



INSITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACION PARA
EL PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL- UNIDAD
DURANGO**

Segregación, comportamiento hormonal y variabilidad genética de
venado cola blanca en vida libre y encierro de la Sierra Madre
Occidental de Durango

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

Dania Melissa Vega Hernández

DIRECTOR:

Dr. Isaias Chairez Hernández

CO-DIRECTOR:

Gaspar Manuel Parra Bracamonte

Victoria de Durango, Durango, Junio 2019.





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Durango, Dgo. siendo las 14:00 horas del día 29 del mes de noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del: CIIDIR-IPN Unidad Durango para examinar la tesis titulada:

Segregación, comportamiento hormonal y variabilidad genética de venado cola blanca en vida libre y encierro de la Sierra Madre Occidental de Durango

Presentada por la alumna:

VEGA

HERNÁNDEZ

DANIA MELISSA

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Con registro:

A	1	5	0	2	2	7
---	---	---	---	---	---	---

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Isaias Chairez Hernández

Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamontes

Dr. Miguel Mauricio Correa Ramirez

Dra. Norma Almaraz Abarca

Dra. Sonia Antonieta Gallina Tessaro

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eduardo Sánchez Ortiz



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

México, D.F. a 13 de noviembre del 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-IPN Durango en su sesión Ordinaria No. 9 celebrada el día 13 del mes de noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>VEGA</u>	<u>HERNÁNDEZ</u>	<u>DANIA MELISSA</u>
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)

Con registro:

A	1	5	0	2	2	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de: Doctorado en Ciencias en Biotecnología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
Segregación, comportamiento hormonal y variabilidad genética de venado cola blanca en vida libre y encierro de la Sierra Madre Occidental de Durango

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Isaías Cháirez Hernández y Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamontes (CBG)

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
El CIIDIR-IPN Unidad Durango

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis



Dr. Isaías Cháirez Hernández

Aspirante



M. en C. Dania Melissa Vega Hernández



Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamontes

Presidente del Colegio



Dr. Eduardo Sánchez Ortiz



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R
UNIDAD DURANGO
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Durango, Dgo., el día 29 del mes de noviembre del año 2018 la que suscribe **Dania Melissa Vega Hernández** alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología, con número de registro A150227, adscrita al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango. CIIDIR-IPN Unidad Durango, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Isaiás Chairez Hernández y del Dr. Gaspar Manuel Parra Bracamontes y cede los derechos del trabajo titulado “Segregación, comportamiento hormonal y variabilidad genética de venado cola blanca en vida libre y en encierro de la Sierra Madre Occidental de Durango”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso de la autora y/o directores del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones daniavegal2@gmail.com, ichairez@hotmail.com y gparra@ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

DANIA MELISSA VEGA HERNÁNDEZ

DEDICATORIA

A mis padres María del Rosario y Ramiro. A mi hermana Nora, y mis sobrinos
Adrienne y Aaron.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico brindado para poder realizar el doctorado.

A Antonio Mancinas, Jesús Meléndez y Roberto Meléndez por permitirnos realizar este trabajo en sus respectivas UMA y el apoyo que siempre nos brindaron.

Al colega y amigo Luis Ángel Sigala y a Rodolfo Gómez “Choco” (descanse en paz) por haberme ayudado a contactar con los dueños de las UMA al inicio del doctorado.

A mi comité tutorial por sus aportaciones y enseñanzas.

Al Dr. Isaías Chairez por todo lo que aprendí de él y todo el trabajo de campo que realizó junto conmigo.

Al Dr. Miguel Correa que durante los cuatro años me dirigió y aconsejó en todo el trabajo del laboratorio además de todas sus enseñanzas.

A la Dra. Sonia Gallina, que siempre, a pesar de la distancia estuvo pendiente para ayudarme y aconsejarme.

A la Dra. Verónica Loera, por permitirme y ayudarme a realizar los análisis hormonales en el laboratorio de Farmacogenómica.

A la Dra. Yolanda Herrera, por ayudarme con la identificación de plantas.

A las laboratoristas Margarita Ortega y Neydi Burciaga.

A mis amigos Lucía, Ivonne, Caty, Oli, Nadia, Mony, Claudia, Jeff, Jesús y Miguel.

A todo el resto de mi familia que siempre tuvieron palabras de aliento.

El presente trabajo se realizó en:

Laboratorio de Biología Molecular del CIIDIR-Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

GLOSARIO.....	I
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO I. IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE LOS INDIVIDUOS A PARTIR DE MORFOMETRÍA FECAL.....	2
1.1 Introducción.....	3
1.2 Materiales y métodos.....	5
1.2.1 Área de estudio.....	5
1.2.2 Colecta y medición de grupos fecales.....	5
1.2.3 Extracción de ADN.....	6
1.2.4 Amplificación del marcador del gen SRY.....	7
1.2.5 Análisis estadísticos.....	7
1.3 Resultados.....	9
1.4 Discusión.....	14
1.5 Conclusiones.....	17
1.5 Referencias.....	17
CAPÍTULO II. SEGREGACIÓN POR SEXO Y EDAD EN POBLACIONES DE VIDA LIBRE Y ENCIERRO.....	22

2.1	Introducción.....	23
2.2	Materiales y métodos.....	25
2.2.1	Área de estudio.....	25
2.2.2	Colecta y clasificación de grupos fecales.....	25
2.2.3	Extracción de ADN fecal.....	26
2.2.4	Identificación del sexo de los grupos fecales.....	26
2.2.5	Análisis espacial de segregación.....	27
2.2.6	Variables ambientales.....	28
2.2.7	Análisis estadístico.....	28
2.3	Resultados.....	28
2.4	Discusión.....	33
2.5	Conclusiones.....	36
2.5	Referencias.....	37
CAPÍTULO III. NIVELES HORMONALES ESTEROIDES (CORTISOL, TESTOSTERONA Y ESTRADIOL) EN POBLACIONES DE VIDA LIBRE Y ENCIERRO.....		42
3.1	Introducción.....	43
3.2	Materiales y métodos.....	46
3.2.1	Área de estudio.....	46
3.2.2	Colecta y clasificación de los grupos fecales.....	46
3.2.3	Extracción de ADN fecal.....	47
3.2.4	Identificación de sexo a partir de ADN fecal.....	48
3.2.5	Análisis hormonales.....	49

3.2.6 Muestreo de vegetación y variables ambientales.....	50
3.2.7 Análisis estadístico.....	50
3.3 Resultados.....	50
3.4 Discusión.....	56
3.5 Conclusiones.....	60
3.5 Referencias.....	61
CAPÍTULO IV. VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS POBLACIONES DE LIBRE Y ENCIERRO.....	67
4.1 Introducción.....	68
4.2 Materiales y métodos.....	71
4.2.1 Área de estudio.....	71
4.2.2 Extracción de ADN fecal.....	72
4.2.3 Amplificación y secuenciación del gen mitocondrial cit <i>b</i>	72
4.2.4 Amplificación de marcadores ISSR.....	74
4.3 Resultados.....	78
4.4 Discusión.....	84
4.5 Conclusiones.....	88
4.5 Referencias.....	89
CONCLUSIONES GENERALES.....	96
ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de los grupos fecales de venado cola blanca por edad y sexo colectados en dos poblaciones (UMA) en Durango, México, mediante la amplificación del marcador del gen SRY y morfometría de pellets fecales.	9
Tabla 1.2 Valores medios de variables morfométricas y coeficiente de variación (CV) de pellets fecales de venado cola blanca colectados en dos poblaciones (UMA) en Durango, México, por edad, estación y sexo.....	11
Tabla 1.3. Sexo observado mediante amplificación del marcador del gen SRY en AND fecal contra el sexo predicho generado por funciones de clasificación mediante redes neuronales y lógica fuzzy a partir de morfometría de pellets fecales de venado cola blanca colectados en dos poblaciones (UMA) en Durango, México.....	13
Tabla 2.1. Grupos fecales colectados por época del año en dos poblaciones (UMA) de Durango, México, categorizados por edad mediante volumen de los pellets fecales y sexo mediante amplificación del marcador del gen SRY de ADN fecal.....	29
Tabla 2.2. Relación macho:hembra por edad y estación del año obtenida a partir del volumen de los pellets fecales e identificación de sexo por amplificación del marcador del gen SRY del ADN fecal en dos poblaciones (UMA) de Durango México.....	30
Tabla 2.3. Relación adulto:juvenil:cría por estación del año obtenida a partir del volumen medio de los pellets fecales en dos poblaciones (UMA)de Durango, México.....	30
Tabla 2.4. Valores del coeficiente de segregación sexual espacial y medias de precipitación, temperatura, fotoperiodo y porcentaje de cobertura vegetal en dos poblaciones (UMA) de Durango, México. Coeficiente de correlación no paramétrico entre el grado de segregación sexual espacial con las variables ambientales.....	33
Tabla 3.1. Características ambientales estacionales presentadas en dos UMA en Durango, México.....	52

Tabla 3.2. Matriz de coeficientes de correlación de Pearson entre cortisol, testosterona, estradiol y las variables ambientales en dos poblaciones (UMA) de Durango, México.....	54
Tabla 3.3. Niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca en dos poblaciones (UMA) en Durango, México.	55
Tabla 4.1. Listado de secuencias de Cit <i>b</i> y su identificación de GeneBank utilizados para el análisis de similitud de subespecies y grupo genético al cual fueron designados para el análisis.....	73
Tabla 4.2. Listado de marcadores ISSR utilizados para el análisis de variabilidad genética entre y dentro de poblaciones (UMA) de la Sierra Madre Occidental de Durango, México.....	75
Tabla 4.3. Distancias genéticas pareadas Kimura-2-parametros entre grupos calculadas a partir de secuencias del gen mitocondrial cit <i>b</i>	78
Tabla 4.4. Distancias genéticas pareadas Kimura-2-parámetros dentro de los grupos analizados calculadas a partir de secuencias de gen mitocondrial cit <i>b</i>	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Segregación por edad y sexo de venado cola blanca en UMA Salvador Allende a partir de grupos fecales.....	31
Figura 2.2. Segregación por edad y sexo de venado cola blanca en UMA Molinillos a partir de grupos fecales.....	32
Figura 3.1. Niveles medios por estación de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca de dos poblaciones (UMA) en Durango, México.....	51
Figura 3. 2. Niveles medios de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca de dos poblaciones (UMA) en Durango, México.....	53
Figura 4.1. Fotografías de los loci amplificados a partir de los marcadores ISSR....	77
Figura 4.2. Dendograma de similitud de grupos genéticos a partir de secuencias del gen mitocondrial <i>cit b</i> en subespecies de venado cola blanca.....	81
Figura 4.3. Diagrama del programa STRUCTURE con la probabilidad de correcta asignación de cada individuo a su población de origen.....	82
Figura 4.4. Dendograma de agrupación de los individuos de las poblaciones de vida libre y encierro mediante algoritmo de Ward.....	83

GLOSARIO

Análisis molecular de varianza (AMOVA): método estadístico para probar diferencias genéticas entre grupos o poblaciones que se basa en el análisis de varianza de las frecuencias genotípicas.

Diversidad genética: grado de variación genética en una población, especie o entre un grupo de especies medido en heterocigosidad, diversidad alélica o heredabilidad.

Heterocigosidad: medida de la variación genética de una población respecto a un locus particular. Se define como la frecuencia de heterocigotos para ese locus.

Hormonas esteroides: son aquellas derivadas del colesterol, contienen el mismo anillo de ciclopentanofenantreno y utilizan la misma numeración atómica que el colesterol.

Lógica fuzzy: también llamada lógica difusa es una lógica multivariada que permite representar matemáticamente la incertidumbre y la vaguedad, proporcionando herramientas formales para su tratamiento. Cualquier problema puede resolverse dado un conjunto de variables de entrada (espacio de entrada), obtener un valor adecuado de variables de salida (espacio de salida).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): método utilizado para realizar copias de segmentos específicos de ADN, donde el ADN es desnaturalizado por aumento de temperatura, se añaden regiones flanqueantes u oligonucleótidos y la secuencia es copiada por medio de una enzima termoestable (Taq).

Redes neuronales: son un modelo matemático formadas por elementos que se comportan de manera análoga a las neuronas (en las funciones más elementales) y están organizadas de una forma similar a la del cerebro. Funcionan mediante procesamiento de señales, análisis de datos y reconocimiento de patrones. Y sirven para desarrollar aplicaciones, construir modelos y proponer y validar modelos.

Segregación: uso diferencial del hábitat por cada sexo. Los individuos de cada sexo utilizan diferentes hábitat excepto en la época reproductiva.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
ANOVA	Análisis de Varianza
mM	milimolar
ng	nanogramo
pM	picomolar
μL	microlitro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
UMA	Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre

RESUMEN

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es una de las especies de fauna silvestre más importantes en México debido a su amplia distribución y a la actividad cinegética. Las poblaciones de venado cola blanca presentes en la Sierra Madre Occidental, de Durango, han sido poco estudiadas comparadas con poblaciones presentes en otras áreas del país. Recientemente, algunos productores han cercado sus predios con la intención de reproducir o realizar actividad cinegética del venado de manera más intensiva. Se cree que el encierro podría afectar el comportamiento, niveles de estrés y estructura genética de las poblaciones de venado. Por ello se planteó, un análisis de la morfometría de grupos fecales para identificación del sexo de los individuos, estudiar la segregación, los niveles hormonales y la estructura genética en una población de vida libre (Salvador Allende) y en encierro (Molinillos). Mediante funciones de clasificación por redes neuronales y lógica fuzzy se predijo el sexo de los individuos a partir de las características morfométricas de los pellets fecales en un 94.4% y 86.9%, respectivamente. Respecto al grado de segregación espacial, ambas poblaciones presentaron el nivel más alto en el verano y el nivel más bajo se presentó en invierno en Salvador Allende y en otoño para Molinillos. Los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces se incrementaron conforme las estaciones avanzaron al invierno y el fotoperiodo se disminuyó. El nivel medio de cortisol en heces fue mayor en Salvador Allende que en Molinillos. Respecto a los niveles de cortisol entre sexos, se observó que las hembras tuvieron niveles más altos que los machos. Mediante la amplificación de marcadores ISSR de ADN fecal se obtuvo la heterocigosidad calculada bajo la suposición de equilibrio de Hardy-Weinberg de 0.1553 para la UMA Salvador Allende y 0.1858 para Molinillos. El % de loci polimórficos fue 85.71% para Salvador Allende y 97.95%. La distancia genética pareada de Nei (1972) entre ambas poblaciones fue de 0.75%. Mediante métodos bayesianos (Δk) se mostró que el valor de k más probable fue $k = 2$, que correspondieron a cada una de las poblaciones. El encierro de las poblaciones de venado cola blanca no siempre es indicativo de modificaciones en el comportamiento, niveles de estrés, reproducción y estructura genética, siempre y cuando se lleve un monitoreo y manejo adecuado de las poblaciones.

ABSTRACT

The white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) is one of the most important wildlife species in Mexico due to its wide distribution and for hunting activity. Populations of white-tailed deer occurring in the Sierra Madre Occidental, of Durango, have been less studied compared to the populations present in other areas of the country. Recently, producers have fenced areas to intensify the reproduction or harvesting of white-tailed deer. It is believed that confinement could affect the behaviour, stress levels and genetic structure of populations. Then, the analysis of the morphometry of the faecal groups for the identification of the sex of the individuals, the study of the segregation, hormonal levels and the genetic structure in a free-living population and one in a confinement (Molinillos) were analyzed. The functions of classification by neural networks and fuzzy logic predicted the sex of individuals from faecal pellet morphometry in 94.4% and 86.9%, respectively. Regarding the degree of spatial segregation, the highest level of segregation occur in summer, and lowest levels were observed in winter for Salvador Allende and autumn for Molinillos. The levels of faecal cortisol, testosterone and estradiol increased as the seasons advanced to winter and the photoperiod decreased. The mean level of faecal cortisol was higher in Salvador Allende than in Molinillos. Higher levels of faecal cortisol were observed in females than males. By amplification of ISSR markers of faecal DNA, and the assumption of Hardy-Weinberg equilibrium, heterozygosity calculated was 0.1553 for Salvador Allende and 0.1858 for Molinillos. The % polymorphic loci was 85.71% for Salvador Allende and 97.95%. Nei (1972) pairwise genetic distance between populations was 0.75%. Using bayesian methods (Δk), it was shown that the most probable k value was $k = 2$, which corresponded to each population. The confinement of white-tailed deer populations is not always indicative of changes in behaviour, stress levels, reproduction and genetic structure, as long as adequate monitoring and management of the populations is carried out.

INTRODUCCION GENERAL

El venado cola blanca es una especie de cérvido nativo del continente americano con gran valor cultural y ecológico. Gracias a la actividad cinegética y ecoturismo, los productores en zonas rurales han diversificado la producción animal a la explotación de especies silvestres, aumentando sus ingresos. Por otro lado, para poblaciones indígenas o rurales, el venado cola blanca es de importancia cultural y es fuente de proteína animal. Para poder realizar aprovechamiento de esta especie silvestre se tiene que hacer mediante el establecimiento de una Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA). Para el establecimiento de una UMA es necesario la elaboración de un plan de manejo, que es un documento que especifica el estado actual de las poblaciones, su hábitat, el tipo de aprovechamiento a realizar, la planeación de ese aprovechamiento y estrategias de conservación. El plan de manejo entonces debería integrar información acerca del comportamiento, la reproducción y estado genético. En la Sierra Madre Occidental de Durango, crece el interés de la instalación, mejoramiento y acondicionamiento de UMAs para aprovechamiento de venado cola blanca. Un ejemplo de ello es la aplicación de malla venadera como cercado para intensificar el manejo de las poblaciones. Sin embargo esas poblaciones han sido poco estudiadas desde el punto de vista ecológico, hormonal y genético, sin tomar en cuenta la diferenciación entre las poblaciones en encierro y vida libre. Otro aspecto importante a considerar bajo el esquema de conservación de las especies, es el muestreo y manejo de las poblaciones, por lo que actualmente se busca obtener datos de los individuos sin tener que contenerlos químicamente o manipularlos. Un tipo de muestreo no invasivo es el uso de las heces fecales, de las cuales se puede obtener desde la composición de la dieta, metabolitos hormonales o ADN. En este trabajo se analizó la morfometría de los pellets fecales para la identificación del sexo de los individuos. Después, se estudió la segregación por edad y sexo en cada población a partir de la ubicación y presencia de los grupos fecales en campo. Por otro lado, se compararon las hormonas esteroides cortisol, testosterona y estradiol en heces por sexo y tipo de población. Finalmente, se analizó la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, así como su separación genética con otras poblaciones de venado en el país a nivel de ADN mitocondrial.

CAPITULO I: IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE LOS INDIVIDUOS A PARTIR DE MORFOMETRÍA DE PELLETS FECALES

1.1 INTRODUCCIÓN

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es una de las especies de fauna silvestre más importantes en México debido al número de animales que son cazados anualmente (Clemente et al. 2015). Las regulaciones establecidas por el gobierno para el aprovechamiento de venado cola blanca en México permiten la cacería diferenciada entre hembras y machos, teniendo preferencia por los machos (Riley, 2003; Lindsay y Belant, 2007). Es necesario obtener información acerca del número de hembras y machos presentes en un área para poder facilitar la aplicación de las leyes de aprovechamiento, reducir cacería ilegal y estimar tasas de aprovechamiento más precisas (Lindsay y Belant, 2007). La determinación del sexo en poblaciones silvestres es importante para entender su estructura y dinámica de población, así como su uso de hábitat, comportamiento y sistema de apareamiento (Shaw et al. 2003; Morden et al. 2011). Anteriormente, las heces fecales han sido utilizadas como índices de abundancia animal (Kobelkowsky et al. 2001; Lounsberry et al. 2015), como estimaciones de su densidad poblacional (Mandujano y Gallina 2004, Beltrán-Vera y Díaz 2010, Piña y Trejo 2014) como fuente de identificación de animales (Brinkman et al. 2010), como medio para determinación de dieta (Homolka et al. 2008, Granados et al. 2014), infestación parasitaria (Myers et al. 2015), y metabolitos hormonales (McCoy y Ditchkoff, 2012, López-Cobá y Montes-Pérez, 2016), para mediciones de estrés fisiológico y funciones reproductivas.

En las heces fecales, se encuentran células epiteliales que se desprenden de la mucosa intestinal, de las cuales se puede aislar ADN, y de esta manera es posible genotipificar a los individuos (Huber et al. 2002; 2003; Tolleson et al. 2005). Dado que las heces pueden ser fácilmente colectadas sin perturbar a los animales, el uso de ADN fecal se ha vuelto una herramienta cada vez más utilizada en estudios de comportamiento, ecología y manejo de fauna (Huber et al. 2003). La determinación del sexo a partir del ADN extraído de heces en especies de fauna silvestre viviendo en libertad se vuelve entonces un opción práctica (Yamauchi et al. 2000; Han et al. 2009) mediante la amplificación por PCR de fragmentos específicos de ADN asociados con un cromosoma sexual, como lo es el gen SRY (Yamauchi et al. 2000; Bryja y Konečný,

2003, Han et al. 2009). El gen SRY produce un factor de transcripción de alta movilidad, el cual reconoce las secuencias específicas de ADN y se adhiere a él. Este proceso inicia con la diferenciación embrionaria de testículos. Entonces, es un gen exclusivo de los machos y está presente en una sola copia en la región no recombinante del cromosoma Y en la mayoría de los mamíferos (Bryja y Konečný, 2003). Algunos métodos no moleculares para la identificación de sexo en campo utilizadas para varias especies de cérvidos son difíciles de llevar a cabo y no son del todo confiables, por ejemplo, la observación directa de la región genital (Morden et al. 2011), los niveles hormonales en sangre y la morfología pélvica. Esas técnicas no siempre se pueden llevar a cabo en poblaciones de vida libre (Shaw et al. 2003), dado que los animales necesitan ser capturados, lo cual puede ser problemático y dañino (Han et al. 2003). Por esas razones, métodos de monitoreo no invasivo como la extracción de ADN fecal o morfometría de pellets fecales se vuelven una herramienta segura que ofrece información confiable (Morden et al. 2011).

La información obtenida a partir de los grupos fecales puede ser utilizada para estimar los parámetros ecológicos en mamíferos y puede ser una gran herramienta para los investigadores, sobre todo si la información sobre sexo y edad de los animales puede ser obtenida a partir de las heces (Sánchez-Rojas et al. 2004). Existen varios estudios donde pudieron identificar la edad utilizando la morfometría de los pellets fecales en venado cola blanca (Ezcurra y Gallina, 1981), reno (*Rangifer tarandus platyrhynchis*) (Morden et al. 2011) y berrendo (*Antilocapra americana sonoriensis*) (Woodruff et al. 2016). Además, se pudo identificar el sexo también con morfometría fecal en alces (*Alces alces*) (MacCracken y Van Ballenbergue, 1987) y venado bura (*Odocoileus hemionus*) (Sánchez-Rojas et al. 2004). Poder determinar la edad y sexo de los individuos de poblaciones de venados a partir del tamaño y forma de los pellets fecales tiene implicaciones de manejo y conservación importantes, sobre todo para aquellas especies que son difíciles de rastrear y observar (Sánchez-Rojas et al. 2004).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue generar funciones de clasificación mediante redes neuronales y lógica fuzzy para predecir el sexo de los animales a partir de la morfometría fecal en venado cola blanca. Para ello, se contrastaron los

resultados obtenidos de la identificación de sexo mediante amplificación del marcador del gen SRY para obtener el porcentaje de clasificación correcta.

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1. Área de estudio

Se colectaron grupos fecales de venado cola blanca en dos Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) (Salvador Allende y Molinillos). Ambas UMA se encuentran ubicadas en el municipio de Durango, Durango, México. Salvador Allende se encuentra localizado en las coordenadas 24° 71' - 24° 05' N y 104° 51' 104° 56' O y cuenta con una elevación de 2200-2680 m, su área es de 3,200 ha. Esta UMA tiene un clima templado semifrío, y templado semihúmedo (Martínez y Martínez, 2010). Los principales tipos de vegetación son bosque de pino-encino, bosque de pino y bosque de encino (González et al. 2007). La UMA Molinillos se encuentra localizada en las coordenadas 23° 36'-23° 39' N y 104° 59' y 105° 06' O con una elevación de 2000 a 2680 msnm y su área es de 300 ha. Esta UMA tiene un clima templado semihúmedo y templado semifrío. El principal tipo de vegetación es bosque de pino, bosque de pino encino, bosque de encino pino, bosque de encino y pastizal (Rosales y Villanueva, 2014).

1.2.2 Colecta y medición de grupos fecales

Los grupos fecales fueron colectados cada dos semanas por 12 meses en cada UMA. Para Salvador Allende el periodo de muestreo abarcó del 1 de marzo 2015 al 31 marzo 2016, y para la UMA Molinillos fue del 1 Octubre 2015 al 31 de Octubre 2016. El periodo de muestreo cubrió las cuatro estaciones del año: primavera (21 marzo- 21 junio), verano (22 junio-22 septiembre), otoño (23 de septiembre-21 de diciembre) e invierno (22 diciembre- 20 marzo). En muestreos previos al periodo de muestreo se identificaron las áreas con mayor actividad de venado cola blanca para cada UMA mediante la técnica de conteo de grupos fecales. Mediante mapas se ubicaron dos transectos de 1000 m para recorrer en cada visita. Se colectaron grupos fecales frescos caracterizados por su suavidad y la humedad del moco exterior que presentan.

