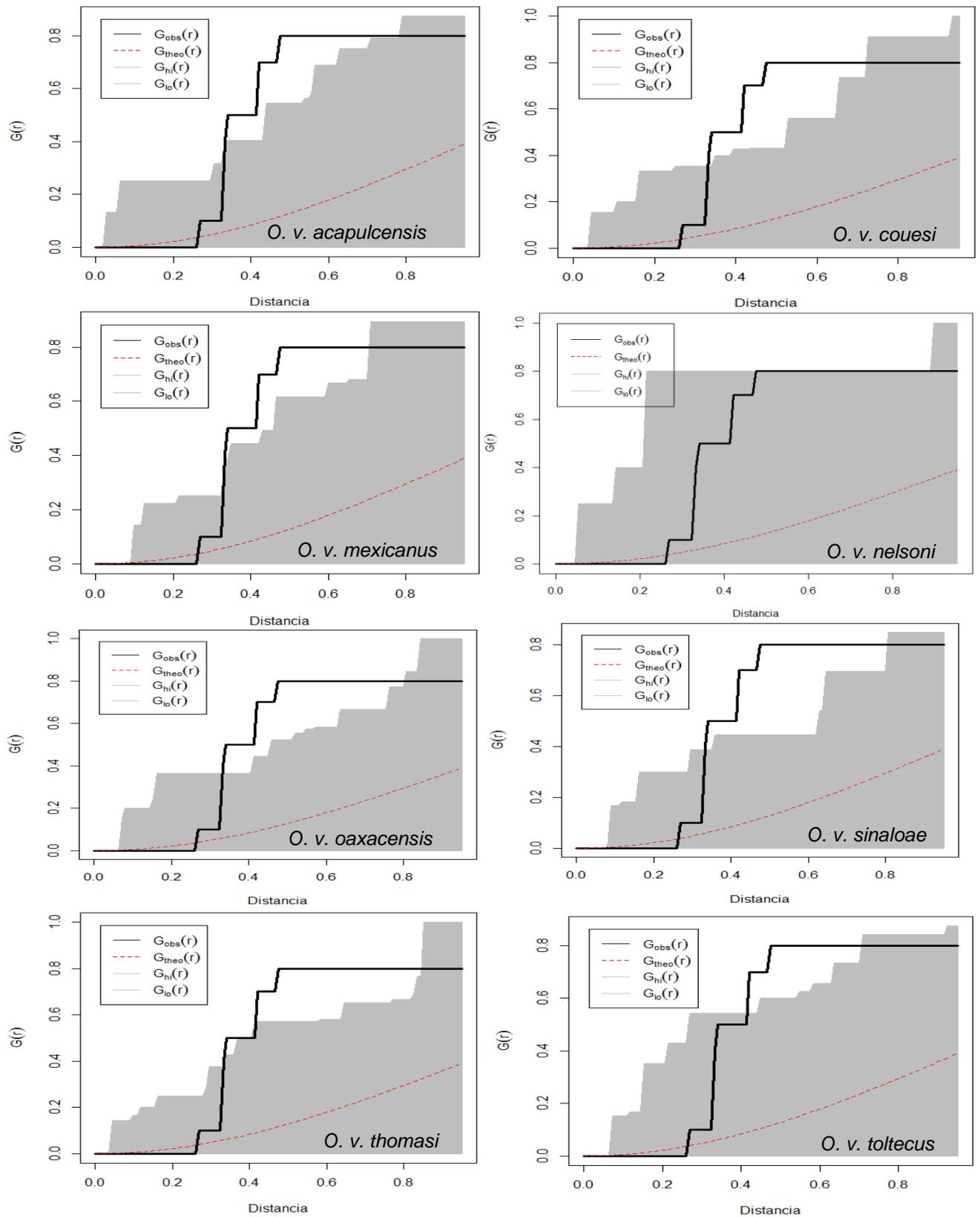
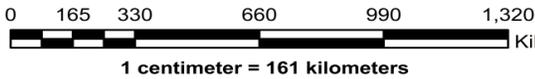
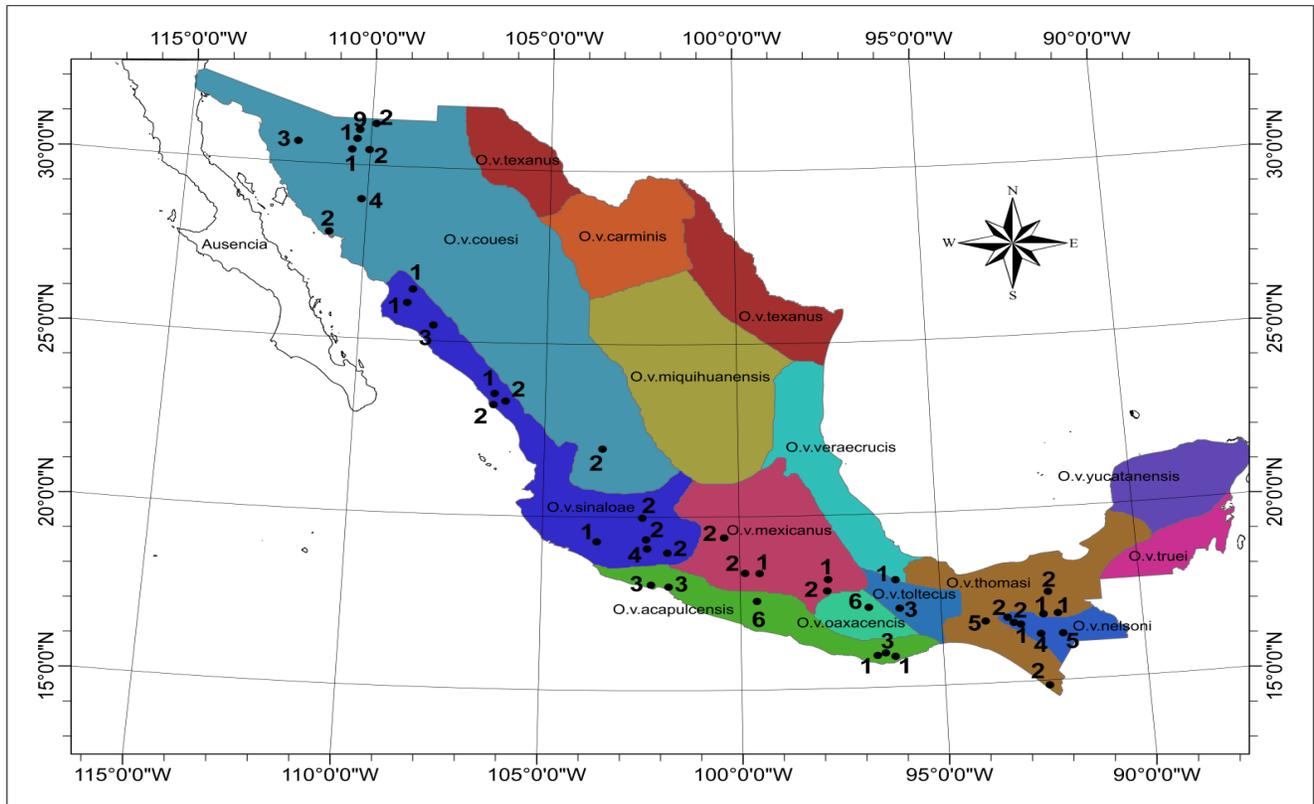


Figura 5. Muestreo aleatorio por subespecie de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano.

El muestreo quedó representado en el mapa de la distribución geográfica de las subespecies propuesto por Hall (1981), donde se muestra con un punto, la posición geográfica de las UMAs, asociado al número de secuencias obtenidas en cada UMA (Figura 6).

Muestreo de subespecies de O. virginianus en el Pacífico Mexicano



Parámetros cartográficos:
North_America_Lambert_Conformal_Conic
Datum: D_ITRF_1992
Unidades: Metros

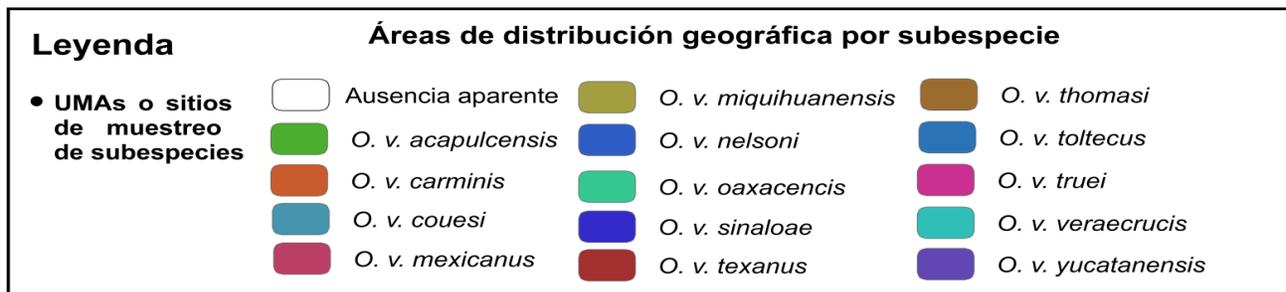


Figura 6. Distribución del muestreo de subespecies de *O. virginianus* en el Pacífico Mexicano.

4.2 Calidad y cantidad de ADN de tejidos de subespecies de *O. virginianus*

El ADN que se obtuvo de las muestras de los diferentes tipos de tejido de *O. virginianus* varió en la cantidad y calidad de ADN. Las concentraciones de ADN máximas se obtuvieron con el tejido hígado y riñón con 335.2 ng/μL y 294.5 ng/μL, respectivamente, asociadas a una relación 260/280 de entre 1.8 y 1.9 nm, indicador de pureza aceptable del ADN. Las muestras de músculo y oreja mostraron concentraciones máximas de ADN de 244 ng/μL y 166.7 ng/μL, respectivamente, pero con la ventaja de presentar una calidad aceptable de ADN (1.8 nm). De muestras de piel se obtuvieron concentraciones máximas de 215.6 ng/μL, aunque con una calidad de ADN ligeramente baja ($\bar{X} = 1.73$ nm). En muestras de cartílago, corazón y terciopelo de astas, las concentraciones de ADN máximas no superaron los 100 ng/μL pero su calidad estuvo alrededor de los 1.8 nm (± 0.5 nm). Se obtuvieron mejores resultados con hígado y riñón al tener mayor número de células que los otros tejidos. La calidad de ADN en músculo disminuye por la presencia de mioglobina.

Según la prueba de Kruskal-Wallis determinó diferencias significativas en la concentración de ADN por tipo de tejido ($H = 21.71$, $p = 0.0028$) pero no se presentaron diferencias significativas en la variable relación 260/280 nm por tipo de tejido ($H = 10.18$, $p = 0.1781$). Según la prueba de rangos de Wilcoxon, la concentración de ADN en riñón e hígado fueron significativamente iguales ($\bar{X} = 294.5$ ng/μL y $\bar{X} = 194.83$ ng/μL, respectivamente), pero fueron significativamente superiores a la concentración de ADN obtenida en el tejido de piel ($\bar{X} = 79.8$ ng/μL), oreja ($\bar{X} = 63.32$ ng/μL), terciopelo de astas ($\bar{X} = 61.3$ ng/μL); corazón ($\bar{X} = 54.1$ ng/μL), músculo ($\bar{X} = 46.48$ ng/μL), y cartílago ($\bar{X} = 38.5$ ng/μL), fueron significativamente iguales en cantidad de ADN (Figura 7).

Aunque no se presentaron diferencias en cuanto a la relación 260/280 nm referida a la calidad de ADN, se observó que las extracciones de ADN obtenidas de corazón ($\bar{X} = 1.81$ nm), oreja ($\bar{X} = 1.82$ nm) y músculo ($\bar{X} = 1.79$ nm) fueron las más cercanas a la relación deseada de 260/280 (1.8 nm), lo cual es indicador de que con este tipo de tejidos se obtiene ADN de calidad (aunque ADN en menor cantidad). Los demás tejidos

(hígado, riñón, cartílago, piel y terciopelo de astas), presentaron una relación 260/280 alrededor de ± 0.1 nm de 1.8 nm.

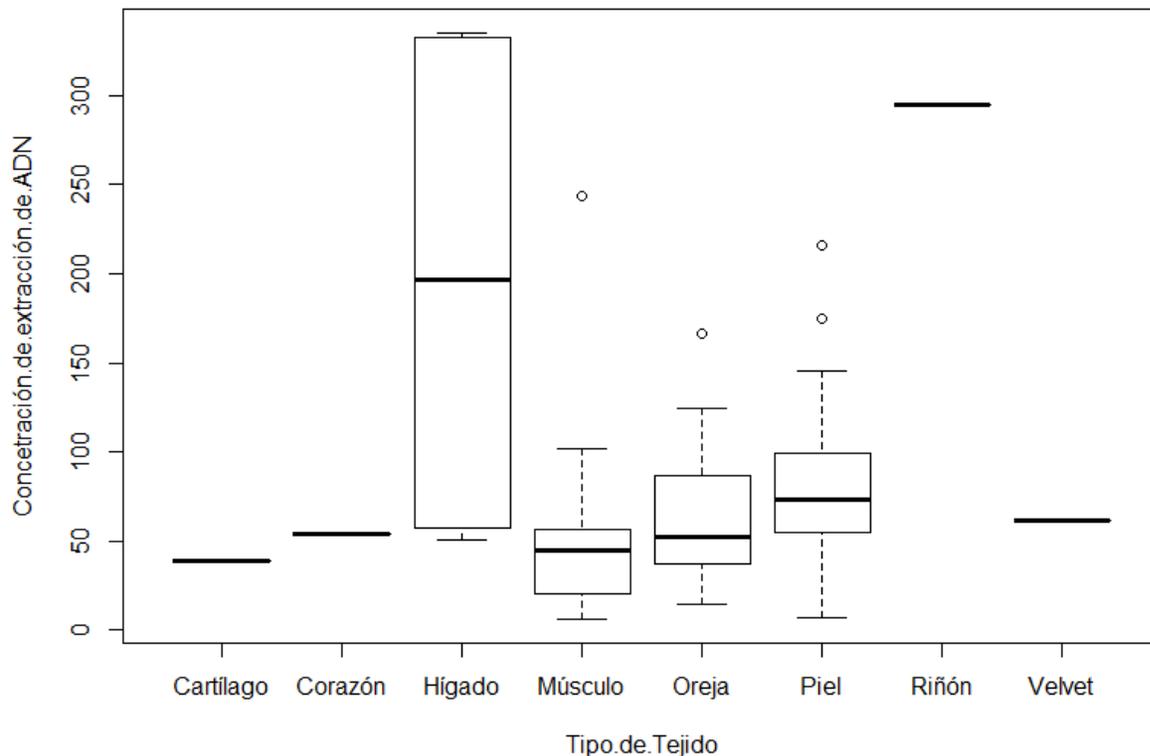


Figura 7. Cantidad de ADN por tipo de tejido de subespecies de *O. virginianus*.

4.3 Características de las secuencias

Se obtuvieron 105 secuencias del fragmento de la región control del ADN_{mt} de las ocho subespecies de *O. virginianus*, con longitud de 425 bases promedio. El análisis de secuencias correspondió a 185.7 sitios polimórficos promedio, 123.37 transiciones promedio y 136.75 transversiones promedio, en las que se presentaron 260.12 sitios parsimoniosamente informativos. Las secuencias estuvieron compuestas por una mayor proporción de timinas, seguido de adeninas y citosinas, y en menor proporción de guaninas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Composición nucleotídica de secuencias de la región D-Loop del ADN_{mt} de subespecies de *O. virginianus*.

Subespecie	n	S	T (%)	C (%)	A (%)	G (%)
<i>O. v. acapulcensis</i>	16	80	30.43	22.31	29.54	17.73
<i>O. v. couesi</i>	26	115	30.90	21.69	29.83	17.31
<i>O. v. mexicanus</i>	8	34	33.12	22.23	25.43	19.21
<i>O. v. nelsoni</i>	14	409	28.21	26.01	27.53	18.25
<i>O. v. oaxacensis</i>	6	3	29.46	22.58	30.11	17.85
<i>O. v. sinaloae</i>	20	356	30.72	22.96	28.70	17.62
<i>O. v. thomasi</i>	11	431	29.13	23.76	27.45	19.66
<i>O. v. toltecus</i>	4	58	28.23	23.38	27.59	20.80
Promedio	-	185.75	30.03	23.12	28.28	18.56

S: número de sitios polimórficos; T: Tiamina; C: Citosina; A: Adenina; G: Guanina.

