

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y
RELACIONES FILOGENÉTICAS EN DIEZ ESPECIES DE
CERVIDAE UTILIZANDO DIEZ LOCI MICROSATÉLITES Y
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL
DEL DNA MITOCONDRIAL.

María Martínez Agüero
Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Carrera de Biología

Santa Fe de Bogotá, Octubre 27 de 2000

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y
RELACIONES FILOGENÉTICAS EN DIEZ ESPECIES DE
CERVIDAE UTILIZANDO DIEZ LOCI MICROSATÉLITES Y
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL
DEL DNA MITOCONDRIAL.

María Martínez Agüero

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar el título de

BIÓLOGA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOLOGÍA

Santa Fe de Bogotá, D.C.

Octubre 27 de 2000

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de julio de 1946: “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado”

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y
RELACIONES FILOGENÉTICAS EN DIEZ ESPECIES DE
CERVIDAE UTILIZANDO DIEZ LOCI MICROSATÉLITES Y
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN DE CONTROL
DEL DNA MITOCONDRIAL.

María Martínez Agüero

APROBADO

Manuel Ruiz-García. Ph.D., Director

Martha L. Bueno, M.Sc.. Jurado.

Julio Mario Hoyos, Ph.D. Jurado.

Luz Mercedes Santamaría, Directora Carrera de Biología

Carlos Corredor, Ph.D. Decano Académico

*Para Juan Alejandro,
quien tuvo la paciencia
para que esto fuera realidad.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la ayuda de muchas personas.

Quiero agradecer especialmente a mi director, Manuel Ruiz-García, del laboratorio de Genética de Poblaciones y Biología Evolutiva, por hacer este trabajo posible, a Diana Álvarez por enseñarme como se trabaja en el laboratorio y por confiar en mí, a todos mis compañeros del laboratorio en especial a Eulalia por la ayuda con el procesamiento de las muestras, a María Ignacia Castillo por ayudarme en mis primeros pasos, a los vecinos de inmunología y a los de herpetología, en especial a Julio Mario Hoyos.

Agradezco a los investigadores, veterinarios y directores de zoológicos, por toda América Latina, que hicieron posible que las muestras llegaran a mis manos y al Dr. Ettore Randi, del Istituto per la Fauna Selvatica, en Ozzano dell'Emilia, por la ayuda invaluable con las muestras de *Capreolus* y las secuenciaciones de la región D-Loop que se presentan en este trabajo. También a Simon Goodman (Institute of Cell, Animal Population Biology, University of Edinburgh, Reino Unido) y a Knut H. Røed (Department of Zoology, Agricultural University, Noruega), por el envío de primers para este trabajo.

Nuevamente doy gracias a Juan Alejandro, quien tuvo la paciencia, y a Gustavo, quien me acompañó en la elaboración del trabajo. A Magdalena Agüero, a Laura

Elisa y a Germán Martínez, ya que sin su ayuda, su orientación y su apoyo este trabajo jamás se habría realizado, a Abi a quien le habría gustado estar en este momento y a Mother quien me enseñó lo primero sobre mis primeros animales.

Agradezco a mis amigos, Luisa, Paula, María Katherine, Eduardo, Magda y Francy.

Por último quiero agradecer a todos los animales a lo largo del mundo que se dejaron muestrear, sin ellos este trabajo habría sido imposible.

Octubre 27 de 2000

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	1
Introducción	2
Revisión de Literatura	6
Aspectos generales de los Cervidae.	6
Marcadores moleculares	8
Especies trabajadas	9
Formulación del problema	13
Justificación	13
Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
Hipótesis	16
Procesamiento de muestras	16
Análisis de diversidad genética con microsatélites.	16
Muestras.	16
Marcadores Microsatélites y procedimiento de laboratorio.	18
1.3. Análisis Genético-Poblacionales.	20
Secuenciación de la región D-Loop.	25
Muestras.	25
Marcadores y procedimiento de laboratorio.	26
Análisis Filogenético.	27
Resultados	30

Microsatélites. Análisis genético-poblacionales	30
Figuras frecuencias alélicas	32
Tabla 1. Equilibrio Hardy-Weinberg	40
Tabla 2. Diferenciación genotípica	67
Tabla 3. Diferenciación génica	68
Tabla 4. Desequilibrio genotípico	77
Tabla 5. Número de migrantes	78
Tabla 6. Regresiones con variables mixtas	80
Tabla 7. Cuellos de botella	82
Tabla 8. Número de alelos en <i>C. nippon</i> y <i>C. elaphus</i>	88
Tabla 9. Número de alelos en <i>C. elaphus</i> y <i>C. capreolus</i>	89
Microsatélites. Filogenia	89
Árboles máxima parsimonia	89
Árboles consenso	97
Secuenciación de la región Control del DNA mitocondrial	99
Tabla 10. Diversidades nucleotídicas	101
Árboles de matrices de distancia	103
Árboles máxima parsimonia	106
Discusión	108
Conclusiones	127
Recomendaciones	129
Bibliografía	128
Anexo	137

RESUMEN.

Los cérvidos son un grupo de mamíferos rumiantes que se encuentran distribuidos de forma natural en América, Europa y Asia, además del norte del Sahara, y que han sido introducidos a otros países, para granjas comerciales. Los Cervidae en América ocupan ecosistemas equivalentes a los ocupados por los grandes Bovidae africanos, por lo cual la introducción de ganado (en especial vacuno) se ha constituido en un punto de presión sobre las poblaciones silvestres. Este grupo, relacionado con el hombre desde tiempos inmemoriales, ha sido objeto de gran cantidad de estudios, la mayoría sobre caracteres morfológicos o comportamentales, los estudios moleculares son realmente pocos y para casos muy concretos. Con este trabajo se pretende mostrar de manera general las principales variables genético-poblacionales que existen entre diez especies de Cervidae, ocho americanos y dos europeos, a través de diez loci microsatélites, los cuales fueron observados en geles de úrea - poliacrilamida utilizando la técnica de PCR. Las poblaciones se encontraron en Equilibrio Hardy-Weinberg para los loci microsatélites analizados.

Con los alelos de los microsatélites y la secuenciación de la región D-Loop se elaboraron filogenias, las cuales fueron comparadas entre ellas y con las reportadas por otros autores. En las filogenias debe resaltarse el agrupamiento que sufren las especies del género *Mazama*, las cuales no forman clados entre ellas sino con otras especies. Las variables genético-poblacionales fueron comparadas con el grado de vulnerabilidad de las especies encontrando una relación entre el número de alelos promedio, los números efectivos y éste (según listados CITES y UICN).