Para identificar los grupos fecales frescos de otros más antiguos, evitamos muestrear en días cuando hubo lluvia o llovió el día anterior. Se colocaron 20-30 pellets fecales superiores en tubos Falcon® (Corning Life Sciences® C352070) con etanol al 96%, los otros pellets fueron colocados en bolsas plásticas para su posterior congelación. Los grupos fecales fueron identificados con nombre de la UMA, fecha y geolocalización. Los pellets fecales mantenidos en bolsas plásticas fueron medidos antes de colocarse en a -20°C . Con un vernier digital, se midió el ancho (A = ancho máximo del pellet), largo (L =largo máximo del pellet), radio ($R=A/2$), Volumen ($V=\pi R^2L$) y la proporción largo/ ancho (L/A). A partir de la media del volumen se asignó una categoría de edad a los grupos fecales: 0-290 mm^3 fueron crías, 291 a 605 mm^3 juveniles y de 606 mm^3 en adelante adultos (Harding 1949, Ezcurra y Gallina, 1981).

1.2.3. Extracción de ADN

Se aisló ADN a partir de dos a cuatro pellets preservados en etanol al 96%. Los pellets se dejaron secar durante 45 min a temperatura ambiente en cajas Petri estériles. Ya secos, se disgregaron los pellets y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se añadió 1 ml de buffer de extracción (2% CTAB, 100 mM TRIS, pH 8, 20 mM EDTA, pH 8, 1.4 NaCl y 1% PVP) y 5 μL de 2-mercaptoetanol por tubo. Los tubos se agitaron en vórtex a 3,400 rpm por 10 segundos y se colocaron en digestión por una hora a 65°C . Pasada la hora, se agregaron 50 μL de Proteinasa K y se colocaron en digestión una hora más a 65°C . Los tubos se centrifugaron a 13,200 rpm durante 15 minutos para separar la parte sólida de las muestras. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y de nuevo se centrifugaron 15 min a 13,200 rpm para quitar impurezas solidas que hayan permanecido. El nuevo sobrenadante se transfirió a nuevos tubos y se agregaron 400 μL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitaron en vórtex a 3,400 rpm por 10 seg y se centrifugaron por 6 min a 13,200 rpm. Se separó el sobrenadante en nuevos tubos y se agregaron 300 μL de acetato de amonio (3M, pH 5.2) y 600 μL de isopropanol. Los tubos se colocaron a -20°C por 12 horas. Se centrifugaron los tubos a 13,200 rpm por 15 minutos, el sobrenadante fue descartado dejando una pastilla de ADN en el fondo del tubo. La pastilla se lavó agregando 500 μL de etanol al 80%, agitación en vórtex a 3,400 rpm por 10 seg y centrifugación por a

13,200 rpm por 6 min. El lavado se realizó dos veces. Se descartó el alcohol de los tubos, ya secos (sin trazas de alcohol) el ADN fue rehidratado con 55 μ L de agua grado biología molecular (Cellgro Corning® 46000). Se obtuvo la pureza y cantidad de ADN en $\text{ng}/\mu\text{L}$ mediante espectrofotómetro Nanodrop®2000. La integridad del ADN fue observada en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio.

1.2.4. Amplificación del marcador del gen SRY

Se amplificó un fragmento del gen SRY mediante el set de primers SRY f: CAT CTT GTC TGT GTG TCG TG y SRY r: CGG GTA GTG TCG TTT GTC TA (Lounsberry *et al.* 2015). Se utilizaron muestras de tejido de machos obtenidas de la UMA Salvador Allende como control positivo. La concentración final para PCR fue 100-150 $\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN, 2.5 mM de MgCl_2 , 0.5 mM de dNTP's, 0.6 pM de cada primer y 0.750 unidades de Taq DNA polimerasa. El perfil térmico de PCR fue 15 min a 95°C de desnaturalización inicial, 35 ciclos de 30 seg a 94°C, 1.30 min a 58°C y 1 min a 72°C, y finalmente 10 min a 72°C de elongación final. Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. En cada gel se añadió marcador de peso molecular y controles positivo y negativo (agua). Los resultados fueron corroborados ya que las muestras que no amplificaron se realizaron por duplicado desde la extracción. Entonces las muestras que no mostraron amplificación se tomaron como hembras y las muestras que mostraron amplificación (banda ~200 pb) se tomaron como machos. Las muestras que mostraron bandas difusas no fueron incluidas en el estudio. Algunas identificaciones de sexo mediante método molecular fueron corroboradas con registros de observaciones de campo.

1.2.5. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño experimental factorial, donde los factores fueron la edad, la estación y el sexo, para todas las variables morfométricas ($\alpha=0.05$) usando el procedimiento PROC GLM en el programa SAS 9.2 (SAS Institute, Cary, N.C.). Los casos donde se obtuvieron diferencias significativas en las variables morfométricas entre sexos se utilizaron para la realización de las funciones de clasificación.

Se realizó un análisis de redes neuronales para clasificar los grupos fecales de acuerdo a un sexo en base a sus medidas morfométricas. Una red neuronal es una técnica precisa para clasificaciones dado que es capaz de almacenar patrones e información repetida para dar una solución o clasificación (Chairez et al. 2008). El análisis incluyó una capa oculta y N_h neuronas, bajo el siguiente modelo:

$$Y_k = f_k \left(\alpha_k + \sum_{j \rightarrow k} w_{jk} f_j \left(\alpha_j + \sum_{i \rightarrow j} w_{ij} x_i \right) \right)$$

Donde Y_k es la variable dependiente (Y_k ; 1= macho, 0=hembra), x_i son los valores de las variables morfométricas. Los pesos w_{ij} y w_{jk} y la constante a_j y a_k fueron estimadas utilizando el algoritmo de propagación hacia atrás. La función de activación fue sigmoïdal y la capa interna y de salida:

$$f(x) = \frac{e^x}{1+e^x}$$

El análisis de redes neuronales se realizó en el programa SPSS 18 (SPSS, Chicago, Illinois).

Para clasificar los grupos mediante lógica fuzzy, se encontraron primero los valores de pertenencia para cada variable morfométrica los cuales son los valores medios que mejor diferencian a las hembras de los machos en todas las variables morfométricas. Entonces se codificaron a una escala binaria donde 1 representa característica de macho y 0 de hembra. Cada combinación lógica de los valores de las variables independientes es representada en una tabla de verdad. Cuando la tabla es construida, cada línea es asignada a un tipo de respuesta, 1 o 0 ya sea el caso, basados sobre la calificación que obtuvo esa muestra en los valores de pertenencia. El análisis de lógica fuzzy se llevó a cabo en el programa fsQCA (Ragin et al. 2006). Los resultados de ambos análisis de clasificación fueron comparados con los resultados de identificación de sexo mediante amplificación de marcador de gen SRY para obtener un porcentaje de correcta clasificación.

1.3 RESULTADOS

Se aisló ADN fecal de 398 muestras de heces fecales frescas colectadas para ambas UMA. Mediante la amplificación del marcador del gen SRY, 385 grupos fecales fueron asignados a un sexo, logrando un 96.7% de éxito en el análisis de PCR. Mediante la media de volumen de cada grupo fecal, se asignaron 31 grupos fecales como crías, 241 como juveniles y 113 como adultos, a su vez; 219 grupos fecales se asignaron como hembras y 166 como machos (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Clasificación de los grupos fecales de venado cola blanca por edad y sexo colectados en dos poblaciones (UMA) en Durango, México, mediante la amplificación del marcador del gen SRY y morfometría de pellets fecales.

Estación	Crías		Juveniles		Adultos		Total
	F	M	F	M	F	M	
Primavera	11	3	37	18	12	11	92
Verano	2	1	14	21	2	9	49
Otoño	4	4	53	36	23	33	153
Invierno	5	1	39	23	18	5	91
Total	22	9	143	98	55	58	385

Con el ANOVA, se pudieron observar diferencias entre edades en largo, ancho, radio y volumen ($P < 0.0001$). Se encontraron diferencias entre estaciones del año, en otoño y verano se presentaron los valores más altos de ancho y radio, en comparación de invierno y primavera ($F_{3, 1148} = 3.8787$, $P < 0.009$, $F_{3, 1148} = 3.8787$, $P < 0.0099$, respectivamente). La proporción largo/ancho tuvo valores más altos en invierno y primavera que en otoño y verano ($F_{3, 1148} = 3.99$, $P < 0.0088$). En las interacciones, solo se encontraron diferencias entre sexo en ancho, radio ($F_{6, 67} = 33.9$, $P = 0.013$) y largo/ancho ($F_{6, 67} = 33.95$, $P = 0.01111$) en muestras pertenecientes a adultos en el

invierno. Entonces, se utilizaron los datos de los 23 grupos fecales colectados en el invierno para realizar las funciones de clasificación.

La variable ancho mostró el menor coeficiente de variación y el volumen presentó el valor más alto. Conforme la edad se incrementó, el coeficiente de variación en los valores de las variables morfométricas también incrementaron (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Valores medios de variables morfométricas y coeficiente de variación (CV) de los pellets fecales de venado cola blanca colectados en dos poblaciones (UMA) en Durango, México, por edad, estación y sexo. (Vol. =volumen, L/A=proporción largo/ ancho).

Edad	Estación	Sexo	Variables									
			Ancho (mm)	CV (%)	Largo (mm)	CV (%)	Radio (mm)	CV (%)	Vol. (mm ³)	CV (%)	L / A	CV (%)
Crías	Primavera	H	5.79	10.36	9.42	10.83	2.89	10.38	249.40	21.01	1.65	15.76
		M	5.75	4.52	10.04	7.07	2.87	4.53	261.41	11.73	1.75	7.43
	Verano	H	6.33	3.00	9.33	6.22	3.17	3.15	294.14	9.37	1.47	6.12
		M	5.80	5.52	9.61	12.07	2.90	5.52	252.12	9.24	1.67	16.17
	Otoño	H	5.66	8.30	9.11	11.53	2.83	8.13	230.21	18.73	1.62	14.81
		M	5.65	4.25	9.22	10.20	2.82	4.26	232.53	15.80	1.63	9.20
	Invierno	H	5.79	6.22	9.43	15.38	2.90	6.21	250.94	21.87	1.63	14.11
		M	6.30	3.17	9.47	20.17	3.15	3.17	293.90	17.05	1.51	22.52
Juveniles	Primavera	H	6.86	9.18	11.64	14.78	3.43	9.04	434.29	24.71	1.71	16.96
		M	6.77	10.04	12.21	11.88	3.39	10.03	445.66	24.42	1.82	15.93
	Verano	H	6.99	10.16	11.62	14.72	3.50	10.29	446.45	20.53	1.69	21.89
		M	7.13	8.27	11.36	12.76	3.56	8.15	458.74	22.93	1.60	13.13
	Otoño	H	7.10	9.01	11.57	15.21	3.55	9.01	460.56	22.67	1.64	18.29
		M	7.06	8.92	11.66	13.98	3.53	9.07	459.53	22.03	1.67	16.17

	Invierno	H	6.86	8.75	12.16	16.94	3.43	8.75	452.34	23.08	1.79	19.55
		M	7.01	8.56	12.37	13.82	3.50	8.57	479.53	20.32	1.78	17.42
Adults	Primavera	H	8.11	5.43	13.53	9.16	4.06	5.42	702.30	15.61	1.67	10.18
		M	8.23	16.16	14.35	15.40	4.11	16.06	809.45	58.92	1.76	14.20
	Verano	H	9.17	16.36	13.53	11.38	4.58	16.38	896.21	29.44	1.53	23.53
		M	8.92	8.86	13.49	14.46	4.46	8.97	856.51	27.48	1.52	14.47
	Otoño	H	8.46	12.29	14.09	13.13	4.23	12.29	803.95	30.13	1.69	16.57
		M	8.45	11.60	13.51	14.51	4.22	11.61	760.85	25.86	1.63	20.86
	Invierno	H	7.81	8.96	14.65	10.58	3.91	8.95	708.05	21.31	1.89	14.29
		H	8.32	8.29	13.74	13.83	4.16	8.17	744.18	16.22	1.67	17.37

Para el análisis de redes neuronales se probaron modelos de 2 a 40 redes neuronales en la capa oculta, y el modelo que tuvo 22 neuronas mostró el menor porcentaje de error. Con esta función de clasificación se predijo el sexo de los individuos a partir de sus características morfométricas en un 94.4% de precisión, ya que se asignó correctamente cuatro de los 5 grupos fecales de machos y la totalidad de los grupos pertenecientes a hembras. Por otro lado, a través del análisis por lógica fuzzy, se obtuvo una tasa de correcta clasificación de 86.9% al clasificar cuatro de los cinco machos como machos y 16 de 18 grupos fecales de las hembras como hembras (Tabla 1.3). Los valores de pertenencia para convertir las variables reales a un código binario fueron ancho ≥ 8.2 mm = 1 (macho), largo ≥ 15.2 mm = 0 (hembra), radio ≥ 4.1 mm = 1 (macho), Volumen ≥ 730 mm³ = 1 (macho) y largo/ancho ≥ 1.8 = 0 (hembra).

Tabla 1.3. Sexo observado mediante amplificación del marcador del gen SRY en ADN fecal contra el sexo predicho generado por funciones de clasificación mediante redes neuronales y lógica fuzzy a partir de morfometría de pellets fecales de venado cola blanca colectados en dos poblaciones (UMA) en Durango, México.

Sexo Observado	Redes neuronales			Lógica Fuzzy		
	Sexo predicho		Clasificación correcta (%)	Sexo predicho		Clasificación correcta (%)
	M	H		M	H	
Macho	4	1	80.0	4	1	80.0
Hembra	0	18	100.0	2	16	88.8
General			94.4			86.9

1.4 DISCUSIÓN

En este estudio, la clasificación de sexo a partir de la morfometría de los pellets fecales fue exitosa solamente con los grupos fecales colectados en invierno pertenecientes a adultos. Las funciones de clasificación fueron capaces de clasificar correctamente un alto porcentaje de las muestras, utilizando la información de las características morfométricas de los pellets. Sin embargo, la clasificación mediante redes neuronales fue más precisa que la clasificación mediante lógica de fuzzy. En una clasificación llevada a cabo por Sánchez-Rojas et al. (2004) con heces de venado bura mediante análisis discriminante por pasos y variables morfométricas, los machos adultos fueron asignados a su sexo en un 100% de precisión y las hembras en un 91.66%. Ese mismo estudio, al utilizar lógica de fuzzy, clasificaron el 100% de los grupos fecales de machos a su sexo de pertenencia y el 75% de los grupos de hembras. MacCracken y Van Ballenberghe (1987) identificaron exitosamente el sexo de alces mediante sus grupos fecales en 92% para machos y 91% para hembras usando un análisis discriminante por pasos.

Las variables que más contribuyeron a la diferenciación entre los grupos fecales de hembras y machos en el invierno para la función de clasificación por redes neuronales fueron ancho, radio, largo, largo/ancho y volumen. Para el análisis por lógica fuzzy, las variables más importantes para determinar el sexo fueron ancho y largo/ancho. MacCracken y Van Ballenberghe (1987) identificaron y clasificaron el sexo de alces a partir de las variables volumen y ancho₁ y ancho₂. Por su parte, Sánchez-Rojas *et al.* (2004) encontró que las mejores variables para clasificar el sexo en venado bura fueron ancho y volumen. Morden et al. (2011) clasificaron el sexo a partir de grupos fecales de renos con la combinación de variables ancho y largo.

En este estudio se encontraron diferencias entre hembras y machos en las variables ancho, radio y relación largo/ancho en grupos fecales de adultos colectados en invierno. Así mismo, Sánchez-Rojas et al. (2004) encontraron diferencias entre edades y sexo solamente en ancho y volumen en pellets fecales de venado bura en todas las estaciones que muestrearon. El método de morfometría fecal se basa en la suposición de que las

medidas de los pellets dependen de la talla corporal del individuo, y esto a su vez, de la edad y el sexo (Camargo-Sanabria y Mandujano, 2009). MacCracken y Van Ballenberghe (1987) sugirieron que la técnica de morfometría de pellets fecales funciona mejor en especies que exhiben un fuerte dimorfismo sexual. El venado cola blanca es una especie dimórfica, este dimorfismo se vuelve más evidente en el invierno cuando se presenta la época reproductiva y la producción de testosterona se incrementa (Clemente et al. 2005), los machos tienen las astas bien desarrolladas, los cuellos ensanchados, y acumulan grasa corporal para mantenerse durante la época de apareamiento (Dostaler et al. 2011); Galindo-Leal y Weber, 1998). Sánchez-Rojas et al. (2004) atribuyó el éxito de la clasificación de los grupos fecales de venado bura a un sexo por el alto grado de dimorfismo sexual que presenta la especie. Camargo-Sanabria y Mandujano (2009) sugirieron que la técnica de morfometría fecal no fue aplicable en su estudio porque el venado cola blanca presente en las áreas tropicales de México presenta menos dimorfismo sexual, además no consideraron las estaciones del año y no hicieron separación por edades.

Por otro lado, los cambios estacionales en la vegetación están muy bien reconocidos en el Norte América. En México, en verano o época de lluvias, la vegetación disponible se vuelve más abundante y a su vez la calidad es mejor. Mientras que en la época seca o invierno, el número de especies para forrajear se disminuye y la calidad de las plantas es menor (Dostaler et al. 2011). Por su parte, Barboza y Bowyer (2000) mencionaron que existe un incremento en el volumen del tracto digestivo en hembras venado cola blanca asociado con los cambios estacionales de la vegetación, afectando el tamaño de sus pellets fecales. Sin embargo, la morfología del tracto digestivo no cambia en machos, por lo que esto puede generar la poca diferenciación de los pellets entre sexos en la época de lluvias o verano. Los cambios en la vegetación se reflejan directamente en la tasa de defecación y el tamaño de los pellets fecales (Tolleson et al. 2005; Clemente et al. 2005; Ball 2010). Álvarez (1994) encontró diferencias en la morfología de los pellets en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y venado gamo (*Dama dama*) según la estación del año que fueron colectados los pellets. Morden et al. (2011) encontraron esas diferencias estaciones comparando las dimensiones de los pellets fecales de renos. Camargo-Sanabria y

Mandujano (2009) comentaron que los pellets fecales en el verano pueden ser más largos y presentan más variación en la morfometría debido al cambio en la dieta resultado del cambio en la vegetación. En este estudio, los venados adultos en el verano tuvieron mayor volumen y ancho (Tabla 1.2). Con respecto a los coeficientes de variación, todas las variables morfométricas tuvieron un coeficiente entre 9 y 35% (Tabla 1.2), por su parte, Sánchez-Rojas et al. (2004) tuvieron coeficientes de variación de 5 a 23%. Esto indica que la varianza es pequeña a mediana entre los grupos de individuos. Además se observó en este estudio que conforme la edad se incrementó el coeficiente de variación. La variable morfométrica con mayor coeficiente de variación fue el volumen, así también lo encontró Sánchez-Rojas et al. (2004).

Respecto a los grupos de edad, el promedio de las variables morfométricas siempre fue más alto en adultos que para las otras edades. Esto concuerda con lo encontrado por MacCracken and Van Ballenberghe (1987) para alce, Camargo-Sanabria y Mandujano (2009) para venado cola blanca, Morden et al. (2011) para reno y Woodruff et al. (2016) en berrendo sonoreense. Sánchez-Rojas et al. (2004) encontraron en venado bura, que los pellets fecales pertenecientes a los juveniles fueron más redondeados, en otras palabras, la proporción largo/ancho fue menor que adultos, sin encontrar diferencias significativas. En este trabajo se encontró que conforme la edad aumentó, la proporción largo/ancho se disminuyó, volviéndose más redondos, sobre todo en machos (Tabla 1.2). Por otro lado, el uso de ADN fecal para la identificación de sexo de los individuos es una técnica confiable y de muestreo no invasivo que sin perturbar a los individuos se puede obtener tal información, siendo de gran importancia para el manejo de fauna silvestre (Shaw et al. 2003; Lindsay y Belant, 2007). En este trabajo se utilizaron un set de primers para amplificar el marcador del gen SRY e identificar el sexo de los individuos a partir del ADN fecal, en otros estudios, se han utilizado dos o más genes (Yamauchi et al. 2000; Huber et al. 2002; Shaw et al. 2003; Lindsay and Belant, 2007). Dado que el gen SRY es exclusivo de machos, se genera la información necesaria a partir de la amplificación de un solo par de primers, volviendo a la técnica más económica. Lindsay y Belant (2007) observaron en venado cola blanca que la amplificación de solo este gen en ADN fecal, pudieron ser identificados los individuos sin problemas. La carencia de producto de PCR

para este marcador no es entonces una reacción fallida, sino la ausencia del cromosoma Y (Huber et al. 2002).

1.5 CONCLUSIONES

La metodología de clasificación de sexos a partir de morfometría de pellets fecales para el monitoreo de venado cola blanca y otros ungulados se vuelve una herramienta más útil e informativa cuando se puede obtener la información del sexo incluso en campo. Esta técnica es muy útil en especies de vida silvestre, los cuales son difíciles de observar o cuando la captura y manipulación no es una opción. Conocer el sexo de los individuos que producen los grupos fecales que se colectan para otros estudios genera mayor información para el monitorio de las dinámicas de la población y su estructura, además que el uso de esta metodología no es perjudicial para los individuos. Basados en estos resultados, los grupos fecales colectados en invierno son los mejores para la realización de la identificación de sexo de los individuos mediante las funciones de clasificación por morfometría de pellets fecales.

1.6 REFERENCIAS

Alvarez, G. 1994. Morphological variability and identification of deer pellets in central Spain. *Folia Zoologica* 43, 25-37.

Ball, M. C. 2010. Faecal pellet size can be used to differentiate age-classes in caribou: implications for non-invasive genetic studies. *Conservation Genetic Resources* 2:239-241.

Barboza, P. S., y Bowyer, R. T. 2000. Sexual segregation in dimorphic deer: a new gastrocentric hypothesis. *Journal of Mammalogy* 81, 473-489.

Beltrán-Vera, C., y Díaz, A. Estimación de la densidad poblacional del venado cola blanca texano (*Odocoileus virginianus texanus*) introducido en la UMA "Ejido de Amanalco" Estado de México. *Ciencia Ergo Sum* 17(2):154-158.

- Brinkman, T. J., Person, D. K., Schwartz, M. K., Pilgrim, K. L., Colson, K. E., y Hundertmark, K. J. 2010. Individual identification of Sitka black deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. *Conservation Genetic Resources* 2, 115-188.
- Bryja, J., y Konečný, A. 2003. Fast sex identification in wild mammals using PCR amplification of Sry gene. *Folia Zoologica* 52, 269-274.
- Camargo-Sanabria, A. A., y Mandujano, S. 2009. Evaluación de la morfometría de pellets como método de categorización de sexos y edades en venado cola blanca (*Odocoileus virginianus mexicanus*) en Puebla, México. *Revista Mexicana de Mastozoología*. 13, 92-104.
- Chairez, I., Gurrola, J.N., García, C., y Echavarría, F. 2008. Grasshopper density population classification with neural networks. *Biophysical Reviews and Letters* 3, 275-283.
- Clemente, F., Riquelme, E., Mendoza, G., Bárcena, R., González, S., y Ricalde, R. 2005. Digestibility of forage diets of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*, Hays) using different ruminal fluid inocula. *Journal of Applied Animal Research* 27, 71-76.
- Clemente, F., Cessa, V., Cortez, C., Tarango, L., y Arenas, P. 2015. Commercial extenders and freezing curves for the preservation of sperm cells of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Applied Animal Research*. 43, 468-473.
- Dostaler, S., Quillet, J., Therrien, J., y Côte, S. 2011. Are feeding preferences of white-tailed deer related to plant constituents? *Journal of Wildlife Management* 75, 913-918.
- Ezcurra, E., y Gallina, S. 1981. Biology and population dynamics of white-tailed deer in Northwestern Mexico. En P. F. Pfolliot, y S. Gallina, editores. *Deer biology, habitat requirements, and management in western North America*. Pp 77-108. Instituto de Ecología. A.C., Ciudad de México, México.
- Galindo-Leal, C., y Weber, M. 1998. El venado de la Sierra Madre Occidental, ecología, manejo y conservación. EDICUSA-CONABIO, Ciudad de México, México.

González, M., González, M., y Márquez, M. 2007. Vegetación y ecorregiones de Durango. Plaza y Valdez, Ciudad de México, México.

Granados, D., Tarango, A. Olmos, G., Palacio, J., Clemente, F., y Mendoza, G. 2014. Dieta y disponibilidad de forraje de venado cola blanca *Odocoileus virginianus thomasi* (Artiodactyla:Cervidae) en un campo experimental de Campeche, México. Revista Biología Tropical 62(2): 699-710.