4.4 Diversidad genética y patrones demográficos históricos de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

O. v. acapulcensis y *O. v. toltecus* fueron las subespecies que presentaron la mayor diversidad haplotípica en contraste con las restantes seis subespecies; sin embargo, *O. v. acapulcensis* y *O. v. oaxacensis* fueron las que presentaron menor diversidad nucleotídica en comparación con las demás subespecies; *O. v. toltecus* es la subespecie que presentó mayor diversidad haplotípica y su diversidad nucleotídica supera el promedio de este indicador, con respecto a las demás subespecies (Cuadro 6). Un dato interesante es que las subespecies *O. v. acapulcensis*, *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus*, *O. v. oaxacensis* y *O. v. sinaloae* están en un proceso de selección, cuyas poblaciones se han expandido después de un reciente cuello de botella, según los valores predichos del índice de Tajima's ($D < 0$; Cuadro 6), lo cual es congruente con el uso de estas subespecies, ya que son las más importantes en términos cinegéticos y tienen un aprovechamiento constante. Por su parte, las subespecies: *O. v. nelsoni*, *O. v. thomasi* y *O. v. toltecus* se encuentran en un fenómeno de selección estabilizadora por la contracción repentina de la población ($D > 0$, índice de Tajima's D ; Cuadro 6); estas

subespecies no tienen un aprovechamiento cinegético riguroso, lo que de cierta manera permite el mantenimiento de las características genéticas de manera selectiva.

Cuadro 6. Indicadores de diversidad genética de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano.

Subespecie	<i>n</i>	<i>H_i</i>	<i>H_c</i>	<i>H</i>	π	Tajima's <i>D</i>
<i>O. v. acapulcensis</i>	16	16	0	1.0±0.0221	0.0541±0.0281	-0.5137
<i>O. v. couesi</i>	26	25	1	0.9969±0.0117	0.1760±0.0871	-0.3151
<i>O. v. mexicanus</i>	8	7	1	0.9643±0.0772	0.2773±0.1521	-1.4233
<i>O. v. nelsoni</i>	14	12	2	0.9780±0.0345	0.5551±0.2838	0.3412
<i>O. v. oaxacensis</i>	6	4	2	0.8000±0.1721	0.0021±0.0019	-1.2331
<i>O. v. sinaloae</i>	20	19	1	0.9947±0.0178	0.3037±0.1518	-1.598
<i>O. v. thomasi</i>	11	10	1	0.9818±0.0463	0.5652±0.2960	1.6626
<i>O. v. toltecus</i>	4	4	0	1.0±0.1768	0.3863±0.2536	2.2613
Total	105	97	8	0.9644±0.0698	0.2899±0.1568	\bar{X} = -0.102

H_i = número de haplotipos identificados; *H_c* = número de haplotipos compartidos dentro de la subespecie; *H* = diversidad haplotípica (± desviación estándar); π = diversidad nucleotídica (± desviación estándar).

La prueba de *Mismatch distribution* para todas las subespecies, se ajustó a una distribución multimodal, ya que se observa la presencia de varios picos definidos, que indican la expansión poblacional histórica y un consecuente desequilibrio demográfico (Figura 8). En este sentido, la comparación de la distribución observada vs esperada presentaron buena adecuación entre el conjunto de datos con el modelo de rápida expansión poblacional en cada subespecie (*O. v. acapulcensis*: $R^2 = 0.1154$, $\theta = 12.072$ y $\tau = 8.17$; *O. v. couesi*: $R^2 = 0.1238$, $\theta = 10.992$ y $\tau = 4.195$; *O. v. mexicanus*: $R^2 = 0.2038$, $\theta = 9.007$ y $\tau = 0.000$; *O. v. nelsoni*: $R^2 = 0.2126$, $\theta = 9.710$ y $\tau = 1.477$; *O. v. oaxacensis*: $R^2 = 0.1667$, $\theta = 0.000$ y $\tau = 1.000$; *O. v. sinaloae*: $R^2 = 0.1686$, $\theta = 28.378$ y $\tau = 0.000$; *O. v. thomasi*: $R^2 = 0.2260$, $\theta = 39.960$ y $\tau = 24.204$; *O. v. toltecus*: $R^2 = 0.3147$, $\theta = 27.982$ y $\tau = 10.518$). Esta hipótesis refuerza las predicciones del modelo de Tajima's *D*, sobre los procesos de cuellos de botella y la contracción repentina de las subespecies.

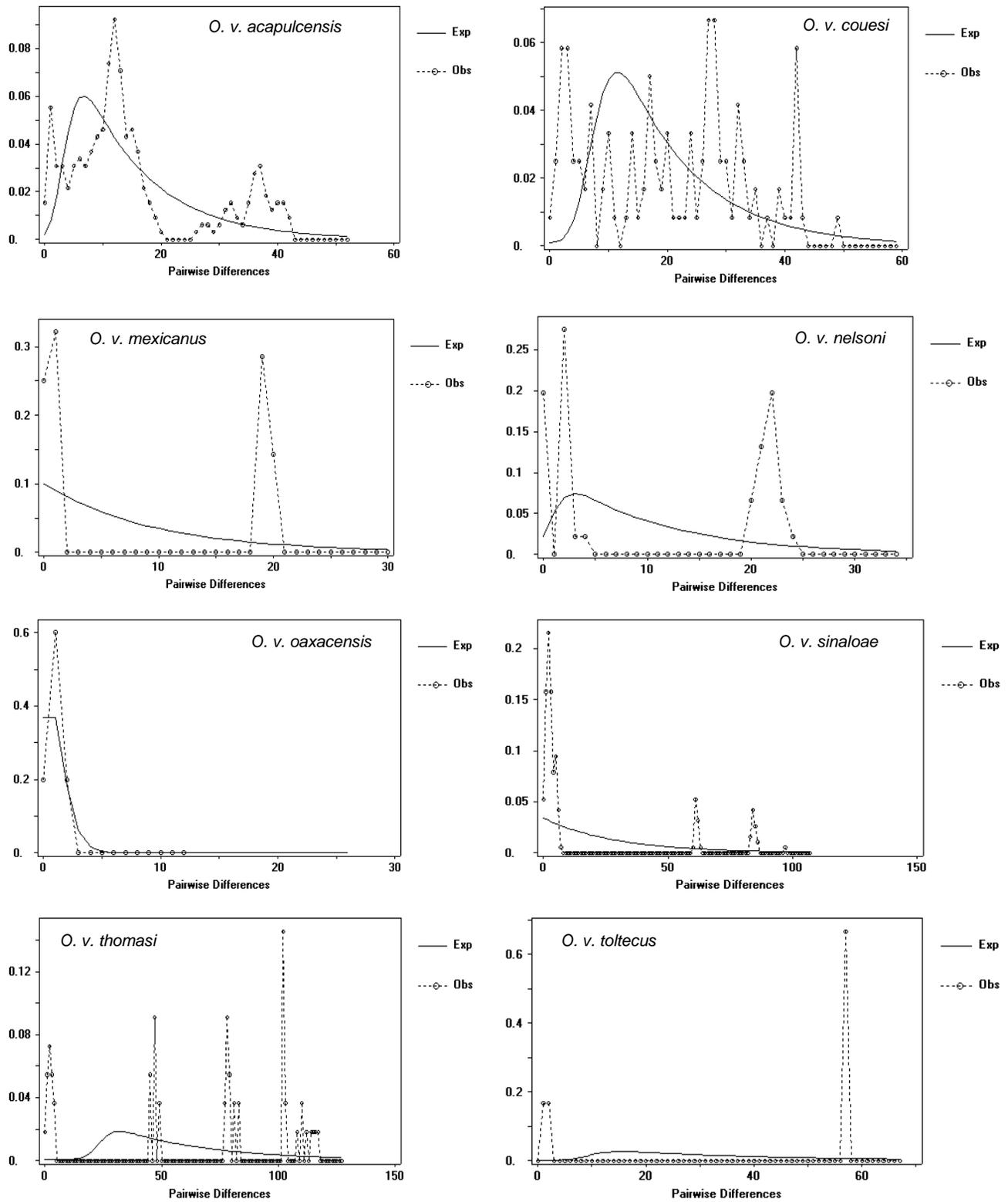


Figura 8. *Mismatch distribution* que muestra cambios en el tamaño de población de subspecies de *O. virginianus*, sobre un modelo de crecimiento poblacional.

4.5 Estructura genética entre y dentro de subespecies de *O. virginianus* y por región geográfica de distribución en el Pacífico Mexicano

De acuerdo con los resultados del AMOVA, las subespecies mostraron una estructura genética. Es decir, se presentó diferenciación genética entre y dentro de subespecies ($F_{ST} = 0.02105$, $p < 0.05$). Esta diferenciación está representada por un 2.11% de variación entre subespecies, pero la mayor partición de la variación genética está alojada dentro de subespecies con un 97.89% de variabilidad genética, lo cual es explicado por la diversidad genética que cada individuo aporta a la población, generando una estructura genética definida dentro de cada subespecie (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de subespecies de *O. virginianus* el Pacífico Mexicano.

Fuentes de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre subespecies	7	4.362	0.01504	2.11
Dentro de subespecies	97	47.553	0.4902	97.89
Total	104	51.914	0.50078	100

Cuando se agruparon las poblaciones con base en su región geográfica, el AMOVA indicó diferenciación genética entre las subespecies del norte, centro y sur del Pacífico Mexicano, ya que se presentó un porcentaje negativo (-0.59%), asociado a una diferenciación genética entre las subespecies agrupadas por regiones ($p < 0.05$; Cuadro 8). Un 2.56% de variación genética entre subespecies dentro de grupos, indica la diferenciación genética entre las subespecies agrupadas por regiones geográficas ($p < 0.05$; Cuadro 8). Por otro lado, se presentó un porcentaje que superó el 98% de variación genética dentro de subespecies, lo cual es indicador de una estructura genética a nivel subespecie ($p > 0.05$; Cuadro 8). En este sentido, la diversidad genética aportada por cada individuo de la población es la que define la diferenciación genética entre grupos y entre subespecies dentro de grupos, pero genera una estructura genética dentro de cada subespecie en su distribución geográfica.

Cuadro 8. Estructura de la variación geográfica de subespecies de *O. virginianus* del norte, centro y sur del Pacífico Mexicano explicada por el AMOVA.

Fuentes de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índice de fijación	p-value
Entre grupos de subespecies	2	1.171	-0.00295 Va	-0.59	$F_{SC} = 0.02546$	0.000 ±0.000
Entre subespecies dentro de grupos	5	3.191	0.01281 Vb	2.56	$F_{ST} = 0.01971$	0.000 ±0.000
Dentro de subespecies	97	47.53	0.49023 Vc	98.03	$F_{CT} = -0.00590$	0.61193 ±0.0123
Total	104	51.914	0.50009	100		

De acuerdo con los valores del índice de diferenciación genética pareados (F_{ST}) para las frecuencias haplotípicas de las subespecies de *O. virginianus*, indicaron que *O. v. acapulcensis* está diferenciada genéticamente de las demás subespecies. *O. v. couesi* no presenta alguna asociación genética con las restantes subespecies, lo cual es consistente con la distancia geográfica. *O. v. mexicanus* es genéticamente cercana a *O. v. toltecus* posiblemente por relación geográfica entre estas. *O. v. nelsoni* no presentan relación genética con las demás subespecies, debido al evidente aislamiento geográfico con respecto a las demás subespecies. *O. v. oaxacensis* y *O. v. toltecus* están relacionadas genéticamente posiblemente por su cercanía geográfica. Las subespecies *O. v. sinaloae* y *O. v. toltecus* parecen estar relacionadas genéticamente, aunque la distancia geográfica es amplia entre estas subespecies, su cercanía puede deberse a algún ancestro común colonizador. *O. v. thomasi* y *O. v. toltecus* también parecen estar genéticamente asociadas, caso como el mencionado anteriormente (Cuadro 9).

Los valores de Nm entre las subespecies fueron altos e indican que existe un mayor intercambio de genes entre *O. v. acapulcensis* con *O. v. couesi*, *O. v. nelsoni*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. sinaloae* y *O. v. thomasi* ($Nm \geq 40$) lo cual puede deberse a un proceso de migración histórico de la especie del norte al sur de México. Esto también sucede con el $Nm (\geq 40)$ mostrado entre *O. v. nelsoni* con *O. v. couesi*, *O. v. oaxacensis* y *O. v. sinaloae* que posiblemente se remonta a un ancestro molecular que colonizó las regiones geográficas donde se distribuyen actualmente las subespecies. Las restantes subespecies: *O. v. mexicanus*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. thomasi* y *O. v. toltecus* tienen valores ≤ 40 de Nm , lo cual es indicador de un alto intercambio de genes; a excepción de *O. v. oaxacensis* con *O. v. nelsoni* y *O. v. thomasi* y este con *O. v. sinaloae* con valores ≥ 40 de Nm (Cuadro 9).

Cuadro 9. Matriz de valores F_{ST} pareados (debajo de la diagonal) y de Nm pareados (encima de la diagonal) de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	119.79	27.5870	316.574	48.5527	265.85	40.5668	5.4472
2	0.00417	-	25.5541	187.034	43.2470	156.42	36.7651	5.2543
3	0.01812	0.01915*	-	29.6170	18.2977	24.0000	17.0980	3.92395
4	0.00158	0.00267	0.01688	-	56.2623	Inf	45.4560	5.333
5	0.01030	0.01156	0.02733	0.0088	-	46.2985	24.3475	4.5270
6	0.00188	0.00320	0.02083	0.0000	0.0108	-	37.5609	4.000
7	0.01233*	0.01360*	0.02924	0.01100	0.02054	0.01331	-	4.5500
8	0.09179*	0.09516*	0.12742*	0.09375*	0.11045*	0.12500	0.10989*	-

Los números representan a las subespecies: 1. *O. v. acapulcensis*. 2. *O. v. couesi*. 3. *O. v. mexicanus*. 4. *O. v. nelsoni*. 5. *O. v. oaxacensis*. 6. *O. v. sinaloae*. 7. *O. v. thomasi*. 8. *O. v. toltecus*. *Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

El MDS mostró una marcada disimilitud entre las subespecies, lo cual refuerza la hipótesis del AMOVA y de los valores del índice de diferenciación genética (F_{ST} ; Figura 9). Las subespecies *O. v. acapulcensis*, *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus* y *O. v. nelsoni* se

encuentran bien diferenciadas en una misma dimensión, aunque *O. v. acapulcensis*, *O. v. couesi* y *O. v. nelsoni* se encuentran relativamente cercanas, están lo suficiente alejadas para diferenciarse. En otra dimensión, las subespecies: *O. v. oaxacensis*, *O. v. sinaloae* y *O. v. thomasi* también están diferenciadas en ese segmento de la dimensión del plano geométrico, lo suficiente alejadas genéticamente. *O. v. toltecus* está en otra dimensión diferente a las restantes subespecies, mostrándose una marcada diferenciación con las siete subespecies. El valor de *Stress* fue bajo (*Stress* = 0.14052), y el ajuste del modelo presentó una correlación alta ($R^2 = 0.95661$).