INTRODUCCIÓN.

Dentro de los Cervidae encontramos las especies motivo de estudio en este trabajo. Esta familia, del Orden Artiodactyla, se encuentra distribuida naturalmente en Eurasia y América. En este último continente, en especial en Sudamérica, han jugado un importante papel ecológico, ya que ocuparon los ecosistemas que los Bóvidos ocuparon en otros continentes.

Los ciervos entraron a América durante el Plioceno y con el establecimiento del istmo de Panamá se desplazaron hacia América del Sur donde tuvieron una radiación muy exitosa, de la que se cree se originaron los géneros aun presentes. Todos los ciervos americanos y el género eurasiático *Capreolus*, pertenecen a la subfamilia Odocoilinae. En Sudamérica encontramos once especies diferentes de ciervos, agrupadas en seis géneros, incluyendo el género *Odocoileus* con una especie exclusivamente norteamericana (*Odocoileus hemionus*).

Encontramos en esta parte del continente americano tres especies de ciervos de alto porte: *Odocoileus virginianus* (ciervo coli-blanco), cuya distribución empieza en Canadá y llega hasta el norte del Brasil. A partir de este punto encontramos los otros dos ciervos: *Ozotoceros bezoarticus* (ciervo de las pampas), especializado en hábitats abiertos con vegetación de pastos como el chaco y la pampa argentina, y *Blastocerus dichotomus* que ocupa las riveras de los ríos Paraná, Paraguay y sus tributarios, el

cual es llamado ciervo del pantanal y se encuentra ampliamente distribuido en el pantanal Brasileño.

De mediano porte encontramos dos especies pertenecientes al mismo género: *Hippocamelus antisensis* e *Hippocamelus bisulcus* (Huemul), quienes ocupan ecosistemas escarpados en las montañas. Sus distribuciones son desde Ecuador hasta el norte de Chile y los Andes Chilenos, respectivamente.

Los ciervos especializados en los hábitats con densa vegetación son de pequeño porte, incluso muy pequeño (como un gato grande), y pertenecen a dos géneros. El primero de ellos es el género *Pudu* con dos especies, *Pudu puda*, de distribución chilena, y *Pudu mephistopheles*, el cual puede ser encontrado en los Andes ecuatorianos y colombianos y en el norte de Bolivia. Son los ciervos de menor porte y ocupan hábitats de páramo. El otro género es *Mazama*, el cual se divide en cuatro especies (o más dependiendo de los autores). Estas son: *Mazama americana*, con distribución desde el sur de México hasta Argentina, *Mazama gouazoubira*, cuya distribución ocupa toda Sudamérica, *Mazama rufina* con distribución restringida a la zona andina de Ecuador, Colombia y Venezuela. La última de las especies es *Mazama chunyi*, la cual es tan pequeña como un *Pudu* y se encuentra restringida a los Andes Bolivianos.

Este trabajo contiene dos partes principales: la primera de ellas es un trabajo con 10 marcadores microsatélites y la segunda consiste en la secuenciación de la región D-Loop para algunos de los ejemplares muestreados.

Los análisis de DNA en las diferentes poblaciones representan unas ventajas significativas: el genotipo muestra más que el fenotipo, esto se debe a que no todas las sustituciones en el DNA producen un cambio fenotípico; otra de las ventajas es que en general las técnicas sirven para extraer y trabajar DNA de cualquier organismo; y el DNA puede ser extraído de pequeñas muestras de pelo, tejido, e incluso heces, que con métodos convencionales serían despreciadas.

Los microsatélites son herramientas muy utilizadas en este momento para determinar paternidades, debido a que son secuencias (con 2 a 10 motivos de repetición) que se encuentran en un único locus, codominantes, que son segregados mendelianamente. Además son muy abundantes en el genoma eucariota, lo que facilita su ubicación. Los microsatélites son altamente polimórficos en los Artiodáctilos, por lo que son una herramienta muy útil en este grupo donde la mayoría de las alozimas trabajadas son monomórficas o presentan muy pocos alelos. Con la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se ha optimizado el uso de las técnicas moleculares, ya que se puede obtener más DNA a partir de pequeñas muestras sin necesidad de clonar el genoma completo.

Los microsatélites se genotificarán a partir de geles de úrea – poliacrilamida teñidos con nitrato de plata. A estos resultados se les realizaron los más comunes análisis genético-poblacionales y a partir de los alelos obtenidos se elaboró una filogenia.

También se realizaron regresiones con variables múltiples comparando los principales estadísticos genético-poblacionales con los listados de CITES y la UICN.

La segunda parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Ettore Randi, y fue la secuenciación de la región D-Loop del DNA mitocondrial. Aquí debemos tener en cuenta otros aspectos tales como que el DNA mitocondrial se hereda matrilinealmente. Con los datos obtenidos de las secuencias se realizó un análisis filogenético.

La principal conclusión del trabajo es aquella que implica la no monofilia del género *Mazama*, evidenciada por los microsatélites y la filogenia molecular.

REVISIÓN DE LITERATURA

Aspectos generales de los Cervidae.

Cervidae es una familia de mamíferos rumiantes, Orden Artiodactyla, que tiene alrededor de 40 especies reportadas para América, Europa y Asia, que se encuentran especializados para consumir en especial pastos y hojas, aunque en situaciones específicas pueden consumir frutos, hongos y otras partes de las plantas. (Richard et al., 1996).

La familia Cervidae incluye usualmente las subfamilias Muntiacinae, Hydropotinae, Cervinae y Odocoilinae y en ocasiones las especies del género *Moschus*. A la subfamilia Cervinae pertenecen los géneros de ciervos del viejo mundo y el ciervo rojo Norteamericano (*Cervus*), y a la subfamilia Odocoilinae los ciervos americanos y el corzo europeo (*Capreolus*) (Wemmer, 1987).

A diferencia de otros Artiodactyla, los machos pueden presentar los caninos superiores muy desarrollados. Las especies presentan dimorfismo sexual en época reproductiva caracterizada por la aparición de cornamenta en los machos (los caribús y renos -*Rangifer tarandus*-, presentan cornamenta tanto hembras como machos y ciervos asiáticos como *Moschus* e *Hydropotes*, no presentan cuernos sino caninos superdesarrollados) la cual se pierde tras el período de reproducción. El período de reproducción es estacional en las zonas templadas y no estacional en las poblaciones Ecuatoriales, por lo cual inicialmente se pensó que los Cervidae tropicales no perdían

la cornamenta debido a que en una misma zona se encontraban durante todo el año machos con cuernos (Redford & Eisenberg, 1992).