Han, S. H., Lee, S. S., Cho, I. C., Oh, M. Y., y Oh, H. S. 2009. Species identification and sex determination of Korean water deer (*Hydropotes inermis argyropus*) by duplex PCR. Journal of Applied Animal Research 35, 61-66.

Harding, J. P. 1949. The use of probability paper for the graphical analysis of polymodal frequency distributions. Journal of Marine Biological Association 28: 141-152.

Homolka, M., Heroldová, M., and Bartoš, L. 2008. White-tailed deer invierno feeding strategy in area shared with other deer species. Folia Zoologica 57, 283-293.

Huber, S., Bruns, U., y Arnold, W. 2002. Sex determination of red deer using Polymerase Chain Reaction of DNA from feces. Wildlife Society Bulletin 30, 208-212.

Huber, S., Bruns, U., y Arnold, W. 2003. Genotyping herbivore feces facilitating their further analyses. Wildlife Society Bulletin 31, 92-697.

Kobelkowsky-Sosa, R., Palacio, J., Clemente, F., Mendoza, G., Herrera, J., y Gallegos, J. 2001. Calidad del hábitat y estado poblacional del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*, Hays) en ranchos cinegéticos de la Sierra Fría, Aguascalientes. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 6, 125-130.

Lindsay, A. R., y Belant, J. 2007. A simple and improved PCR based technique for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) sex identification. Conservation genetics. Technical note. Primaveraer. DOI 10.1007/s10592-007-9326-y.

López-Cobá, E. H., y Montes-Pérez, R. C. 2016. Valoración de metabolitos de testosterona, progesterona y estrógenos en excretas de venado cola blanca (*Odocoileus*

virginianus) como método para determinar el sexo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87:180-186.

Lounsberry, Z. T., Forrester, T. D., Olegario, M. T., Brazeal, J. L., Wittmer, H. U., y Sacks, B. N. 2015. Estimating sex-specific abundance in fawning areas of high-density Columbian black-tailed deer using fecal DNA. *Journal of Wildlife Management* 79, 39-49.

MacCracken, J. G., y Van Ballenberghe, V. 1987. Age and sex-related differences in fecal pellet dimensions of moose. *Journal of Wildlife Management* 51, 360-364.

Mandujano, S., y Gallina, S. 2004. Dinámica poblacional del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en un bosque tropical seco. Pp. 317-330. En: V. Sánchez y R. A., Medellín, (Eds). *Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa*. Instituto de Biología e Instituto de Ecología, UNAM, México.

Martínez, J. H., y Martínez, L. 2010. 'Propuesta para el ordenamiento ecológico territorial del ejido Presidente Salvador Allende, municipio de Durango'. (SEMARNAT, Durango, Mexico).

McCoy, J. C., y Ditchkoff, S. S. 2012. Patterns of fecal hormones in a fenced population of white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin* 36, 641-646.

Morden, C. J. C., Weladji, R. B., Ropstad, E., Dahl, E., y Holand, Ø. 2011. Use of faecal pellet size to differentiate age classes in female Svalbard reindeer *Rangifer tarandus platyrhynchus*. *Wildlife Biology* 17, 441-448.

Myers, W. L., Foreyt, W. J., Talcott, P. A., Evermann, J. F., and Chang, W. 2015. Serologic, trace element, and fecal parasite survey of free-ranging, female mule deer (*Odocoileus hemionus*) in eastern Washington, USA. *Journal of Wildlife Diseases* 51, 125-136.

Piña, E. y Trejo, I. 2014. Densidad poblacional y caracterización del hábitat de venado cola blanca en un bosque templado de Oaxaca, México. *Acta Zoológica Mexicana* 30(1): 114-134.

- Ragin, C. C., Drass, K. A., y Davey, S. 2006. 'Fuzzy-Set/Qualitative Comparative Analysis 2.0'. (Department of Sociology, University of Arizona, Tucson, Arizona.)
- Riley, S., Decker, D., Enck, J., Curtis, P., Lauber, T., y T. Brown. 2003. Deer populations up, hunter populations down: Implications of interdependence of deer and hunter population dynamics on management. *Ecoscience*. 10, 455–461.
- Rosales, S., y Villanueva, J. 2014. Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en bosques de *Pinus duranguensis* Martínez en el municipio de Durango. In 'Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en cinco bosques de coníferas'. (Comp. M. R. Pérez) pp. 83-110. SAGARPA, INIFAP, CENID, COMEF, Mexico.
- Sánchez-Rojas, G., Gallina, S., y Equihua, M. 2004. Pellet morphometry as a tool to distinguish age and sex in the mule deer. *Zoo Biology* 23, 139-146.
- Shaw, C. N., Wilson, P. J., y White, B. N. 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. *Journal of Mammalogy* 84, 123-128.
- Tolleson, D. R., Randel, R. D., Stuth, J. W., y Neuendorff, D. A. 2005. Determination of sex and species in red and fallow deer by near infrared reflectance spectroscopy of the faeces. *Small Ruminant Research* 57, 141-150.
- Woodruff, S. P., Johnson, T. R., y Waits, L. P. 2016. Examining the use of fecal pellet morphometry to differentiate age classes in Sonoran pronghorn. *Wildlife Biology* 22, 217-227.
- Yamauchi, K., Hamasaki, S. I., Miyazaki, K., Kikusiu, T., Takeuchi, Y., y Mori, Y. 2000. Sex determination base on fecal DNA analysis of amelogenin gene in sika deer (*Cervus nippon*). *The Journal of Veterinary Medical Science* 62, 669-671.

**CAPITULO II. SEGREGACION POR SEXO Y EDAD EN POBLACIONES DE VIDA
LIBRE Y ENCIERRO.**

2.1 INTRODUCCIÓN

El venado cola blanca es una especie de gran importancia económica y ecológica en México (Villarreal, 1999, Clemente et al. 2015). El manejo de especies silvestres de interés económico requiere del análisis sobre el estado de la población, tendencias demográficas, la colecta de datos como la edad y sexo (que nos indica la natalidad y mortalidad en estudios de monitoreo) para mejorar la producción animal así como la cosecha o cacería sustentable (Janermo et al. 2017). La información acerca del número de hembras y machos que habitan en un área también sirve para facilitar el cumplimiento de las leyes aplicables para el manejo de fauna, reducir la caza furtiva, estimar tasas de aprovechamiento más precisas, aplicar prácticas de manejo localizado y estimar adecuadamente las densidades de población (Lindsay y Belant, 2007; Peterson et al. 2017). Datos confiables sobre las poblaciones son un requisito para el manejo exitoso de las poblaciones de ungulados y, los movimientos de segregación de los animales podrían sesgar las estimaciones de densidad de población y tendencias demográficas. Documentar el comportamiento de segregación e identificar los factores que influyen en éste son importantes para proveer el entendimiento de la ecología básica de las especies y para generar información crítica para la conservación y manejo de las especies (Diefenbach et al. 2008; Lutz et al. 2015; Lutz et al. 2016).

La segregación sexual se define como el uso exclusivo por machos y hembras de diferentes áreas a determinadas escalas espaciales y temporales, es común entre los rumiantes polígamos y particularmente en cérvidos con dimorfismo sexual (Kie y Bowyer, 1999). Este fenómeno puede ser explicado como el patrón en el que machos y hembras utilizan diferentes recursos o realizan actividades en grupos del mismo sexo o edad por un periodo de tiempo (De la Cruz, 2017). Tales diferencias en el uso del área y recursos, pueden causar importantes diferencias en forrajeo y otras formas de comportamiento, así como en la capacidad de sobrevivencia de los sexos. También los factores ambientales podrían influir en la segregación, particularmente en ungulados (Conradt, 1998). Numerosas ideas han surgido para explicar la segregación sexual en especies de rumiantes sexualmente dimórficas (Barboza y Bower, 2000). Existen varias hipótesis causantes de la segregación sexual y de edades: 1) dimorfismo sexual- tamaño corporal,

2) estrategia reproductiva, 3) hipótesis de los factores sociales y 4) Hipótesis sobre la conducta del forrajeo o presupuesto energético (De la Cruz, 2017). Barboza y Bower (2000) agruparon las hipótesis de la segregación en dos grupos: riesgos de depredación y diferencia en la talla corporal. Por otro lado, Sánchez-Rojas et al. (2002) comentan que la hipótesis más invocada para explicar esta segregación es la estrategia reproductiva. El grado de segregación sexual varía entre las diferentes poblaciones de la misma especie y entre especie (Conradt, 1999). Además, las diferentes hipótesis que explican la segregación así como los factores que la pueden provocar no excluyen a los demás, por lo que existe un gran número de posibles causas de la segregación sexual que deben ser estudiadas para el manejo de las poblaciones.

Históricamente el estudio y análisis de dispersión y movimientos en ungulados mediante radiotelemetría, implica la captura o contención química, y manipulación de los individuos. Esta situación podría poner en riesgo a los individuos y a las personas que los manipulan, además de que podría causar sesgos en la obtención de datos de otras investigaciones debido al estrés provocado por la manipulación (Huber et al. 2003). Los grupos fecales de cérvidos han sido utilizados como índices de abundancia animal (Kobelkowsky-Sosa et al. 2001; Lounsberry et al. 2015) y estimaciones de densidad (Mandujano y Gallina, 2004, Vega, 2011), fuente de identificación de animales (Brinkman et al. 2010), como medio para determinar la dieta (Homolka et al. 2008) y metabolitos hormonales (McCoy y Ditchkoff 2012). Dado que las heces pueden ser fácilmente recolectadas sin causar daños o disturbios a los individuos, y se pueden obtener muchas muestras, el uso de esta técnica para obtener información se torna una herramienta importante en estudios de comportamiento, ecología y manejo de las poblaciones manteniendo el esquema de conservación y sustentabilidad (Huber et al. 2003). Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la segregación estacional por sexo y edad en dos poblaciones de venado cola blanca tanto en vida libre como en encierro a partir de los grupos fecales.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Área de estudio

Se colectaron grupos fecales de venado cola blanca en dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) localizadas en el municipio de Durango, Durango, México. La población en vida libre se ubica en la UMA Salvador Allende. Esta UMA está localizada entre las coordenadas 24° 71' – 24° 05' N y 104° 51'- 104° 56' O, a una elevación de 2200-2680 msnm. Esta UMA tiene un área de 3200 ha, y un clima templado semifrío y templado semihúmedo. La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 2.52 venados/km² (Vega et al. 2016). Los principales tipos de vegetación son bosque de encino-pino, pino-encino y bosque de encino (González et al. 2007). En la UMA Molinillos se encuentra una población de venado cola blanca en 300 ha de encierro. La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 4.58 venados/km² (Vega et al. 2016). Esta UMA se localiza en las coordenadas 23° 36'- 23° 39' N y 104° 59'- 105°06' O a una elevación de 2000 a 2680 msnm. El clima en esta UMA es templado semifrío y templado subhúmedo. Los principales tipos de vegetación son bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque de encino pino y pastizal (Rosales y Villanueva, 2014).

2.2.2. Colecta y clasificación de los grupos fecales

Se colectaron grupos fecales cada dos semanas por 13 meses en cada UMA. El periodo de muestreo cubrió las cuatro estaciones del año. En Salvador Allende, el periodo de muestreo ocurrió del 1 Marzo 2015 al 31 de Marzo 2016 y en Molinillos del 1 Octubre 2015 al 31 Octubre 2016. Se establecieron las áreas de más actividad de venado mediante conteo de grupos fecales realizado en muestreos previos. Se colectaron grupos fecales frescos de 0 a 24 horas después de haber sido depositados, estos grupos se caracterizan por la suavidad y la humedad del moco exterior que presentan los pellets. De la parte superior del grupo fecal, se colectaron alrededor de 20-30 pellets en tubos Falcon® de 50 ml con etanol al 96%. La otra parte de los pellets se colectó en bolsas plásticas y se pusieron en congelación a -20°C. Los grupos fecales fueron identificados por UMA, fecha y geolocalización. Se midió el largo y ancho de los pellets designados a congelación y se calculó el volumen de los pellets. A partir de la media de volumen de cada grupo fecal, estos fueron asignados a una categoría de edad: hasta a 290 mm³

fueron considerados crías, 291 a 605 mm³ como juveniles y 606 mm³ o más como adultos (Harding, 1949, Ezcurra y Gallina, 1981, Kobelkowsky-Sosa et al. 2001).

2.2.3 Extracción de ADN fecal

Se aisló ADN de dos a cuatro pellets fecales (dependiendo del tamaño del pellet) mantenidos en etanol al 96%. Se dejaron secar los pellets por 45 min a temperatura ambiente en cajas Petri esterilizadas. Ya secas, se colocaron 0.5 g de muestra en microtubos de 1.5 ml y se agregó 1 ml de buffer de extracción (2% CTAB, 100 mM TRIS, pH 8, 20 mM EDTA, pH 8, 1.4 M NaCl y 1% de PVP) y 5 µL de 2-mercaptoetanol, por tubo. Los tubos se agitaron mediante vórtex por 10 s a 3,400 rpm y se colocaron en digestión por hora a 65°C. Después de esa hora, se agregó 50 µL de Proteinasa K a los tubos y se dejaron una hora más a 65°C. Se centrifugaron los tubos por 15 min a 13,200 rpm para separar la fase sólida y se transfirió el sobrenadante a nuevos microtubos estériles y se centrifugaron por 15 min a 13200 rpm. El sobrenadante se transfirió a nuevos microtubos estériles y se agregó 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Después, los tubos se agitaron mediante vórtex por 10 seg a 3400 rpm y se centrifugaron por 6 min a 13200. Se separó la fase superior y se transfirió a nuevos microtubos y se agregó 300 µL de acetato de amonio (3M, pH 5.2) y 600 µL de alcohol isopropílico. Se dejaron los tubos a -20°C durante toda la noche. Después se centrifugaron los tubos por 15 min a 13200 rpm. Se desechó el sobrenadante y se dejó la pastilla de ADN en la parte inferior del tubo. Se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 80% y centrifugación por 6 min a 13200 rpm, este paso se realizó en dos ocasiones. Finalmente se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente. El ADN fue rehidratado con 55 µL de agua grado biología molecular. Se calculó la pureza y cantidad del ADN mediante espectrofotómetro Nanodrop® 2000. La integridad del ADN se observó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

2.2.4 Identificación de sexo en los grupos fecales

Para determinar el sexo de los animales que depositaron los grupos fecales colectados, se amplificó el fragmento del gen SRY con el par de oligonucleótidos SRY forward: CAT CTT GTC TGT GTG TCG TG y SRY reverse: CGG GTA GTG TCG TTT GTC TA (Lounsberry et al. 2015) mediante PCR. Se utilizaron tres muestras de tejido proveniente

de tres machos adultos cazados en Salvador Allende durante la época de caza presente durante el periodo de muestreo como controles positivos. Las concentraciones finales por reacción de PCR fueron 100-150 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ DNA, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM dNTP's, 0.6 pM primers y 0.750 unidades de Taq ADN polimerasa. El perfil térmico que se utilizó fue 15 min a 95°C de desnaturalización inicial, 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 1.30 min a 58 °C y 1 min a 72 °C, y finalmente, 10 min a 72 °C de elongación final. En cada reacción de PCR llevada a cabo, se incluyó una muestra de ADN de tejido como control positivo y agua como control negativo. Se observaron los productos de PCR en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En cada gel se agregó el marcador de peso molecular, los controles positivo y negativo. Las muestras que no mostraron amplificación fueron repetidas en todo el proceso. Entonces, las muestras que no mostraron amplificación en los geles fueron tomadas como hembras y las muestras que mostraron amplificación (banda de ~200 pb) fueron asignadas como machos. Las muestras que mostraron bandas difusas no se tomaron en cuenta para el estudio. Algunas identificaciones de sexo mediante método molecular fueron corroboradas con los registros de los animales que pudieron ser observados en campo.

2.2.5 Análisis espacial de segregación

Se estimó el grado de segregación espacial por estación del año mediante la fórmula propuesta por Conradt (1998):

$$CSSE = \sqrt{\left(1 - \frac{N-1}{X \cdot Y} \cdot \sum_{i=1}^k \frac{x_i y_i}{n_i - 1}\right)}$$

Donde:

CSSE: Coeficiente de Segregación Sexual Espacial (0=no hay segregación, 1=segregación completa)

X= Número total de machos observados

Y= Número total de hembras observadas

N= Número total de animales observados (X+Y)

x_i = Número de machos en *ith* tipo de hábitat/cuadrante espacial

y_i = Número de hembras en *ith* tipo de hábitat/cuadrante espacial

n_i = Número de animales en *ith* tipo de hábitat/cuadrante espacial (X_i+Y_i)

k = Número de tipos de hábitats/cuadrantes espaciales

Por otro lado, los datos espacio-temporales tomados de los grupos fecales así como su identificación de edad y sexo fueron ubicados en mapas realizados con QGIS 2.18 (QGIS, 2018).

2.2.6 Variables ambientales

Para obtener información acerca de la cobertura vegetal de los estratos arbustivo-herbáceo se llevaron a cabo líneas Canfield para cada estación del año. Las líneas tuvieron longitud de 20 m en cursos aleatorios de 2 m. Información de temperatura diaria, precipitación diaria, fotoperiodo (horas luz al día) fueron proporcionados por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

2.2.7 Análisis estadístico

Para conocer la existencia de relación entre el grado de segregación sexual espacial y las variables ambientales se realizó un análisis de correlación no paramétrico mediante el programa estadístico SAS versión 9.0. (SAS Institute, Cary, N.C.).

2.3 RESULTADOS

Se colectaron 351 grupos fecales frescos para ambas UMA en todas las épocas del año. En Salvador Allende se colectó un menor número de grupos fecales (105) comparado con la UMA Molinillos (246). En ambas UMA se encontró el menor número de grupos fecales en verano, mientras que el mayor número se encontró en invierno en Salvador Allende y en otoño en Molinillos. La época con el segundo mayor número de heces fue primavera en ambas UMA (Tabla 2.1). En general se encontraron más heces pertenecientes a hembras en ambas UMA para todas las edades y épocas a excepción

del verano en Molinillos y en otoño para crías en Salvador Allende y otoño adultos en Molinillos (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Grupos fecales colectados por época del año en dos UMA de Durango, México, categorizados por edad mediante volumen de los pellets fecales y sexo mediante amplificación del marcador del gen SRY de ADN fecal (H= hembras, M= macho).

Estación	Salvador Allende							Molinillos						
	Crías		Juveniles		Adultos		Total	Crías		Juveniles		Adultos		Total
	H	M	H	M	H	M		H	M	H	M	H	M	
Primavera	3	1	18	6	3	2	33	3	1	18	7	13	10	52
Verano	0	0	2	4	2	1	9	1	3	4	6	0	4	18
Otoño	0	1	11	6	3	2	23	1	1	19	15	43	46	125
Invierno	0	0	17	9	11	3	40	0	0	8	4	25	14	51
Total	4	2	47	25	19	8	105	5	5	49	32	81	74	246

La proporción macho: hembra fue mayor en Salvador Allende, es decir que hubo un mayor número de hembras por macho. En invierno existió un mayor número de hembras por macho en ambas UMA, mientras que en el verano se observó el efecto contrario (Tabla 2.2). Respecto a la edad, en Salvador Allende, se observó mayor presencia de juveniles que de adultos y en Molinillos predominaron los grupos fecales de adultos. La mayor proporción de grupos fecales de juveniles se observó en primavera en Salvador Allende y en verano en Molinillos (Tabla 2.3).

Tabla 2.2. Relación macho: hembra por edad y estación del año obtenida a partir del volumen de los pellets fecales e identificación de sexo por amplificación del marcador del gen SRY del ADN fecal en dos UMA de Durango México.

Estación	Salvador Allende			Molinillos		
	Crías	Juveniles	Adultos	Crías	Juveniles	Adultos
Primavera	1: 3	1: 3.00	1: 1.15	1: 3.00	1: 2.57	1: 1.13
Verano	-	1: 0.50	1: 2.00	1: 1.30	1: 0.66	1: 0.00
Otoño	1: 0	1: 1.83	1: 1.15	1: 1.00	1: 1.26	1: 0.93
Invierno	-	1: 1.88	1: 3.66	-	1: 2.00	1: 1.78

Tabla 2.3. Relación adulto:juvenil:cría por estación del año obtenida a partir del volumen medio de los pellets fecales en dos UMA de Durango, México.

Estación	Salvador Allende	Molinillos
Primavera	1: 4.80: 0.80	1: 1.08: 0.17
Verano	1: 2.00: 0.00	1: 2.50: 1.00
Otoño	1: 3.40: 0.20	1: 0.38: 0.02
Invierno	1: 1.85: 0.00	1: 0.30: 0.00

En Salvador Allende, en primavera, los grupos fecales se encontraron cercanos. En verano, se observó el menor número de grupos fecales, la mayoría de machos. Se observó que en otoño aumentó el número de grupos fecales de ambos sexos y edades (sin contar crías) y continuó hasta el invierno, donde hubo el mayor número de grupos fecales de juveniles y adultos (Figura 2.1).

En Molinillos, en el verano se presentó el menor número de grupos fecales, siendo además, de machos principalmente. En otoño es cuando se observó la mayor cantidad de grupos fecales, de juveniles y adultos, formando dos grupos (Figura 2.2). Estos grupos se mantuvieron hasta el invierno aunque con menores valores.

Respecto al grado de segregación espacial, ambas UMA presentaron el nivel más alto en el verano. El nivel más bajo de segregación espacial se presentó en invierno en Salvador Allende y en otoño para Molinillos. Sin embargo, la segregación espacial en general fue menor en Molinillos para todas las estaciones (Tabla 2.4). No se encontró alguna correlación significativa entre el grado de segregación espacial y las variables ambientales para ambas UMA (Tabla 2.4).

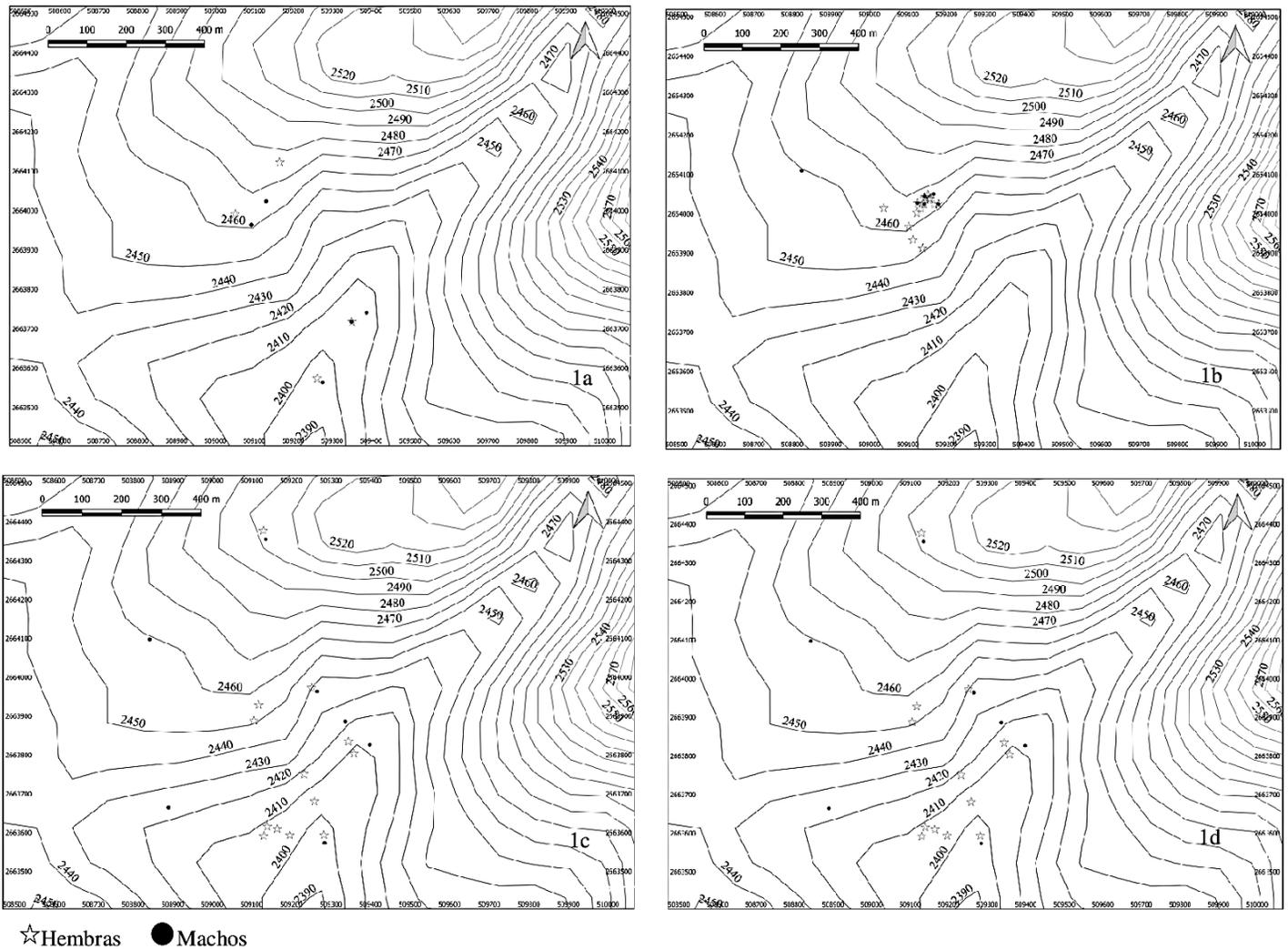


Figura 2.1. Segregación por edad y sexo de venado cola blanca en UMA Salvador Allende a partir de grupos fecales en primavera (1.a), verano (1.b), otoño (1.c) e invierno (1.d).