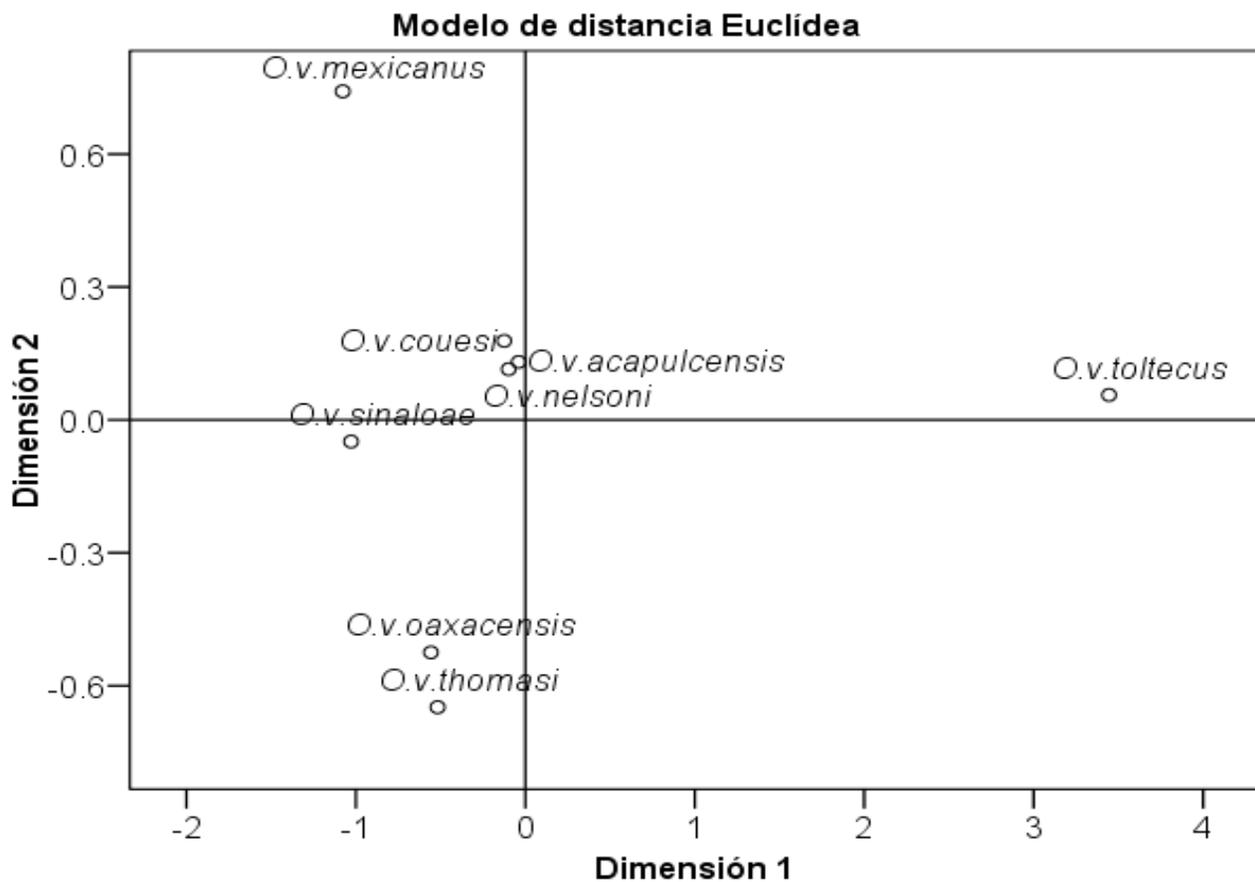


Figura 9. Análisis de escalamiento multidimensional sobre los valores de F_{ST} pareados de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano.

El Nm es más evidente entre grupos de subespecies cercanas geográficamente. *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus* y *O. v. toltecus* presentan Nm entre éstas, ya que se agrupan en una dimensión. Por su parte, *O. v. acapulcensis* se encuentra en la misma dimensión

que *O. v. oaxacensis* y *O. v. thomasi* por compartir *Nm* entre sí, mientras que las subespecies: *O. v. nelsoni* y *O. v. sinaloae* comparten cierto flujo genético entre sí (Figura 10). El valor de *Stress* ($Stress = 0.26462$) se considera bueno, y por su parte, el ajuste del modelo presentó una correlación alta ($R^2 = 0.66472$).

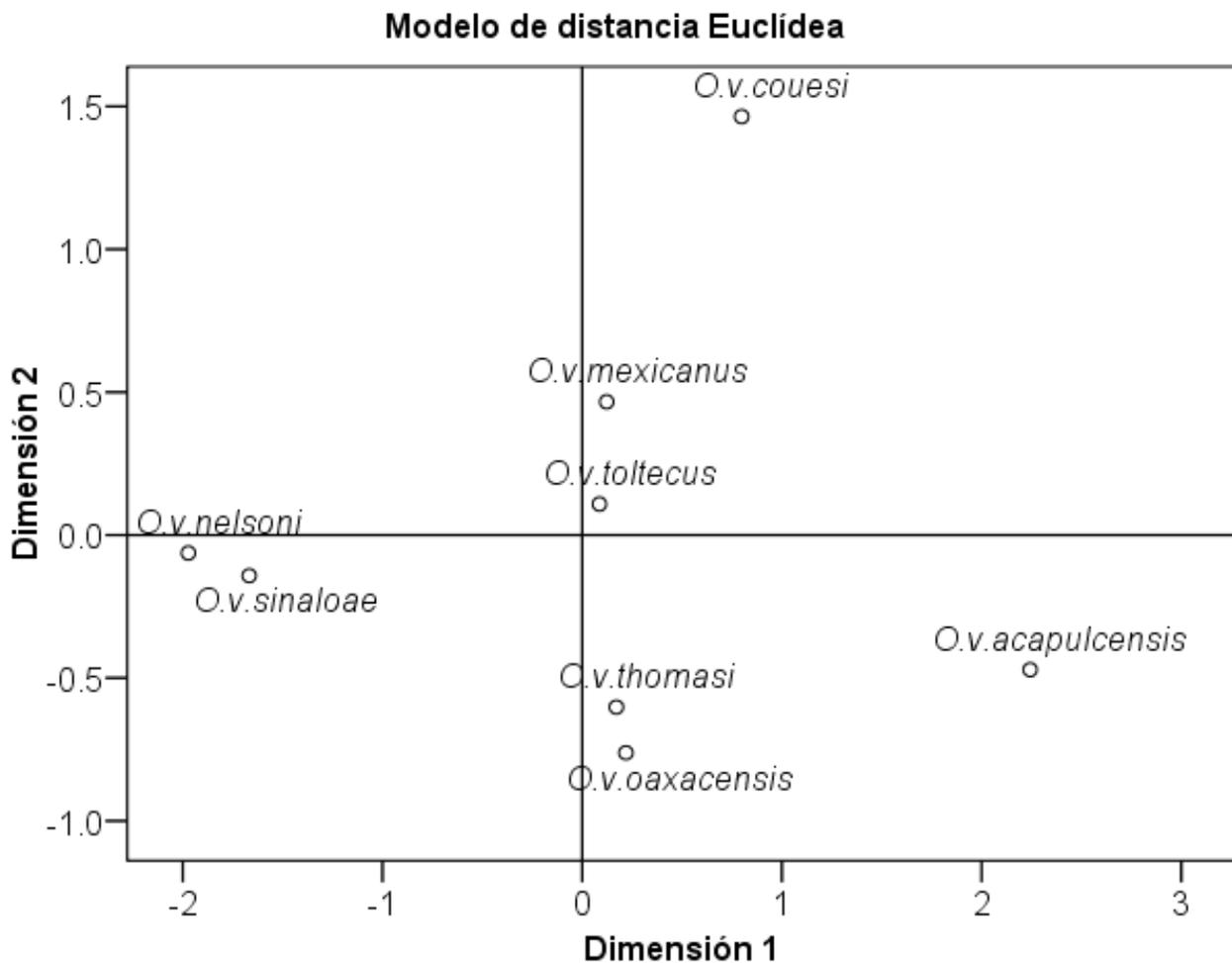


Figura 10. Análisis de escalamiento multidimensional sobre los valores de flujo genético pareados de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano.

De acuerdo con el APC, el componente 1 y 2 explican el 63.5 % y 21.8 % de la varianza, que representan el 85.3% de la varianza total acumulada. En el gráfico del APC, siete subespecies se agruparon en un plano de los componentes y *O. v. acapulcensis* se ubicó en otro plano diferente al resto de las subespecies.

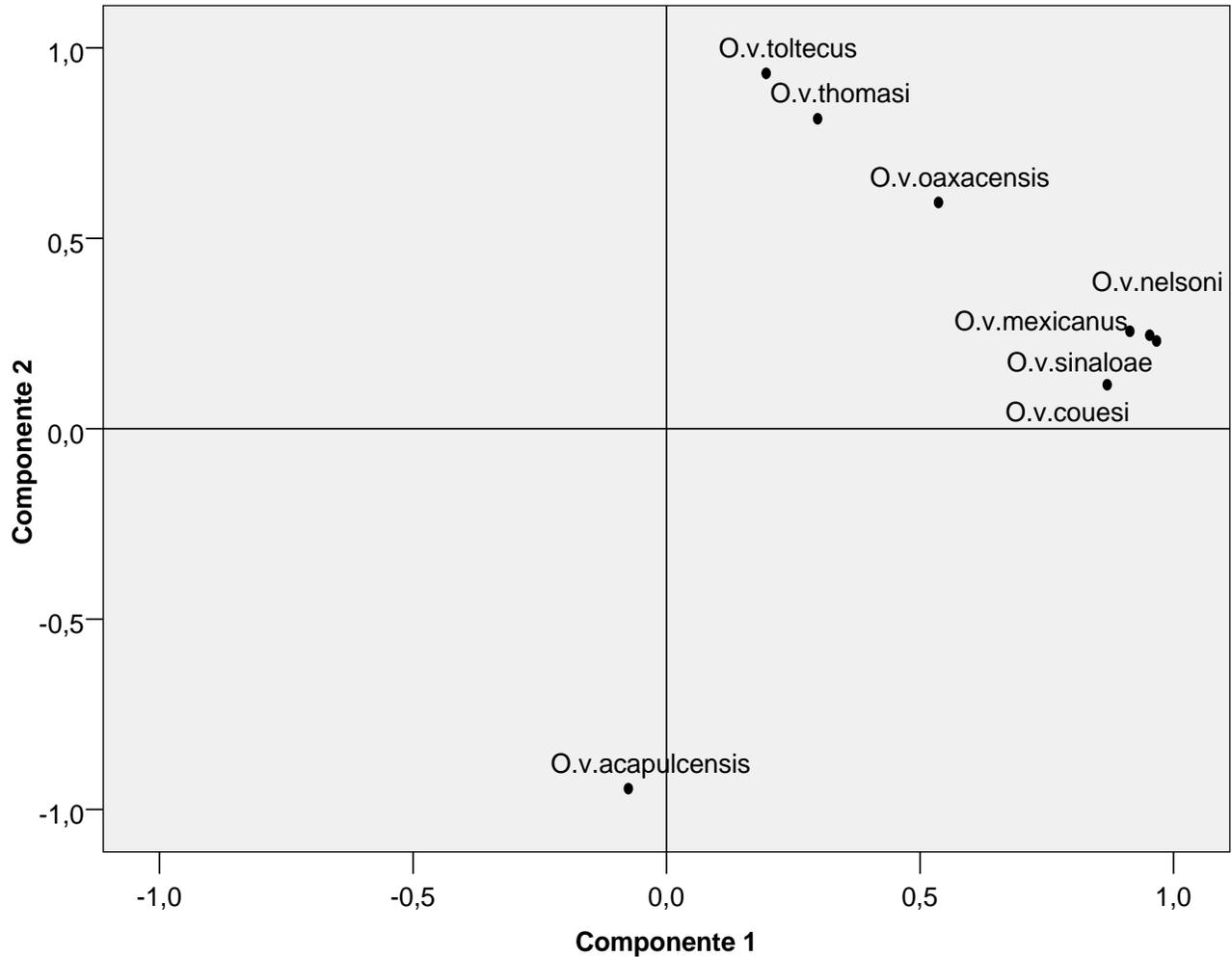


Figura 11. Análisis de Componentes Principales aplicado sobre la matriz de F_{ST} y Nm .

4.6 Relaciones filogenéticas entre subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

El filograma obtenido por Maximum Likelihood muestra las relaciones filogenéticas entre las ocho subespecies *O. virginianus* (Figura 11). Los valores de Bootstrap mostraron que algunos grupos están alejados filogenéticamente y los nodos con valores superiores al 50% indicaron la cercanía filogenética entre los haplotipos. En el filograma se formaron para las subespecies: *O. v. toltecus*; *O. v. thomasi*; *O. v. sinaloae*; *O. v. nelsoni*; *O. v. mexicanus*; *O. v. couesi*; y *O. v. acapulcensis*, mientras que no se formó un clado estructurado para *O. v. oaxacensis*, esto se pudo deber a que los haplotipos tiene linajes diferentes; aunado a esto, las subespecies presentaron politomía, es decir,

se presentaron clados divergentes. Esto fue indicador de que los haplotipos estudiados se derivaron de diferentes linajes, y por tanto existen haplotipos de las subespecies en diferentes posiciones del filograma, sin embargo, la separación de las subespecies en los clados, coincidió con el reconocimiento actual de las subespecies (Figura 11). La presencia de politomia ser un reflejo de la diversidad alta haplotípica y de la baja diferenciación entre y dentro de las subespecies, lo cual es respaldado con lo obtenido por el AMOVA (ver Cuadros 7 y 8). Es importante mencionar que se obtuvieron clados que definen el reconocimiento de las subespecies, lo cual se confirmó con el filograma obtenido por Máxima Parsimonia.

Un índice de consistencia (IC) igual a 0.478049 se obtuvo para el filograma derivado de Máxima Parsimonia, el cual mide el grado de homoplasia; por su parte, el índice de retención (IR) fue 0.682493, el cual midió los cambios de estado del filograma (Figura 12). Dado que el IR fue mejor que IC, por lo tanto los cambios de estado ocurrieron predominantemente en los nodos internos, lo cual reflejó de una diferenciación genética dentro de cada subespecie. La agrupación de clados monofiléticos se observaron por subespecie en el filograma, con valores de *bootstrap* que reforzaron la predicción de los nodos con el 100% de certidumbre. Este filograma, usando Máxima Parsimonia, resolvió de manera más consistente la historia evolutiva de las subespecies.

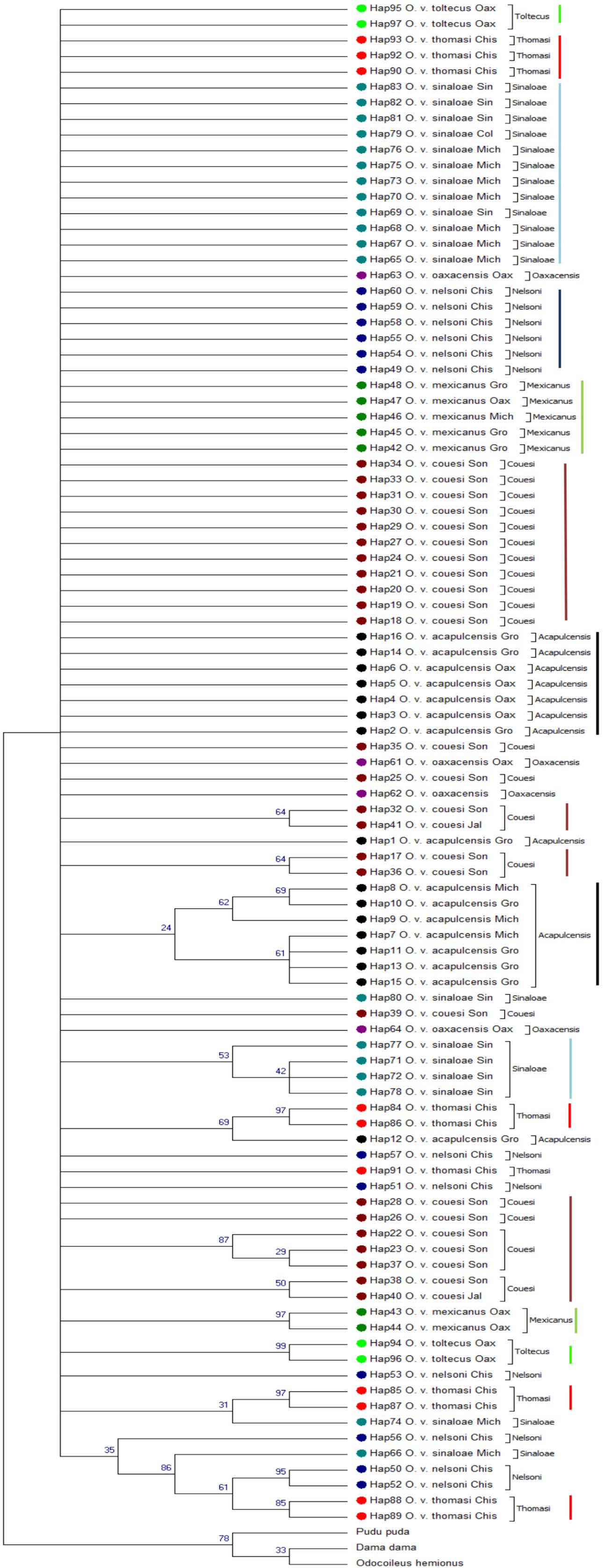


Figura 12 Filograma obtenido por el método de Maximum Likelihood ($L = -778.8643$). El árbol inicial se obtuvo mediante búsqueda heurística del método de Neighbor-Joining a una matriz de distancias pareadas. Porcentajes en ramas evalúan su ajuste derivado de 1000 réplicas de Bootstrap.