Los ciervos son de origen Eurasiático y pasaron a América durante el Plioceno, su adaptación fue buena y la entrada a Sudamérica y su posterior radiación se dio en el Plioceno tardío (Eisenberg, 1989).

Los ciervos sudamericanos de pequeño tamaño viven entre la vegetación tupida (bosques y selvas) para lo cual se encuentran adaptados con su bajo porte y su cornamenta poco ramificada. Por el contrario los ciervos de gran tamaño presentan cornamenta ramificada y viven en zonas abiertas como sabanas, estepas y zonas inundadas (Barbantý & Merino, 1997).

Dada su larga relación con los hombres, los ciervos han sido estudiados morfológicamente por el hombre desde la época del paleolítico sobre aspectos morfológicos y ecológicos (Lara, 1977), sin embargo la genética molecular de los Cervidae no ha sido muy estudiada y los trabajos que encontramos cobijan aspectos como variación genética a partir de análisis de proteínas para el ciervo común europeo (Glenn & Smith, 1993) y secuenciación de Citocromo-*b* Mitocondrial para el ciervo rojo americano (Carr & Hughes, 1993). Uno de los estudios más amplios es el elaborado por Emerson y Tate (1993) sobre la subfamilia Cervinae tomando representantes de los cuatro géneros que forman la subfamilia.

El grupo de Engel y colaboradores (1996) realizó un estudio muy amplio con microsatélites sobre la conservación de loci microsatélites en especies de artiodáctilos, donde se utilizaron tanto especies domésticas como silvestres. Dentro del grupo analizado se encontraban seis especies de cérvidos, todos ellos nórdicos de

modo que el estudio de las especies neotropicales, en las cuales se encuentran la mayoría de dudas taxonómicas, debido a su enorme parecido fenotípico y a su poco estudio, aún no ha sido ampliamente explorado. Esto es especialmente exagerado en el género *Mazama* el cual presenta altas incongruencias en las diferentes clasificaciones presentadas por los autores (Allen, 1915; Eisenberg, 1989; Barbantý & Merino, 1997; Emmons, 1990; Tirira, 1999). Los estudios moleculares que se han realizado con ejemplares de este género no parecen aclarar el panorama sino que plantean nuevas dudas taxonómicas (Smith et al., 1986; Barbantý & Merino, 1997)

Marcadores moleculares

Los microsatélites son marcadores altamente polimórficos de DNA con loci discretos y alelos codominantes compuestos por cortos elementos repetitivos, en series de dos a seis nucleótidos. Estos marcadores son muy frecuentes en el genoma de los eucariotas y se encuentran distribuidos al azar. Esto ha permitido que tengan un amplio uso en varios aspectos como la determinación de paternidades. Finalmente, su importancia ha aumentado debido a la aplicación en el estudio de las poblaciones y la posibilidad que presentan de conocer la historia evolutiva de éstas (Hoelzel, 1998).

La técnica de PCR (reacción en cadena de la Polimerasa) es muy utilizada para análisis genético-poblacionales debido a que es relativamente económica, simple y sus resultados son muy útiles, ya que permite amplificar DNA aún a partir de material de baja calidad (como pelos, manchas de sangre y heces) y puede ser aplicada a variedad de aspectos en biología molecular. Debido a que enzimas, como la

polimerasa I de los eucariotas, son sensibles a las altas temperaturas y dejan de ser útiles por al ser sometidas a temperaturas denaturantes, lo cual es un paso fundamental en el procedimiento de la PCR, la extracción de Taq DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (bacteria termófila) solucionó este problema y así el DNA que será amplificado se puede trabajar a altas temperaturas (Hoelzel, 1998).

Especies trabajadas

Mazama gouazoubira: se distribuye en la Isla San José en Panamá, Colombia, Venezuela, Guyana, Perú, Ecuador, hasta el norte de Argentina y Uruguay, el este de Brasil y Bolivia. Se encuentra en variedad de hábitats en el bosque lluvioso y bosque más abiertos, así como en hábitats secos. Prefiere la vegetación densa. Es diurno y solitario. Se alimenta de frutos caídos, flores y brotes tiernos (Emmons & Feer, 1990). No se encuentra ubicada en ningún apéndice de CITES o de UICN aunque se encuentra sometida a alta presión por caza de subsistencia.

Mazama americana: distribuida desde la península de Yucatán, en México, hasta norte de Argentina y Uruguay, sur de Bolivia y sur de Brasil. Tiene distribución en las Antillas (Trinidad y Tobago). Se encuentra en bosque tropicales lluviosos, plantaciones y sabanas cercanas a bosques. Diurno y nocturno, se alimenta de frutos, hongos, brotes tiernos y flores (Emmons & Feer, 1990). No se encuentra considerada dentro de ningún apéndice CITES o UICN aunque está presionada por la cacería de subsistencia.

Mazama rufina: esta especie de pequeño tamaño se encuentra distribuida en la parte norte de Sudamérica. Para algunos autores se encuentra en una distribución

discontinua con un parche en Ecuador y otro en Venezuela (Wemmer, 1987), mientras que para otros la distribución es continua desde Venezuela hasta Ecuador, pasando por Colombia (Redford & Eisenberg, 1992). Dado que lo argumentado por Wemmer es que la distribución no es continua debido a las cordilleras, y los reportes para el Ecuador se encuentran desde el nivel del mar hasta los 3000 metros, la afirmación de la distribución discontinua no es muy aceptable. Esta especie no se encuentra reportada en los apéndices de CITES y para la UICN se encuentra en bajo riesgo. De su biología se sabe muy poco, por lo que no se tiene certeza de su estado ecológico actual.

Odocoileus virginianus: Esta es la especie de ciervo americano con más amplia distribución, ya que se encuentra desde el sur de Canadá hasta Bolivia y el norte del Brasil, en una distribución continua a través de Centroamérica y el norte de Sudamérica. Se encuentra en hábitats abiertos y bosques montanos, desde el nivel del mar hasta los 4000 metros. De hábitos tanto diurnos como nocturnos, se alimenta de retoños y pastos, principalmente, comiendo en ocasiones frutos y flores (Emmons & Feer, 1990). Presionado por la caza de subsistencia y la destrucción del hábitat no se encuentra reportado en listados de CITES o UICN excepto para la subespecie *Odocoileus virginianus mayensis*, que se encuentra distribuida en Guatemala y Costa Rica.