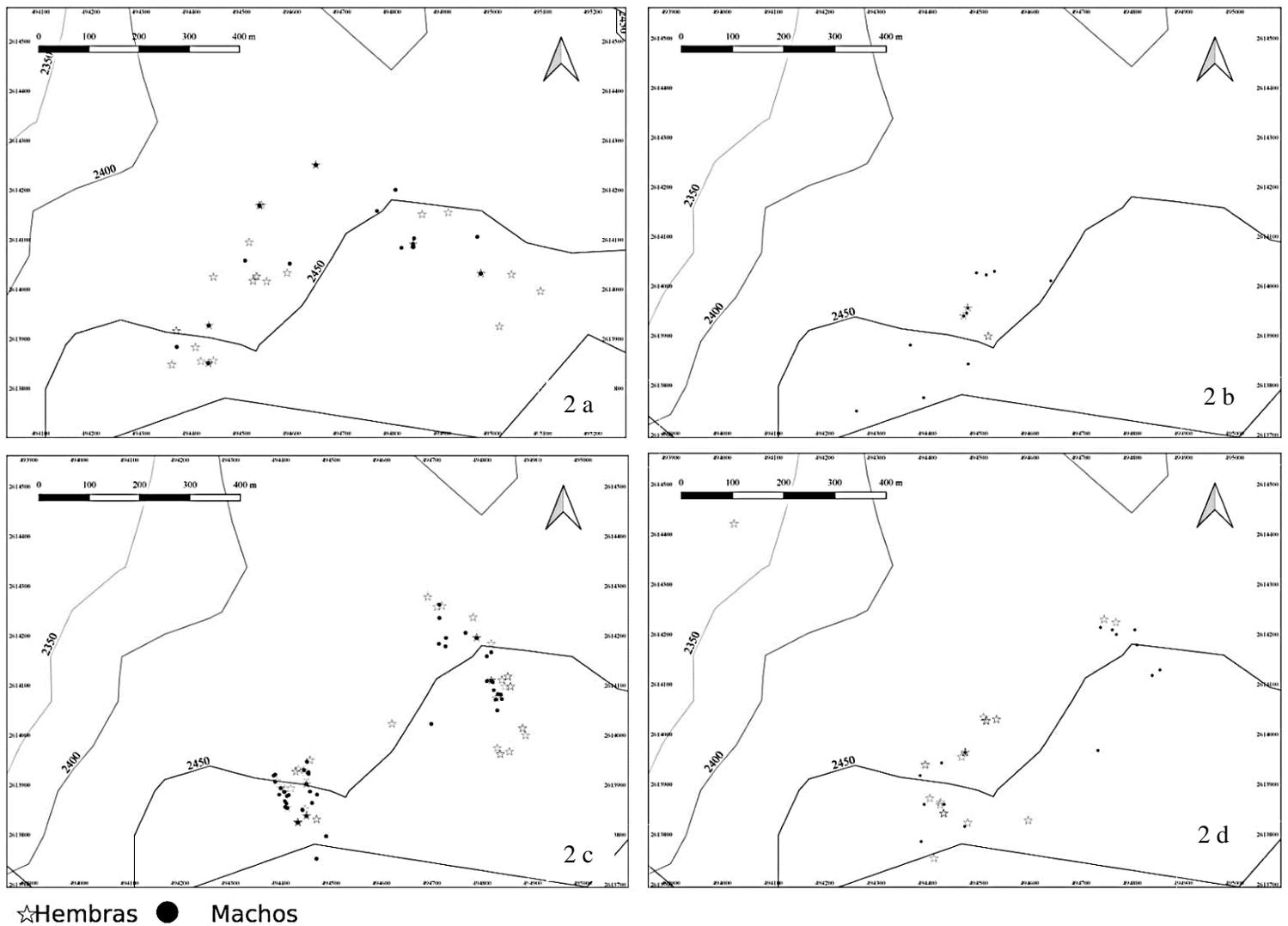


Figura 2.2. Segregación por edad y sexo de venado cola blanca en UMA Molinillos a partir de grupos fecales en primavera (2.a), verano (2.b), otoño (2.c) e invierno (2.d).

Tabla 2.4. Valores del coeficiente de segregación sexual espacial y medias de precipitación, temperatura, fotoperiodo (horas luz al día) y porcentaje de cobertura vegetal en dos UMA de Durango, México, y coeficiente de correlación no paramétrico entre el grado de segregación sexual espacial con las variables ambientales.

UMA/Estación	Grado de segregación	Precipitación	Temperatura	Fotoperiodo	Cobertura
Salvador Allende					
Primavera	0.386	2.6	9.2	13.31	36.5
Verano	0.910	13.8	11.2	12.95	75.2
Otoño	0.454	0.0	4.0	11.15	66.5
Invierno	0.339	0.0	2.7	11.09	57.4
Correlación	-	0.1054	0.4000	0.2000	0.6000
<i>p</i>	-	0.8946	0.6000	0.8000	0.4000
Molinillos					
Primavera	0.282	1.1	2.9	12.92	57.8
Verano	0.943	8.9	11.3	12.99	85.8
Otoño	0.130	0.3	4.8	11.28	54.4
Invierno	0.250	0.0	0.3	11.15	51.9
Correlación	-	0.8000	0.4000	0.8000	0.8000
<i>p</i>	-	0.2000	0.6000	0.2000	0.2000

2. 4 DISCUSIÓN

En Molinillos se encontró mayor número de grupos fecales frescos que en Salvador Allende, esto pudo deberse a que en Molinillos el área de movimiento tiene un límite por el cercado y los animales tienen un ámbito hogareño restringido, por lo que los grupos fecales son más probables de ser encontrados y ocasiona que el grado de segregación se disminuya. Cabe mencionar que en la UMA Salvador Allende es permitida la cacería, esto podría provocar la baja presencia de grupos fecales pertenecientes a machos adultos. Tomando en cuenta que la cacería provocó una menor cantidad de machos en esta UMA, la relación en el número de hembras por

macho se incrementó (Tabla 2.3). Según Karns et al. (2011), la presión de la cacería y los vehículos también pueden hacer que se muevan los animales con mayor frecuencia, aunque este efecto no es observado en Molinillos. Por su parte Kie y Bowyer (1999) documentaron en su estudio con venado cola blanca, que la depredación puede afectar la segregación de los individuos dependiendo del sexo. Sin embargo, esos factores no fueron estrictamente medidos en este estudio ya que no hay depredación en ambas UMA.

La separación espacial de sexos fuera de la época de apareamiento está presente en casi todos los rumiantes polígamos (Pérez-Solano et al. 2016). El grado de variación espacio-temporal durante la segregación de esas especies es muy variable. Se cree que indirectamente o de manera variable, la competencia entre los sexos es la causante de la segregación. Esta hipótesis incluye la idea del tamaño corporal, proponiendo que las hembras competitivamente excluyen a los machos de algunos sitios con mejor calidad de alimentos y protección (Barboza y Bowyer, 2000). Se ha propuesto que en ciervo rojo, los machos son menos tolerantes que las hembras a sitios con poca biomasa (Kie y Bowyer, 1999). Otra causa de segregación puede ser la estructura del paisaje, o el ambiente y la variación ambiental puede afectar la dispersión (Long et al. 2005). Brinkman et al. (2005) explican que en respuesta a las severas condiciones del clima, los venados podrían minimizar el movimiento para conservar energía. Así también, Conradt (1999) y Rosenberry et al. (2000) comentan que la cantidad de cobertura vegetal puede provocar la segregación en cérvidos. Long et al. (2005) señalan que existió una correlación entre la distancia de movimiento y dispersión de venado cola blanca y la cobertura forestal. Por su parte, para venado bura (*Odocoileus hemionus*) en el Desierto Chihuahuense, Pérez-Solano et al. (2016) mencionan que el tipo de la vegetación de un sitio afecta la densidad de venado en un área, y De la Cruz (2017) encontró mayor presencia de grupos fecales en transectos con mayor presencia de vegetación, y asociación con ciertas características de la vegetación y el sexo obtenido de los grupos fecales.

Sin embargo, Peterson et al. (2017) no encontraron relación entre la segregación y cobertura vegetal. Brinkman et al. (2005) y Lutz et al. (2016) no encontraron

diferencias entre distancias recorridas o elección de un ámbito hogareño para venado cola blanca entre un sitio con alta cobertura forestal y un ecosistema completamente agrícola. Long et al. (2005) mencionan que el venado cola blanca es una especie generalista por lo que se mueven con similitud en sitios con poca o alta cobertura forestal. Esto podría explicar que no exista correlación entre el grado de segregación espacial y las condiciones ambientales.

A partir de esto, se asume que la segregación y movimientos realizados por los animales fue causa de estrategia reproductiva. Esta hipótesis asume en ungulados que antes de la época reproductiva los machos hacen uso del hábitat y sus recursos de manera que incrementen su masa corporal y acceda a más hembras en la época reproductiva, y a su vez, las hembras preñadas aseguren la sobrevivencia de sus crías, buscando sitios con menor riesgo a la depredación, por lo que harán uso de los recursos de diferente manera para cumplir ese objetivo (Sánchez-Rojas et al. 2002).

Los eventos de dispersión del venado cola blanca usualmente inician durante dos periodos: en época reproductiva (otoño e invierno) y en época de nacimientos de los cervatos (entre primavera y verano) (Lutz et al. 2015). Entonces, la baja presencia de grupos fecales, principalmente de hembras, en ambas UMA, y el alto grado de segregación espacial en el verano, coincide con la época de pariciones. Durante la época de partos, las hembras preñadas buscan aislamiento y muestran comportamiento violento hacia otros venados, incluyendo familiares (Lutz et al. 2016). Las hembras de venado cola blanca muestran patrones de comportamiento complejos durante la preñez y la crianza de los cervatos, probablemente el tipo de áreas utilizadas por las hembras se modifica, así como el forrajeo y las estrategias para evitar a los depredadores buscando áreas con cierta cobertura vegetal (Soto-Werschitz et al. 2018). Así también, Long et al. (2005) y Kolodzinski et al. (2010) observaron que en verano, las hembras se dispersaron dada la época de pariciones.

El aumento de grupos fecales encontrados y el bajo nivel de segregación espacial en otoño para Molinillos e invierno para Salvador Allende, puede ser indicativo de la época reproductiva. Conforme el estro se acerca, las hembras se concentran en el movimiento y marcas de olor dentro de las áreas de mayor actividad, lo cual puede

incrementar la oportunidad de los machos de detectar a las hembras enfocándose a las actividades dentro de un área pequeña (Karns et al. 2011, Peterson et al. 2017). Con base en estos resultados, la época reproductiva se podría estar presentando a finales de otoño en Molinillos, mientras que en Salvador Allende se extiende al invierno. Esto puede ser explicado por la edad de los individuos, ya que en Salvador Allende hay menos proporción de adultos. Se ha observado que hembras de un año y medio de edad y hasta hembras de 6 meses pueden entrar en celo mucho después que las hembras adultas (Karns et al. 2011). Probablemente los individuos se reúnen para la reproducción de manera tardía, consecuencia de un estro retrasado. Hembras jóvenes exhiben celos tardíos y pueden provocar que se extienda la época reproductiva y pueden explicar parcialmente porque los machos buscan las hembras en invierno para aumentar las oportunidades de reproducirse (Lutz et al. 2016).

Se observó en este estudio una mayor proporción de juveniles poco antes de entrar a la época de apareamiento. La mayor proporción de juveniles se observó en otoño en Salvador Allende y en verano en Molinillos (Tabla 4). Esto concuerda con Janermo et al. (2017) al observar que el inicio de la época reproductiva, la proporción de machos adultos fue baja, pero incrementó continuamente y alcanzó un nivel alto teniendo un pico sobre la época reproductiva, después decreció. Dado que los machos y las hembras se segregan fuera de la época reproductiva y los machos migran estacionalmente, los machos naturalmente llegan a las áreas de reproducción después y a veces varía (Karns et al. 2011).

2.5 CONCLUSIONES

En general, los movimientos de segregación sexual y de edad ocurren en la época de pariciones y época reproductiva, regidos por una estrategia reproductiva. Por lo anterior es importante estudiar y registrar estos movimientos ya que son indicativo del inicio y término de cada una de estas épocas.

Sin embargo, hay que tomar en cuenta que existen muchos factores que pueden provocar la segregación y desplazamiento de los individuos. El seguimiento y registro

de esos movimientos proveen información acerca de sus causas para realizar actividades de manejo en las poblaciones.

Hay que considerar esas variaciones en los patrones de segregación de cada sexo y edad en cada época del año ya que puede afectar los resultados de estimaciones de población mediante técnica de conteo de grupos fecales. Se recomienda realizar las estimaciones de población tanto en verano como en invierno, además, se requiere más información sobre factores que provoquen la segregación de los individuos para el manejo adecuado de las poblaciones.

2.6 REFERENCIAS

Barboza, P. S. y Bowyer, R. T. 2000. Sexual segregation in dimorphic deer: a new gastrocentric hypothesis. *Journal of Mammalogy*, 81(2): 473-489.

Brinkman, T. J., Deperno, C. S., Jenks, J. A., Harlodson, B. S., y Osborn, R. G. 2005. Movement of female white tailed deer effects of climate and intense row crop agriculture. *Journal of Wildlife Management*, 69(3):1099-1111.

Brinkman, T. J., Person, D. K., Schwartz, M. K., Pilgrim, K. L., Colson, K. E., y Hundertmark, K. J. (2010). Individual identification of Sitka black deer (*Odocoileus hemionus sitkensis*) using DNA from fecal pellets. *Conservation Genetic Resources*, 2: 115-188.

Clemente, F., Cessa, V., Cortez, C., Tarango, L., y Arenas, P. 2015. Commercial extenders and freezing curves for the preservation of sperm cells of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Applied Animal Research*, 43(4): 468-473.

Conradt, L. 1998. Mesasuring the degree of sexual segregation in group-living animals. *Journal of Animal Ecology*, 67: 217-226.

Conradt, L. 1999. Social segregation is not a consequence of habitat segregation in red deer and feral soay sheep. *Animal Behavior*, 57: 1151-1157.

De la Cruz, N. P. 2017. Estudio de la segregación sexual del venado bura en la reserva de la biosfera de Mapimí, evaluando sus consecuencias ecológicas. Tesis Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, 64 p.

Diefenbach, D. R., Long, E. S., Rosenberry, C. S., Wallingford, B. D., y Smith, D. R. 2008. Modeling distribution of dispersal distances in male white tailed deer. *Journal of Wildlife Management*, 72(6): 1296-1303.

Ezcurra, E., y Gallina, S. 1981. Biology and population dynamics of white-tailed deer in Northwestern Mexico. Pp. 78-108. En: P. F. Pfolliot y S. Gallina (Eds). *Deer biology, habitat requirements, and management in western North America*. Instituto de Ecología. A.C., Ciudad de México, México.

González, M., González, M., y Márquez, M. 2007. *Vegetación y ecorregiones de Durango*. Plaza y Valdez. Ciudad de México, México, 220 p.

Harding, J. P. (1949). The use of probability paper for the graphical analysis of polymodal frequency distributions. *Journal of Marine Biological Association* 28: 141-152.

Homolka, M., Heroldová, M., y Bartoš, L. 2008. White-tailed deer winter feeding strategy in area shared with other deer species. *Folia Zoologica*, 57: 283-293.

Huber, S., Bruns, U., y Arnold, W. 2003. Genotyping herbivore feces facilitating their further analyses. *Wildlife Society Bulletin*, 31: 92-697.

Janermo, A., Jansson, G., y Månsson, J. 2017. Temporal variations in activity patterns during rut-implications for survey techniques of red deer, *Cervus elaphus*. *Wildlife Research*, 44(2): 106-113.

Karns, G. R., Lancia, R. A., DePerno, C. S., y Conner, M. C. 2011. Investigation of adult male white-tailed deer excursions outside their home range. *Southeastern Naturalist*, 10(1): 39-52.

Kie, J. G., y Bowyer, T. 1999. Sexual segregation in white-tailed deer: density-dependent changes in use of space, habitat selection, and dietary niche. *Journal of Mammalogy*, 80(3): 1004-1020

Kobelkowsky-Sosa, R., Palacio, J., Clemente, F., Mendoza, G., Herrera, J., y Gallegos, J. 2001. Calidad del hábitat y estado poblacional del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*, Hays) en ranchos cinegéticos de la Sierra Fría, Aguascalientes. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 6: 125-130.

Kolodzinski, J. J., Tannenbaum, L. V., Muller, L. I., Osborn, D. A, Adams, K. A., Conner, M. C., Ford, W. M., y Miller, K. V. 2010. Excursive behaviors by female white-tailed deer during estrus at two mid-atlantic sites. *The American Midland Naturalist*, 163: 366-373.

Lindsay, A. R., y Belant, J. 2007. A simple and improved PCR based technique for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) sex identification. *Conservation genetics*. Technical note. Springer.

Long, E. S., Diefenbach, D. R., Rosenberry, C. S., Wallingford, B. D., y Grund, M. D. 2005. Forest cover influences dispersal distance of white-tailed deer. *Journal of Mammalogy*, 86(3): 623-629.

Lounsberry, Z. T., Forrester, T. D., Olegario, M. T., Brazeal, J. L., Wittmer, H. U., y Sacks, B. N. 2015. Estimating sex-specific abundance in fawning areas of high-density Columbian black-tailed deer using fecal DNA. *Journal of Wildlife Management*, 79: 39-49.

Lutz, C. L., Diefenbach, D. R., y Rosenberry C. S. 2015. Population density influences dispersal in female white-tailed deer. *Journal of Mammalogy*, 96(3): 494-501

Lutz, C. L., Diefenbach, D. R., y Rosenberry, C. S. 2016. Proximate influences on female dispersal in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Management*, 80(7):1218-1226.

Mandujano, S., y Gallina, S. 2004. Dinámica poblacional del venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en un bosque tropical seco. Pp. 317-330. En: V. Sánchez y

R. A., Medellín, (Eds). Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa. Instituto de Biología e Instituto de Ecología, UNAM, México.

McCoy, J. C., y Ditchkoff, S. S. 2012. Patterns of fecal hormones in a fenced population of white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin*, 36: 641-646.

Pérez-Solano, L. A., Gallina, S.A. y Sánchez-Rojas, G. 2016. Individual variation mule deer (*Odocoileus hemionus*) and home range in the Chihuahuan Desert, Mexico. *Journal of Mammalogy*, 97(4):1228-1237

Peterson, B. E., Storm, D. J., Norton, A. S., y Van Deelen, T. R. 2017. Landscape influence on dispersal of yearling male white tailed deer. *The Journal of Wildlife Management*, 81(8):1449-1456.

QGIS Development Team. 2018. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <https://qgis.org>

Rosales, S., y Villanueva, J. 2014. Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en bosques de *Pinus duranguensis* Martínez en el municipio de Durango. Pp. 83-110. En: M. R. Pérez (Comp). Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en cinco bosques de coníferas. SAGARPA, INIFAP, CENID, COMEF, Mexico.

Rosenberry, C. S., Conner, M. C., y Lancia, R. A. 2000. Behavior and dispersal of white-tailed deer during the breeding season. *Canadian Journal of Zoology*, 79:171-174.

Sánchez-Rojas, G., Gallina, S. y Equihua, M. 2002. Segregación sexual y por edad del venado bura (*Odocoileus hemionus*) en el desierto Chihuahuense. *Memorias VII Simposio Sobre Venados en México*.

Soto-Werschitz, A., Mandujano, S., y Gallina, S. 2018. Home-range analyses and habitat use by white-tailed deer females during breeding season. *Therya*, 9(1):1-6.

Vega, D. y Hernández, G. 2011. Caracterización ambiental del Rancho El Carmen, Chorreños, en el municipio de Coneto de Comonfort, Durango, para el manejo de

venado cola blanca (*Odocoileus virginianus* sub. *coues*). Revista Chapingo Serie Zonas Áridas 10:105-111.

Vega, D. M., Gutiérrez, M. V., y Reyes, J. L. 2016. Densidad poblacional de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en dos UMAs de Durango, México. Vidsupra 8(2):24-28.

Villarreal, J. G. 1999. Venado cola blanca, manejo y aprovechamiento cinegético. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. 471 pp.

**CAPITULO III. NIVELES HORMONALES ESTEROIDES (CORTISOL,
TESTOSTERONA Y ESTRADIOL) EN POBLACIONES DE VIDA LIBRE Y
ENCIERRO.**

3.1 INTRODUCCIÓN

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es una especie de gran importancia ecológica y socioeconómica en México (Clemente et al. 2015). Por esta razón, aspectos como la productividad y la reproducción deben ser atendidos para un mejor manejo de la especie (Shipka et al. 2007), ya sea para la conservación o para la explotación (Pelletier et al. 2003), y el monitoreo de los niveles hormonales ayuda a conocer el estado social y físico actual de las poblaciones (McCoy y Ditchkoff, 2012). Las hormonas regulan la fisiología y el comportamiento de los individuos, así como el crecimiento, la condición corporal, el comportamiento social, la sobrevivencia y sobre todo, la reproducción. (Morden et al. 2011). En especies de cérvidos presentes en áreas templadas y frías, factores ambientales, como el fotoperiodo puede influir en la producción hormonal, ya que el fotoperiodo es el responsable de la adaptación de los cérvidos a altas latitudes y la época reproductiva se manifiesta cuando el fotoperiodo disminuye y las hormonas reproductivas se incrementan (García et al. 2005). Se ha observado también que los cambios estacionales en la disponibilidad de vegetación y su calidad pueden afectar el nivel de producción de glucocorticoides en venado cola blanca (Millspaugh y Washburn, 2004). El venado cola blanca es una especie muy sensible y es fácilmente estresado por disturbios causados por las actividades humanas, incluso aquellas asociadas a la actividad cinegética, la recreación o el ecoturismo, provocando alteraciones en su producción hormonal (Brown et al. 2012). El propio estado reproductivo (Huber et al. 2003a) y las interacciones sociales entre los individuos (Dye et al. 2012) también puede tener una influencia sobre la producción hormonal. Existe una gran variedad de factores que pueden cambiar los niveles hormonales, y entonces, afectar el metabolismo. Dicha situación tiene implicaciones económicas y de conservación, por lo que existe el interés de conocer que factores tienen influencia sobre la producción hormonal y mitigar aquellos causantes de estrés o que tengan efectos deletéreos sobre las poblaciones (Millspaugh y Washburn, 2004).

El cortisol es una hormona glucocorticoide esteroide, la cual es conocida como la hormona del estrés. La secreción de los glucocorticoides ocurre durante una respuesta al estrés, la cual habilita al animal a enfrentarse al estrés movilizándolo la energía requerida

para la respuesta y minimizando el gasto de energía en tejidos que no son necesarios para la sobrevivencia inmediata (Huber et al. 2003). Aunque no se conocen bien los efectos del estrés sobre la fauna silvestre, existen investigaciones que sugieren un posible efecto fisiológico deletéreo a largo plazo (Brown et al. 2012). Respecto a la relación de los glucocorticoides con la testosterona, se cree que los glucocorticoides tienen un efecto de supresión en la producción de andrógenos como un resultado de interacciones negativas entre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (McCoy y Ditchkoff, 2012). La testosterona es una hormona esteroide secretada principalmente por las gónadas. En machos de mamíferos polígamos, la testosterona estimula el crecimiento muscular y óseo, origina las características sexuales secundarias, incrementa la tasa metabólica y promueve el comportamiento agresivo (Pelletier et al. 2003). La testosterona se ha utilizado como indicador de agresión, dominancia y estado reproductivo en cérvidos machos (Taillon y Côté, 2008), además, la producción de testosterona se ha asociado con el desarrollo y crecimiento de las astas en ungulados. El estradiol es una hormona esteroide producida principalmente por las gónadas y su producción se incrementa en la época reproductiva. En hembras, promueve la ovulación y el comportamiento sexual durante el estro (Bubenik et al. 1997). La testosterona y el estradiol no solo regulan los patrones reproductivos en hembras y machos en la época reproductiva, sino también regulan aspectos de comportamiento sexual y fisiológicos durante la vida de los individuos, por ello, es importante determinar los perfiles de hormonas esteroides cuando se desarrollan programas de conservación y manejo de especies de vida libre (Soto et al. 2004). Anteriormente, los niveles hormonales se han medido mediante muestras sanguíneas, lo cual requiere de la contención y captura de los animales, sin embargo; esas actividades son detonantes de estrés para las poblaciones de fauna silvestre (Kapke et al. 1999). El estrés causado por la captura puede afectar el muestreo sanguíneo al modificarse las concentraciones de las hormonas, en consecuencia, las mediciones hormonales pueden volverse sesgadas y entonces, los datos serían mal interpretados (McCoy y Ditchkoff, 2012). En la actualidad, se buscan técnicas de muestreos no invasivas, que mantengan la integridad física y metabólica de los animales, ejemplo de ello es el uso de heces fecales y orina (Taillon y Côté, 2008). Dado que las heces fecales pueden ser colectadas sin perturbar y estresar

a los individuos, se ha vuelto una técnica de muestreo muy común en estudios de comportamiento y ecología en los años recientes (Huber et al. 2003). Preferiblemente, las heces fecales para estudios hormonales deberían de provenir de animales de los cuales su edad y sexo sean conocidos, sin embargo, las condiciones en campo y del muestreo de poblaciones en vida libre no siempre permiten contar con esa información (Millspaugh y Washburn, 2004). No obstante, es posible identificar el sexo de los animales mediante análisis de ADN (Huber et al. 2002; Tolleson et al. 2005) y la amplificación con técnica PCR de fragmentos de ADN asociados con un cromosoma sexual como lo es el gen SRY (Han et al. 2009). En general, los análisis de los esteroides fecales, tal como el cortisol, testosterona, estradiol o sus metabolitos, no es una técnica costosa que es confiable para monitorear, de manera remota, el comportamiento y reproducción en ungulados silvestres (Kapke et al. 1999).