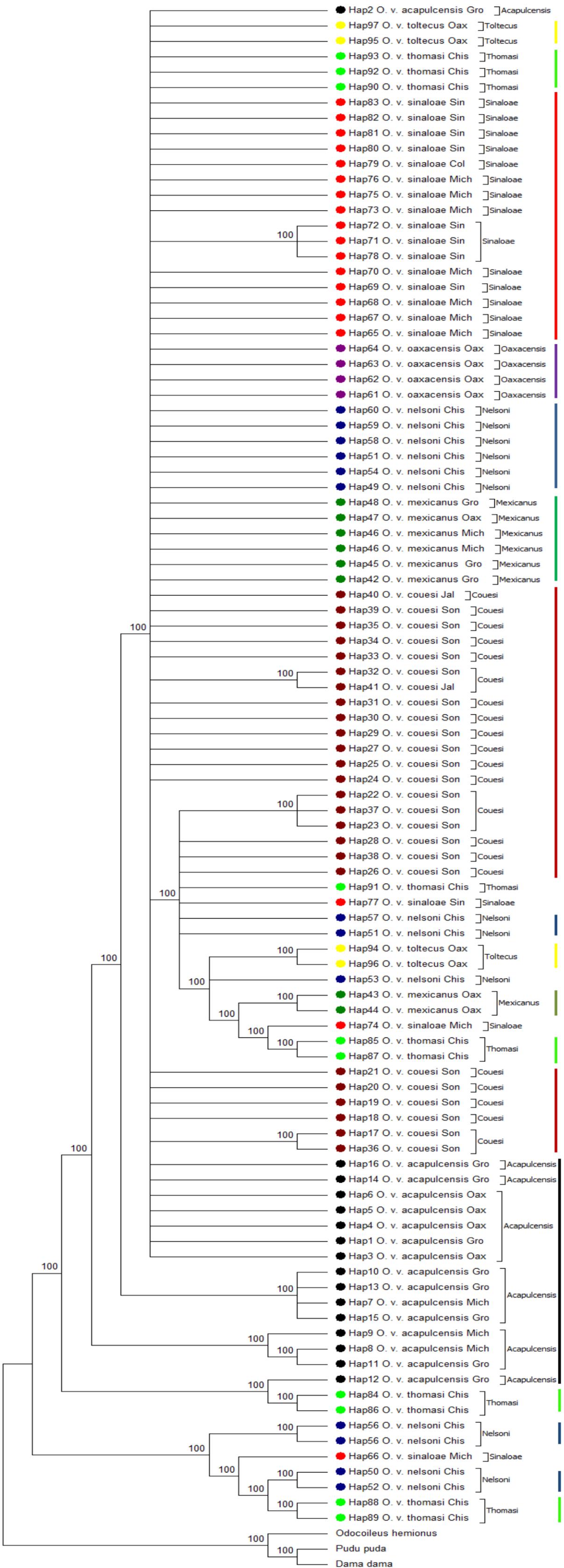


Figura 13. Filograma derivado del método de Máxima Parsimonia, obteniendo el árbol consenso a partir de los dos árboles más parsimoniosos. Las ramas fueron colapsadas a un 70% de confiabilidad. IC = 0.478049; IR = 0.682493.

El árbol evolutivo mostró una tipología de red radial, con dos haplotipos diferenciados con un total de 194 mutaciones en el árbol. El árbol mostró dos haplotipos para el total de las muestras de *O. virginianus* además de presentar haplotipos radiales, lo cual evidencia la existencia de acervos genéticos únicos, con mutaciones puntuales que en general no modifican las frecuencias haplotípicas (Figura 14).

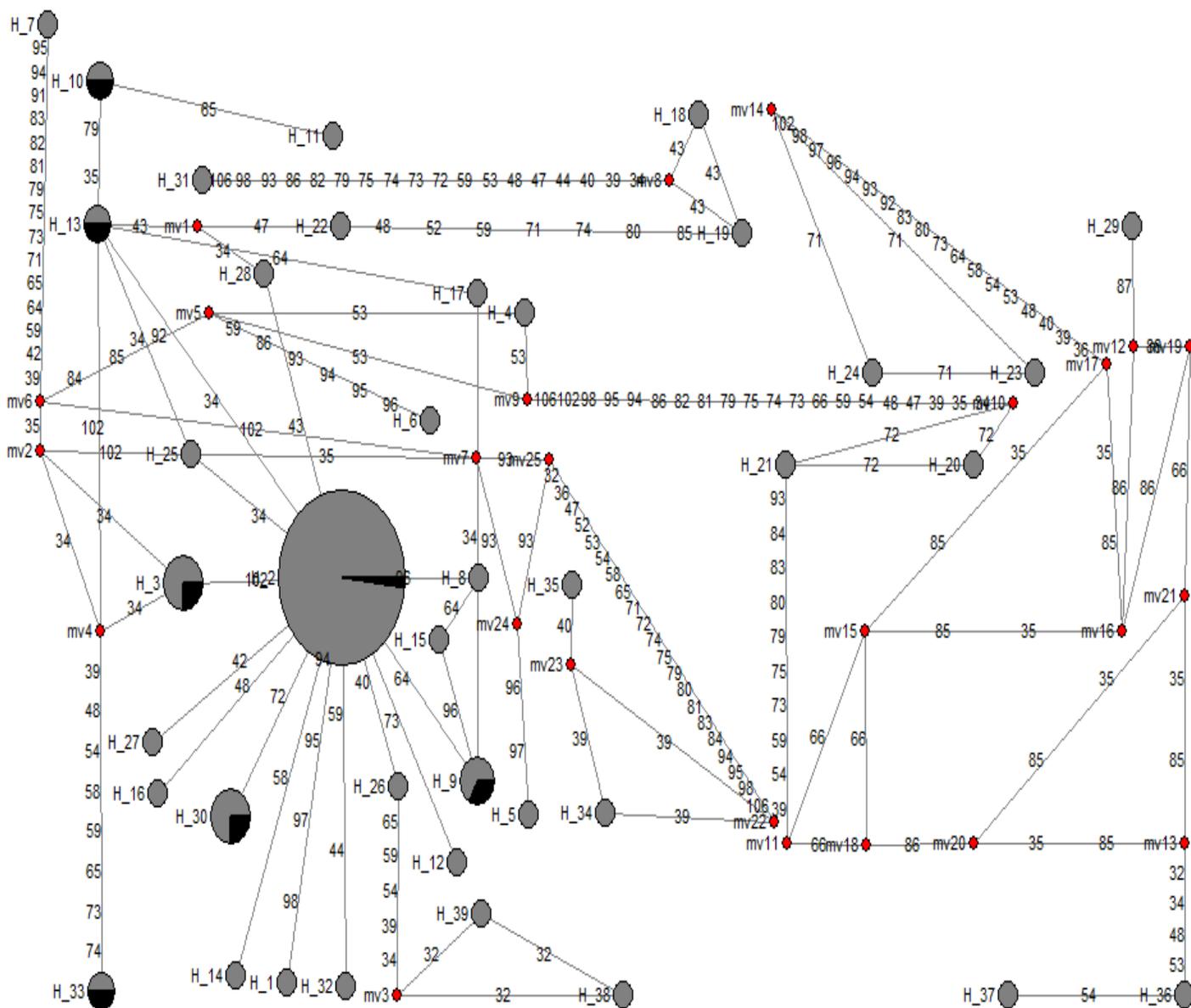


Figura 144. Árbol evolutivo con probabilidades de mutaciones entre haplotipos de subespecies de *O. virginianus*.

4.7 Genealogía entre subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

La red de haplotipos confirma la separación de las subespecies y muestra las relaciones genealógicas entre linajes que dieron origen a haplotipos de otras subespecies (Figura 15). Un caso fue que *O. v. acapulcensis* está representado por seis linajes ancestrales divergentes (haplotipos en rectángulos), pero un solo linaje (Hap 3), originó a otros ocho haplotipos (en óvalos) de la misma subespecie los cuales se diferenciaron del haplotipo ancestral por varios pasos mutacionales (cada círculo ligados a las líneas de conexión representan un paso mutacional), pero también resultó que este mismo linaje generó cuatro linajes que corresponden a la subespecie *O. v. sinaloae*, los cuales diferenciaron por más de más de 10 pasos mutacionales del linaje original. *O. v. couesi* (Hap27) también se derivó de otro linaje de *O. v. sinaloae* (Hap82) diferenciado por ocho pasos mutacionales del linaje original. En este sentido, existen linajes bien diferenciados de *O. v. sinaloae*, pero otros haplotipos derivan de ancestros regionales de *O. v. couesi* y *O. v. acapulcensis* (Figura 15).

Las restantes subespecies: *O. v. nelsoni*, *O. v. mexicanus*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. couesi*, *O. v. toltecus* y *O. v. thomasi* presentaron linajes ancestrales que únicamente dan origen a haplotipos de sus respectivas subespecies. En los casos del Hap78 de *O. v. sinaloae*, Hap47 de *O. v. mexicanus*, Hap18 de *O. v. couesi*, Hap94 de *O. v. toltecus*, Hap63 de *O. v. oaxacensis* y Hap85 de *O. v. thomasi* fueron haplotipos que tienen múltiples conexiones y probablemente fueron haplotipos ancestrales y los haplotipos periféricos fueron los más recientes. Aquellos haplotipos con una única conexión o incluso que no están conectados con otros haplotipos, es posible que hayan evolucionado recientemente y por tanto han tenido poco tiempo para dispersarse y transferir su linaje (Figura 15). Posiblemente esto se explique por los resultados de la prueba de *Mismatch distribution* y el índice de Tajima's D que indicaron cambios demográficos históricos en las subespecies, lo cual explica la limitada la dispersión de linajes.

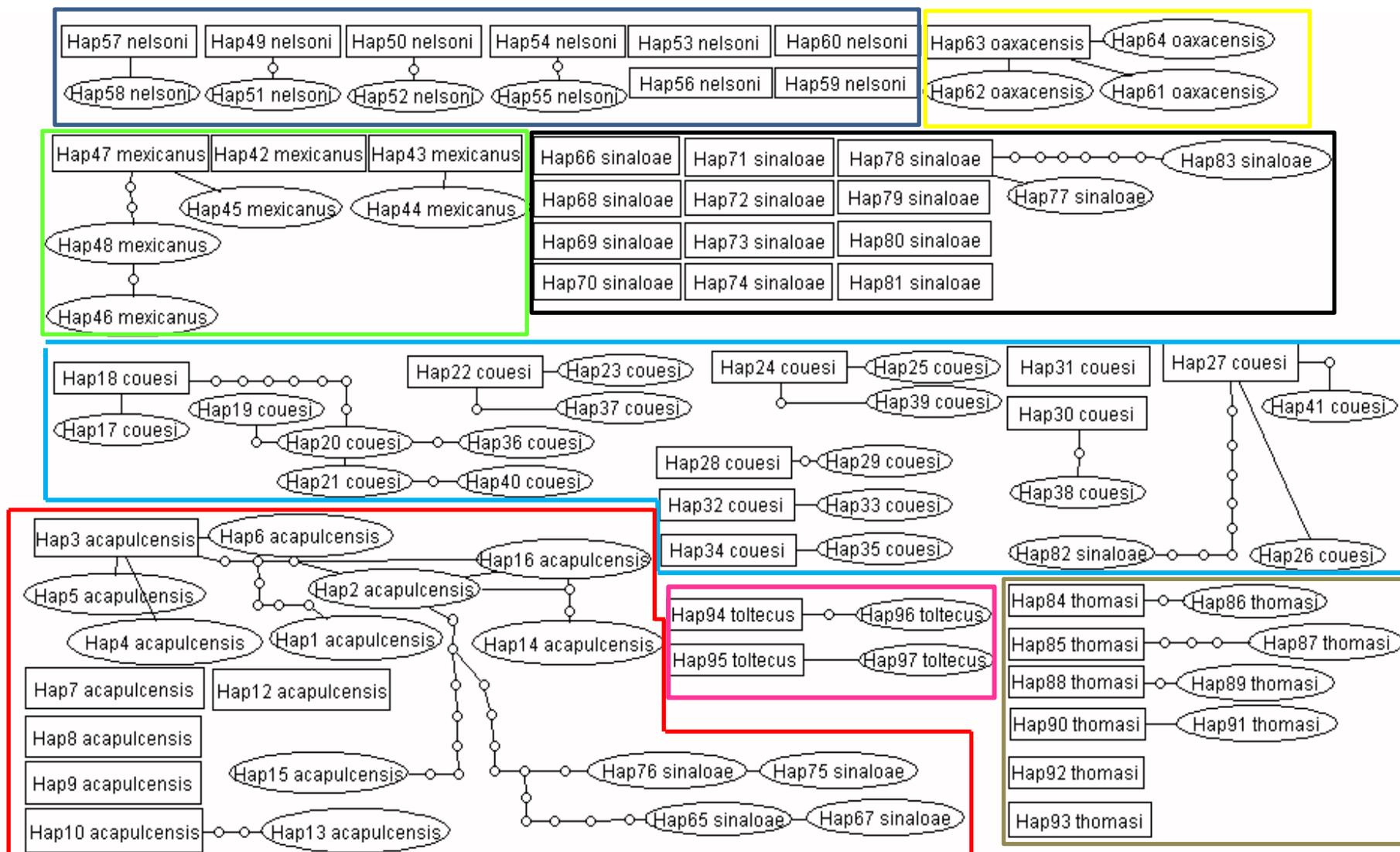


Figura 15. Red de relaciones genealógicas entre subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano.

V. DISCUSIÓN

5.1 Muestreo

El estudio de la diversidad genética, derivado de los enfoques conceptuales de genética de poblaciones y filogeografía, dependen en gran medida del esfuerzo del muestreo geográfico de la especie en estudio (Awise, 2000). Con el apoyo de los responsables técnicos de las UMAs, se logró obtener un número representativo de muestras de tejido de las subespecies de *O. virginianus*, que a pesar de ser técnicas invasivas, el aprovechamiento está sustentado y justificado en estudios previos del tamaño de la población y la estimación la de tasa de cosecha, autorizadas por la SEMARNAT en México (SEMARNAT, 2005).

El muestreo en un inicio fue de tipo dirigido, pero resultó tener una representación aleatoria de los sitios de muestreo. Un adecuado muestreo genético es aquél que evita el sesgo por muestreo y obtiene muestras en las poblaciones distribuidas en el gradiente ambiental donde habita (Loo, 2011). El muestreo de *O. virginianus* en este estudio, permitió recolectar muestras aleatorias en los ecosistemas donde habita, precisamente en los ecosistemas donde exhibe polimorfismo a nivel genotípico y fenotípico, aumentando la probabilidad de capturar el espectro de la variación genética que presenta la especie, y esto permitió la detección de Unidades Operativas de Conservación (OCU por sus siglas en inglés), lo cual es indicador de un muestreo eficiente en términos del tamaño de muestra y aleatoriedad del muestreo (ver discusión de OCU más adelante; Walsh, 2000).

Nuestros resultados muestran que la estrategia de colecta de tejido puede ser fácilmente adaptada y replicada a otras especies de fauna silvestre en México para investigaciones en genética de poblaciones y filogeografía, ya que el método de recolección de muestras fue adecuado porque evitó la degradación del ADN, lo cual, según Frantzen *et al.* (1998), es importante para el análisis de genotipos. El muestreo es importante para los estudios filogeográficos, porque brindan resultados que deben tenerse en cuenta en los programas de conservación porque permite conocer el estado actual de la diversidad genética y tomar acciones de preservación del acervo genético

(Castresana *et al.*, 2013). En este sentido, el tipo de muestreo implementado, mostró la capacidad de reflejar una clara agrupación de genotipos similares que coinciden con los ecosistemas, lo cual es indicador de que se ha muestreado el espectro de la diversidad genética dispersa en la distribución geográfica de las subespecies de *O. virginianus*.

5.2 Calidad y cantidad de ADN

En *O. virginianus* no se ha reportado la cantidad y calidad de ADN extraído de tejido. Las extracciones de ADN que obtuvimos de los diferentes tejidos de *O. virginianus*, se encuentran dentro de los rangos de cantidad de ADN (desde 40 ng/μl hasta 335.7 ng/μl), garantizados por el kit de extracción de ADN utilizado (Qiagen, 2006). En contraste con la cantidad de ADN obtenida de excretas (técnicas no invasivas) en *Rangifer tarandus* (\bar{X} = 16.2 ng/μl) y *Vulpex velox* (\bar{X} = 7.5 ng/μl), se extraen concentraciones inferiores a las que reportamos (Ball *et al.* 2007). La baja cantidad y calidad de ADN obtenida a partir de técnicas no invasivas son una alternativa para el estudio genético de la fauna silvestre, pero generalmente se presentan errores al momento del análisis genético (Wehausen *et al.*, 2004), por lo tanto en este estudio no fueron consideradas este tipo de muestras, pero se sugiere su uso en especies crípticas, en algún estatus de riesgo o sin aprovechamiento.