Blastocerus dichotomus: distribuido desde el centro de Brasil hasta Paraguay, Bolivia y el norte de Argentina. Llamado el ciervo del pantanal debido a la utilización de este hábitat, donde se esconde durante el día para alimentarse al ocaso con juncos, pastos y plantas acuáticas. Solitarios por lo general pueden encontrarse en ocasiones en

grupos pequeños (Tirira, 1999). Listada en el apéndice I de CITES y considerada como vulnerable por la UICN, debido a la presión por la caza de subsistencia y deportiva, a la destrucción del hábitat y al contagio de enfermedades propias del ganado vacuno.

Hippocamelus antisensis: distribuido en la Cordillera de los Andes desde Ecuador hasta el nordeste de Argentina. Habita cerros escarpados y montañas empinadas con elevaciones entre los 2500 y 5200 metros. De actividad tanto diurna como nocturna se alimenta de pastos y juncos mayoritariamente. Forma grupos de más de ocho individuos, al parecer dirigidos por una hembra (Tirira, 1999). Se encuentra en el apéndice I de CITES y catalogado como en peligro por la UICN.

Ozotoceros bezoarticus: Se encuentra distribuida desde el sudoeste de Brasil, sudeste de Bolivia, Paraguay y norte de Argentina. Ocupa variedad de pastizales de tierras bajas y áreas temporalmente inundables, tanto por aguas dulces como estuarinas. Son bastante sedentarios y por lo general diurnos. Se alimentan de arbustos tiernos, pero su dieta no está bien conocida. Viven en pequeños grupos de cinco o seis individuos y ocasionalmente se observan individuos solitarios. Considerada por CITES en el apéndice I y por la UICN como vulnerable.

Pudu mephistopheles: Típico de páramo, tiene una distribución sobre la cordillera en Ecuador y Colombia. Se han encontrado individuos entre los 1700 y los 4000 metros de altura (Tirira, 1999). Este es el menor ciervo de América y se sabe muy poco sobre su ecología y comportamiento (Redford & Eisenberg, 1992). Se encuentra listado por la UICN como bajo riesgo y está en el apéndice II de CITES.

Adicionalmente se trabajará con muestras de los únicos dos Odocoilinae no americanos: *Capreolus capreolus* y *Capreolus pygargus*. El primero de distribución europea y la península arábiga, y el segundo distribuido desde el noreste de Asia hasta el norte y centro de China y Corea (Honacki et al., 1992). *Capreolus capreolus* y *Capreolus pygargus* no se encuentran en los apéndices de CITES y para la UICN son especies en bajo riesgo, aunque su hábitat se encuentra muy intervenido por el hombre y la presión de la caza deportiva se presenta aún en algunos países.

También se utilizaron los datos de Slate y colaboradores (1998) y de Røed y Midthjell (1998), para comparar los alelos obtenidos para los microsatélites probados.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El propósito de este estudio es describir el grado de polimorfismo y la variabilidad genética encontrada en las especies de ciervos analizadas y realizar análisis para contribuir a aclarar las relaciones filogenéticas entre las especies.

JUSTIFICACIÓN

Con el desarrollo de este proyecto se espera encontrar alguna relación entre el estado genético-poblacional de las especies y su grado de vulnerabilidad; del mismo modo se considera importante realizar una comparación entre especies neotropicales y europeas para saber si los factores de presión sobre el grupo taxonómico afectan de forma similar a todas las especies estudiadas.

Debido a que se espera encontrar una relación directa entre el grado de vulnerabilidad y el grado de variabilidad encontrado en las diferentes especies, este proyecto tendría aplicaciones ecológicas y permitiría realizar un análisis filogenético que refleje la importancia de las diferentes especies en las estrategias conservacionistas y en la elaboración de mapas de distribución para reservas a considerar.

Adicionalmente, como reflejo de la amplia variabilidad morfológica que encontramos en el grupo, en especial en las especies neotropicales, es importante comparar los resultados filogenéticos para determinar la presencia de subespecies que de acuerdo a la distribución poblacional se encuentren bien diferenciadas molecularmente del

mismo modo que se reconsiderarán las definiciones de las características propias de cada especie.

Es interesante realizar este proyecto de trabajo sobre este grupo tan bien conocido desde una perspectiva diferente debido al escaso número de estudios que se han realizado desde el punto de vista molecular sobre las especies neotropicales de Cervidae.

OBJETIVOS

Describir el polimorfismo y la variabilidad genética en ocho especies neotropicales y cinco especies europeas de Cervidae a partir de 10 loci microsatélites.

- Realizar análisis de la heterocigosidad, variabilidad genética, equilibrio Hardy-Weinberg, heterogeneidad génica intra e interespecífica.
- Realizar un análisis de regresión simple entre el estado de vulnerabilidad de la especie (CITES, UICN) y la variabilidad genética encontrada.

Construir una filogenia a partir de secuenciación de 1143 pares de bases (pb) de la región de control del DNA mitocondrial (D-loop) y los loci microsatélites analizados de las especies de Cervidae neotropicales

MATERIALES Y MÉTODOS

Hipótesis

H₁: Se encontrará una correlación significativa entre niveles de variabilidad génica y riesgo de extinción al analizar 12 especies de Cervidae neotropicales y europeos.

H₂: Los resultados filogenéticos utilizando la secuenciación de la región D-Loop mitocondrial y los alelos de 10 loci microsatélites no concordará con las filogenias conocidas utilizando caracteres morfológicos.

H₃: Los complejos rearrreglos cromosómicos característicos de género *Mazama* tienen reflejo en los marcadores moleculares empleados (microsatélites).

H₄: Las especies analizadas mostrarán haber pasado por un cuello de botella reciente.

Procesamiento de muestras

Las muestras, obtenidas gracias a la colaboración de los diferentes parques Zoológicos, fueron procesadas para la obtención del DNA con el método estándar del Fenol-Cloroformo (Sambrock et al., 1989) en el caso de tratarse de muestras de tejido, mientras que las muestras de pelo o mancha de sangre fueron procesadas con una solución al 10% de Chelex siguiendo el protocolo propuesto por Walsh y colaboradores (1991).

1. Análisis de diversidad genética con microsatélites.

1.1. Muestras.

Se analizaron un total de 114 ejemplares de Cervidae para 10 loci microsatélites.

Mazama americana: Muestras de pelo de 7 individuos procedentes del Zoológico de Santa Cruz, Bolivia; de Colombia se analizaron muestras de pelo de 4 individuos procedentes del Alto Sinú, una muestra de tejido obtenido de una piel seca en Huila y 2 muestras de pelo proporcionadas por los indígenas Yaguas en Leticia; 6 muestras de tejido procedentes del mercado de Iquitos, Perú; muestra de tejido de 1 individuo procedente de la Guyana Francesa; y muestra de pelo de un individuo del Zoológico de Asunción, Paraguay. Total 22 muestras.