Las poblaciones de venado cola blanca presentes en la Sierra Madre Occidental del estado de Durango, han sido poco estudiadas y en general, el manejo que se realiza para esta especie es poco. Algunos productores han colocado cercado con la intención de iniciar con una producción o actividad cinegética en sus propiedades. Se cree que una población en encierro, y su contacto frecuente con personas y sus actividades, presenta mayores niveles de cortisol en heces. Por su parte, la cobertura vegetal, traducida en disponibilidad de alimento para venado, es la principal variable ambiental promotora de estrés en las poblaciones de venado cola blanca tanto en vida libre como en cautiverio. Por lo anterior, los objetivos planteados en este estudio fueron: 1) identificar el sexo de los individuos que produjeron las heces fecales mediante amplificación de ADN fecal, 2) determinar los niveles de cortisol, testosterona y el estradiol en heces de venado cola blanca en dos poblaciones, tanto en vida libre y en encierro, 3) hacer un análisis correlacional entre hormonas y variables ambientales de cada sitio para conocer si algún factor ambiental está provocando estrés y, 4) comparar los niveles hormonales entre poblaciones y sexos.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Área de estudio

Se colectaron grupos fecales de venado cola blanca en dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) localizadas en el municipio de Durango, Durango, México. La población en vida libre se presentó en la UMA Salvador Allende. La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 2.52 venados/km² (Vega et al. 2016). Esta UMA se encuentra ubicada entre las coordenadas 24° 71' - 24° 05' N y 104° 51' - 104° 56' O, con un rango de elevación de 2,200-2,680 m y un clima templado semi frío y templado semi húmedo. Esta UMA cuenta con un área de 3200 ha con libre movimiento de venado cola blanca. Los principales tipos de vegetación en ésta UMA fueron bosque de pino-encino, bosque de pino y bosque de encino (González et al. 2007). La población en encierro estuvo presente en la UMA Molinillos. La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 4.58 venados/km² (Vega et al. 2016). Esta UMA está localizada en las coordenadas 23° 36' - 23° 39' N y 104° 59' - 105° 06' O, con una elevación de 2,000-2680 msnm. Esta UMA comprende un área de 300 ha cercadas por malla venadera. El clima en este sitio es templado subhúmedo y templado semifrío. Los principales tipos de vegetación son bosque de pino, bosque de encino-pino, bosque de encino y pastizal (Rosales y Villanueva, 2014).

3.2.2. Colecta y clasificación de los grupos fecales

Los grupos fecales fueron colectados cada dos semanas por 13 meses en cada UMA. El periodo de muestreo cubrió las cuatro estaciones: primavera (21 marzo-21 junio), verano (22-junio-22 septiembre), otoño (23 septiembre-21 diciembre) e invierno (22 diciembre-20 marzo). El periodo de muestreo en la UMA Salvador Allende abarcó del 1 marzo 2015 al 31 marzo 2016, y para la UMA Molinillos fue del 1 octubre 2015 al 31 octubre 2016. En muestreos previos al periodo de colecta, se establecieron los sitios con mayor actividad de venado cola blanca para cada UMA. Se recorrieron dos transectos de 1,000 m de largo durante cada visita de muestreo. Se colectaron grupos fecales frescos, reconocidos

por la humedad de la mucosidad externa y la suavidad de los pellets. Se colocaron de 20-30 de los pellets superiores de cada grupo en tubos Falcon® de 50 ml con etanol al 96%. La otra parte de los pellets se guardaron bolsas plásticas y se mantuvieron a -20°C. Los grupos fecales se identificaron por UMA, fecha y geolocalización. Se midieron el largo y ancho máximos de los pellets fecales de cada grupo antes de colocarlos en congelación. A partir de allí, se calculó el volumen de los pellets y se obtuvo una media de volumen por grupo fecal para asignarse a una categoría de edad: hasta 290 mm³ se consideraron crías; 291 a 605 mm³ juveniles y de 606 mm³ en adelante se tomaron como adultos (Harding, 1949; Ezcurra y Gallina, 1981).

3.2.3. Extracción de ADN fecal

Se aisló ADN mediante el método denominado CTAB-acetato a partir de dos a cuatro pellets (dependiendo del tamaño) mantenidos en etanol al 96%. Primero, se dejó evaporar el alcohol por 45 min a temperatura ambiente en cajas Petri. Ya secos, se picaron con navajas estériles y se colocaron 0.5 g de muestra en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de buffer de extracción (2 % CTAB, 100 mM TRIS, pH 8, 20 mM EDTA, pH 8, 1.4 M NaCl y 1 % PVP) y 5 µL de 2-mercaptoetanol a cada tubo. Se agitaron los tubos en vórtex (Labnet®) a 3400 rpm por 10 seg y se colocaron una hora en digestión a 65°C. Pasada una hora de digestión, se agregaron 50 µL de Proteinasa K, y se colocaron en digestión una hora más a 65°C. Para separar la parte solida de la muestra, los tubos se colocaron en la centrifuga (Eppendorf® 5415) por 15 min a 13,200 rpm. Este paso se repitió, para eliminar partes solidas que hayan permanecido. El sobrenadante se colocó en tubos nuevos estériles y se agregaron 400 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitaron mediante vórtex a 3,400 rpm por 10 seg y se colocaron en la centrifuga por 6 minutos a 13,200 rpm. El sobrenadante se colocó en tubos nuevos y se agregaron 300 µL de acetato de amonio (3M, pH 5.2) y 600 µL de isopropanol. Los tubos se mantuvieron a -20°C por toda la noche, antes del siguiente paso se temperaron por 5 min. Se centrifugaron los tubos por 15 min a 13,200 rpm. En este caso, el sobrenadante se desechó, dejando un pellet de ADN en el fondo del tubo. El pellet de ADN se lavó añadiendo 500 µL de etanol al 80%, se agitó en vórtex por 10

seg a 3,400 rpm y se centrifugó durante 6 min a 13,200 rpm. el paso de lavado se realizó dos veces. Al final, el etanol al 80% se desechó y se secaron los tubos. El ADN fue hidratado con 55 μL de agua grado biología molecular (Cellgro Corning® 46000). Se obtuvo la pureza y cantidad de ADN en $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ mediante un espectrofotómetro Nanodrop® 2000 (Thermo Scientific®). La calidad del ADN fue observada mediante geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

3.2.4. Identificación de sexo a partir del ADN fecal

Para identificar el sexo de los individuos que produjeron los grupos fecales, se amplificó un fragmento del gen SRY mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con el par de iniciadores: SRY forward CAT CTT GTC TGT GTG TCG TG y SRY reverse: CGG GTA GTG TCG TTT GTC TA (Lounsberry et al. 2015). Se utilizaron tres muestras de tejidos provenientes de venados machos adultos cazados en la UMA Salvador Allende como controles positivos. Las concentraciones finales para la reacción de PCR fueron 100-150 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$ de ADN, 2.5 mM MgCl_2 , 0.5 mM dNTP's, 0.6 pM de iniciadores de PCR y 0.750 unidades de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de PCR fueron 15 min a 95°C de desnaturalización inicial, 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 1.30 min a 58 °C, 1 min a 72 °C, finalmente, 10 min a 72 °C de elongación final. Cada reacción de PCR incluyó un control positivo y un control negativo (agua). Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. En cada gel se agregó marcador de peso molecular y controles positivo y negativo. Para asegurar los resultados, las extracciones de ADN, reacciones de PCR, y la observación de los productos en gel se llevaron a cabo por duplicado. Las muestras que no mostraron amplificación se tomaron como hembras, mientras que las muestras que mostraron una banda (~200 pb) se tomaron como machos. Las muestras que mostraron bandas difusas no se tomaron en cuenta para el estudio. Algunas identificaciones de sexo mediante métodos moleculares fueron corroboradas registros visuales que se pudieron obtener de los animales durante los muestreos.

3.2.5. Análisis hormonales

Se tomaron 0.5 g de las heces mantenidas en congelación para realizar la extracción de esteroides totales. Para la extracción se utilizó el método de Pavitt, Walling, Möstl, Pemberton y Kruuk (2015) con modificaciones. Se descongelaron las muestras y se colocaron en tubos de microcentrífuga de 2 ml y se agregaron 720 μ L de metanol y 80 μ L de agua destilada. Los tubos fueron agitados en vórtex por 10 min a 3,400 rpm y se mantuvieron en un agitador de placas durante toda una noche en movimiento constante. Se centrifugaron los tubos por 15 min a 2000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos estériles nuevos. Estos extractos de esteroides totales se diluyeron 1:20. Se utilizaron 20 μ L de los extractos diluidos para la cuantificación de las hormonas. Para la cuantificación de las hormonas se usaron los kits comerciales Cortisol ELISA Kit, Estradiol Elisa Kit y Testosterone Elisa Kit de la marca Cayman® y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para el cortisol, la sensibilidad fue 0.07 ng/g y los coeficientes de variación intra e inter ensayos fueron <15 y <25% respectivamente. La especificidad del análisis para cortisol fue cortisol 100%, prednisolona 4.0%, cortexolona 1.6%, 11-deoxycorticosterona 0.23%, dexametasona 15%, 17-hidroxi progesterona 0.23%, glucunórido de cortisol 0.15%, corticosterona 0.14%, cortisona 0.13%. Para estradiol, la sensibilidad fue 0.03 ng/g y los coeficientes de variación intra e inter ensayos fueron <18 y <30% respectivamente. La especificidad para el análisis de estradiol fue estradiol 100%, estradiol-3-sulfato 14.5%, glucunórido de estradiol-3 14%, estrona 12%, glucunórido de estradiol-17 10%, estriol 0.30%, 5 α - dihidrotestosterona 0.06%, etinilestradiol 0.05%, 5-androsterona-17 β -ol-3 0.02%, aldosterona <0.01%. Para la testosterona, se tuvo una sensibilidad de 0.012 ng/g y los coeficientes de variación entre ensayos fueron <20% y <15%, respectivamente. La especificidad de esta hormona en el análisis fue 19-nortestosterona 140%, testosterona 100%, 5 α -dihidrotestosterona 27.4%, 5 β -dihidrotestosterona 18.9%, metil testosterona 4.7%, androstenediona 3.7%, 11-ketotestosterona 2.2%, 5-androstenediol 0.51%, epi-testosterona 0.2%, progesterona 0.14%. Las muestras se analizaron en un lector de ELISA marca EliRead de KontroLab® y se determinó la concentración de cada muestra utilizando la ecuación obtenida al graficar los estándares en cada una de las hormonas.

3.2.6. Muestreo de vegetación y variables ambientales

Se llevaron a cabo líneas Canfield y puntos en cuadrantes para estimar la cobertura vegetal en cada estación. Las líneas Canfield de 20 m de longitud se realizaron en porciones de 2m para darle más representatividad al muestreo (Mostacedo y Fredericksen 2000). Además, se muestrearon 10 sitios al azar en puntos en cuadrante para las especies arbustivas (Mostacedo y Fredericksen, 2000). Los datos acerca de temperatura, precipitación y fotoperiodo fueron obtenidos de instituciones gubernamentales, Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) e Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA).

3.2.7. Análisis estadístico

Con el objetivo de conocer las diferencias en los niveles de las hormonas esteroides entre sexos y entre UMA en cada estación del año, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) factorial donde los factores fueron, UMA, estación y sexo (procedimiento GLM, SAS Institute 9.2, Cary, NC, USA). Además, se obtuvo el coeficiente de correlación de Pearson para relacionar la cantidad de hormonas (cortisol, testosterona o estradiol) por cada UMA con sus variables ambientales (temperatura, precipitación, fotoperiodo y cobertura vegetal) (procedimiento Corr, SAS Institute 8.0, Cary, NC, USA).

3.3 RESULTADOS

Se colectaron un total de 385 de grupos fecales en cada UMA abarcando todas las estaciones. Para el estudio no se tomaron en cuenta los grupos fecales de los cervatos. Mediante la amplificación del fragmento del gen SRY, se logró identificar el sexo en 198 grupos fecales que provenían de venados hembra y 156 grupos fecales pertenecientes a machos y se estimó la relación macho: hembra, para Salvador Allende fue 1:2.33 y para Molinillos 1:2.0

En general, los niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces se incrementaron conforme las estaciones avanzaron al invierno y el fotoperiodo se disminuyó en ambas UMA (Fig 3.1).

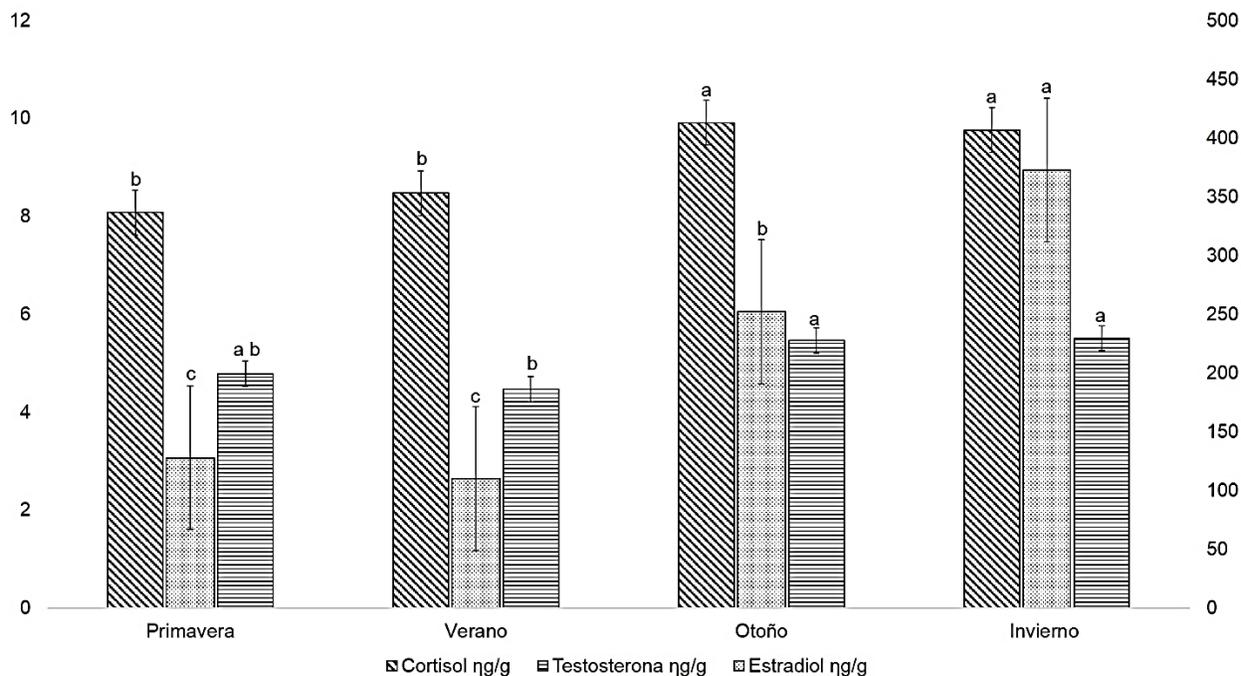


Figura 3.1. Niveles medios por estación de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca de dos poblaciones (UMA) en Durango, México. La misma letra sobre barras con mismo fondo indica no diferencias significativas.

Se encontraron correlaciones significativas negativas entre estradiol con temperatura y fotoperiodo en la UMA Salvador Allende. Por su parte, para UMA Molinillos, se observó una correlación negativa entre el cortisol con temperatura y fotoperiodo, testosterona con temperatura y fotoperiodo, estradiol con temperatura y fotoperiodo (Tabla 3.2). Las características ambientales estacionales para cada UMA se muestran en la Tabla 3.1. El aumento en los niveles hormonales en heces coincide con la disminución del fotoperiodo y la presencia de la época reproductiva (otoño-invierno).

Tabla 3.1. Características ambientales estacionales presentadas en dos poblaciones (UMA) en Durango, México. (T= temperatura media por estación. PP= precipitación pluvial media por estación. Fotoperiodo= número de horas al día promedio por cada estación. Cobertura= cobertura vegetal del estrato herbáceo-arbustivo por estación)

Estación	Salvador Allende				Molinillos			
	T (°C)	PP (mm)	Fotoperiodo (h)	Cobertura (%)	T (°C)	PP (mm)	Fotoperiodo (h)	Cobertura (%)
Primavera	9.2	2.6	13.31	36.5	2.9	1.1	12.92	57.8
Verano	11.2	13.8	12.95	75.2	11.3	8.9	12.99	85.8
Otoño	4.0	0.0	11.15	66.5	4.8	0.3	11.28	54.4
Invierno	2.7	0.0	11.09	57.4	0.3	0.0	11.15	51.9

Respecto a la vegetación, no se encontró correlación entre las hormonas esteroides y la cobertura vegetal en Salvador Allende. Sin embargo, se observó correlación negativa entre la cobertura vegetal y cortisol, testosterona y estradiol en Molinillos (Tabla 3.2).

El nivel medio de cortisol en heces fue mayor en Salvador Allende que en Molinillos ($F_{1,103}=31.87$, $p<0.0001$) (Fig. 3.2). Esas diferencias fueron más evidentes en primavera y verano ($F_{3,103}=8.17$, $p<0.0001$) (Tabla 3.3).

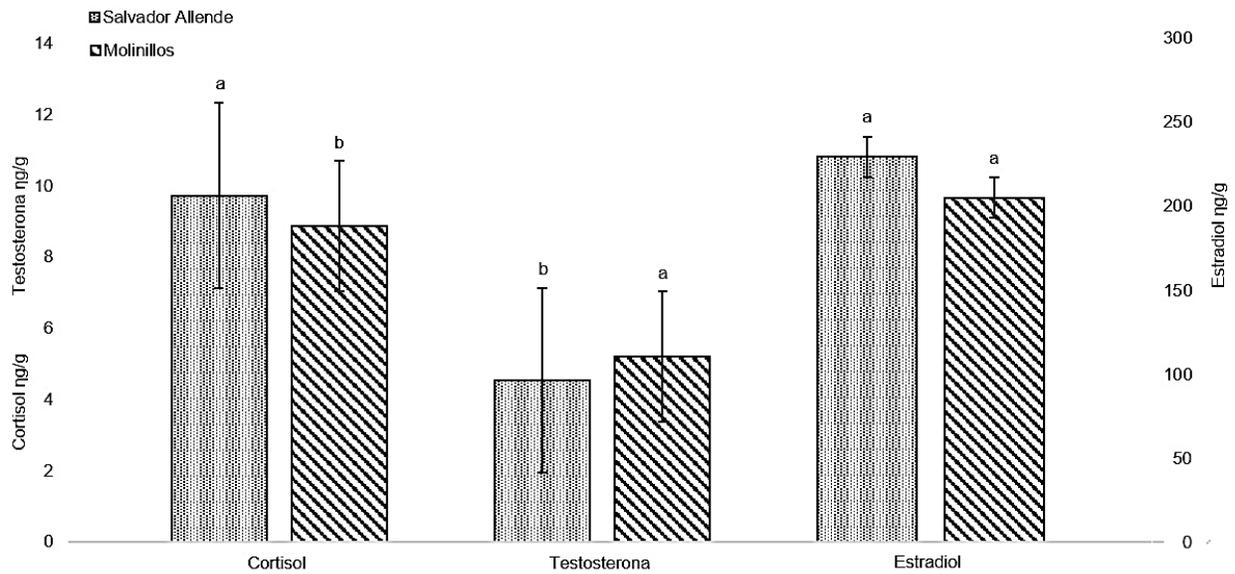


Figura 3. 2. Niveles medios de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca de dos poblaciones (UMA) en Durango, México, Salvador Allende (población en vida libre) y Molinillos (población en encierro). La misma letra sobre barras con distinto fondo indica diferencias no significativas.

Se observó en los machos, que el cortisol disminuyó conforme la testosterona también disminuyó tanto en Salvador Allende como en Molinillos (Tabla 3.2). También se observó, en Molinillos, correlación significativa entre testosterona y estradiol (Tabla 3.2).

Respecto a los niveles de cortisol entre sexos, se observó que las hembras tuvieron niveles más altos que los machos ($F_{1,103}=27.85$, $p<0.0001$), especialmente en el verano y el invierno ($F_{3,103}=3.46$, $p=0.0192$) (Tabla 3.3). Respecto a los niveles de testosterona fecales se observó que las hembras mostraron más altos niveles de testosterona en heces que los machos en verano ($F_{3,103}=5.79$, $p=0.0011$) (Tabla 3.3).

Tabla 3. 2. Matriz de coeficientes de correlación de Pearson entre cortisol, testosterona (T), estradiol (E2), y las variables ambientales en dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) en vida libre (Salvador Allende) y encierro (Molinillos).

Salvador Allende							
	Cortisol	T	E2	Temperatura	Precipitación	Fotoperiodo	Cobertura
Cortisol	-	0.37300	0.16748	-0.14172	0.16823	-0.26218	0.33104
<i>p</i>		0.0463	0.3763	0.4550	0.3742	0.1616	0.0740
T	-	-	-0.31834	-0.01084	0.09551	-0.13959	0.34732
<i>p</i>			0.0924	0.9555	0.6221	0.4702	0.0649
E2	-	-	-	-0.60536	-0.35185	-0.34895	-0.23595
<i>p</i>				0.0004	0.0566	0.0588	0.2094
Molinillos							
	Cortisol	T	E2	Temperatura	Precipitación	Fotoperiodo	Cobertura
Cortisol	-	0.43491	0.38241	-0.51328	-0.21410	-0.73204	-0.58998
<i>p</i>		<0.0001	0.0002	<.0001	0.0372	<.0001	<.0001
T	-	-	0.20859	-0.34290	-0.08039	-0.33039	-0.32017
<i>p</i>			0.0498	0.0009	0.4488	0.0014	0.0020
E2	-	-	-	-0.44417	-0.12131	-0.51178	-0.40643
<i>p</i>				<.0001	0.2441	<.0001	<.0001

p=significancia

Tabla 3.3. Niveles de cortisol, testosterona y estradiol en heces de venado cola blanca en dos poblaciones (UMA) en Durango, México. (T= testosterona. E= estradiol. SA= Salvador Allende, población en vida libre. M= Molinillos, población en encierro).

Estación	UMA	Hembras			Machos		
		Cortisol ng/g	T ng/g	E2 ng/g	Cortisol ng/g	T ng/g	E2 ng/g
Primavera	SA	9.64 ± 0.50	3.43 ± 1.00	287.87 ± 125.50	8.64 ± 0.94	3.75 ± 1.00	153.49 ± 115.93
	M	8.07 ± 0.67	5.02 ± 1.15	112.91 ± 83.68	7.76 ± 0.47	4.90 ± 1.07	125.39 ± 84.61
Verano	SA	10.18 ± 0.84	5.06 ± 0.99	181.62 ± 67.37	9.57 ± 0.77	4.18 ± 0.95	203.91 ± 80.45
	M	8.36 ± 0.62	4.94 ± 0.75	103.83 ± 42.72	7.63 ± 0.56	4.29 ± 0.70	79.10 ± 39.20
Otoño	SA	9.88 ± 0.49	4.99 ± 1.16	148.80 ± 163.33	10.33 ± 1.20	5.04 ± 0.99	321.10 ± 150.25
	M	9.92 ± 0.55	4.97 ± 1.44	279.60 ± 235.47	9.89 ± 1.18	5.70 ± 1.26	241.10 ± 198.64
Invierno	SA	10.09 ± 0.83	3.92 ± 1.15	392.37 ± 162.45	9.48 ± 1.15	4.30 ± 0.51	319.60 ± 144.98
	M	10.12 ± 0.66	4.39 ± 1.64	397.19 ± 177.81	9.52 ± 0.88	5.54 ± 0.96	344.60 ± 168.29

3.4 DISCUSION

Los niveles de cortisol, testosterona y estradiol fecal aumentaron conforme avanzaron las estaciones al invierno, esto pudo ser por la disminución del fotoperiodo. El fotoperiodo es el principal mecanismo ambiental que controla los cambios estacionales mediante la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Li et al. 2001). En venado cola blanca, la glándula pineal funciona como un traductor neuroendocrino de la variación circadiana y circanual del fotoperiodo y produce melatonina en respuesta de la oscuridad, y altos niveles de melatonina eleva la producción de hormonas esteroides reproductivas, y se inicia la época reproductiva (Bubenik, 2006). La estrategia de adaptación al fotoperiodo, lo cual lleva a la época reproductiva, asegura que la preñez y el periodo de lactancia coincidan con el periodo donde existe la mayor fuente y variedad de alimento (Li et al., 2001).