En este trabajo se identificó que el riñón e hígado fueron los tejidos con mayor cantidad y calidad de ADN, esto debido a que son órganos que presentan células multinucleadas y en consecuencia mayor cantidad de ADN, en comparación con los restantes tejidos de *O. virginianus* que se lograron analizar. Similarmente, Gómez *et al.* (2010), extrajeron mayor concentración de ADN en hígado de cabras, en comparación con la extracción de ADN en corazón, el cual estuvo asociado a una mayor cantidad de proteínas; en riñón, obtuvieron una cantidad de ADN intermedia entre hígado y corazón, pero con menor concentración de proteínas, lo cual es deseable y representa una ventaja al momento de realizar la genotipificación mediante PCR.

Otros estudios deberán proporcionar las concentraciones de ADN en tejido sanguíneo, cerebral, testicular, ovarios, pulmón, semen, bazo, saliva u otros órganos internos (p. ej. sistema digestivo) para tener mejor sustento de cuál es el tipo de tejido de *O. virginianus* que proporciona mejor integridad del ADN, hasta donde sea posible la consecución legalizada de este tipo de muestras. Se sugiere que en futuros trabajos en *O. virginianus* y de otras especies de Cérvidos en México, se solicite riñón e hígado como principal tejido a coleccionar, ya que se garantizará un ADN íntegro con certidumbre en el análisis genotípico, evitando errores de genotipado. Tener ADN de buena calidad y cantidad, facilita el desarrollo y aplicación de marcadores moleculares con resultados altamente reproducibles (Waye y Haigh, 1992).

5.3 Diversidad genética y patrones demográficos de subespecies de *O. virginianus*

Los valores de diversidad genética de las subespecies estudiadas son similares a los reportados en la literatura para otras subespecies de *O. virginianus* (ver Cuadro 1). *O. v. acapulcensis*, *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. sinaloae* y *O. v. toltecus* tuvieron una relación de diversidad haplotípica (H) grande (que representa una alta cantidad de haplotipos únicos y exclusivos) y diversidad nucleotídica (π) pequeña (<0.5), lo cual es indicador de que las subespecies han sufrido un cuello de botella (*bottleneck*) seguido de crecimiento poblacional rápido y acumulación de mutaciones. Las subespecies *O. v. nelsoni* y *O. v. thomasi* tuvieron una relación de H y π grandes (>0.5), considerándose estables con una larga historia evolutiva, mostrando un contacto secundario entre linajes bien diferenciados (Grant y Bowen, 1998). Esta información fue corroborada con los valores obtenidos por el índice de Tajima's D , ya que cuando el valor de D es negativo, indica expansión poblacional, por presentar mutaciones nuevas que están segregando (separando) y son observadas como mutaciones únicas, siendo las subespecies *O. v. acapulcensis*, *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus*, *O. v. oaxacensis* y *O. v. sinaloae* las que han experimentado estas mutaciones por haber sufrido cuellos de botella, mientras que las subespecies *O. v. nelsoni*, *O. v. thomasi* y *O. v. toltecus* tuvieron un valor D positivo ($D \geq 0$), indicador de un proceso de selección balanceado, con mutaciones en frecuencias intermedias. Es

decir, estas subespecies sufrieron una contracción de la población repentina en el pasado, pero después de esto, se mantuvieron en equilibrio, dispersándose solo algunos linajes (Tajima, 1989).

Las subespecies de *O. virginianus* estudiadas no compartieron haplotipos, debido a la biología reproductiva de este cérvido. El ADN_{mt} es transferido vía materna y existe filopatría por parte de las hembras, y en el caso de *O. virginianus*, los machos son los que migran grandes distancias para aparearse con hembras, las que tienen un ámbito hogareño dentro del ecosistema donde nacieron (Nelson y Mech, 1992); este comportamiento reproductivo disminuye la frecuencia de transferencia del ADN_{mt} de *O. virginianus* (Purdue *et al.*, 2000; Purdue *et al.*, 2006), moldeando la heterogeneidad del flujo genético (Nelson, 1993) y la estructura social-genética de esta especie (Mathews y Porter, 1993). No compartir haplotipos entre subespecies es evidencia del aislamiento geográfico y reproductivo entre sí; en otras palabras, cada subespecie debe considerarse como ESU (Ryder, 1986), ya que nuestros resultados indican que cada subespecie ha tenido historias evolutivas independientes; otro aspecto importante para las subespecies bajo estudio suponen una unidad de manejo genético, para lo cual se deben diseñar estrategias de conservación específicas (Dizon *et al.*, 1992; Eizrik, 1996). Estudios posteriores deberán incluir el mayor número de subespecies reconocidas y otros marcadores moleculares para esclarecer la categoría taxonómica correspondiente, incluso para clasificarlas a una categoría taxonómica a nivel de especie.

En cuanto a la demografía histórica que dio origen a la diversidad genética observada en las subespecies bajo estudio, los resultados demuestran una evidente distribución multimodal, lo que refleja procesos de expansión poblacional súbita, que vienen asociados a un proceso estocástico de extinción de linajes vía deriva genética, quedando grabados en la estructura genética de las subespecies y son detectables a través de la prueba *Mismatch distribution* (Rogers y Harpending, 1992). En México, *O. virginianus* es de interés cinegético sujeta a presiones constantes de aprovechamiento, fragmentación del hábitat, cacería furtiva, autoconsumo por comunidades locales y es

una especie depredada por carnívoros; esto ha traído como consecuencia la reducción del tamaño efectivo de la población de apareamiento, a través del cual, solo ciertos linajes son los que engendran la siguiente generación, mientras que otros linajes se extinguen o se quedan en menor frecuencia en la población. Como es de esperarse en especies de interés cinegético y con caza furtiva comercial, un fenómeno similar ha sido demostrado en el cévido Chiru, *Pantholops hodgsonii*, en China, cuya especie se encuentran en riesgo de extinción por efecto de la pérdida de diversidad genética (Xiang-Dong *et al.*, 2005).

Nuestros resultados generan una comprensión más detallada de la historia evolutiva de las subespecies de *O. virginianus* y una de las implicaciones para contribuir a la protección de estas ESUs, que reflejan importancia evolutiva de los linajes (Awise y Hamrick, 1996), es que su diversidad genética debe ser conservada a través del concepto propuesto por Doadrio *et al.* (1996), como Unidad Operativa de Conservación (OCU, por sus siglas en inglés), ya que las características ecológicas (y genéticas) de *O. virginianus* se apegan a dicho concepto: especies con distribución en un área geográfica continua, cuya distribución sea limitada por barreras geográficas y ambientales, y que sea habitada por una o más poblaciones que compartan el mismo patrón genético, deberán ser sujetas a estrategias de conservación específicas.

Otra estrategia importante que se sugiere es la conexión de UMAs de *O. virginianus* mediante corredores biológicos, para maximizar las tasas de migración y en consecuencia la probabilidad reproductiva aleatoria que diversifique los linajes *intra* subespecies, evitando siempre la translocación de individuos de otras subespecies a regiones geográficas a las que no pertenecen, ya que esto impacta de manera negativa la estructura genética de *O. virginianus* (Leberg y Ellsworth, 1999).

5.4 Estructura genética de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

En filogeografía, es común analizar la estructura genética de las poblaciones, para probar hipótesis concernientes a la diferenciación dentro y entre grupos de poblaciones o especies, usando el AMOVA como principal método estadístico de comparación de la

estructura genética (Meirmans, 2006). Los resultados del AMOVA para las subespecies de *O. virginianus* muestran que la variación genética está repartida en un 97.9% dentro de subespecies y sólo un 2.11% entre subespecies, reflejando una marcada diferenciación genética entre subespecies. Cuando los componentes de varianza del AMOVA son altos en el nivel de comparación jerárquico “entre subespecies”, el índice de diferenciación genética (F_{ST}) resulta bajo. Sin embargo, en este estudio sucedió lo contrario, la mayor varianza se presentó en el nivel de comparación jerárquico dentro de subespecies, confirmando que los individuos dentro de cada subespecie comparten genes (nucleótidos) en común, lo que hace que las distancias euclidianas de la matriz pareada sean más cercanas entre individuos de una misma subespecie y más alejadas entre individuos de subespecies diferentes (Excoffier *et al.*, 1992; Excoffier, 2007). Una historia evolutiva similar es la reportada por el estudio diversidad genética de *O. virginianus* en Mississippi, EE.UU. usando marcadores microsatélites (DeYoung *et al.*, 2003), resultado que es de esperarse en especies que han experimentado cuellos de botella, tamaños de población desiguales y deriva genética (Hedrick, 1999). Una historia similar ha ocurrido con los parámetros demográficos históricos que experimentan en campo las subespecies de *O. virginianus* en este estudio.

El AMOVA adicional para evaluar el grado de diferenciación de los grupos geográficos de las subespecies de *O. virginianus*, mostró diferenciación genética estadísticamente significativa entre grupos de subespecies (F_{SC}) y entre las subespecies y dentro de grupos (F_{ST}) (grupo del Norte: *O. v. couesi* y *O. v. sinaloae*; grupo del Centro: *O. v. acapulcensis* y *O. v. mexicanus*; grupo del Sur: *O. v. nelsoni*, *O. v. oaxacensis*, *O. v. thomasi* y *O. v. toltecus*), pero no hubo una diferenciación genética dentro de subespecies (F_{CT}), lo que representa que los individuos de cada subespecie son genéticamente homogéneos a nivel regional. En otras palabras, los individuos de cada subespecie presentan un patrón genético similar en la región geográfica particular de distribución. En este AMOVA se presentaron valores negativos del componente de varianza y el porcentaje de variación en el nivel jerárquico de comparación entre grupos de subespecies (F_{SC}) del AMOVA. Por un lado, en sentido estadístico, los componentes de varianza suelen ser negativos porque son covarianzas y sus índices de fijación

asociados pueden ser vistos como coeficientes de correlación. Generalmente, los componentes de varianza ligeramente negativos ocurren cuando existe ausencia de estructura genética, ya que el verdadero valor del parámetro que se estima es menor o igual que cero (covarianza ≤ 0) (Meirmans, 2006). Por otro lado, en sentido biológico, la ausencia de estructura genética que demuestran los componentes de varianza negativos, indican exceso de heterocigosis (como ocurre en *Penaeus japonicus* del este de Asia; Tzeng *et al.*, 2004), lo que permite inferir que las subespecies de *O. virginianus* agrupadas en el Norte de México son genéticamente diferentes de las subespecies del Centro y Sur del país (y viceversa), lo cual es evidencia de una clara división entre grupos geográficos de subespecies, influenciado por la distancia geográfica entre sí y por un alto flujo genético. Habitualmente, especies con alta vagilidad, como es el caso de *O. virginianus*, no exhiben una estructura genética-geográfica (Avisé, 2009).

En *O. virginianus* no se ha reportado AMOVA con componentes de varianza negativos, pero casos similares de ausencia de variación genética entre grupos geográficos se presenta en el pez *Anaecypris hispanica* que se encuentra en riesgo de extinción porque ha experimentado cuellos de botella y escaso flujo genético entre poblaciones (Alves *et al.*, 2001); otro caso particular sucede con poblaciones de camellos (*Camellus dromedarius*) del sur de África, cuyos resultados muestran valores negativos en el AMOVA, por una baja diferenciación entre las poblaciones analizadas, que probablemente se deba al origen genético de la especie (Nolte *et al.*, 2005). En mosquitos, una escasa estructura genética entre regiones analizadas se presenta porque los individuos están más relacionados genéticamente dentro de poblaciones de un mismo sitio, que entre regiones geográficas contrastantes; este resultado es consistente con una selectividad de diversidad genética mitocondrial en cada población (Rasgon *et al.*, 2006), y que puede estar ocurriendo en cada subespecie de *O. virginianus*.

La idea central de la filogeografía parte de que la gran mayoría de las especies en la naturaleza exhiben una estructura genética que corresponde con la geografía

(Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009). En este sentido, el MDS es una técnica exploratoria para el análisis de la estructura genética-geográfica (Lessa, 1990). Cuando se aplicó este análisis a la matriz del índice de F_{ST} pareado entre las subespecies estudiadas de *O. virginianus*, se observó que los valores de las distancias euclidianas calculados para cada subespecie no se superponen o traslapan en el plano dimensional. Esto es reflejo de una clara diferenciación genética entre las subespecies, consistentemente, el ACP confirma este resultado. Este fenómeno de estructura genética-geográfica sucede también en poblaciones del lobo gris (*Canis lupus*), distribuidas en la tundra/taiga, que son diferentes fenotípica y genéticamente a las poblaciones distribuidas en el bosque de coníferas, por la escasa migración de lobos entre ecosistemas, ya que las tasas de migración están asociadas al tipo de presa que prefieren: en la tundra/taiga cazan presas residentes y por tanto los lobos no migran (fijándose los caracteres genéticos y fenotípicos), mientras que en el bosque de coníferas, los lobos cazan al Caribú (*Rangifer tarandus*), que migra de Norte a Sur, haciendo que los lobos migren (aumentando el Nm) en función de la migración del Caribú, diferenciando caracteres genéticos y fenotípicos a lo largo de la distribución (Musiani *et al.*, 2007).

El Nm se refiere a los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra así como por eventos de extinción y recolonización de poblaciones enteras (Stalkin, 1985). En nuestro estudio, las subespecies de *O. virginianus* mostraron niveles de Nm muy altos (≥ 40) y en mayor proporción niveles altos Nm (≤ 40 ≥ 30), congruente con lo estimado por Nelson (1993) para *O. virginianus* ($Nm = 40$ ciervos por generación); en esta especie, valores altos de Nm se dan por poligamia asociado a procesos de colonización por distancia y Nm restringido se da por cohesión genética (Cronin *et al.*, 1991); esto último es de apoyo para delimitar a las subespecies como especies (Petit y Excoffier, 2009), y un sustento más de soporte, es que se ha identificado a *O. virginianus* como una especie poliéstrica estacional, cuya reproducción se relaciona con la latitud y el fotoperiodo (Arenas, 2011), lo que genera una barrera reproductiva entre las subespecies.

El MDS y el APC, indica que existe diferenciación genética entre subespecies y poca evidencia de un cruzamiento reciente entre individuos de diferentes subespecies. Ambos análisis muestran que las distancias genéticas son distintas entre las subespecies de tal manera que existe divergencia genética entre éstas, probablemente debido a los procesos de especiación se experimentó cada subespecie (Díaz *et al.*, 2006).

Un resultado de este estudio es que parece existir un patrón geográfico que ha determinado los procesos migratorios de los linajes ancestrales de *O. virginianus* que colonizaron los ecosistemas de México. Esto permitió sugerir hipótesis sobre las posibles rutas migratorias de acuerdo al relieve mexicano, que probablemente siguieron los linajes ancestrales que dieron origen a los actuales linajes de *O. virginianus*, siendo los relieves geográficos como: el Altiplano Mexicano, la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental y el Istmo de Tehuantepec, las barreras geográficas que han limitado el *Nm* entre subespecies de *O. virginianus* a lo largo de su distribución. Por ejemplo, el MDS indicó que *O. v. couesi*, *O. v. mexicanus* y *O. v. toltecus* comparten *Nm* y correspondió a la hipótesis planteada sobre la ruta migratoria a través del Altiplano Mexicano que siguieron los linajes ancestrales de estas subespecies (ver Figura 15). Otra hipótesis de ruta migratoria es la planteada entre las subespecies de *O. v. acapulcesis*, *O. v. oaxacensis* y *O. v. thomasi*, donde se considera que posiblemente los linajes ancestrales de estas subespecies se migraron desde el norte de Tamaulipas (dado que no se tiene información de las subespecies distribuidas en esta región, se incluyen dos líneas que cortan la ruta migratoria en esta zona como interrogante de lo que sucede con el *Nm*) a través de toda la Llanura Costera del Golfo de México (siendo la Sierra Madre Oriental la que limitó su dispersión hacia el Este del país), dispersándose por diferentes rutas a través del Istmo de Tehuantepec, divergiendo *O. v. nelsoni* y *O. v. sinaloae* (ver Figura 15). Otras hipótesis quedan sin concluir por el desconocimiento del *Nm* de otras subespecies (signos de interrogación en Figura 15), sugiriendo el desarrollo de estudios futuros para resolver el dilema de la dispersión histórica de *O. virginianus*.