Mazama gouazoubira: Muestras de pelo de 2 individuos del Zoológico de La Paz, Bolivia; 3 muestras de tejido procedentes de la Guyana Francesa; muestras de pelo de 2 individuos de Venezuela; y muestra de pelo de un individuo del Zoológico de Asunción, Paraguay. Total 8 muestras.

Mazama rufina: Una muestra de piel procedente del Chocó Ecuatoriano y una muestra de pelo del individuo del Zoológico Jaime Duque, Colombia. Total 2 muestras.

Odocoileus virginianus: 8 muestras de pelo del Zoológico Jaime Duque, 7 muestras de pelo del Zoológico de Pereira, 1 muestra de pelo del Zoológico Santa Cruz y muestras de sangre de 2 individuos de la WSPA en Colombia; muestras de pelo de 4 animales de Venezuela; y muestra de pelo de un animal del norte de Guatemala. Total 23 muestras.

Hippocamelus antisensis: Muestras de tejido de 4 animales encontrados muertos en la naturaleza en la Provincia de Salta, Argentina. Total 4 muestras.

Pudu mephistopheles: Muestra de una pezuña adquirida en el mercado de Iquitos, Perú; y una muestra de pelo de un individuo disecado en el mercado de Sesquilé, Colombia. Total 2 muestras.

Ozotoceros bezoarticus: Pelo de 2 individuos del Zoológico de Santa Cruz, Bolivia. Total 2 muestras.

Capreolus capreolus: Muestras de 5 DNA genómico procedentes de España; y 21 muestras procedentes de los Alpes occidentales, en la Reserva Natural Castel Porziano, Italia. Total 26 muestras.

Capreolus pygargus: Muestras de 4 individuos procedentes de los Alpes occidentales, Reserva Natural Castel Porziano, Italia. Total 4 muestras.

Blastocerus dichotomus: 2 muestras de pelo de individuos del Zoológico de Santa Cruz y 4 de individuos del Zoológico de La Paz, Bolivia; y 2 muestras de pelo de animales del Zoológico de Asunción, Paraguay. Total 8 muestras.

Cervus elaphus: muestras de DNA genómico de 5 animales procedentes de Argyll, Escocia; y 4 muestras de DNA genómico de animales de Italia. Total 9 muestras.

Cervus nippon: 5 muestras de DNA genómico procedentes de Argyll, Escocia. Total 5 muestras.

1.2. Marcadores Microsatélites y procedimiento de laboratorio.

Se utilizaron diez (10) marcadores para microsatélites moleculares, dos de ellos diseñados específicamente para el ciervo coli-blanco -*Odocoileus virginianus*- (DeWoody et al., 1995) Cervid 1 y Cervid 3; cuatro diseñados para el reno -*Rangifer tarandus*- (Røed & Midthjell, 1998) NVHRT 16, NVHRT 30, NVHRT 71 y NVHRT

73; y cuatro diseñados para Bovidae (Slate et al, 1998) TGLA 337, IDVGA 55, FCB 193 y BOVIRBP.

Los DNA obtenidos con los métodos de Fenol-Cloroformo y Chelex fueron procesados para obtener los genotipos de la siguiente manera:

Se realizaron las reacciones de PCR utilizando, cuando las muestras fueran extraídas por el método del Fenol-Cloroformo, el siguiente protocolo que consiste en adicionar 2.0 μl de MgCl_2 2.5 mM, 2.5 μl de Buffer 10x, 2.5 μl dNTPs 0.01 mM, 2 picomoles de cada uno de los primers (forward y reverse), 0.25 unidades de Taq polimerasa (1 u/ μl), 2 μl de DNA y completando a una volumen de 25 μl con agua desionizada. Si el DNA había sido obtenido utilizando CHELEX se duplicaban los volúmenes de reactivos adicionados, se agregaban 20 μl de DNA y se completaba a un volumen de 50 μl con agua desionizada.

Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un Termociclador Geneamp PCR Sistem 9600 de Perkin Elmer. Las temperaturas utilizadas para el caso de Cervid 1 y Cervid 3 fueron 2 min a 94°C para denaturar; 35 ciclos de: 30 s a 92°C (denaturación), 1 min a 60°C (“annealing”), 2 min a 74°C (extensión); 10 min a 74°C de extensión (DeWoody, 1995). Para el caso de los marcadores de renos fueron 5 min a 94°C para denaturar; 30 ciclos de: 1 min a 95°C (denaturación), 30 s a 55°C (“annealing”), 1 min a 72°C (extensión); 10 min a 72°C de extensión (Røed & Midthjell, 1998). Y para el caso de los marcadores de Bovidae fueron 2 min a 94°C para denaturar; 7 ciclos de: 30 s a 94°C (denaturar), 1 min a 50°C (“annealing”), 30 s

a 72°C (extensión); 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 1 min a 52°C, 30 s a 72°C (Slate et al., 1998).

Los productos amplificados fueron conservados a 4°C hasta su utilización. La presencia de DNA amplificado fue revisada en gel de agarosa al 3% donde se observó la aparición de banda frente a bromuro de Etidio en una cámara de electroforesis horizontal GNA200 de Pharmacia Biotech. Las muestras amplificadas se corrieron en un gel denaturante de Úrea – Poliacrilamida al 6% en una cámara vertical Hoefer SQ3 sequencer, con una fuente de poder EPS 3500 de Pharmacia Biotech, a 35 W constantes durante 2-3 horas dependiendo del tamaño del marcador.

El DNA fue fijado al gel con ácido acético al 10% y se procedió a la tinción de éste, para evidenciar las bandas, con AgNO₃ precipitado con CaCO₃. Los geles fueron conservados entre papel celofán frío para su lectura posterior.

1.3. Análisis Genético-Poblacionales.

Una vez los geles fueron analizados y se distinguieron perfectamente los genotipos de los especímenes estudiados se procedió a determinar algunos de los estadísticos genético poblacionales básicos, tales como el número de alelos, las frecuencias alélicas y la heterocigosis esperada.