Por otro lado, los niveles de cortisol pueden ser influenciados por la dieta y el tipo de vegetación. Para animales presentes en latitudes templadas o frías, la disponibilidad de especies vegetales y su calidad nutricional cambiará estacionalmente (Dostaler et al. 2011). Durante el invierno, los cérvidos que viven en áreas templadas tiene que lidiar con la baja abundancia de plantas y la baja calidad del forraje, llevando a altas demandas de energía causadas por la termorregulación y locomoción (Taillon y Côté, 2008). Cuando la condición corporal es baja, los herbívoros utilizan las reservas corporales y las proteínas de los músculos para sobrevivir, esto eleva la secreción de los glucocorticoides, dado que movilizan las reservas energéticas necesarias para enfrentar las condiciones ambientales (Huber et al. 2003a). En este estudio, los niveles de cortisol en las heces no fueron diferentes entre las poblaciones para el otoño y el invierno. Sin embargo, en la primavera y el verano, la población en vida libre (Salvador Allende) tuvo niveles más altos de cortisol en heces y la cobertura vegetal fue menor en esa época, aunque la correlación no fue significativa estadísticamente (Tabla 3.3).

Así también, no solo la época reproductiva causa elevaciones en el nivel de estrés en los animales. Huber et al. (2003a) encontraron que los niveles de metabolitos de cortisol en ciervo rojo (*Cervus elaphus*) variaron conforme a la estación, y las concentraciones medias fueron significativamente más altas durante diciembre y enero. Ellos asociaron

ese incremento en los niveles de cortisol en heces a la época reproductiva pero también a las temperaturas extremas, nevadas, precipitación y el viento. En este estudio, se encontró una correlación negativa entre el cortisol fecal y la temperatura en la población en encierro (Molinillos). Así mismo, Huber et al. (2003a) mostraron una relación negativa entre la temperatura mínima y los niveles de metabolitos de cortisol para ciervo rojo.

Por las condiciones del encierro, se esperaba que los niveles de cortisol fueran más altos en Molinillos. Li et al. (2007) observaron que el encierro y altas densidades poblacionales elevaron los niveles de cortisol fecal en ciervo del padre David (*Elaphurus davidianus*) comparados con individuos en vida libre. Millspaugh y Washburn (2004) observaron que animales silvestres que se han sometido al encierro pueden producir mayor cantidad de glucocorticoides que los animales en vida libre. Esto es porque un poco antes de que se produzca una situación de estrés, el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal se activa y los resultados son la alta producción de glucocorticoides (He et al. 2004) pero, conforme el tiempo avanza y las condiciones causantes de estrés continúan, el cuerpo puede crear una respuesta regulatoria de tal manera que la producción de glucocorticoides se disminuye debajo de los niveles normales y pueden reflejar la etapa final del estrés en los animales que han sido criados en cautiverio desde el nacimiento (Linklater et al. 2010). Este fenómeno podría ser una explicación para la población en Molinillos, dado que esta población se ha mantenido 13 años en encierro natural. Sin embargo, He et al. (2004) observaron que en centros de reproducción de ciervo almizclero (*Moschus sp.*) en semi cautiverio o encierros naturales, los individuos mostraron menos comportamiento asociado al estrés que aquellos que vivían en cautiverio. También, encontraron que los animales adultos en esos encierros naturales tuvieron menor cantidad de enfermedades. Entonces, se sugiere que los ambientes creados en los encierros naturales no son perjudiciales en ciervo almizclero (Liu et al. 2010). Es importante mencionar que en Salvador Allende está permitida la actividad cinegética a diferencia de Molinillos, y los niveles de cortisol en heces en esta UMA podrían haber sido afectados. Así también, la presencia de la cerca en Molinillos podría disminuir el contacto con sus depredadores. Por ejemplo, Creel et al. (2009) reportaron una elevación de glucocorticoides en heces de elk (*Cervus elaphus*) ante la presencia de sus depredadores. Esto puede sugerir que

las condiciones de encierro natural mantenidas en Molinillos no están generando altos niveles de estrés, y probablemente la densidad poblacional aún puede ser mantenida en equilibrio en esa área.

El aumento de los glucocorticoides en la época reproductiva en machos ya ha sido reportado en varios estudios (Pelletier et al. 2003; Bartos et al. 2010; McCoy y Ditchkoff, 2012). Confirmando lo anterior, McCoy y Ditchkoff (2012) comentaron que la actividad reproductiva eleva los niveles de glucocorticoides en machos de venado cola blanca, así como ellos; Pelletier et al. (2003) observaron lo mismo en el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*) y Chunwang et al. (2004) en ciervo del padre David (*Elaphurus davidianus*). En este estudio se observó que los niveles más altos de cortisol en ambas UMA se presentaron antes de la época reproductiva y se mantuvieron en el invierno. Estos niveles altos cortisol corresponden de igual manera a los niveles de testosterona (Tabla 3.3). El aumento en cortisol se atribuye al incremento de la testosterona, que a su vez, fomenta las interacciones agresivas entre los machos con el objetivo de establecer dominancia (Chunwang et al., 2004). En el venado cola blanca, la competencia entre machos por obtener un mayor número de hembras mediante la intimidación de otros machos ocurre al inicio de la época reproductiva para establecer o mantener sus jerarquías de dominancia (Ronsberry et al. 2005). Se ha observado que tanto los animales que ejercen dominancia como aquellos subordinados pueden presentar altos niveles de estrés y la producción de cortisol se eleva poco antes del inicio de la época reproductiva, ya que es en este momento cuando la dominancia y las jerarquías son establecidas para asegurar el éxito de copula, y se mantienen hasta terminar la época reproductiva (Bartos et al. 2010). En este estudio, esto se corrobora al observarse una correlación positiva entre el cortisol y la testosterona en heces en ambas poblaciones. También se ha mencionado que las hembras adultas pueden mostrar agresión contra machos jóvenes en esta época (Ronsberry et al. 2001).

Huber et al. (2003a) observaron niveles más altos de metabolitos de cortisol en invierno (diciembre y enero) que en todo el resto del año en ciervo rojo, pero no encontraron diferencias significativas entre hembras y machos en algún mes en particular. Por otro lado, He et al. (2014) encontraron diferencias en los niveles de cortisol entre sexos para

ciervo almizclero, los machos tuvieron significativamente menos glucocorticoides fecales que las hembras. McCoy y Ditchkoff (2012) observaron más altos niveles de glucocorticoides fecales en hembras de venado cola blanca antes de la época reproductiva y durante la época reproductiva. Yoshimura et al. (2003) mencionan que la diferencia en la actividad adrenocortical entre hembras y machos es común en varias especies. Esas diferencias pueden ser causadas por las hormonas reproductivas, los receptores de los glucocorticoides y sus proteínas de unión. Las diferencias entre sexos puede reflejar una diferencia en el metabolismo de los esteroides, las vías de excreción y la respuesta de la glándula pituitaria (Huber et al. 2003a). Además, He et al. (2014) mencionan que existe un efecto a largo plazo en el cual las hembras pueden elevar los niveles de estrés en los machos, lo que lleva a un estrés crónico y por lo tanto bajos niveles de cortisol, sobre todo en poblaciones que viven en ambientes perturbados.

López y Montes (2016) observaron una cantidad mayor de metabolitos de testosterona fecal en hembras en venado cola blanca, aunque no fueron estadísticamente diferentes. Además encontraron que los machos de venado cola blanca produjeron más estradiol en la época no reproductiva, mientras que las hembras lo hacen en la época reproductiva. Los altos niveles de estradiol en los machos antes o durante la época reproductiva son explicados por la importancia que tiene esta hormona en la espermatogénesis (García et al. 2005). En la época no reproductiva (primavera y verano), el estradiol puede estar asociado con la producción, desarrollo y crecimiento de las astas. Bubenik et al. (1997) observaron que el crecimiento de las astas ocurría cuando las concentraciones de testosterona en sangre eran mínimas, pero la hormona aumentaba rápidamente durante la fase de mineralización de las astas alcanzando un pico un poco antes de la época reproductiva. Entonces, el estradiol es la hormona más importante para el crecimiento y maduración de las astas. Aunque aún no se conoce exactamente la vía de acción, se cree que el estradiol podría estarse produciendo a partir de la aromatización de la testosterona (Bubenik et al. 2005), y entonces, los niveles de testosterona en heces bajan.

Los valores de los niveles de cortisol y testosterona en este estudio fueron bajos, aunque dentro de los rangos reportados en varios estudios realizados en venado cola blanca y

otros cérvidos (Pelletier et al., 2003; Chunwang et al., 2004; McCoy y Ditchkoff, 2012; López y Montes, 2016). Esto pudo haber ocurrido por la actividad microbiana presente en las heces, las cuales metabolizan las hormonas esteroides a metabolitos con los cuales no existe reacción cruzada con los anticuerpos utilizados en este estudio. Millspaugh et al. (2003) mencionan que los microorganismos en heces pueden metabolizar los esteroides fecales a metabolitos con menor afinidad por los anticuerpos utilizados en cada uno de los diferentes estudios. Para este trabajo las heces se colectaron frescas pero tomó un par de horas pasarlas a congelación y sufrieron la fase de descongelación para el proceso de extracción de esteroides totales. Millspaugh y Washburn (2004) comentaron que los metabolitos hormonales fecales pueden cambiar en periodos cortos de tiempo, especialmente cuando se calientan, se congelan y se descongelan. Cuando Li et al. (2001) obtuvieron bajos niveles de estradiol fecal en su trabajo, lo atribuyeron a la sensibilidad de la técnica utilizada o a que la hormona había sido metabolizada en las heces a otro esteroide que no tuvo reacción cruzada con el anticuerpo que ellos utilizaron.

3.5 CONCLUSIONES

Las hormonas reproductivas, testosterona y estradiol, se elevan durante la época reproductiva y cuando el fotoperiodo disminuyó. Este comportamiento se presentó en ambas poblaciones. El cortisol fecal se elevó en el invierno dada la época reproductiva y las actividades relacionadas a esta como la agresión entre machos, las bajas temperaturas y la baja cantidad y calidad del alimento disponible. El cortisol fecal fue más alto en la población en vida libre, indicando que las poblaciones en encierro natural no siempre presentan altos niveles de estrés cuando las condiciones de manejo son adecuadas. Bajo un manejo y monitoreo adecuados, los encierros naturales pueden llegar a ser una buena estrategia para el manejo y reproducción de venado cola blanca sin causar efectos deletéreos en esas poblaciones, siempre y cuando las densidades poblacionales no sean altas. Finalmente, existen varios factores que provocan la elevación en los niveles de cortisol en las poblaciones de vida libre que deben ser estudiadas.

3.6 REFERENCIAS

Bartos, L., Schams, D., Bubenik, G. A., Kotrba R., y Tomanek, M. 2010. Relationship between rank and plasma testosterone and cortisol in red deer males (*Cervus elaphus*). *Physiology and Behavior*, 101:628-634.

Brown, C. L., Hardy, A. R., Barber, J. R., Fristrup, K. M., Crooks, K. R., y Angeloni, L. M. 2012. The effect of human activities and their associated noise on ungulate behaviour. *PlosOne*, 7(7): e40505.

Bubenik, G. A., Miller, K. V., Lister, A. L., Osborn, D. A., Bartos, L., y Van Der Kraak, G. J. 2005. Testosterone and estradiol concentrations in serum, velvet skin, and growing antler bone of male white-tailed deer. *Journal of Experimental Zoology*, 303A: 186-192.

Bubenik, G. A. 2006. Seasonal regulation of deer reproduction as related to the antler cycle.a review. *Veterinarski Archv*, 76 (Suppl.): S275-S285.

Bubenik, G. A., Schams, D., White, R. J., Rowell, J., Blake, J., y Bartos, L. 1997. Seasonal levels of reproductive hormones and their relationship to the antler cycle of male and female reindeer (*Rangifer tarandus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 116 B (2):269-277.

Chunwang, L., Zhigang, J., Yan, Z., y Caie, Y. 2004. Relationship between serum testosterone, dominance and mating success in Pére David's Deer stags. *Ethology*, 110:681-691.

Clemente, F., Cessa, V., Cortez, C., Tarango, L., y Arenas, P. 2015. Commercial extenders and freezing curves for the preservation of sperm cells of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Applied Animal Research*, 43 (4): 468-473.

Dostaler, S., Quillet, J., Therrien, J., y Côte, S. 2011. Are feeding preferences of white-tailed deer related to plant constituents?. *Journal of Wildlife Management*, 75: 913-918.

Dye, M. E., Demarais, S., Strickland, B. K., Jones, P. D., McDonald, C. G., y Prochaska, D. F. 2012. Factors affecting conception date variation in white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin*, 36 (1): 107-114.

Ezcurra, E., y Gallina, S. 1981. Biology and population dynamics of white-tailed deer in Northwestern Mexico. En P. F. Pfolliot, y S. Gallina, editores. *Deer biology, habitat requirements, and management in western North America*. Pp 77-108. Instituto de Ecología. A.C., Ciudad de México, México.

García, R. J., Barbanti, J. M., y Negrão, J. A. 2005. Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationships to the reproductive behaviour, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). *Theriogenology*, 63:2113-2125.

González, M., González, M., y Márquez, M. 2007. *Vegetación y ecorregiones de Durango*. Plaza y Valdez, Ciudad de México, México.

Han, S. H., Lee, S. S., Cho, I. C., Oh, M. Y., y Oh, H. S. 2009. Species identification and sex determination of Korean water deer (*Hydropotes inermis argyropus*) by duplex PCR. *Journal of Applied Animal Research*, 35: 61-66.

Harding, J. P. 1949. The use of probability paper for the graphical analysis of polymodal frequency distributions. *Journal of Marine Medical Association*, 28:141-152.

He, L., Wang, W. X., Li, L. H., Liu, B. Q., Liu, G., Liu, S. Q., Qi, L., y Hu, D. F. 2014. Effects of crowding and sex on fecal cortisol levels of captive forest musk deer. *Biological Research*, 47:48.

Huber, S., Bruns, U., y Arnold, W. 2002. Sex determination of red deer using Polymerase Chain Reaction of DNA from feces. *Wildlife Society Bulletin*, 30 (1):208-212.

Huber, S., Palme, R., y Arnold, W. 2003a. Effects of season, sex and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer. *General and Comparative Endocrinology*, 130: 48-54.

Huber, S., Bruns, U., y Arnold, W. 2003b. Genotyping herbivore feces facilitating their further analyses. *Wildlife Society Bulletin*, 31 (3): 92-697.

Kapke, C. A., Arcese, P., Ziegler, T. E., y Scheffler, G. R. 1999. Estradiol and progesterone metabolite concentration in white-tailed deer feces. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 30 (3): 361-371.

Li, C., Jiang, Z., Jiang, G., y Fang, J. 2001. Seasonal changes of reproductive behavior and fecal steroid concentrations in Père David's deer. *Hormones and Behavior*, 40:518–525.

Li, C., Jiang, Z., Tang, S., y Zeng, Y. 2007. Influence of enclosure size and animal density on fecal cortisol concentration and aggression in Père David's deer stags. *General and Comparative Endocrinology*, 151:202-209.

Linklater, W., Macdonald, E., Flamand, J., y Czekala, N. 2010. Declining and lower fecal corticoids are associated with distress, not acclimation to stress, during the translocation of African rhinoceros. *Animal Conservation*, 13(1):104–111.

Liu, W. H., Wang, Y. Q., Li, F. R., Tang, J., y Yang, Z. 2010. A primary study on breeding the musk deer by enclosure culture in Qinling Mountains. *Journal of Economic Animal*, 14(2):63–66.

Lounsberry, Z. T., Forrester, T. D., Olegario, M. T., Brazeal, J. L., Wittmer, H. U., y Sacks, B. N. 2015. Estimating sex-specific abundance in fawning areas of high-density Columbian black-tailed deer using fecal DNA. *Journal of Wildlife Management*, 79(1):39-49.

López, E., y Montes, R. 2016. Valoración de metabolitos de testosterona, progesterona y estrógeno en excretas de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) como método para determinar el sexo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 180.186.

Millspaugh, J. J., y Washburn, B. E. 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and comparative endocrinology*, 138: 189-199.

Millspaugh, J.J., Washburn, B.E., Milanick, M.A., Slotow, R., y Van Dyk, G. 2003. Effects of heat and chemical treatments on fecal glucocorticoid measurements: implications for sample transport. *Wildlife Society Bulletin*, 31 (2): 399-406.

McCoy, J. C., y Ditchkoff, S.S. 2012. Patterns of fecal hormones in a fenced population of white-tailed deer. *Wildlife Society Bulletin*, 36 (4): 641-646.

Morden, C. J. C., Weladji, R. B., Ropstad, E., Dahl, E., Holand, Ø., Mastro Monaco, G., y Nieminen, M. 2011. Fecal hormones as non-invasive population monitoring method for reindeer. *The Journal of Wildlife Management*, 75 (6): 1426-1435.

Mostacedo, B., y Fredericksen, T. S. 2000. Manual de métodos básicos de muestreo y análisis en ecología vegetal. BOLFORD, Santa Cruz, Bolivia.

Pavitt, A. T. Walling, C. A., Möstl, E., Pemberton, M., y Kruuk, L. E. B. 2015. Cortisol but not testosterone is repeatable and varies with reproductive effort in wild red deer stags. *General and Comparative Endocrinology*, 222:62-68.

Pelletier, A., Bauman, J., y Festa-Bianchet, M. 2003. Fecal testosterone in bighorn sheep (*Ovis canadensis*): behavioural and endocrine correlates. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 1678-1684.

Ronsberry, C., Conner, M., y Lancia, R. 2001. Behavior and dispersal of White-tailed deer during the breeding season. *Canadian Journal of Zoology*, 79: 171-174.

Rosales, S., y Villanueva, J. 2014. Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en bosques de *Pinus duranguensis* Martínez en el municipio de Durango. Pp 83-110 in M. R. Pérez, compilador. Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en cinco bosques de coníferas. SAGARPA, INIFAP, CENID, COMEF, Mexico.

Statistical Analysis System (SAS Institute Inc.). (2008). SAS version 9.2. Cary, NC, USA: Author.

Shipka, M. P., Rowell, J. E., y Sousa, M. C. 2007. Steroid hormone secretion during the ovulatory cycle and pregnancy in farmed Alaskan reindeer. *Journal of Animal Science*, 85: 944-951.

Soto, M. A., Salame-Méndez, A., Ramírez-Pulido, J., Yáñez, L., y Armenta, M. A. 2004. Valoración de hormonas esteroides en heces de una pareja de lobo mexicano en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana*, 20 (2):187-196.

Taillon, J., y Côté, S. D. 2008. Are faecal hormones levels linked to winter progression, diet quality and social Rank in Young ungulates? An experiment with white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) fawns. *Behavioural Ecology and Sociobiology Journal*, 62: 1591-1600.

Tolleson, D. R., Randel, R. D., Stuth, J. W., y Neuendorff, D. A. 2005. Determination of sex and species in red and fallow deer by near infrared reflectance spectroscopy of the faeces. *Small Ruminant Research*, 57: 141-150.

Vega, D. M., Gutiérrez, M. V., y Reyes, J. L. 2016. Densidad poblacional de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en dos UMAs de Durango, México. *Vidsupra*, 8(2):24-28.

Yoshimura, S., Sakamoto, S., Kudo, H., Sassa, S., Kumai, A., y Okamoto, R. 2003. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids*, 68(5):439–445.

**CAPITULO IV. VARIABILIDAD GENÉTICA DENTRO Y ENTRE POBLACIONES DE
VIDA LIBRE Y ENCIERRO**

4.1 INTRODUCCIÓN

El venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) es una especie de la familia Cervidae y es nativa del continente americano (Ambriz et al. 2016). Con excepción de las áreas desérticas y montañosas del oeste de Estados Unidos y la península de Baja California (Mathis et al. 2017), el venado se encuentra presente desde Canadá hasta Bolivia y Venezuela, siendo una de las especies de ungulados con distribuciones latitudinales más amplias (De la Rosa et al. 2012). Las características morfológicas del venado cola blanca en América son variables (Hernández, 2014). El venado difiere en el tamaño corporal, el color del pelaje, y otras características físicas a través de todo su rango de distribución (De la Rosa et al. 2012). Sin embargo, la clasificación taxonómica de subespecies de venado cola blanca han sido objeto de controversias, principalmente por la falta de estudios moleculares para identificar subespecies como filogenéticamente diferentes (Hernández, 2014). Anteriormente los criterios para la definición de subespecies en el venado cola blanca se basaron en las características morfológicas y la zona geográfica en la que se encuentran dentro de la distribución natural de la especie. La designación de subespecies de los cérvidos de América generalmente tiene que estar en concordancia con sus relaciones filogenéticas pero en realidad no están bien definidas (Cronin et al. 2005). A pesar de ser un género de gran importancia (*Odocoileus*) y de ser de gran interés desde el punto de vista cinegético y cultural, se ha hecho poco progreso en cuestiones de sistemática respecto a estos venados (Gutiérrez et al. 2017). Basados en características morfológicas se han identificado 38 subespecies y 14 de ellas se encuentran en territorio mexicano. Las subespecies presentes en el norte del país tienen características estéticas, como la talla corporal y astas ramificadas que los hacen populares para el deporte de la cacería, lo cual provee ingresos económicos significativos en los estados donde ellos se distribuyen (Ambriz et al. 2016).

Desde que se crearon las unidades de manejo para la conservación de vida silvestre (UMA), la Ley General Vida Silvestre (DOF 2002) ha promovido la diversificación de la producción animal y permite la explotación del venado cola blanca aprobando su

conservación en áreas encerradas para la preservación (LGVS, 2013). Motivados por esta oportunidad, algunos productores han cambiado a la reproducción de venado para la actividad cinegética. Sin embargo, la creación de UMAs puede inducir a la transición de poblaciones silvestres a poblaciones en encierro y pueden intensificar el manejo (Hernández et al. 2014). Teóricamente, esta práctica puede desatar importantes fenómenos sobre la variación genética, promoviendo un efecto de consanguineidad y reduciendo el flujo genético entre poblaciones (Askari et al. 2011). Debido a las demandas de trofeos, las subespecies del norte están siendo expandidas más comúnmente de sus hábitats originales hacia el centro o sur de México. Sin embargo, esas translocaciones podrían resultar en la pérdida de la identidad genética de los venados locales que han desarrollado características fenotípicas de acuerdo a su hábitat a través de miles de años de evolución (Ambriz et al. 2016). Esto pone en duda el futuro de la diversidad genética de esta especie, dado que no hay estudios que fundamenten las diferencias genéticas entre las subespecies, ni de sus tamaños poblacionales, mediante las cuales se pueden establecer mejores estrategias de conservación (Logan et al. 2007). Las subespecies representan un patrimonio biológico importante de la biodiversidad que posee un país, por lo que deberían ser consideradas dentro de la temática de manejo y conservación de la fauna silvestre como subespecies endémicas y no ser translocadas o introducidas en otras áreas donde serían consideradas como exóticas y perder el potencial genético de ellas (Hernández, 2014).

En la Sierra Madre Occidental de Durango existen poblaciones de venado cola blanca que histórica y geográficamente han sido clasificadas como subespecie *couesi* (Galindo-Leal y Weber, 1998). Según Halls (1984), esta subespecie cuenta con mayor la distribución geográfica en México, y está presente por toda la Sierra Madre Occidental desde Sonora hasta el norte de Jalisco (Villarreal, 1999). A pesar de que el venado cola blanca es una de las especies de fauna silvestre más estudiadas, las poblaciones presentes en la serranía del estado de Durango no han sido objeto de estudio desde el punto de vista genético. Más recientemente, los productores han comenzado el establecimiento formal de UMAs para venado para aprovechamiento (cacería) o ecoturismo, ya sea en encierro o vida libre. La

información sobre aspectos genéticos es relevante para el manejo y la conservación de las especies, dado que es importante integrar los datos genéticos poblacionales en programas de manejo sustentable y conservación con la finalidad de hacer más efectivas las decisiones de conservación de largo plazo (Rodríguez et al. 2015). Varios marcadores que se basan en PCR son capaces de estimar la diversidad genética de las poblaciones. Los ISSR (Inter Simple Sequence Repeats por sus siglas en inglés) son marcadores arbitrarios que se amplifican mediante PCR en la presencia de un oligonucleótido complementario a un motivo microsatélite. Cada banda corresponde a una secuencia de ADN delimitada por dos microsatélites invertidos. Son rápidos y fáciles de manejar (Fahmi y Al-Otaibi, 2011). Los marcadores ISSR están caracterizados por ser de herencia dominante, y su polimorfismo es analizado por la presencia o ausencia de bandas (dominancia y recesividad). El uso de marcadores tipo ISSR no requiere de información preliminar de la secuencia de ADN que se quiere estudiar (Kol y Lazebny, 2006). Los ISSR han sido recientemente utilizados en diferentes estudios de la diversidad genética y la estructura de diferentes artiodáctilos y otros mamíferos (Kol y Lazebny, 2006; Askari, et al 2011; Fahmi y Al-Otaibi, 2011; Jiejun et al. 2013; Rodríguez et al. 2015). Este tipo de marcadores son especialmente valiosos para la evaluación de poblaciones de una misma especie bajo manejo diferencial como lo es el encierro contra animales en vida libre.