Figura 17. Hipótesis de la dispersión del flujo genético en subespecies de *O. virginianus* del pacífico mexicano.

5.5 Filogenia de subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

La filogenia se define como el agrupamiento mínimo de individuos, de poblaciones o grupos de poblaciones que son diagnosticables por un número dado de caracteres (moleculares en este estudio) compartidos, y dentro de los cuales hay un patrón claro ancestro-descendiente (Avice, 2006). El filograma de Máxima Parsimonia resolvió a una escala más fina la filogenia de *O. virginianus* en contraste con el filograma obtenido por Máxima Verosimilitud, por lo que la discusión de este apartado se referirá al filograma del criterio filogenético obtenido por Máxima Parsimonia, ya que evidencia de manera más clara la herencia matrilineal *intra* subespecies y el grado de divergencia *inter* subespecies.

El filograma con Máxima Parsimonia formó ocho grupos de haplotipos monofiléticos que corresponden a cada subespecie estudiada, resumiendo que sus miembros (haplotipos) descienden de un linaje ancestral, compartido única y exclusivamente por éstos, con identidad espacial unívoca. En este filograma, se asumió que los grupos monofiléticos en referencia se encontraron en un proceso de especiación, ya que probablemente, la selección natural y la deriva génica actúan de manera diferencial sobre los caracteres de los individuos (Cerritos, 2007). Otro aspecto fundamental del filograma es que también diferenció filogrupos con menor número de haplotipos, esto debido al polimorfismo haplotípico que se presentó en diferentes regiones geográficas, mostrando tasas de evolución variadas. Es decir, mostró tasas de sustitución de nucleótidos diferenciales y niveles altos de polimorfismo intraespecífico en el ADN_{mt}, infiriendo un proceso de especiación a nivel individual influenciado por el ambiente local (Lunt *et al.*, 1998). Este proceso de especiación ocurre cuando las fuerzas evolutivas actúan de diferente modo, por adaptabilidad a nivel local. Sin embargo, con esta información no es posible subir de categoría taxonómica de subespecie a nivel de especie, ya que aún existe flujo genético alto entre subespecies, el cual puede ser ancestral. Aunado a esto, será necesario un análisis con uso combinado de dos o más marcadores nucleares y mitocondriales, cuyos resultados deben coincidir para tener el sustento evolutivo suficiente para considerarlas como especies.

Las ramas del filograma presentaron la misma longitud en casi un 70% de los casos, lo que fue indicador de un tiempo de divergencia similar entre los haplotipos, mientras que el otro 30% de los casos, tienen diferente longitud de ramas, lo que es representativo de eventos recientes de especiación (Ruiz-García *et al.*, 2007). *O. v. nelsoni*, *O. v. thomasi* y *O. v. toltecus* mostraron grupos polifiléticos en concordancia entre la distribución geográfica, y que casualmente concuerda con los resultados del índice de Tajima's D, que indicaron que estas subespecies pasaron por un proceso de selección estabilizadora, apoyando la hipótesis de que estas subespecies están en un proceso de reciente adaptación en su ecosistema. En *Sitta carolinensis*, un ave de amplia distribución con reconocimiento de nueve subespecies, muestra un fenómeno similar, donde cuatro grupos monofiléticos muestran una fuerte evolución en relación a su hábitat de distribución en Norte América (Spellman y Klicka, 2007).

Por otro lado, el árbol evolutivo mostró un patrón filopátrico dado por la baja dispersión de las hembras y gran dispersión de los machos de *O. virginianus*, y por tanto solo se presentan pocos haplotipos diferenciados (Cullingham *et al.*, 2011). Un árbol evolutivo similar fue reportado para *O. virginianus* usando SNP, encontrando un haplotipo que agrupó a todos los ejemplares analizados de venados de esta especie, como respuesta de una historia evolutiva de linajes que se han conservado a través del tiempo (Seabury *et al.*, 2011).

5.6 Genealogía en subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

La red de haplotipos es una aproximación complementaria que apoya la interpretación de la genealogía de genes y que está entrelazada con la demografía histórica de las especies (Avice, 2009). La red de haplotipos de las subespecies de *O. virginianus* de este estudio, mostró el anidamiento *intra* subespecies y los haplotipos ancestrales que dieron origen a haplotipos de la misma subespecie, lo que fue indicador de que son recíprocamente monofiléticas, corroborando la cohesión genética del filograma (Templeton, 1994). A pesar de ser un resultado esperado e importante, otro resultado relevante fue que *O. v. acapulcensis* y *O. v. couesi* dieron origen a *O. v. sinaloae* según la conexión mínima de pasos mutacionales entre estas subespecies. Este último

resultado puede ser motivo de no considerar a *O. v. sinaloae* como una subespecie, ampliando la distribución para *O. v. acapulcensis* y *O. v. couesi* hacia el norte y sur, respectivamente, suprimiendo con esto, la distribución de *O. v. sinaloae*. Se considera que aún con la escasa evidencia de la herencia genealógica entre estas tres subespecies -porque limita las inferencias del proceso evolutivo de origen y especiación de *O. v. sinaloae*- puede ser resuelto a una escala más fina incluyendo más haplotipos de las tres subespecies (obteniendo muestras de otros individuos) a fin de esclarecer si *O. v. sinaloae* es una ESU o simplemente son haplotipos derivados de *O. v. acapulcensis* o de *O. v. couesi*.

Por otro lado, la red de haplotipos de las subespecies de *O. virginianus* que se presentó es atípica, ya que muchos de los haplotipos de las subespecies no tienen conexión (Clement *et al.*, 2000; Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Esto básicamente está fundamentado en tres predicciones teóricas (Posada y Crandall, 2001): presencia de mutaciones puntuales en haplotipos como parte de procesos de especiación que estadísticamente exceden el 95% del límite de parsimonia y por ende el algoritmo no los conecta. Una segunda predicción es que la falta de conexiones entre haplotipos se deba a que no se muestrearon los haplotipos intermedios (ancestrales), los que deberían conectarse con los haplotipos muestreados. La última predicción teórica indica que la escasa conexión tiene que ver con la estructura geográfica y los factores demográficos, como la extinción de linajes y cambios en el tamaño poblacional, mismos que fueron obtenidos con las pruebas: Tajima's D y *Mismatch distribution*. Se piensa que esta extinción de linajes se dio durante la cosecha de *O. virginianus*, ya que entre los años 2007 y 2010, se autorizó el aprovechamiento de alrededor de 23,485 ejemplares (alrededor de 8,000 individuos anuales en promedio) de las subespecies de *O. virginianus* distribuidas en el Norte y noreste de México. En diferentes periodos, los permisos de aprovechamiento de *O. virginianus* que se otorgaron fueron: 19,031 ejemplares en 2007-2008, 3,285 ejemplares en 2008-2009 y 1,169 ejemplares en 2009-2010, esto sin contar los periodos de aprovechamiento transcurridos desde el año 2001 al año 2006 y los más recientes del 2011 al 2015 (SEMARNAT, 2013); si le sumamos los animales aprovechados vía caza ilegal y aprovechamiento por comunidades

rurales, más los ejemplares depredados de manera natural, posiblemente durante estos procesos, los linajes fueron diezmados.

Una posible estrategia para recuperar linajes es recurrir a ejemplares de *O. virginianus* que se encuentran en zoológicos o en UMAs intensivas, para lo cual previamente deberán caracterizarse genéticamente para conocer si son haplotipos diferentes y que no se encuentran en las poblaciones silvestres; con técnicas biotecnológicas reproductivas como inseminación artificial y trasplante de embriones, hacer el respectivo cruzamiento y liberar individuos (genéticamente diferentes) a la correspondiente área de distribución natural con el fin de incrementar la diversidad genética *intra* subespecie. Estudios complementarios de genética de poblaciones podrán informar sobre índices de endogamia y parentesco como referentes para incrementar la heterocigosidad *intra* subespecies (De la Rosa-Reyna *et al.*, 2012). Es imperante regular el aprovechamiento cinegético considerando la diversidad genética observada de las subespecies, hasta lograr la estabilidad de la estructura genética de *O. virginianus*. Programas de recuperación genética como el que se propone y que se considera exitoso es con el venado de las Pampas en Argentina-Uruguay, *Ozotoceros bezoarticus* (González *et al.*, 1998) y *O. virginianus* en EEUU (DeYoung *et al.*, 2003).

5.7 Aislamiento por distancia entre subespecies de *O. virginianus* del Pacífico Mexicano

La prueba de Mantel (1967) principalmente estima la correlación entre los valores de diferenciación (por ejemplo: F_{ST} , D, y análogos) y las distancias geográficas que separan los pares de poblaciones. En las subespecies de *O. virginianus* en estudio, aplicamos esta prueba para examinar la hipótesis de aislamiento por distancia: subespecies más distantes entre sí tienen menor posibilidad de ser genéticamente iguales, ya que la probabilidad de intercambio de genes disminuye con la distancia geográfica, como sucede en algunas especies (p. ej. ver Jørgensen *et al.*, 2005).

La hipótesis planteada no se cumplió en lo general, ya que se presentó un patrón de correlación débil, negativa y no significativa. Es decir, subespecies más cercanas

geográficamente entre sí, son genéticamente diferentes y viceversa. Habitualmente, especies con amplios rangos de distribución, por ejemplo, como *Panthera onca*, no muestran asociación entre la distancia genética y geográfica, esto por su capacidad para dispersarse y por distribuir la diversidad genética en distintas áreas geográficas (Ruíz-García *et al.*, 2012). Estudios de genética del paisaje (*landscape genetics*; Manel *et al.*, 2003) podrán dar luz sobre la interacción de la heterogeneidad de los ecosistemas mexicanos con la relación ecológica-genética de *O. virginianus* en cada ecosistema donde se distribuye, considerando la propuesta de Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez (2013) que para desarrollar un estudio de esta índole, proponen un protocolo de 5 etapas, que incluye los fundamentos y variables, los métodos estadísticos y los softwares más adecuados para desarrollar un estudio integral de genética del paisaje.

VI. CONCLUSIONES

El muestreo resultó aleatorio y se obtuvo ADN íntegro para la secuenciación de la región D-Loop del ADN_{mt} en 105 muestras de ocho subespecies de *O. virginianus*.

La diversidad genética observada está siendo mermada por cuellos de botella y deriva génica que históricamente experimentaron las subespecies de *O. virginianus*.

Se detectó una estructura genética dentro de subespecies y una marcada divergencia genética-geográfica entre las subespecies distribuidas en el Norte, Centro y Sur del Pacífico Mexicano, como reflejo de un limitado flujo genético, lo que lleva a considerar a las subespecies como ESU y OCU.

La filogenia entre las subespecies reveló la relación matrilineal y de ancestro-descendencia para ocho grupos monofiléticos representados por haplotipos de cada subespecie geográfica, con eventos de especiación en las subespecies sureñas.

La genealogía mostró que *O. v. acapulcensis* y *O. v. couesi* originaron a *O. v. sinaloae*, por lo que se debe considerar la ampliación de la distribución de las dos primeras y suprimir la distribución de la última.

Existe un evidente aislamiento por distancia inverso, como indicador de que subespecies geográficamente cercanas son genéticamente diferentes.

Establecer veda para *O. virginianus* apoyará la conservación de la diversidad genética evitando la extinción de linajes. Un programa de restauración genética mediante biotecnología reproductiva, usando ejemplares en cautiverio, fomentará la diversificación de linajes. La conexión entre UMAs incrementará el flujo genético.

Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa planteada para este estudio.

VII. LITERATURA CITADA

- Ambriz, M.P. 2010. Evolución del polimorfismo mitocondrial en subespecies de venado cola blanca *Odocoileus virginianus* del estado de Michoacán, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 73 p.
- Ambriz-Morales, P., X.F. De La Rosa-Reyna, A.M. Sifuentes-Rincon, G.M. Parra-Bracamonte, A. Villa-Melchor, O. Chassin-Noria, W. Arellano-Vera. 2016. The complete mitochondrial genomes of nine white-tailed deer subspecies and their genomic differences. *Journal of Mammalogy*. 97(1): 234-245.
- Alves, M.J., H. Coelho, M.J. Collares-Pereira and M.M. Coelho. 2001. Mitochondrial DNA variation in the highly endangered cyprinid fish *Anaecypris hispanica*: importance for conservation. *Heredity*. 87: 463-473.
- Anderson, J.D, R.L. Honeycutt, R.A. Gonzales, K.L. Gee, L.C. Skow, R.L. Gallagher, D.A. Honeycutt and R.W. DeYoung. 2002. Development of microsatellite DNA markers for the automated genetic characterization of white-tailed deer populations. *Journal of Wildlife Management*. 66(1): 67-74.
- Anderson, T.J.C., R. Komuniecki, P.R. Komuniecki and J. Jaenike. 1995. Are mitochondria paternally inherited in *Ascaris*? *International Journal for Parasitology*. 25: 1001-1004.
- Aranda, M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos medianos de México. CONABIO. Instituto de Ecología A. C. México. 212 pp.
- Arbogast, B.S. and G.J. Kenagy. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*. 28: 819-825.
- Arenas, B.P. 2011. El fotoperiodo y su relación con la reproducción del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus miquihuanensis*) en el Altiplano Potosino. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 44 p.
- Arif, A.I. and H.A. Khan. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32(1): 9-17.
- Avise, J.C., J. Ball, R. Bermingham, E. Lamb, T. Neigel, J. Reeb, C. and N. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematic*. 18: 489-522.
- Avise, J.C. and J.L. Hamrick. 1996. Conservation genetics: case histories from nature. Chapman and Hall, New York. 512 p.

- Avise, J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, United Kingdom. 447 p.
- Avise, J.C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 688 p.
- Avise, J.C. 2006. Evolutionary pathways in nature: a phylogenetic approach. Cambridge University Press. New York. EEUU. 286 p.
- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*. 36: 3-15.
- Ball, M.C., R. Pither, M. Manseau, J. Clark, S.D. Petersen, S. Kingston, N. Morrill and P. Wilson. 2007. Characterization of target nuclear DNA from faeces reduces technical issues associated with the assumptions of low-quality and quantity template. *Conservation Genetics*. 8: 577-586.
- Beebee, T. and G. Rowe. 2007. An introduction to molecular ecology. Oxford. Oxford University Press. 416 pp.
- Bivand, S.R., E. Pebesma and V. Gómez-Rubio. 2013. Applied spatial data analysis with R. 2nd Ed. Springer New York. EEUU. 405 p.
- Blanchong, J.A., S.A. Bess and K.T. Scribner. 2013. Genetic diversity and population structure in urban White-Tailed Deer. *Journal of Wildlife Management*. 521: 1-8.
- Bradley, R., F.C. Bryant, F.C. Bradley, M.L. Haynie and R.J. Baker. 2003. Implications of hybridization between white-tailed deer and mule deer. *Southwestern Naturalist*. 48(4): 654-660.
- Calderón, L.R.D. 2009. Análisis genético para la conservación y manejo de subespecies de *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) en México. Tesis de Maestría en Ciencias. Instituto Politécnico Nacional. 87 p.
- Carr S.T., S.W. Ballinger, J.N. Derr, L.H. Blankenship and J.W. Bickham. 1986. Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in West Texas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83: 9576-9580.
- Catresana, J., J. Igea, P. Aymerich, A. Fernández-González y J. Gosálbez. 2013. Filogeografía del Desmán Ibérico (*Galemys pyrenaicus*) y su distribución en la red de Parques Nacionales. En: *Proyectos de Investigación en Parques Nacionales: 2009-2012*. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. España. Pp. 143-154.