Se realizó también un análisis del equilibrio Hardy–Weinberg para los marcadores moleculares empleados. Para ello se utilizaron diferentes métodos. El estadístico F de Wright (1965), cuya expresión es: $F = 1 - (H_0/H_e)$, donde H_0 es el número de heterocigotos observados y H_e el número esperado de los mismos asumiendo que el locus analizado se encuentra en Equilibrio Hardy-Weinberg; para mirar la

significancia del estadístico F puede utilizarse un test de χ^2 el cual se refleja en la expresión: $\chi^2 = F^2 N (m-1)$, con $m (m-1)/2$ grados de libertad, y donde \underline{N} es el número de individuos analizados y \underline{m} es el número de alelos de cada locus. Otro de los procedimientos utilizados fue la f de Robertson y Hill (1984) donde para cada alelo \underline{i} la estima de la desviación de la frecuencia de homocigotos, \underline{ii} , respecto a lo esperado si se asume el locus en Equilibrio Hardy-Weinberg tiene como expresión: $T_{ii} = [2 (2n-1) n_{ii} - n_i (n_i-1)] / [4 (n-1)]$, donde \underline{n} es el tamaño de la muestra, \underline{n}_{ii} es el número de homocigotos observados y \underline{n}_i es el número de alelos \underline{i} para la muestra.

También se realizaron tests exactos con cadenas de Markov (Raymond & Rousset, 1995), los cuales son muy importantes cuando se trata de muestras pequeñas o muy pequeñas, o de un bajo número de alelos, ya que no se encuentran sesgados por los tamaños de la muestra; esta es una vía alternativa para mirar si existe diferenciación poblacional a través de un procedimiento no paramétrico. Adicionalmente, estos tests proporcionan resultados locus a locus, lo que permite encontrar loci que presenten comportamientos aberrantes. Los procedimientos estadísticos multi-loci se obtienen a partir del test de probabilidad combinada de Fisher. Un test exacto parte de una tabla de contingencia donde cada fila representa una población y cada columna un alelo. N_{ij} es el número de copias del alelo \underline{j} en la población \underline{i} . La hipótesis nula corresponde a la ausencia de diferenciación poblacional. Teniendo H_0 , la probabilidad α es:

$\alpha = (\alpha (N_{i.}!)) \cdot (\alpha (N_{.j}!)/(N_{..}!)) \alpha \alpha (N_{ij}!)$, donde $N_{i.}$ se refiere a las celdas correspondientes a la población \underline{i} , $N_{.j}$ se refiere al número total del alelo \underline{j} y $N_{..}$ a la suma de todas las celdas.

Adicionalmente, se calculó el desequilibrio gamético entre los marcadores analizados. Ello consiste en medir asociaciones estadísticamente significativas entre dos alelos de dos loci no necesariamente ligados físicamente para conseguir la mejor aproximación entre el fenotipo observado y el esperado basado en el modelo genético que relaciona cuentas relativas de los genotipos (Hartl & Clark, 1987). Esto se realizó a través de tests exactos, de modo que la probabilidad de desequilibrio gamético D_{AB} frente a cero (siendo $D_{AB} = p_{AB} - p_A p_B$, donde p_A es la frecuencia del alelo A, p_B en la frecuencia del alelo B y p_{AB} es la frecuencia de los individuos que portan simultáneamente A y B) $Pr(n_{AB}) = [(2n)! (p_A p_B)^{n_{AB}} (p_A' p_B')^{n_{A'B'}} (p_A p_B')^{n_{AB'}} (p_A' p_B)^{n_{A'B}} / n_{AB}! n_{A'B}! n_{AB'}! n_{A'B'}!]$ (Weir, 1996).

El índice de fijación (simbolizado por F_{ST}), mide los efectos de la subdivisión de una población, que es la reducción de la heterocigosis en una subpoblación debido a la deriva génica. Entonces, $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$, donde H_T es la heterocigidad esperada de un individuo en un muestreo al azar de la población total y H_S es la heterocigidad esperada de un individuo en un muestreo al azar de la subpoblación. F_{ST} siempre es mayor o igual a cero, ya que el efecto Wahlund asegura que $H_T > H_S$. Si todas las subpoblaciones se encontraran en Equilibrio Hardy-Weinberg con las mismas frecuencias alélicas, $F_{ST} = 0$. Utilizando F_{ST} se calculó el grado de heterogeneidad genética entre poblaciones de la misma especie y entre especies diferentes (Weir & Cockerham, 1984).

Se realizaron estimas de flujo génico entre poblaciones, número efectivo por la tasa de migración por generación, usando el método de los alelos privados (Slatkin, 1985) y el programa Genepop versión 2. Este método parte de la ecuación de Ewens para

calcular el número de alelos diferentes esperados en una muestra r de una población de tamaño N : $E(k) = (r / +j)$, donde k es el número de alelos diferentes en la muestra y $r = 4N$, si estos alelos son neutrales. Lo que Slatkin propone en su artículo, antes citado, es que si no se presenta migración entre las poblaciones, en el equilibrio todos los alelos serán privados. Complementando entonces la ecuación de Ewens propone que si tenemos d demos muestreados, la frecuencia promedio de los alelos, todos ellos privados, será:

$$p(1) = (d / (k_1 + \dots + k_d)).$$

Los datos obtenidos para el número promedio de alelos por locus, la heterocigosidad promedio esperada y los números efectivos (tanto para el modelo de alelos infinitos como para el modelo stepwise) fueron comparados con el estado reportado por CITES o la UICN (Anexo 2) para cada una de las especies utilizando el programa REGR (del paquete estadístico MULTICUA) que permite una regresión con variables mixtas utilizando distancias. Este programa realiza un análisis de regresión múltiple, lineal o no lineal, partiendo de una matriz de datos mixtos (variables continuas, cualitativas o binarias).

Si Y es el vector de observaciones de la variable dependiente (continua) y W una $n \times p$ -matriz de datos correspondiente a las variables independientes continuas, cualitativas o binarias, se obtiene a partir de la matriz W , una matriz de distancias D euclídea usando una función de distancia. Sobre la matriz de distancias se realiza un análisis clásico de coordenadas principales. Si $X = (X_{(k)}, Z)$ es la matriz con las coordenadas principales, donde $X_{(k)}$ es un conjunto seleccionado de coordenadas principales, se propone el modelo de regresión $Y = \alpha_0 1' + X_{(k)} \alpha_{(k)} + e_{(k)}$.

La selección de $X_{(k)}$ en general se realiza tomando las coordenadas principales más correlacionadas con la variable dependiente en número igual al número inicial de variables independientes. El programa considera nulos los valores propios menores que 0.1 y por tanto las coordenadas principales asociadas tienen correlación nula con la variable dependiente. El programa utiliza varias posibles distancias. Para este trabajo se escogió la distancia de Gower, $d_{ij}^2 = 1 - s_{ij}$, donde $s_{ij} = \alpha(1 - (|x_{ih} - x_{jh}| / G_h) + a + \alpha) / (p_1 + (p_2 - d) + p_3)$, siendo p_1 el número de variables continuas, a y d son respectivamente los números de coincidencias y no incidencias para las p_2 variables binarias, y α es el número de coincidencias para las p_3 variables cualitativas. G_h es el rango de la h -ésima variable continua (Arenas et al., 1991).