Se cree entonces que la variabilidad genética dentro de una población en encierro se verá afectada por la limitación del intercambio de animales y por lo tanto del flujo de genes. Por lo que el objetivo de este trabajo fue corroborar la subespecie de venado cola blanca, con individuos presentes en la Sierra Madre Occidental de Durango, mediante la secuenciación del gen mitocondrial *cit b* y estimar la variabilidad genética dentro y entre dos poblaciones (UMA), de vida libre y encierro con la amplificación de marcadores ISSR, para analizar el efecto del encierro sobre la estructura genética de las poblaciones y tomarlo en cuenta en las actividades de manejo y conservación de las poblaciones en esta área.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Área de estudio

La población en vida libre se presentó en la UMA Salvador Allende. La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 2.52 venados/km² (Vega et al. 2016). Esta UMA se encuentra ubicada entre las coordenadas 24° 71'- 24° 05' N y 104° 51'-104° 56' O, con un rango de elevación de 2200-2680 m y un clima templado semi frío y templado semi húmedo (Martínez y Martínez, 2010). Esta UMA cuenta con un área de 3200 ha con libre movimiento de venado cola blanca donde es permitida la actividad cinegética. Los principales tipos de vegetación en ésta UMA fueron bosque de pino-encino, bosque de pino y bosque de encino (González et al. 2007). La población en encierro estuvo presente en la UMA Molinillos. La densidad poblacional estimada en el invierno fue de 4.58 venados/km² (Vega et al. 2016). Esta UMA está localizada en las coordenadas 23° 36'- 23° 39' N y 104° 59'- 105°06' O, con una elevación de 2000-2680 msnm. Esta UMA comprende un área de 300 ha cercadas por malla venadera y no existe actividad cinegética. El clima en este sitio es templado subhúmedo y templado semifrío. Los principales tipos de vegetación son bosque de pino, bosque de encino-pino, bosque de encino y pastizal (Rosales y Villanueva, 2014).

Se colectaron grupos fecales frescos de venado cola blanca en dos Unidades de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA) localizadas en el municipio de Durango, Durango, México. En muestreos previos al periodo de colecta, se establecieron los sitios con mayor actividad de venado cola blanca para cada UMA. Se recorrieron dos transectos de 1000 m de largo por 2 m de ancho durante cada visita de muestreo. Se colectaron grupos fecales frescos, reconocidos por la humedad de la mucosidad externa y la suavidad de los pellets. De cada grupo se colectaron de 20-30 de los pellets superiores en tubos Falcon® de 50 ml con etanol al 96%. La otra parte de los pellets se guardaron en bolsas plásticas y se mantuvieron a -20°C. Los grupos fecales se identificaron por UMA, fecha y geolocalización.

4.2.2. Extracción de ADN fecal

Se extrajo ADN fecal a partir de 0.5 g de los pellets fecales mantenidos en congelación mediante el kit comercial ISOLATE Fecal DNA Kit de Bioline®. La extracción de ADN se llevó a cabo bajo las instrucciones del fabricante. Como controles positivos, se utilizaron tres muestras de tejido de venados machos provenientes de UMA Salvador Allende. La extracción ADN de las muestras de tejido se realizó mediante método CTAB.

4.2.3. Amplificación y secuenciación del gen mitocondrial cit *b*

Con el fin de analizar y corroborar la subespecie que con la que se está trabajando, se amplificó el gen mitocondrial cit *b* mediante los oligonucleótidos para PCR MH104: TTGTTCTTCATCTCTGGTTTACAAGAC y ML103: GACTAATGATATGAAAAA CCATCGTTG (Świslocka et al. 2013). Las concentraciones finales para la reacción de PCR fueron 200-250 ng/μL ADN, 2.5 mM MgCl₂, 0.6 pM primers y 1 U de Taq DNA Polimerasa. El perfil térmico para la amplificación fue 3 min a 95°C de desnaturalización inicial, 30 ciclos de 45 seg a 95°C, 1 min a 58°C y 1.50 min a 72°C, y 15 min a 72°C de elongación final. Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. Las bandas formadas fueron cortadas de los geles y purificadas para secuenciación con isotiocianato de guanidina (4.5 M). Se utilizaron 250 ng/μL de ADN purificado para reacción de secuenciación. El producto de la reacción de secuenciación se purificó mediante el método enzimático usando Big Dye® Terminator (Applied Biosystems®) y Magnesil® Green (Promega®). Cada muestra fue secuenciada en ambas direcciones (forward y reverse) en secuenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®). Los electroferogramas de todas las secuencias fueron alineados y editados en el programa CHROMAS PRO v. 2.1.8. Para comprobar la identidad e integridad de las secuencias obtenidas, se utilizó la herramienta BLAST del NCBI. Además, se obtuvieron de GeneBank las secuencias disponibles de subespecies de venado cola blanca reportadas para México y Centroamérica (Tabla 4.1), de *Odocoileus hemionus* (venado bura) y *Rangifer tarandus* (reno) como grupo externo. Las secuencias obtenidas así como las

consultadas en GeneBank fueron asignadas a un grupo según su área de localización (Tabla 4.1). Las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo Clustal-W en el programa MEGA v. 6. Se construyó un dendograma de similitud mediante el algoritmo del vecino más cercano (neighbor-joining) y se calcularon las distancias genéticas pareadas empleando Kimura-2-parámetros en el programa MEGA v. 6.

Tabla 4.1. Listado de secuencias de cit *b* y su identificación de GeneBank utilizados para el análisis de similitud de subespecies y grupo genético al cual fueron designados para el análisis (SMOc= Sierra Madre Occidental).

GeneBank ID	Autor	Subespecie o sitio de colecta de la muestra	Grupo
MK188897	Este trabajo	<i>O. v.</i> (Durango)	SMOc
MK188898	Este trabajo	<i>O. v.</i> (Durango)	SMOc
MK188899	Este trabajo	<i>O. v.</i> (Durango)	SMOc
MK188900	Este trabajo	<i>O. v.</i> (Durango)	SMOc
MK188901	Este trabajo	<i>O. v.</i> (Durango)	SMOc
MK188902	Este trabajo	<i>O. v.</i> (Durango)	SMOc
HQ332445	Seabury et al. 2011	<i>O. v. texanus</i>	Golfo-Norte
KM612271	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. veraecrucis</i>	Golfo-Norte
KM612272	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. yucatanensis</i>	Sur
KM612273	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. texanus</i>	Golfo-Norte
KM612274	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. sinaloe</i>	Pacífico
KM612275	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. couesi</i>	Pacífico
KM612276	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. toltecus</i>	Centro-Norte
KM612277	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. oaxacensis</i>	Sur
KM612278	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. mexicanus</i>	Centro-Norte
KM612279	Ambriz et al. 2016	<i>O. v. acapulcensis</i>	Sur
KY928666	Gutiérrez et al. 2017	<i>O. v.</i> (Chihuahua)	Centro-Norte
KX171728	Mathis et al. 2017	<i>O. v.</i> (Tamaulipas)	Golfo-Norte
KX171727	Mathis et al. 2018	<i>O. v.</i> (Tamaulipas)	Golfo-Norte

KX171718	Mathis et al. 2019	<i>O. v.</i> (Florida)	Florida
DQ673136	Cronin et al. 2006	<i>O. v. texanus</i>	Golfo-Norte
KY928670	Gutiérrez et al. 2017	<i>O. v. yucatanensis</i>	Sur
FJ188824	Latch et al. 2009	<i>O. hemionus</i>	Bura
HM222707	Naidu et al. 2012	<i>O. hemionus</i>	Bura
HQ122586	Herrero et al. 2010	<i>O. hemionus</i>	Bura
KY928663	Gutiérrez et al. 2017	<i>O. v.</i> (Nicaragua)	Sur
KY928669	Gutiérrez et al. 2017	<i>O. v.</i> (Honduras)	Sur
FJ188750	Latch et al. 2009	<i>O. hemionus</i> (B. C.)	Bura
FJ188754	Latch et al. 2009	<i>O. hemionus</i> (B. C. S.)	Bura
FJ188809	Latch et al. 2009	<i>O. hemionus</i> (Chihuahua)	Bura
FJ188881	Latch et al. 2009	<i>O. hemionus</i> (Sonora)	Bura
AY726678	Cronin et al. 2005	<i>Rangifer tarandus</i> (Canadá)	Reno
AY726676	Cronin et al. 2005	<i>Rangifer tarandus</i> (Canadá)	Reno
AY726690	Cronin et al. 2005	<i>Rangifer tarandus</i> (Alaska)	Reno

4.2.4. Amplificación de marcadores ISSR

Al inicio del estudio se utilizaron 9 marcadores microsatélites caracterizados por Anderson et al. (2002): INRA01, Cervid1, N, Q, D, BM203, BM6506, BM4208 y OarFCB193. Los oligonucleótidos “forward” estuvieron marcados con fluorescencia mediante el uso del primer M13 universal (FAM-TGT AAA ACG ACG GCC AGT) (Schuelke, 2000). Los marcadores fueron amplificados mediante PCR y los productos purificados para su genotipificación mediante el uso de Magnesil Green® y analizados en secuenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems®). Sin embargo, no se obtuvieron resultados adecuados para el análisis de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones ya que la incidencia de alelos nulos fue muy alta (datos no mostrados).

Entonces, se optó por la amplificación de 7 marcadores ISSR (Tabla 4.2, Figura 4.1). Las concentraciones finales para PCR para todos los marcadores fueron 50 ng/μL de ADN, 1.5 Mm de MgCl₂, 0.6 pM primers, 1 U/ μL de Taq DNA Polimerasa.

El perfil térmico fue 94°C por 5 min de desnaturalización inicial, 45 ciclos de 94°C por 1 min, temperatura de alineamiento según marcador por 1 min y 72°C POR 45 seg, y 72°C por 10 min de elongación final. Cada reacción de PCR incluyó el mismo control positivo y agua como control negativo. Los productos de PCR fueron observados en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio mediante luz ultravioleta. Las fotografías de los geles fueron analizadas en el programa PhyElph v. 1.4 y se construyó una matriz binaria de presencia y ausencia de loci en todas las muestras. Se obtuvo la heterocigocidad, frecuencias alélicas y % de loci polimórficos en el programa TFPGA v. 1.3. Se realizó AMOVA con 999 permutaciones en el programa GenAlEx. Para evaluar la distancia genética entre grupos se utilizó la distancia estándar de Nei (1978) en el programa TFPGA v. 1.3. Finalmente, se realizó una asignación genotípica mediante métodos bayesianos, bajo un modelo de análisis con 100 000 cadenas de Markov Monte Carlo en la fase previa a la corrida y 500 000 cadenas de Markov Monte Carlo en la corrida, y un rango de posibles clústers (k) de 1-5 con 20 simulaciones por cada k mediante el programa STRUCTURE v. 2.3.4. Los resultados arrojados por STRUCTURE fueron analizados en STRUCTURE HARVESTER para obtener el número más probable de k usando el valor modal de Δk (Evanno et al. 2005). Los datos arrojados sobre las probabilidades de k fueron graficados en CLUMPAK. También se realizó un dendograma de agrupamiento mediante algoritmo de Ward, distancia euclidiana con 200 repeticiones en el programa PAST3.

Tabla 4.2. Listado de marcadores ISSR utilizados para el análisis de variabilidad genética entre y dentro de poblaciones (UMA) de Durango, México.

Primer	Secuencia	T° de alineamiento	Referencia
ISSR1	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	49°	Ruíz et al. 2018
ISSR2	GAGGAGGAGGAGGAGGAGC	54°	Babii et al. 2015
ISSR3	CACCACCACCACCACCACG	54°	Escobar-Saucedo et al. 2018
ISSR4	ACCACCACCACCACCACCG	54°	Fahmi y Al-Otaibi 2011
ISSR5	BDBACAACAACAACAACA	47°	Machkour-M'Rabet et al. 2009
ISSR6	WBGACAGACAGACAGACA	49°	Roux et al. 2007
ISSR7	AGCAGCAGCAGCAGCGA	49°	Escobar-Saucedo et al. 2018

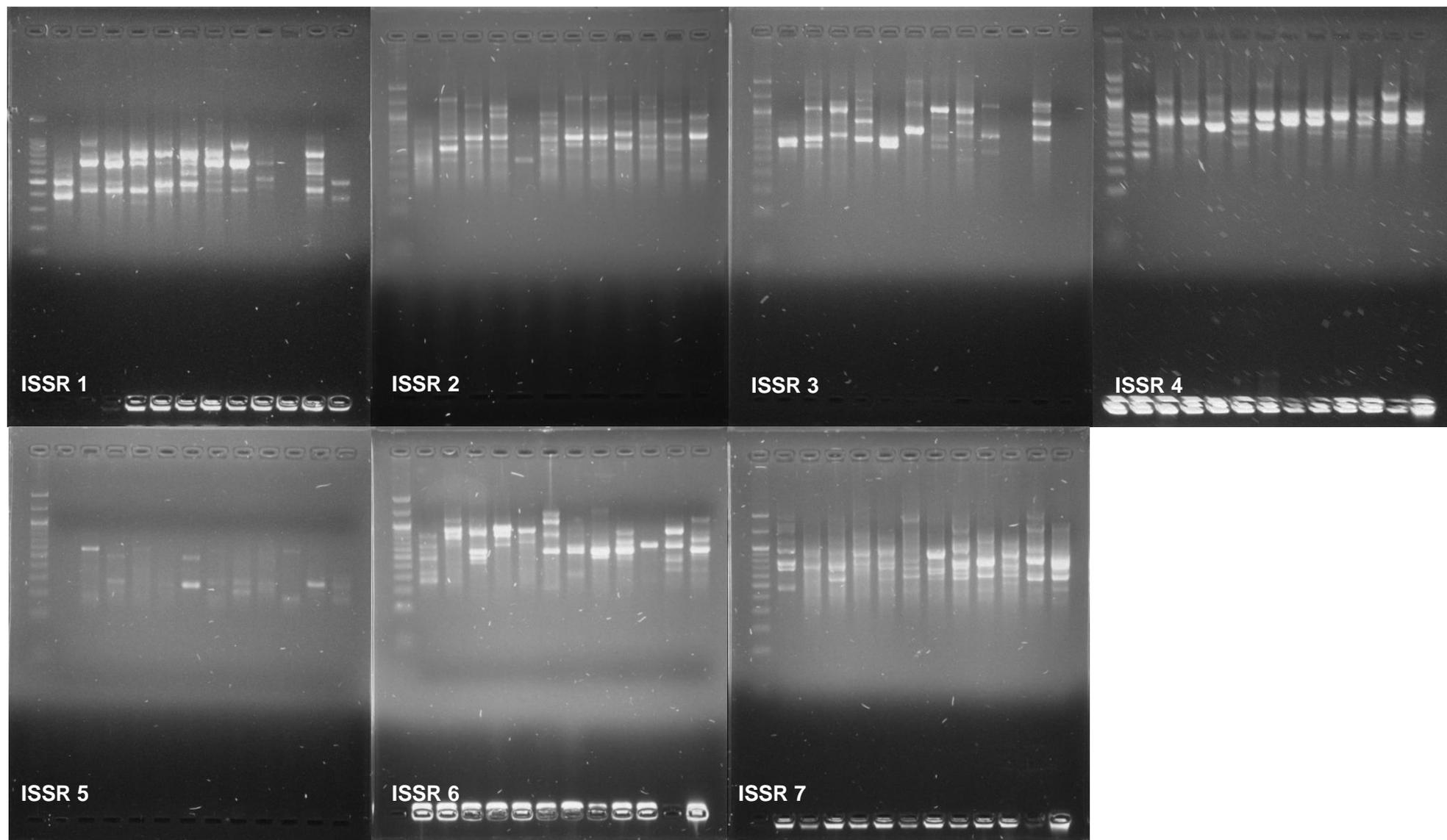


Figura 4.1. Fotografías de los loci amplificados a partir de los marcadores ISSR (muestras 57-67 pertenecientes a Molinillos).

4.3 RESULTADOS

Se obtuvieron secuencias de gen *cit b* de 644 pb de 6 individuos. Tres muestras de Salvador Allende provinieron de muestras de tejido (SAm, SAp, SAc) y 3 muestras de Molinillos de heces fecales (Mo53, Mo55, Mo183). Las distancias genéticas pareadas de Kimura-2- parámetros entre grupos calculadas a partir de las secuencias entre grupos tuvieron un rango de 4.1% a 1.2%. Los grupos más distantes fueron el grupo SMOc y el grupo Florida. Los grupos con más cercanía fueron Pacífico con Bura (1.0%), Golfo-Norte con Centro-Norte (1.2 %) y Centro-Norte con Bura (1.2 %). El grupo SMOc estuvo más cercano a los individuos del grupo Pacífico (1.6%) (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Distancias genéticas pareadas Kimura-2- parámetros entre grupos calculadas a partir de secuencias del gen mitocondrial *cit b*.

Grupo 1	Grupo 2	Distancia genética
SMOc	Pacífico	0.016
SMOc	Golfo-Norte	0.027
Pacífico	Golfo-Norte	0.017
SMOc	Sur	0.024
Pacífico	Sur	0.014
Golfo-Norte	Sur	0.020
SMOc	Centro-Norte	0.024
Pacífico	Centro-Norte	0.013
Golfo-Norte	Centro-Norte	0.012
Sur	Centro-Norte	0.018
SMOc	Florida	0.041
Pacífico	Florida	0.025
Golfo-Norte	Florida	0.029
Sur	Florida	0.027
Centro-Norte	Florida	0.028

SMOc	Bura	0.022
Pacífico	Bura	0.010
Golfo-Norte	Bura	0.014
Sur	Bura	0.018
Centro-Norte	Bura	0.012
Florida	Bura	0.027

La distancia genética dentro de los grupos fue baja, de 1.6% a 0.16%, indicando consistencia dentro de los grupos (Tabla 4.4). El dendograma de similitud mediante el algoritmo del vecino más cercano mostró un grupo marcado formado por las muestras de este estudio. Las secuencias provenientes de individuos muestreados en Texas (*O. v. texanus*), Veracruz (*O.v veraecrucis*) y Tamaulipas formaron otro grupo. Todos los individuos *O. hemionus* y un individuo del grupo Centro-Norte (*O. v. toltecus*) se agruparon en el grupo Bura. Todos los individuos originarios del sur (*O. v. acapulcensis*, *oaxacensis*, *yucatanensis*) e individuos provenientes de Sudamérica formaron un grupo definido. Finalmente los individuos *O.v. couesi* y *O. v. sinaloe* y un individuo proveniente de Chihuahua formaron el grupo Pacífico. El grupo SMOc estuvo más cercanamente relacionado con el grupo Pacífico y más alejado del Golfo-Norte (Figura 4.2).

Tabla 4.4. Distancias genéticas pareadas Kimura-2- parámetros dentro de cada de uno de los grupos analizados calculadas a partir de secuencias de gen mitocondrial *cit b*.

Grupo	Distancia genética
SMOc	0.0016
Golfo-Norte	0.0035
Sur	0.0126
Pacífico	0.0016
Centro-Norte	0.0163

Florida	-
Bura	0.0045

Figura 4.2. Dendograma de similitud de grupos genéticos a partir de secuencias del gen mitocondrial *cit b* en subespecies de venado cola blanca.

Los marcadores microsatélites mostraron exceso de homocigosidad en cinco de los nueve microsatélites empleados, por lo que el alto número de alelos nulos no permitió el uso de estos marcadores para determinar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones.

Con los siete marcadores ISSR se pudieron amplificar 147 loci, ISSR 1 (22), ISSR2 (20), ISSR3 (21), ISSR4 (24), ISSR5 (21), ISSR6 (17) y ISSR7 (21). La heterocigosidad calculada bajo la suposición de equilibrio de Hardy-Weinberg fue de 0.1553 para la UMA Salvador Allende y 0.1858 para Molinillos. El % loci polimórficos fue 85.71% para Salvador Allende y 97.95%. La distancia genética pareada de Nei (1972) calculada entre ambas poblaciones fue de 0.75%. La diferenciación entre los dos grupos se midió mediante el coeficiente de coancestría $\theta = 0.0338$ (equivalente a F_{st}). El AMOVA mostró que la variación genética está distribuida mayormente dentro de cada grupo (93% de la variación) mientras que el 7% se debió a las diferencias entre grupos.

La evaluación de los valores de k obtenidos en el programa STRUCTURE mediante el método Δk mostró que el valor de k más probable fue $k = 2$, que en términos generales correspondieron a cada una de las UMA. El grupo formado por individuos de Molinillos mostraron mayor probabilidad de ser asignados a Molinillos. Mientras que los individuos de Salvador Allende no mostraron una alta probabilidad de asignación a su población (Figura 4.3).

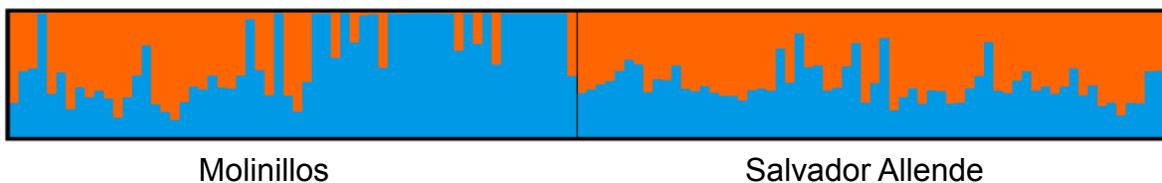


Figura 4.3. Diagrama del programa STRUCTURE con la probabilidad de correcta asignación de cada individuo a su población de origen.

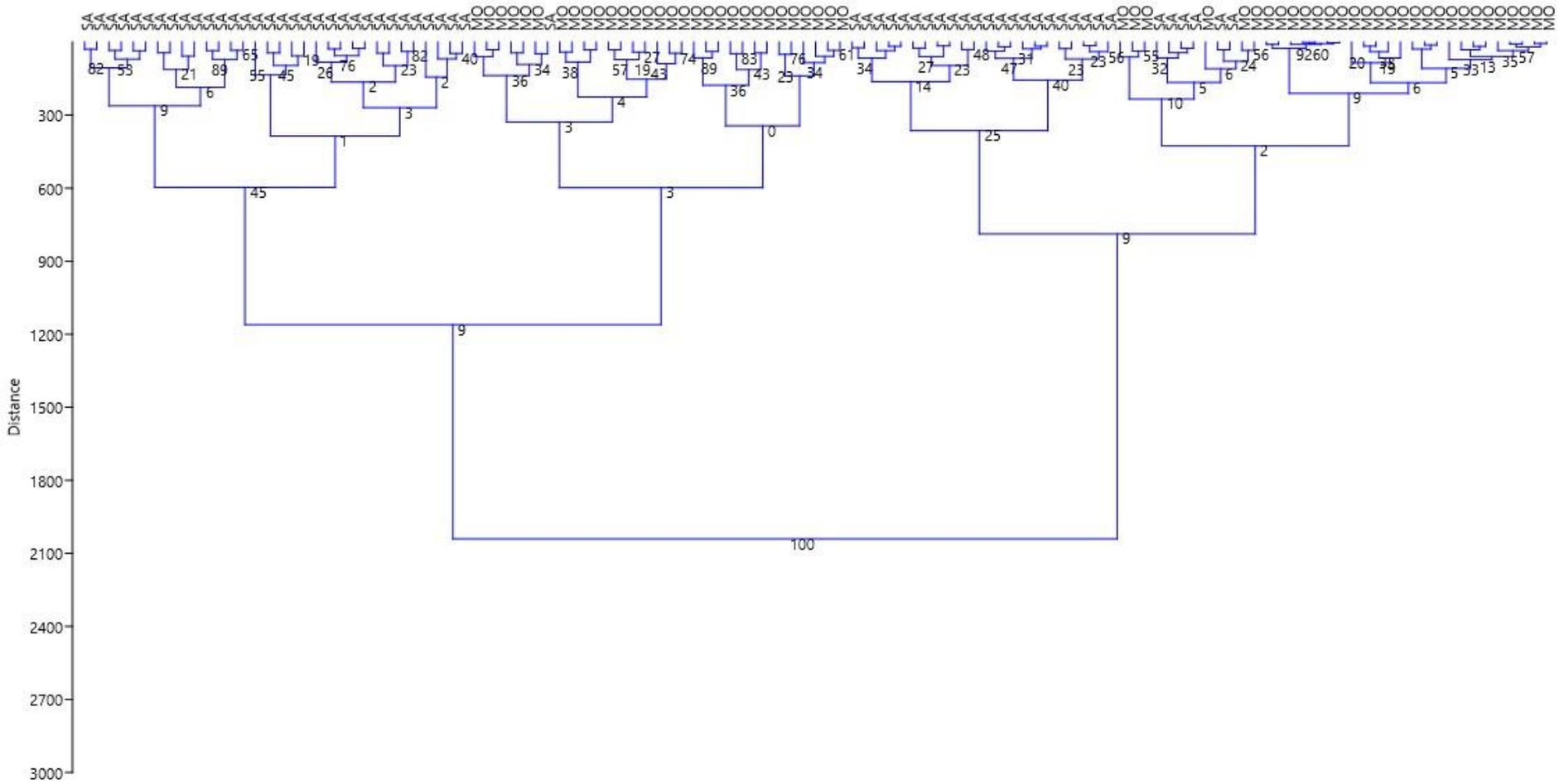


Figura 4.4. Dendrograma de agrupación de los individuos de las poblaciones de vida libre (SA) y encierro (Mo) mediante algoritmo de Ward.