- Cerritos, F.R. 2007. La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. Pp. 325-349. *En*: Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (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 Uso de la Biodiversidad. México.
- Cienfuegos-Rivas, E., F.G. Cantú-Medica, K.G. Logan-López, F. González-Saldívar, F., A. González-Reyna, H. Castillo-Juárez, G.D. Mendoza-Martínez y Martínez-J.C. González. 2011. La cosecha selectiva: un factor de cambio en las astas del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*). *Agrociencia*. 45: 771-783.
- Comer, C.E., J.C. Kilgo, G.J. D'Angelo, T.C. Gleen and K.V. Miller. 2005. Fine-scale genetic structure and social organization in female white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management*. 69(1): 332-344.
- Cullingham, C.I., E.H. Merrill, M.J. Pybus, T.K. Bollinger, G.A. Wilson and D.W. Coltman. 2011. Broad and fine-scale genetic analysis of white-tailed deer populations: estimating the relative risk of chronic wasting disease spread. *Evolutionary Applications*. 4: 116-131.
- Clément, G., A. Ropiquet and A. Hassanin. 2006. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 40(1): 101-117.
- Clement, M., D. Posada and K.A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 9(10): 1657-1660.
- Chillopa, M.F. 2008. Esquema legal para el aprovechamiento sustentable del venado en México. XI Simposio sobre Venados en México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Crandall, K., O. Bininda-Emonds, G. Mace and R. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Tree*. 15: 290-295.
- Cronin, M.A. 2006. A proposal to eliminate redundant terminology for Intra-species groups. *Wildlife Society Bulletin*. 34(1): 237-241.
- Cronin, M.A., M.E. Nelson and D.F. Pac. 1991. Spatial heterogeneity of Mitochondrial DNA and Allozymes among populations of White-Tailed deer and Mule Deer. *Journal of Heredity*. 82: 118-127.
- Darrell, L., L. Honeycutt, J.S. Nova, J.W. Bickham and W.D. Klimstra. 1994. Historical biogeography and contemporary patterns of mitochondrial DNA variation in white-tailed deer from the Southeastern United State. *Evolution*. 48(1): 122-136.

- Delfín-Alfonso, C., S. Gallina y C.A. López. 2009. Evaluación del hábitat del venado cola blanca utilizando modelos espaciales y sus implicaciones para el manejo en el centro de Veracruz, México. *Tropical Conservation Science*. 2(2): 215-228.
- De la Rosa-Reyna, X.F., R.D. Calderón-Lobato, G.M. Parra-Bracamonte, A.M. Sifuentes-Rincón, R.W. DeYoung, F.J. García-De León and W. Arellano-Vera. 2012. Genetic diversity and structure among subspecies of White-Tailed Deer in Mexico. *Journal of Mammalogy*. 93(4): 1158-1168.
- DeWoody, J.A., R.L. Honeycutt and L.C. Skow. 1995. Microsatellite markers in White-Tailed Deer. *Journal of Heredity*. 86(4): 317-319.
- DeYoung, R.W., S. Demarais, R.L. Honeycutt, R.A. Gonzales, K.L. Gee and J.D. Anderson. 2003. Evaluation of a DNA microsatellite panel useful for genetic exclusion studies in white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin*. 31(1): 220-232.
- DeYoung, R.W., S. Demarais, R.L. Honeycutt, A.P. Rooney, R.A. Gonzales and K.L. Gee. 2003. Genetic consequences of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) restoration in Mississippi. *Molecular Ecology*. 12: 3237-3252.
- DeYoung, R.W., S. Demarais, R.A. Gonzales, R.L. Honeycutt, and K.L. Gee. 2002. Multiple paternity in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) revealed by DNA microsatellites. *Journal of Mammalogy*. 83(3): 884-892.
- DeYoung, R.W., S. Demarais, K.L. Gee, R.L. Honeycutt, M.W. Hellickson and R.A. Gonzales. 2009. Molecular evaluation of the White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) mating system. *Journal of Mammalogy*. 90(4): 946-953.
- DeSalle, R. and G. Amato. 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature Review Genetics*. 5: 702-712.
- Diaz, A., Hughes, S., Putman, R., Mogg, R. and Bond, M. 2006. A genetic study of sika (*Cervus nippon*) in the New Forest and in the Purbeck region, southern England: is there evidence of recent or past hybridization with red deer (*Cervus elaphus*)? *Journal of Zoology*. 270: 227-235.
- Diggle, P.J. 2002. *Statistical analysis of spatial point patterns*. Hodder Headline Group. Arnold London. Oxford University Press Inc. New York. EEUU. 288 pp.
- Diggle, P.J. 2013. *Statistical analysis of spatial and spatio-temporal point patterns*. Chapman and Hall/CRC, Boca Raton.
- Dizon, A.E., C. Lockyer, W.F. Perrin, D.P. Demaster and J. Sisson. 1992. Rethinking the stock concept: A phylogeographic approach. *Conservation Biology*. 6: 24-36.

- Doadrio, I., A. Perdices and A. Machordom. 1996. Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes*. 45: 259-271.
- Domínguez-Domínguez, O. y E. Vázquez-Domínguez. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32(1): 59-70.
- Douzery, E. and E. Randi. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution*. 14(11): 1154-1166.
- Eizrik, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservacao e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics*. 19(4): 23-29.
- Espinoza, A.L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. *En: Ecología Molecular*. L. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Eds.). Instituto Nacional de Ecología. 574p.
- ESRI. 2011. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: Environmental Systems Research Institute.
- Excoffier, L. and G. Heckel. 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews Genetics*. 7: 745-758.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.
- Excoffier, L., P. Smouse and J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA Haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Excoffier, L. 2007. Analysis of population subdivision. Pp. 980-1020. *In: D.J. Balding, M. Bishop and C. Cannings (Eds). Handbook of Statistical genetics, Third Edition*. John Wiley and Sons. 1392 p.
- Felsenstein, J. 1971. The rate of loss of multiple alleles in finite haploid populations. *Theoretical Population Biology*. 2: 391-403.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. *Evolution*. 39(4): 783-791.
- Fuentes-Hurtado, M., J.C. Marín, D. González-Acuña, C. Verdugo, F. Vidal and J.A. Vianna. 2011. Molecular divergence between insular and continental Pudu deer (*Pudu puda*) populations in the Chilean Patagonia. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 46(1): 23-33.

- Fulbright, T.E. and J.A. Ortega-Santos. 2006. White-Tailed Deer habitat: ecology and management on rangelands. Texas A & M University Press. EE.UU. 256 p.
- Fluxus Technology Ltd. 1999-2016. Network 4.5.1.0. User Guide. Disponible en: <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- Frankham, R., J.D. Ballou and D.A. Briscoe. 2010. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge. UK. 644 pp. 2nd Edition.
- Frantzen, M.A.J., J.B. Silk, J.W.H. Ferguson, R.K. Wayne and M.H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology*. 7: 1423-1428.
- Fraser, D.J. and L. Bernatchez. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*. 10: 2741-2752.
- Gallina, S., S. Mandujano, J. Bello, H.F. López A. and M. Weber. 2010. White-Tailed Deer *Odocoileus virginianus* (Zimmerman, 1780). Pp. 101-118. *In: Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer*. Duarte J.M.B and S. González (Eds.). Jaboticabal: Funep/IUCN. 393 p.
- Garrido-Garduño, T. y E. Vázquez-Domínguez. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 84: 1031-1054.
- Geist, V. 1998. Deer of the world: their evolution, behavior and ecology. Mechanicsburg, Pennsylvania: Stackpole Books. 326 p.
- Gómez, P.M., O. Mora, R.M. Melendez, J.L. Romano, H. Vera y A. Shimada. 2010. Efecto de una sublimación prolongada sobre el peso, la condición y la composición corporal en cabras. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1(3): 205-219.
- González, S., J.E. Maldonado, J.A. Leonard, C. Vilá, J.M. Barbanti Duarte, M. Merino, N. Brum-Zorrilla and R.K. Wayne. 1998. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular Ecology*. 7: 47-56.
- Guillot, G., R. Leblois, A. Coulon and A.C. Frantz. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology*. 18: 4734-4756.
- Grant, W.S. and B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lesson for conservation. *The Journal of Heredity*. 89(5): 415-426.
- Griffiths, R.C. 1980. Lines of descent in the diffusion approximation of neutral Wright-Fisher models. *Theoretical Population Biology*. 17: 40-50.

- Groves, C. and P. Grubb. 2011. Ungulate taxonomy. The Johns Hopkins University Press. EEUU. 317 p.
- Hall, B.G. 2004. Phylogenetic trees made easy: a how-to manual. Sunderland (MA): Sinauer Associate. 221 p.
- Hall, B.G. 2013. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*. 30(5): 1229-1235.
- Hall, E.R. 1981. The mammals of North America. 2nd Edition. John Wiley and Sons Inc. EEUU. pp: 601-1175.
- Halls, L.K. 1984. White-Tailed Deer ecology and management. Stackpole Books, Harrisburg, PA. 870 p.
- Harding, R.M. 1996. New phylogenies: An introductory look at the coalescent. Pp. 15-22. *In: New uses for new phylogenies*. Harvey, P. H., A. J. Leigh Brown, J. Maynard Smith and S. Nee (Eds.). Oxford University Press, Nueva York. EEUU. 368 p.
- Harrison, C.J. and J.A. Langdale. 2006. A step by step guide to phylogeny reconstruction. *The Plant Journal*. 45: 561-572.
- Hatzoglou, E., G. Rodakis and R. Lecanidou. 1995. Complete sequence and gene organization of the mitochondrial genome of the Land Snail *Albinaria coerulea*. *Genetics*. 140: 1353-1366.
- Hedrick, P.W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*. 53: 313-318.
- Hernández-Llamas 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 en Ciencias. Colegio de Postgraduados. México. 55 p.
- Hernández, M.P.M. 2010. Dinámica espacio temporal del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus texanus*) en el Norte de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. 114 p.
- Hernández-Fernández, M. and E.S. Vrba. 2005. A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. *Biological Review*. 80: 269-302.
- Hundertmark, J.K., G.F. Shields, I.G. Udina, R.T. Bowyer, A.A. Danilkin and C.C. Schwartz. 2002. Mitochondrial phylogeography of Moose (*Alces alces*): late Pleistocene divergence and population expansion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 22(3): 375-387.

- INE. 2000. Estrategia Nacional para la Vida Silvestre. Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (INE-SEMARNAT). 212 p.
- INFOSTAT. 2008. Software estadístico InfoStat versión 2008. Manual de usuario. Grupo InfoStat. FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina. 2008.
- IUCN. 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 09 March 2012.
- Jørgensen, H.B.H., M.M. Hansen, D. Bekkevold, D.E. Ruzzante and V. Loeschcke. 2005. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*. 14: 3219-3234.
- Jukes T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-132. *In: Mammalian Protein Metabolism*. Munro, H.N. (Ed.). Academic Press, New York. EEUU.
- Kellogg, R. 1956. What and where are the whitetails? Pp. 31-55. *In: The deer of North America*. Taylor, W.P. (Ed.). The Stackpole Company, Harrisburg, Pennsylvania. EEUU. 668 p.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular and Evolution*. 16: 111-120.
- Kimura, M. and T. Ohta. 1969. The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. *Genetics*. 61: 763-771.
- Kuznetsova, M.V., M.V. Kholodova and A.A. Danilkin. 2005. Molecular phylogeny of deer (Cervidae: Artiodactyla). *Russian Journal of Genetics*. 41(7): 742-749.
- Knowles, L.L. and W.P. Maddison. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*. 11: 2623-2635.
- Lanteri, A.A. y V.A. Confalonieri. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. Pp. 118-193. *En: Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: conceptos, teorías, métodos y aplicaciones*. Llorente-Bousquets y J.J. Monrroe (Eds.). Facultad de Ciencias. UNAM. México. 277 p.
- Leberg, P.L. and D.L. Ellsworth. 1999. Further evaluation of genetic consequences translocations on Southeastern White-Tailed Deer populations. *The Journal of Wildlife Management*. 63(1): 327-334.
- Lessa, E.P. 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Systematic Zoology*. 39(3): 242-252.

- Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. 1998. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Última reforma DOF 04-06-2012. México.
- Ley General de Vida Silvestre. 2000. Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Última reforma 06-06-2012.
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Logan-López, K. 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 en Ciencias. Colegio de Postgraduados.
- Logan-López, K., E. Cienfuegos-Rivas, A. Sifuentes-Rincón, M. González-Paz, F. Clemente-Sánchez, G. Mendoza-Martínez y L. Tarango-Arámbula. 2007. Patrones de variación genética en cuatro subespecies de venado cola blanca al noreste del México. *Agrociencia*. 41(1): 13-21.
- Logan-López, K., E. Cienfuegos-Rivas, F. Clemente-Sánchez, G.D. Mendoza-Martínez, A. Sifuentes-Rincón y L. Tarango-Arámbula. 2006. Caracterización morfométrica de cuatro subespecies de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en la zona noreste de México. *Revista Científica, FCV-LUZ*. XVI(1): 14-22.
- Loo, J. 2011. Manual de genética de la conservación. Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. Comisión Nacional Forestal (CONAFOR). México. 192 p.
- López, C.J.A. 2010. Diversidad y diferenciación genética de tres subespecies de venado cola blanca *Odocoileus virginianus* del estado de Michoacán, México analizada con microsatélites nucleares. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 70 p.
- Lopez, R.G. and P. Beier. 2012. Weathered antlers as a source of DNA. *Wildlife Society Bulletin*. 36(2): 380-382.
- Lunt, D.H., L.E. Whipple and B.C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology*. 7: 1441-1455.
- Lynch, M. 1991. The genetic interpretation of inbreeding and outbreeding depression. *Evolution*. 45: 622-629.
- Mahmut, H., R. Masuda, M. Onuma, M. Takahashi, J. Nagata, M. Suzuki and N. Ohtaishi. 2002. Molecular phylogeography of the Red Deer (*Cervus elaphus*) populations in Xinjiang of China: comparison with other Asian, European, and North American Populations. *Zoological Science*. 19(4): 485-495.

- Mandujano, S. 2004. Estudio bibliográfico de los estudios de venados en México. *Acta Zoológica Mexicana (nueva serie)*. 20 (1): 211-251.
- Mandujano, S., C.A. Delfín-Alfonso and S. Gallina. 2010. Comparison of geographic distribution models of White-Tailed Deer *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) subspecies in Mexico: biological and management implications. *Therya*. 1(1): 41-68.
- Mandujano, S. 2011. Bibliografía estudios de venados en México. Colección de Manejo de Fauna Silvestre No. 2. Instituto Literario de Veracruz S.C. Veracruz, México. 121 p.
- Mandujano, S. 2011. Consideraciones ecológicas para el manejo del venado cola blanca en UMA extensivas en bosques tropicales. Pp. 249-275. *En: Temas sobre conservación de vertebrados silvestres en México*. Sánchez, O., P. Zamorano, E.R. Peters y H. Moya (Eds.). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México.
- Manel, S., M.K. Schwartz, G. Luikart and P. Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*. 18: 189-197.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 207-220.
- Marshall T.C. and J.A. Spalton. 2000. Simultaneous inbreeding and outbreeding depression in reintroduced *Arabian oryx*. *Animal Conservation*. 3: 241-248.
- Mathews, N.E. and W.F. Porter. 1993. Effect of social structure on genetic structure of free ranging White-Tailed Deer in the Adirondack Mountains. *Journal of Mammalogy*. 74(1): 33-43.
- Mayr, E. 1982. Of what use are subspecies? *The Auk*. 99(3): 593-595.
- Meiri, M., A.M. Lister, T.F.G. Higham, J.R. Stewart, L.G. Straus., H. Obermaier, M.R. González M., A.B. Marín-Arroyo and I. Barnes. 2013. Late-glacial recolonization and phylogeography of European red deer (*Cervus elaphus* L.). *Molecular Ecology*. 22: 4711-4722.
- Meirmans, P.G. 2006. Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 60: 2399-2402.
- Merino, M.L. and R.R. Vieira. 2010. Origin, systematics, and morphological radiation. Pp. 2-11. *In: Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer*. Duarte, J.M.B. and S. González (Eds.). FUNEP, Jaboticabal, Brasil and Gland Switzerland. IUCN.