La heterocigosidad esperada para cada locus fue calculada a partir de:

$H = 1 - \sum (n_i^2)$, siendo n_i cada uno de los alelos del locus en cuestión. Los números efectivos (N_e) se calcularon de acuerdo al modelo mutacional propuesto así:

$N_e = H / 4\mu (1-H)$, para el modelo de alelos infinitos, donde H es la heterocigosidad esperada promedio y μ es la tasa de mutación por generación. Para el modelo stepwise se utilizó: $N_e = 1 - (1 - H^2) / 8\mu (1-H)^2$. Las tasas de mutación utilizadas fueron 1.5×10^{-4} y 10^{-5} a partir de valores para otros mamíferos.

Empleando el programa Bottleneck versión 1.1.03 (Piry et al., 1999) se calculó la probabilidad de cuellos de botella recientes en las poblaciones analizadas de las diferentes especies de ciervos. Este programa se basa en el principio por el cual una población que ha sufrido una reciente disminución de sus números efectivos muestra

una correlación entre el número de alelos y la heterocigosidad en los loci polimórficos (Luikart & Cornuet, 1998). Sin embargo el número de alelos disminuye más rápido que la heterocigosidad (H_e). Por lo tanto H_e será mayor que la heterocigosis esperada en el equilibrio (H_{eq}) ya que H_{eq} está calculada a partir del número de alelos.

Basándose en los alelos encontrados (presencia – ausencia) para los diferentes marcadores microsátélites, se construyeron filogenias a partir de matrices de distancia y métodos de máxima parsimonia. Este método permite minimizar la longitud de la filogenia obtenida. Dos métodos principales fueron utilizados: Heuristic search y Branch and Bound search. Con el primero las estrategias usadas fueron el procedimiento general con almacenamiento en cada paso del árbol, utilizando adición paso a paso. El método Branch and Bound fue computado por la vía stepwise. Para elegir los árboles más parsimoniosos se utilizaron la longitud del árbol, el índice de consistencia (CI), el índice de retención (RI), el índice de consistencia rescalado (RC) y el índice de homoplasia (HI). Para determinar la consistencia de los diferentes clados internos se realizaron análisis de bootstraps con 500 replicaciones y generando árboles de consenso de bootstraps con frecuencias mayores del 50%. En estos casos en los cuales los árboles de consenso se utilizaron se siguieron los siguientes métodos: estricto, semiestricto, regla de mayoría, y Adams.

2. Secuenciación de la región D-Loop.

2.1. Muestras.

Para el análisis filogenético se utilizaron las siguientes muestras:

Una muestra de tejido de *Mazama americana* (Y08209) de posible procedencia Mexicana de un individuo del Zoológico de San Diego (Estados Unidos) extraída de los mismos tejidos utilizados por Douzery y colaboradores (1995).

Cuatro muestras de pelo con bulbo de *Odocoileus virginianus* procedentes del área central de Colombia de los zoológicos Jaime Duque y Pereira.

La secuencia de un individuo de *Odocoileus hemionus* de procedencia norteamericana obtenida por Feng y colaboradores, no publicado (número de acceso al banco de datos EMBL U12865).

Una muestra de *Ozotoceros bezoarticus* de pelo con bulbo obtenida directamente en el Zoológico de Santa Cruz, Bolivia.

Dos muestras de *Mazama americana* y una de un individuo fenotípicamente *Mazama gouazoubira* de la misma procedencia y naturaleza que la anterior.

La muestra de *Pudu puda* se obtuvo a partir de tejido procedente de Chile.

Como grupo ajeno se utilizaron dos secuencias de *Muntiacus reevesi* y *Elaphodus cephalophus*, dos Muntiacinae asiáticos, las cuales habían sido secuenciadas por el Dr. Randi en el instituto donde se realizó el proceso de secuenciación.

2.2. Marcadores y procedimiento de laboratorio.

Se secuenció una región del DNA mitocondrial de la región de control (D-Loop) de 1133 pb, en colaboración con el Dr. Ettore Randi, del Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica en Ozzano dell'Emilia en Italia, de la siguiente forma: La región comentada

se amplificó vía PCR utilizando los primers L-Pro 5'-CGTCAGTCTCACCATCAACCCCAAAGC-3' y H-Phe 5'-

GGGAGACTCATCTAGGCATTTTCAGTG-3' (Douzery & Randi, 1997) los cuales se encuentran adyacentes a las posiciones 15740 y 420 de los genes mitocondriales bovinos tRNA^{Pro} y tRNA^{Phe}.

Las amplificaciones se realizaron con AmpliTaq DNA polimerasa y con MgCl₂ 3mM, utilizando un termociclador 9600 Perkin Elmer con los siguientes ciclos: 94°C durante 2 min; 30 ciclos de 94°C durante 15 s, 55°C durante 15 s y 72°C durante 1 min; y 10 min a 72°C. Los productos obtenidos por PCR se purificaron en geles de agarosa de baja temperatura de fusión. Las secuencias fueron obtenidas por ciclos de DNA de dos cadenas con Δtaq Sequenase, utilizando los primers externos citados antes (L-Pro y H-Phe) y los primers adyacentes a la zona media de la región central conservada en los artiodáctilos (L-362 5'-AATCACCATGCCGCGTGAAACC-3' y H493 5'-TGAGATGGCCCTGAAGAAAGAACC-3').

2.3. Análisis Filogenético.

Una vez obtenidas las secuencias, éstas fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). En regiones altamente variables, se introdujeron huecos (gaps) cuando implicaron al menos dos substituciones y fueron agrupados para maximizar la similitud global. Inserciones grandes (47 y 75 pb) fueron excluidas para los análisis filogenéticos.

En primer lugar, se obtuvieron los estadísticos π (diversidad nucleotídica, número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias escogidas al azar) y su varianza de muestreo y error estándar, θ por nucleótido, K (número

promedio de diferencias nucleotídicas; Tajima, 1983) y sus varianzas de muestreo y estocásticas, y $M=4N_e v$ por secuencia, donde N_e es el número efectivo y v es la tasa de mutación nucleotídica por generación, con su correspondiente varianza sin recombinación, para los géneros *Odocoileus* y *Mazama* colombianos y bolivianos, respectivamente. Para cada uno de esos géneros se analizó el desequilibrio de ligamiento entre las variantes de diferentes sitios polimórficos con los siguientes parámetros genético poblacionales: D (Lewontin & Kojima, 1964), D' (Lewontin, 1964) y los coeficientes de correlación y determinación de desequilibrio gamético, R y R^2 (Hill & Robertson, 1968). La significación de D se midió, simultáneamente, con una χ^2 y con el test exacto de Fisher con dos colas. Finalmente, también, para ambos géneros se calculó el test D de Tajima (1989) para observar si las secuencias analizadas siguen un modelo molecular neutral o no. Este test se basa en el hecho que en un modelo neutral las estimas del número de sitios segregantes y el número promedio de diferencias nucleotídicas están correlacionados. Se calculó este estadístico asumiendo que sigue una distribución β . Todos estos estadísticos fueron calculados con el programa informático DnaSP (Rozas & Rozas, 1995).