4.4 DISCUSIÓN

Con la utilización del gen mitocondrial *cit b* se tiene la ventaja de obtener las secuencias relativamente fácil a partir ADN degradado (Gutiérrez et al. 2017), como lo puede ser de ADN fecal. Además, estudios previos han mostrado que los análisis con *cit b* pueden aclarar las inconsistencias taxonómicas de los mamíferos causadas por una exploración insipiente de caracteres morfológicos (Hernández, 2014). Este gen evoluciona relativamente rápido, pero es lo suficientemente estable para ofrecer información a distintos niveles taxonómicos (Gutiérrez et al. 2017). Además, existe un gran número de secuencias de *cit b* disponibles en GenBank para complementar el análisis.

Los análisis de las secuencias de *cit b* mostraron que el venado cola blanca presente en Sierra Madre Occidental de Durango forma un grupo separado de las demás subespecies reportadas para México. Los individuos clasificados geográficamente en este estudio como Golfo-Norte y Sur, formaron grupos definidos con las subespecies de cada zona. Los individuos de las subespecies provenientes de la zona clasificada como Golfo-Norte fueron más cercanos en este y otros estudios, por ejemplo, Ambriz et al. (2016), encontraron más cercanía de individuos *O. v. texanus* con *O. v. veraecrucis*, y marcadamente se diferenciaban de subespecies del sur (*O. v. acapulcencis*, *O. v. oaxacencis*, *O. v. yucatanensis*) y las subespecies *O.v. sinaloe* y *O. v. couesi*. Logan et al. (2007) encontraron haplotipos compartidos entre individuos provenientes del noreste de México (*O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. carminis* y *O. v. miquihuanensis*). Por su parte, De la Rosa et al. (2012), mediante el uso de microsatélites, encontraron más cercanía entre la subespecies *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis* y *O. v. carminis*, mientras que estas mismas estuvieron mucho más alejadas de *O. v. yucatanensis* y *O. v. sinaloe*. Por su parte, Hernández (2014), mediante la secuenciación de región control, reportó que la subespecie *O.v. couesi* fue cercana a *O.v. miquihuanensis* (0.003), sin embargo las muestras fueron tomadas de individuos provenientes de Zacatecas y Aguascalientes para *O.v. couesi* y Zacatecas y San Luis Potosi, México, para *O. v. miquihuanensis*. Sin embargo, las poblaciones de venado cola blanca de la Sierra

Madre Occidental de Durango no habían sido antes comparadas y estudiadas genéticamente.

Por otro lado, en este estudio todas las secuencias pertenecientes a *O. hemionus* formaron un solo grupo, aunque un individuo de la subespecie *O. v. toltecus* y otro individuo proveniente en Chihuahua, México (presumiblemente de la subespecie *O. v. carminis*) se agruparon también con el grupo Bura. Gutiérrez et al. (2017) sugieren que *O. hemionus* está más cercanamente relacionado con *O. virginianus* que incluso de aquellos *O. hemionus* reportados como otras subespecies presentes a mayores latitudes (*O. h. columbianus* o *O. h. sitkensis*). Esto podría ser consecuencia de la hibridación que existe entre las dos especies sobre todo en la parte centro-norte del país donde convergen ambas especies (De la Cruz, 2016).

La diferenciación de las poblaciones de venado cola blanca de la Sierra Madre Occidental con el resto de las subespecies puede deberse a los cambios en el clima al final del Pleistoceno, que resultaron en una distribución irregular de venados cola blanca (Ellsworth et al. 1994). Estos cambios provocaron que estos individuos se mantuvieran en una elevación sobre el nivel del mar superior y aislada con un régimen de lluvias adecuado que pudo sostener individuos todo el año sin la necesidad de desplazarse, comparados con aquellos individuos presentes en climas más secos (Latch et al. 2009).

Respecto al uso de marcadores microsatélites, De la Rosa et al. (2012) observaron un alto nivel de alelos nulos debido a la poca heterocigocidad presentada en ciertos loci para la subespecie *O. v. yucatanensis*, mientras que la subespecie *O. v. texanus* presentó una alta variabilidad genética en todos los loci. A su vez, Mathis et al. (2017) encontraron alelos nulos en varios loci microsatélites en muestras de animales provenientes de Cuba y el Caribe, comparadas con animales provenientes del sur de Estados Unidos. La frecuencia de alelos nulos en individuos de la misma especie tienden a incrementar con el aumento de la distancia filogenética que exista con la especie focal de la cual se aislaron esos marcadores (De la Rosa et al. 2012). Esta pudo ser la razón por la cual los marcadores microsatélites utilizados en este estudio mostraron un alto grado de alelos nulos por baja heterocigocidad y por ello,

no fueron informativos para el análisis de variabilidad genética dentro y entre poblaciones.

Mediante el análisis con marcadores ISSR se obtuvo que la población en encierro (Molinillos) tuvo mayor nivel de heterocigocidad y mayor porcentaje de loci polimórficos que la población en vida libre (Salvador Allende). Teóricamente, la domesticación de los animales tiene el potencial de disminuir la variación genética en comparación a los de vida libre dado al efecto fundador, deriva génica y selección en poblaciones que no tienen un tamaño efectivo de población alto. La variación genética es importante para mantener el desempeño óptimo y la potencial adaptabilidad de las poblaciones tanto en vida libre como cautiverio (Hartl et al. 2003). Sin embargo, el venado cola blanca se ha caracterizado por su alta variabilidad dentro y entre poblaciones (Kollars et al. 2004). Además, se ha reportado en varias especies de cérvidos domesticados, como el elk (*Cervus elaphus*), tener niveles de variabilidad genética comparables con poblaciones silvestres, probablemente resultantes de un grupo fundador muy variado, mutaciones recientes u otros factores (Cronin et al. 2009). Por su parte, Mathis et al. (2017) reportaron el caso de una población de venado cola blanca introducida en Cuba con altos niveles de variabilidad genética y bajo nivel de endogamia, sugiriendo que no existió un solo grupo fundador pequeño si no un gran grupo de individuos con gran variabilidad genética. Budd et al. (2018) encontraron en poblaciones de venado cola blanca en Missouri, USA, que estuvieron bajo severa pérdida de individuos o situaciones de cuellos de botella, altos niveles de variabilidad genética dentro de los sitios estudiados y bajos niveles de diferenciaciones entre sitios. Este podría ser el caso de Molinillos, donde el encierro de los individuos se inició con un cierto número de individuos con alta variabilidad genética. La población de Molinillos se formó mediante la atracción de animales de vida libre con suplemento alimenticio que se quedaron dentro del encierro conforme la malla venadera se colocó, sin previo conocimiento de su genealogía, manejo o selección. Por otro lado, se cree que la cacería selectiva podría tener un efecto sobre la variabilidad genética en las poblaciones ya que existen genotipos en loci de enzimas específicas que están significativamente relacionadas con mayor

ramificación en astas y lo largo de ellas, y al disminuir su presencia del pool génico en la población podría alterar significativamente las frecuencias alélicas (Hartl et al. 2003). Además, la cacería afecta la estructura social y los patrones reproductivos en venado cola blanca, lo cual afecta la variación temporal de las frecuencias genotípicas o alélicas (Kollars et al. 2004). Dado que en Salvador Allende se permite la cacería con preferencia en los machos, podría verse afectada la heterocigocidad y el número de loci polimórficos.

Aunque la población en encierro muestra un alto nivel de variabilidad genética, el análisis mediante STRUCTURE, muestra que existe una marcada separación de los individuos de Molinillos con los de Salvador Allende en dos grupos ($k=2$), indicando que el encierro comienza la diferenciación genética entre esos grupos y evita el flujo génico, y esto podría tener un efecto a largo plazo. Igualmente el dendograma de similitud de Ward, igualmente marcan dos grupos genéticos. Aunque el venado cola blanca se adapte bien a la urbanización y fragmentación, las modificaciones al hábitat creadas por el hombre inhiben el flujo genético (Locher et al. 2015). La reducción genética dentro de las poblaciones y el incremento de diferenciación genética entre ellas se vuelven bastante marcadas cuando las poblaciones son mantenidas en confinamiento durante varias generaciones (Hartl et al. 2003). Si esas poblaciones fueron fundadas por un pequeño número de individuos y existe un crecimiento exponencial que supere el tamaño efectivo de población ocurrirán cambios dramáticos en las frecuencias alélicas (Świslocka et al. 2013). En general, un bajo tamaño efectivo de población lleva a un incremento en la endogamia y una disminución en la variabilidad genética que puede causar una reducción en el desempeño de la población por depresión por endogamia (Brommer et al. 2015). Tanto procesos naturales como antropogénicos que afectan las características físicas y bióticas del paisaje tiene influencia sobre la demografía de las poblaciones silvestres y el movimiento de los individuos, esos procesos pueden influir en los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y el grado de la variación espacial en la frecuencia de los genes (Locher et al. 2015).

Los niveles de heterocigocidad calculada mostrados por las poblaciones de este trabajo (0.155 Salvador Allende, 0.185 Molinillos) con los marcadores ISSR, se pueden considerar altos, con capacidad de mantener a las poblaciones genéticamente viables por algunas generaciones. Sin embargo, estos datos deben ser tomados en cuenta en el manejo genético de las poblaciones mediante de introducción de individuos a las poblaciones. Los valores de heterocigocidad se encontraron dentro de los rangos mostrados en otros estudios con mamíferos utilizando marcadores ISSR por ejemplo oryx árabe (*Oryx leucoryx*) (0.09-0.36) (Fahmi y Al-Otaibi, 2011), borrego cimarrón (*Ovis canadiensis*) (0.262) (Rodríguez et al. 2015) y ciervo de agua chino (*Hydropotes inermis*) (0.1571 -0.1891) (Jiejun et al. 2013).

Los ISSR mostraron un alto nivel de loci y alta reproducibilidad. Estos marcadores son confiables ya que permiten evaluar a un gran número de loci y varios organismos, y son útiles para detectar patrones genéticos que pueden ser resultado de la relativamente reciente colonización y origen de las poblaciones (Askari et al. 2011). Los ISSR han probado ser eficientes en análisis de diferenciación genética y diversidad de mamíferos y otros organismos (Rodríguez et al. 2015).

4.5 CONCLUSIONES

El venado cola blanca presente en la Sierra Madre Occidental representa un pool genético poco estudiado que debe ser objetivo de más análisis, para un adecuado manejo y conservación. Por lo anterior, el manejo de las poblaciones de venado cola blanca de la zona que se encuentren ya sea en un encierro o en vida libre, deberá considerar el estado genético de los individuos, sobre todo si se desea realizar introducción de individuos para elevar la variabilidad genética de las poblaciones.

Poblaciones mantenidas en encierro no siempre representan la pérdida de variabilidad genética y aumento de endogamia, siempre y cuando esa población

haya sido fundada por individuos con alta variabilidad genética y exista un manejo adecuado.

La cacería basada en la selección de los animales más grandes y de astas más ramificadas pueden llevar a la disminución de la variabilidad genética en las poblaciones de venado cola blanca.

El estudio de las poblaciones mediante la secuenciación de genes mitocondriales como *cit b* permitió el análisis de divergencia entre individuos de la misma o diferente especie en una gran escala de tiempo. Mientras que los ISSR fueron útiles para analizar las variaciones entre y dentro de las poblaciones dadas por cambios genéticos más recientes.

4.6 REFERENCIAS

Anderson, J. D., Honeycutt, R. L., Gonzales, R. A., Gee, K. L., Skow, L. C., y Gallagher, R. L. 2002. Development of microsatellite DNA markers for the automated genetic characterization of white-tailed deer populations. *The Journal of Wildlife Management*, 66 (1): 67-74.

Ambriz, P., De La Rosa, X. F., Sifuentes, A. M., Parra, G. M., Villa, A., Chassin, O., y Arellano, W. 2016. The complete mitochondrial genomes of nine white-tailed deer subspecies and their genomic differences. *Journal of Mammalogy*, 97 (1):234-245.

Askari, N., Mohammad Abadi, M., y Baghizadeh, A. 2011. ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iranian Journal of Biotechnology*, 9(3):222-229.

Babii, A., S. N. Kovalchuck, T. T. Glazko, G. Y. Kosovskii, and V. I. Glazko. 2015. Multilocus genotyping of cattle using highly polymorphic genomic elements (microsatellites, DNA transposon helitron). *Biogeosystem Technique* 5(3):243-255.

Brommer, J. E. Kekkonen, J., y Wikström, M. 2015. Using heterozygosity-fitness correlations to study inbreeding depression in isolated population of white-tailed deer founded by few animals. *Ecology and Evolution*, 5(2): 357–367.

Budd, K., Berkman, L. K., Anderson, M., Koppelman, J., y Eggert, L. S. 2018. Genetic structure and recovery of white-tailed deer in Missouri. *The Journal of Wildlife Management* DOI: 10.1002/jwmg.21546.

Cronin, M. A. MacNeil, M. D., y Patton, J. 2005. Variation in mitochondrial DNA and microsatellite DNA in caribou (*Rangifer tarandus*) in North America. *Journal of Mammalogy*, 86 (3):495-505.

Cronin, M. A., MacNeil, M. D., y Patton, J. C. 2006. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus granti*, *Rangifer tarandus groenlandicus*, and *Rangifer tarandus caribou*). *Journal of Heredity*, 97(5): 525-530.

Cronin, M.A., Renecker, L. A., y Patton, J. C. 2009. Genetic variation in domestic and wild elk (*Cervus elaphus*). *Journal of Animal Science*, 87: 829:834.

De La Cruz, N. P. 2017. Estudio de la segregación sexual del venado bura en la Reserva de la Biosfera de Mapimí, evaluando sus consecuencias ecológicas. Tesis Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 53 p.

De la Rosa, X. F., Calderón, R. D., Parra, G. M., Sifuentes, A. M., DeYoung, R. W., García, F. J., Arellano, W. 2012. Genetic diversity and structure among subspecies of White-tailed deer in Mexico. *Journal of Mammalogy*, 93 (4): 1158-1168.

Ellsworth, D. L., Honeycutt, R. L., Silvy, N. J., Bickham, J.W. y Klimstra, W. D. 1994. Historical biogeography and contemporary patterns of mitochondrial DNA variation in white-tailed deer from the southeastern United States. *Evolution*, 48:122–136.

Escobar-Saucedo, M.A., C. Aguilar, A. Vázquez-Ramos, M. H. Reyes-Valdés, and R. Rodríguez-Herrera. 2018. Genetic diversity in Apple tree cultivars established in the Sierra de Arteaga, Coahuila, Mexico. *Sistemas y Recursos Agropecuarios* 5 (13): 65-70.

Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.

Fahmi A. I., y Al-Otaibi S. A. 2011. Genetic Variation in Captive Herd of Arabian Oryx Using RAPD and ISSR Markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(27): 5251-5262

Galindo-Leal, L. y M. Weber. 1998. El venado de la Sierra Madre Occidental: Ecología, manejo y conservación. México: Edicusa-CONABIO, Ediciones Culturales, S.A de C.V.

González, M., González, M., y Márquez, M. 2007. Vegetación y ecorregiones de Durango. Plaza y Valdez. Ciudad de México, México, 220 p.

Gutiérrez, E. E., Helgen, K. M., McDonough, M. M., Bauer, F., Hawkins, M. T. R., Escobedo-Morales, L. A., Patterson, B- D., y Maldonado, J. E. 2017. A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens geographic data, and dense sampling. *Zookeys*, 697:87-131.

Halls, L. K. 1984. White-tailed deer: Ecology and Management. Wildlife Management Institute. Stackpole Books. Harrisburg, PA. USA. 859 p.

Hartl, G. B., Zachos, F., y Nadlinger, K. 2003. Genetic diversity in European red deer (*Cervus elaphus* L.): anthropogenic influences on natural populations. *Comptes Rendus Biologies*, 326: S37-S42.

Hernández P. M. Parra, G. M., De la Rosa, X. F., Chassin, O., y Sifuentes, A. M. 2014. Genetic shifts transition from wild to farmed white-tailed deer (*Odocoileus*

virginianus) population. International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services y Management, 10 (1): 3–8.

Hernández, A. 2014. Variabilidad genética y relación filogeográfica de tres subespecies de venado en la región centro norte de México. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 67 pp

Herrero, B., Lago, F. C., Madriñán, M., Vieites, J. M., Espiñeira, M. 2011. Authentication of species in meat products by genetic techniques. European Food Research and Technology, 232(3): 509–51.

Jiejun, L., Yixin, B., Jun, L., Yanni, W., y Xu, Z. 2013. Genetic diversity and genetic structure of four cultured populations of Chinese water deer (*Hydropotes inermis*) in Zhoushan Archipiélago. Acta Ecológica Sinica 33 (11): 3460-3469.

Kol, N. V. y Lazebny, O. E. 2006. Polymorphism of ISSR-PCR markers in Tuvian population of reindeer *Rangifer tarandus* L. Russian Journal of Genetics. 42(12):1464-1466.

Kollars, P. G, Beck, M. L., Mech, S. G., Kennedy, P. K., y Kennedy, M. L. 2004. Temporal and spatial genetic variability in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Genetica, 121:269-276.

Latch, E. K., Heffelfinger, J. R., Fike J. A., y Rhodes, O. E.. 2009. Species-wide phylogeography of North American mule deer (*Odocoileus hemionus*): cryptic glacial refugia and postglacial recolonization. Molecular Ecology, 18:1730–1745.

Ley General de la Vida Silvestre. 2013. Nueva Ley publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de julio de 2000.

Locher, A., Scribner, K. T., Moore, J. A., Murphy, B., y Kanefsky, J. 2015. Influence of landscape features on spatial genetic structure of white-tailed deer. *The Journal of Wildlife Management*, 79 (2): 180-194.

Logan, K., Cienfuegos, E., Sifuentes, A., Gonzalez, M., Clemente, F., Mendoza, G. y Tarango, L. 2007. Patrones de variación genética en cuatro subespecies de venado cola blanca en el noreste de México. *Agrociencia* 41: 13-21.

Martínez, J. y Martínez, L. 2010. Propuesta para el ordenamiento ecológico territorial del ejido Presidente Salvador Allende, municipio de Durango. Durango, México. 29 p.

Marckour- M'Rabet, S., Y. Henaut, A. Dor, G. Perez-Lachaud, C. Pélissier, C. Gers, and L. Legal. 2009. ISSR (Inter Simple Sequences Repeats) as molecular markers to study genetic diversity in tarantula (Aranae, Mygalomorphae). *The Journal of Arachnology* 37:10-14.

Mathis, V. L. Ascunce, M. S., Logan, K., DeYoung, R. W., Honeycutt, R. L., Olson, K. V., Kassu, G., Silvy, N. J., y Reed, D. L. 2017. Insights into the genetic origins of White-tailed deer on the Naval Station Guantanamo Bay. *Caribbean Naturalist*, 45:1-20.

Naidu, A., Fital, R. R., Munguía-Vega, A., y Culver, M. 2012. Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals. *Molecular Ecology Resources*, 12: 191-196.

Rodríguez, M. A., Gasca, J., Medellín, R. A., y Eguiarte, L. E. 2015. Analysis of genetic diversity of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) from Mexican populations. *Journal of Mammalogy*, 96 (3):473-480.

Rosales, S., y Villanueva, J. 2014. Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en bosques de *Pinus duranguensis* Martínez en el municipio de Durango. Pp. 83-110. En: M. R. Pérez (Comp). Efecto de la deforestación sobre la variabilidad climática en cinco bosques de coníferas. SAGARPA, INIFAP, CENID, COMEF, Mexico.

Roux. O., M. Gevrey, L. Arvanitakis, C. Gers, D. Bordat, and L. Legal. 2007. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analyses of *Plustella xylostella* populations native to different geographical areas. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43:240-250.

Ruiz, V. C., Legaría, J. P., Sahagún, J., y de la O, M. 2018. Genetic variability in some cultivated and wild amaranth species. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 9 (2):405-416.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18:233-234.

Seabury, C. M. Bhattarai, E. K., Taylor, J. F. Viswanathan, G. G., Cooper, S. M., Davis, D. S., Dowd, S. E., Lockwood, M. L. y Seabury, P. M. 2011. Genoma-wide polymorphism and comparative analyses in the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): A model for conservation genomics. *PlosOne*, 6 (1):e15811.

Świslocka, M., M. Czajkowska; N. Duda; J. Danylow; E. Owadowska y M. Ratkiewicz. 2013. Complex patterns of population genetic structure of moose, *Alces alces*, after recent spatial expansion in Poland revealed by sex-linked markers. *Acta Theriologica*, 58: 367-378.

Vega, D. M., Gutiérrez, M. V., y Reyes, J. L. 2016. Densidad poblacional de venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en dos UMAs de Durango, México. *Vidsupra*, 8(2):24-28.

Villarreal, J. G. 1999. Venado cola blanca, manejo y aprovechamiento cinegético. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. Monterrey, N.L. México. 471 pp.

CONCLUSIONES GENERALES

El venado cola blanca de la Sierra Madre Occidental de Durango es una especie con gran potencial socioeconómico, ecológico y de investigación. Como se ha observado, representa un reservorio genético diferente a los antes reportados, y por ende su conservación se vuelve de gran importancia. Por ello, aspectos ecológicos, reproductivos y genéticos deben ser tomados en cuenta para la implementación de UMAs y el manejo que se lleve a cabo en ellas, ya que esta información permite una mejor toma de decisiones, con ello el aumento en la productividad, y la conservación de la especie. Con este tipo de estudios, los productores y manejadores de la fauna silvestre pueden realizar actividades como manejo y mejoramiento de hábitat, suplementación alimenticia, o introducción de individuos a las poblaciones por mencionar algunas, dependiendo del caso y necesidades de cada población.



ANEXOS

Tabla de pesos (w_{ij}) y constantes (α) calculados mediante redes neuronales para el cálculo e identificación de sexo de individuos de venado cola blanca a partir de morfometría de pellets fecales

W_{ij}	W_1	W_2	W_3	W_4	W_5	W_6	W_7	W_8	W_9	W_{10}	W_{11}	W_{12}	W_{13}	W_{14}	W_{15}	W_{16}	W_{17}	W_{18}	W_{19}	W_{20}	W_{21}	W_{22}	
Ancho	0.334	3.419	0.015	0.185	0.028	0.148	0.025	0.599	0.750	0.160	2.570	0.013	1.173	0.099	1.864	0.449	6.549	1.074	1.424	0.108	0.167	0.414	
Largo	0.438	0.750	0.071	0.219	0.678	1.882	1.230	5.396	0.837	0.217	4.701	1.296	0.890	0.542	1.159	0.554	2.987	0.900	0.563	0.191	0.749	0.351	
Radio	0.669	2.377	0.027	0.296	0.190	0.178	0.131	0.039	0.583	0.091	2.259	0.213	1.174	0.121	1.148	0.176	6.647	1.468	1.099	0.041	0.577	0.592	
Volume n	0.289	3.317	0.637	0.189	0.752	0.691	0.652	3.527	0.326	0.608	0.390	0.706	0.327	1.507	1.720	0.493	3.783	0.526	1.428	1.051	1.519	1.067	
Largo/ancho	0.345	1.410	0.903	0.003	0.029	1.509	0.712	2.892	0.842	0.807	4.530	0.120	0.249	0.311	1.939	0.484	4.306	1.521	0.523	0.451	0.153	0.409	
α_j	0.614	2.425	0.299	0.394	0.341	0.979	0.839	7.115	0.056	0.348	4.078	0.918	0.513	1.590	3.868	0.199	4.606	0.153	0.434	0.841	2.140	0.897	
W_{jk}	α_k	W_1	W_2	W_3	W_4	W_5	W_6	W_7	W_8	W_9	W_{10}	W_{11}	W_{12}	W_{13}	W_{14}	W_{15}	W_{16}	W_{17}	W_{18}	W_{19}	W_{20}	W_{21}	W_{22}
Sexo 1	0.065	0.412	4.566	0.741	0.008	0.143	1.074	1.144	5.213	1.046	0.027	5.179	0.627	0.260	1.707	4.373	0.809	8.031	2.327	0.665	0.605	1.516	1.130
Sexo 2	0.664	0.646	4.489	0.790	0.109	0.712	1.628	1.248	5.136	1.376	0.747	5.400	0.950	0.406	0.906	4.362	0.119	7.973	2.186	0.693	0.915	1.892	0.692