- Mendez, E. 1984. Origin, classification and distribution. Pp. 513-524. *In*: White-Tailed Deer: Ecology and Management. Halls, L.K. (Ed.). Stackpole Books, Harrisburg, Pennsylvania. EEUU.
- Miller, B.F., R.W. DeYoung, T.A. Campbell, B.R. Laseter, W.M. Ford and K.V. Miller. 2010. Fine-scale genetic and social structuring in a central Appalachian White-Tailed Deer herd. *Journal of Mammalogy*. 91(3): 681-689.
- Molina, G.V.M. 2002. Diferenciación genética de poblaciones de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus* Boddaert). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma de Nuevo León. 87 p.
- Monteith, K.L., R.A. Long, V.C. Bleich, J.R. Heffelfinger, P.R. Krausman and R.T. Bowyer. 2013. Effects of harvest, culture, and climate on trends in size of horn-like structures in trophy ungulates. *Wildlife Monographs*. 183(1): 1-28.
- Moscarella, R.A., M. Aguilera and A.A. Escalante. 2003. Phylogeography, population structure, and implications for conservation of White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*) in Venezuela. *Journal of Mammalogy*. 84(4): 1300-1315.
- Musiani, M., J.A. Leonard, H.D. Cluff, C.C. Gates, S. Mariani, P.C. Paquet, C. Villà and R.K. Wayne. 2007. Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: genetics, coat colour and association with migratory caribou. *Molecular Ecology*. 16: 4149-4170.
- Naranjo, E.J., J.C. López-Acosta y R. Dirzo. 2010. La cacería en México. *Biodiversitas*. 91: 6-10.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 70(12): 3321-3323.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular evolution and phylogenetic*. Oxford University Press, New York. EEUU. 352 p.
- Nelson, M.E. 1993. Natal dispersal and gene flow in White-tailed Deer in Northeastern Minnesota. *Journal of Mammalogy*. 74(2): 316-322.
- Nelson, M.E. and L.D. Mech. 1992. Dispersal in female White-Tailed deer. *Journal of Mammalogy*. 73(4): DOI: <http://dx.doi.org/10.2307/1382212>
- Nolte, M., A. Kotzé, F.H. van der Bank and J.P. Grobler. 2005. Microsatellite markers reveal low genetic differentiation among southern African *Camelus dromedarius* populations. *South African Journal of Animal Science*. 35(3): 152-161.
- Nowak, R.M. 1991. *Walker's mammals of the world*. Sixth Edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. EEUU. 2,015 p.

- Ojasti, J. 1996. Wildlife utilization in Latin American: current situation and prospects for sustainable management. (FAO Conservation Guide 25). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Roma.
- Olrog, C.C. 1967. Una observación sobre el concepto de subespecie. *Hornero*. 10(4): 444-445.
- Ramos-Onsins, S.E. and J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*. 19: 2092-2100.
- Patten, M.A. and P. Unitt. 2002. Diagnosability versus mean differences of Sage Sparrow subspecies. *The Auk*. 119(1): 26-35.
- Petit, R.J. and L. Excoffier. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution*. 24(7): 386-393.
- Pitra, C., J. Fickel, E. Meijaard and P.C. Groves. 2004. Evolution and phylogeny of old world deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33: 880-895.
- Posada, D. and K.A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: tress grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*. 16(1): 37-45.
- Purdue, J.R., M.H. Smith and J.C. Patton. 2000. Female philopatry and extreme spatial genetic heterogeneity in White-Tailed Deer. *Journal of Mammalogy*. 81: 179-185.
- Purdue, J.R., T.K. Oleksyk and 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.
- Premoli, A., M.P. Quiroga, C.P. Souto y P. Mathiasen. 2011. Genética de la Conservación: de poblaciones a filogeografía. Pp.31-45. *En: J. Simonetti y R. Dirzo (Ed.). Conservación Biológica: perspectivas desde América Latina*. Publisher: Editorial Universitaria.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Randi, E., M. Pierpaoli and A. Danilkin. 1998. Mitochondrial DNA polymorphism in populations of Siberian and European roe deer (*Capreolus pygargus* and *C. capreolus*). *Heredity*. 80: 429-437.
- Rasgon, J.L., A.J. Cornel and T.W. Scott. 2006. Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proceedings the Royal of Society Biological Science*. 273: 1603-1611.

- Retes, L.R., M.I. Cuevas G., S. Moreno M., F.G. Denogean, F. Ibarra, M. Martín R. 2010. Unidad de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre como alternativa para los nuevos agronegocios. *Revista Mexicana de Agronegocios*. XIV (27): 336-346.
- Rojo-Curiel, A., J.L. Cruz, G. Solano y R. Hernández. 2007. Plan de manejo tipo de venado cola blanca en zonas templadas y tropicales en México. DGVS, SEMARNAT, México. D.F. Publicación electrónica.
- Rogers, A. and H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9(3): 552-569.
- Rogers, A.R., A.E. Fraley, M.J. Bamshad, W.S. Watkins and L.B. Jorde. 1996. Mitochondrial Mismatch analysis is insensitive to the mutational process. *Molecular Biology and Evolution*. 13(7): 895-902.
- Ruíz-García, M., N. Leguizamón, C. Vázquez, K. Rodríguez y M.I. Castillo. 2010. Métodos genéticos para la reintroducción de los géneros *Saguinus*, *Aotus* y *Cebus* (Primates: Cebidae) decomisados en Bogotá, Colombia. *Revista de Biología Tropical*. 58(3): 1049-1067.
- Ruíz-García, M., E. Randi, M. Martínez A. y D. Álvarez. 2007. Relaciones filogenéticas entre géneros de ciervos neotropicales (Artiodactyla: Cervidae) mediante secuenciación de ADN mitocondrial y marcadores microsatelitales. *Revista de Biología Tropical*. 55(2): 723-741.
- Ruiz-García, M., C. Vázquez, A. Murillo, M. Pinedo and D. Álvarez. 2012. Population genetics and phylogeography of the largest wild cat in the Americas: an analysis of the jaguar by means of microsatellites and mitochondrial gene sequences. Pp. 413-464. *In: Molecular population genetics, phylogenetics, evolutionary biology and conservation of the neotropical carnivores*. M. Ruiz-García and J.M. Shostell (Eds.). Nova Science Publishers, Hauppauge, Nueva York, EEUU.
- Ryder, O.A. 1986. Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*. 1: 9-10.
- Qiagen. 2006. DNeasy Blood & Tissue Handbook. 61 p. EEUU.
- Seabury, C.M., Bhattarai E.K., Taylor J.F., Viswanathan G.G., Cooper S.M., Dowd S.E., Lockwood M.L., and P.M. Seabury. 2011. Correction: genome-wide polymorphism and comparative analyses in the White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*): a model for conservation genomics. *PLoS ONE*. 6(2): 10.1371/annotation/80c6965b-ffa0-4100-8a20-3f41a08b2894.
DOI: 10.1371/annotation/80c6965b-ffa0-4100-8a20-3f41a08b2894

- SEMARNAP. 1997. Programa de Conservación de la Vida Silvestre y Diversificación Productiva en el Sector Rural 1997-2000. Instituto Nacional de Ecología y Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 207 p.
- SEMARNAT. 2000. Estrategia nacional para la vida silvestre. Logros y retos para el desarrollo sustentable 1995-2000. SEMARNAT-INE. México. D.F.
- SEMARNAT. 2005. Los permisos de caza deportiva y su evolución en el tiempo. Dirección General de Vida Silvestre. SEMARNAT. México. Consultado en: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_04/05_aprovechamiento/recuadros/c_rec_2_05.htm (03/06/15).
- SEMARNAT. 2013. Aprovechamientos. Relación de Unidades de Manejo autorizadas. Periodos de aprovechamiento de 2001 al 2010. SEMARNAT. Consultado el 05/06/2015 en: <http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestion-ambiental/vida-silvestre/aprovechamientos>
- SEMARNAT. 2014. Plan de manejo tipo para la conservación y aprovechamiento sustentable del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en climas templados y tropicales de México: extensivo y cría en cautiverio. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 71 p.
- Serna-Lagunes, R., D. González y P. Díaz-Rivera. 2012. Variación genética de poblaciones en cautiverio de *Crocodylus moreletii* (Crocodylia: Crocodylidae) mediante el uso de marcadores microsatelitales. Revista de Biología Tropical. 60(1): 425-436.
- Sorin, A.B. 2004. Paternity assignment for White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*): mating across age classes and multiple paternity. Journal of Mammalogy. 85(2): 356-362.
- Smith, W.P. 1991. *Odocoileus virginianus*. Mammalian Species. 388: 1-13.
- SPSS. 2004. Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). SPSS Base 12.0 User's Guide for Windows. SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA.
- Spellman, G. and J. Klicka. 2007. Pylogeography of the White-breasted Nuthatch (*Sitta carolinensis*): diversification in North American pine and oak woodlands. Molecular Ecology. 16: 1729-1740.
- Storfer, A. 1999. Gene flow and endangered species translocation -a topic revisited. Biological Conservation. 87: 173-180.
- Slatkin, M. 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations. Genetics. 99: 323-335.

- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 16: 393-430.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457-462.
- Strassmann, J.E., C.R. Solis, J.M. Peters and D.C. Queller. 1996. Strategies for finding and using highly polymorphic DNA microsatellite loci for studies of genetic relatedness and pedigrees. Pp. 163-180. *In: Molecular Zoology*. Ferraris J. and S. Palumbi (Eds.). Wiley-Liss Inc. New York. EEUU.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123(3): 585-95.
- Technelysium. 2012. Chromas lite v. 2.1.1. Copyright 1998-2012. Technelysium Ply Ltd.
- Templeton, A.R., K.A. Crandall and C.F. Sing. 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.
- Templeton, A.R. 1994. The role of molecular genetics in speciation studies. *In: Molecular ecology and evolution: approaches and applications*. Birkhäuser verlag, Basel, Suiza.
- Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: Testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*. 7: 381-397.
- Templeton, A.R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. Pp. 3-27. *In: Speciation and its consequences*. Otte, D. and J.A. Endler (Eds.). Sinauer, Sunderland, Massachusetts, EEUU.
- Templeton, A.R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*. 10: 779-791.
- Templeton, A.R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*. 13: 789-809.
- Templeton, A.R. and C.F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*. 134: 659-669.

- Tzeng, T-D., Yeh, S-Y., and Hui, C-F. 2004. Population genetic structure of the kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) in East Asia inferred from mitochondrial DNA sequences. PICES Journal of Marine Science. 61: 913-920.
- Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 2012. Impacto del aprovechamiento cinegético del venado cola blanca *Odocoileus virginianus* en la reconversión del uso del suelo y la restitución de la biodiversidad en Nuevo León. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2014. *Odocoileus virginianus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2 www.iucnredlist.org.
- Vázquez-Domínguez, E., S. Castañeda-Rico, T. Garrido-Garduño y T.A. Gutiérrez-García. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. Revista Chilena de Historia Natural. 82(2): 277-297.
- Vázquez-Domínguez, E. 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. Pp. 369-378. *In*: Protected areas and the regional planning imperative in North America. Nelson, G., J.C. Day, L.M. Sportza, J. Loucky and C. Vásquez (Eds.). University of Calgary Press, Canada.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. Pp. 441-466. *En*: Ecología Molecular. Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (compiladores). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Villesen, P. 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. Molecular Ecology Notes. 7(6): 965-968. Disponible en: <http://www.birc.au.dk/software/fabox>
- Villareal, J. 1999. Venado Cola Blanca. Manejo y Aprovechamiento. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. 401 p.
- Villareal, J. 2013. Guía de campo para el cazador responsable de venado cola blanca. Consejo Estatal de Flora y Fauna Silvestre de Nuevo León A.C. 64 p.
- Walsh, P.D. 2000. Sample size for the diagnosis of conservation units. Conservation Biology. 14(5): 1533-1537.
- Waye, S.J. and J.C. Haigh. 1992. DNA probes for identification of Cervidae. Pp. 384-389. *In*: The Biology Deer. Brown R. (Ed.). Springer Verlag. New York. EEUU.
- Weber, M. 1993. Ganadería de ciervos: ¿alternativa o amenaza a la conservación de la fauna nativa? Agrociencia. 3: 99-113.

- Wehausen J.D., R.R. II Ramey and C.W. Epps. 2004. Experiments in DNA extraction and PCR amplification from Bighorn Sheep feces: the importance of DNA extraction method. *Journal of Heredity*. 95: 503-509.
- Weir, B. and C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.
- Weir, B.S. 1996. Genetic data analysis II. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. EEUU. 283 p.
- Wilson, D. and D. Reeder's. 2005. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3rd Edition. Johns Hopkins University Press. Vol. 2. Baltimore, Maryland. EEUU. 2142 p.
- Whitehead, G.K. 1993. The Whitehead encyclopedia of deer. Voyageur Press Inc. Stillwater, USA. 704 p.
- Wright, J., H. Zeballos, I. Domínguez, M.M. Gallardo, M.C. Moreno and R. Ibáñez. 2000. Poachers alter mammal abundance, seed dispersal, and seed predation in a Neotropical forest. *Conservation Biology*. 14: 227-239.
- Xiang-Dong, R., H. Pei-Jian, Z. Jian-Long, W. Qiu-Hong, F. Sheng-Guo. 2005. Evolutionary history and current population relationships of the Chiru (*Pantholops hodgsonii*) inferred from mtDNA variation. *Journal of Mammalogy*. 86(5): 881-886.
- XLSTAT. 2015. XLSTAT Software. Copyright Addinsoft 1995-2015. <http://www.xlstat.com>.
- Zink, R. 2004. The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society*. 271(1539): 561-564.
- Zhang, W.Q. and M.H. Zhang. 2012. Phylogeny and evolution of Cervidae based on complete mitochondrial genomes. *Genetics and Molecular Research*. 11(1): 682-635.

Model	Param	BIC	AICc	InL	R	Freq A	Freq T	Freq C	Freq G	A=>T	A=>C	A=>G	T=>A	T=>C	T=>G	C=>A	C=>T	C=>G	G=>A	G=>T	G=>C		
JC	197	3191.863906	1989.570964	-786.6472751	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	
K2	198	3195.87686	1987.600414	-784.5457083	0.759628903	0.25	0.25	0.25	0.25	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07
T92	199	3198.469566	1984.210891	-781.7340172	0.770096961	0.268243243	0.268243243	0.231756757	0.231756757	0.08	0.07	0.1	0.08	0.1	0.07	0.08	0.12	0.07	0.12	0.08	0.07	0.07	
JC+I	198	3200.079716	1991.80327	-786.6471361	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
JC+G	198	3200.237118	1991.960672	-786.7258372	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
K2+I	199	3204.091346	1989.832672	-784.5449073	0.759629696	0.25	0.25	0.25	0.25	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07
K2+G	199	3204.262796	1990.004122	-784.6306322	0.759559073	0.25	0.25	0.25	0.25	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07
T92+I	200	3206.686777	1986.447151	-781.7345788	0.770055739	0.268243243	0.268243243	0.231756757	0.231756757	0.08	0.07	0.1	0.08	0.1	0.07	0.08	0.12	0.07	0.12	0.08	0.07	0.07	
T92+G	200	3206.876876	1986.63725	-781.8296283	0.770064902	0.268243243	0.268243243	0.231756757	0.231756757	0.08	0.07	0.1	0.08	0.1	0.07	0.08	0.12	0.07	0.12	0.08	0.07	0.07	
JC+G+I	199	3208.453206	1994.194532	-786.7258372	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
K2+G+I	200	3212.478884	1992.239258	-784.6306322	0.759559073	0.25	0.25	0.25	0.25	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.11	0.07	0.07
T92+G+I	201	3215.092964	1988.873665	-781.8296283	0.770064902	0.268243243	0.268243243	0.231756757	0.231756757	0.08	0.07	0.1	0.08	0.1	0.07	0.08	0.12	0.07	0.12	0.08	0.07	0.07	
HKY	201	3217.697616	1991.478317	-783.1319542	0.810484134	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
HKY+I	202	3225.913705	1993.716011	-783.1319547	0.810463533	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
HKY+G	202	3226.123803	1993.926109	-783.2370035	0.80999638	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
TN93	202	3226.166592	1993.968897	-783.2583978	0.811011586	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
HKY+G+I	203	3234.339891	1996.165082	-783.2370035	0.80999638	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
TN93+I	203	3234.38268	1996.207872	-783.2583981	0.811000799	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
TN93+G	203	3234.591238	1996.41643	-783.362677	0.810760916	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
GTR	205	3240.679358	1990.554165	-778.1906487	0.776283695	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.14	0.08	0.11	0.08	0.09	0.04	0.07	0.14	0.05	0.09	0.05	0.05	0.05	
TN93+G+I	204	3242.807326	1998.656685	-783.362677	0.810760916	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.09	0.06	0.11	0.05	0.1	0.07	0.05	0.15	0.07	0.09	0.09	0.06	0.06	
GTR+I	206	3248.895611	1992.797151	-778.1907312	0.77625815	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.14	0.08	0.11	0.08	0.09	0.04	0.07	0.14	0.05	0.09	0.05	0.05	0.05	
GTR+G	206	3249.150081	1993.051621	-778.3179663	0.775843166	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.14	0.08	0.11	0.08	0.09	0.04	0.07	0.14	0.05	0.09	0.05	0.05	0.05	
GTR+G+I	207	3257.366169	1995.295726	-778.3179663	0.775843166	0.194594595	0.341891892	0.220810811	0.242702703	0.14	0.08	0.11	0.08	0.09	0.04	0.07	0.14	0.05	0.09	0.05	0.05	0.05	

Anexo. Máxima Verosimilitud de ajuste en 24 modelos de sustitución de nucleótidos diferentes.