A partir de todas las secuencias nucleotídicas obtenidas, se calcularon las matrices de distancias genéticas entre pares de secuencias utilizando los métodos de dos parámetros de Kimura (1980) y el de Tajima & Nei (1984). Para el primer procedimiento, se tienen en consideración posibles diferencias entre transiciones (P) y transversiones (Q), siendo el número de sustituciones por sitio nucleotídico entre dos secuencias dadas $K=(1/2) \ln(a) + (1/4) \ln(b)$, donde $a=1/(1-2P-Q)$ y $b=1/(1-2Q)$.

En el segundo método, en el cual las frecuencias de los cuatro nucleótidos pueden ser diferentes, $K = -b/n(1 - (p/b))$, donde $b = (b_1 + p^2/h)/2$, siendo $b_1 = 1 - q_i^2$, donde q_i es la frecuencia en equilibrio del i -ésimo nucleótido ($i=1, 2, 3, 4$, esto es A, G, T, C), y $h = \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 (X_{ij})^2 / (2 q_i q_j)$, donde X_{ij} es la proporción de pares de nucleótidos i y j entre dos secuencias comparadas (Li, 1997).

Los resultados obtenidos con otras distancias genéticas, como la de Jukes-Cantor (1969), la de Tamura & Nei (1993), o la del modelo de los seis parámetros de Kimura (1981), ofrecieron resultados idénticos a los mostrados en este trabajo.

A estas matrices de distancias genéticas se les aplicaron los algoritmos UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) y neighbor-joining (Saitou & Nei, 1987) para obtener diversos árboles filogenéticos entre los géneros de Cervidae americanos analizados. Estos análisis se llevaron a cabo con el programa MEGA 1.2 (Kumar et al., 1993). Para analizar la significación de los diversos clados obtenidos se aplicó el método bootstrap con 1000 permutaciones. Valores por encima del 75% se consideraron altamente significativos. También se obtuvieron árboles filogenéticos utilizando métodos de máxima parsimonia con los procedimientos "heuristic search" y "branch and bound search" con el programa PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993). El porcentaje de bootstrap fue utilizado, de nuevo, para determinar la significación de los diversos clados encontrados.

RESULTADOS

El trabajo realizado consta de dos partes principales: el análisis genético–poblacional a partir de los loci microsatélites y el análisis filogenético a partir de las secuencias de la región control del DNA mitocondrial (D-Loop). Adicionalmente se realizó un análisis filogenético a partir de la totalidad de los resultados obtenidos con los microsatélites utilizando como patrón los datos obtenidos por Slate y colaboradores (1998) para *Cervus elaphus* y *Cervus nippon*.

Microsatélites

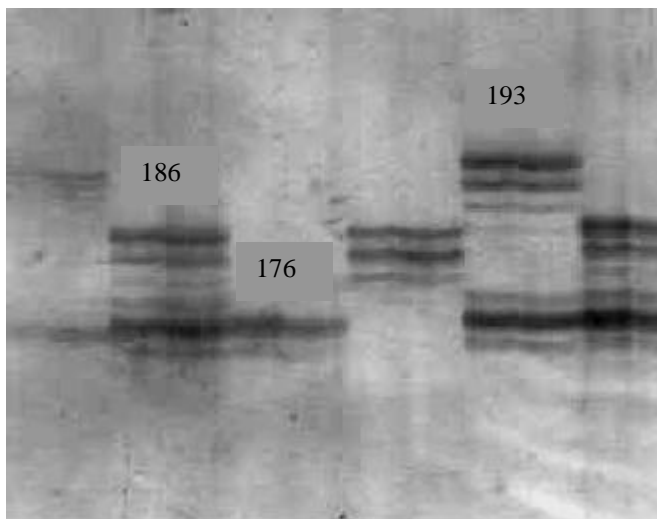
En las figuras 1 a 10 se muestran las frecuencias alélicas obtenidas para los diferentes marcadores microsatélites en las 10 especies de Cervidae trabajadas. Puede observarse que la mayor cantidad de alelos fue obtenida para Cervid 1, Cervid 3 e IDVGA 55, y que las especies en las cuales se probaron el mayor número de marcadores son *Odocoileus virginianus* y *Mazama americana*. En ninguna de las especies tenemos resultados para los diez microsatélites, aunque con certeza sólo podemos decir que *Capreolus capreolus* y *Capreolus pygargus* (figuras 9 y 10) no amplifican para Cervid 1. Adicionalmente es importante resaltar que los marcadores diseñados para renos fueron probados en muy pocos individuos por especie, debido a la poca disponibilidad de primers, y que de no todas las especies se tenían la misma cantidad de individuos.

Para Cervid 1 la mayor cantidad de alelos se encontró en *Mazama americana* (ver figura 1), mientras que para Cervid 3 la mayor cantidad de alelos encontrados es para *Odocoileus virginianus* (ver figura 4). Dentro de los marcadores de Bóvidos aquel con el cual se obtuvieron los resultados más significativos fue IDVGA 55, encontrándose 6 alelos tanto en *Odocoileus virginianus* como en *Mazama americana*.

En las otras especies se encontraron menos alelos para cada marcador.

Los tamaños de los alelos individuales para cada marcador microsatélite se encuentran reportados en el Anexo 1 y son los números dentro de cada barra (pares de bases).

Foto 1. Gel de Poliacrilamida: Alelos de Microsatélites.



En la foto podemos ver un gel con tres diferentes alelos para cinco individuos diferentes. El primer individuo (de izquierda a derecha) presenta dos alelos (por lo tanto es un heterocigoto) uno de ellos de

186 pb y el otro de 176 pb. El individuo que se encuentra a su derecha presenta sólo la banda de 176 pb, por lo tanto este individuo es un homocigoto (ambos alelos son iguales).

Figura 1: Frecuencias alélicas para *Mazama americana*.

9 loci microsatélites. 22 individuos.

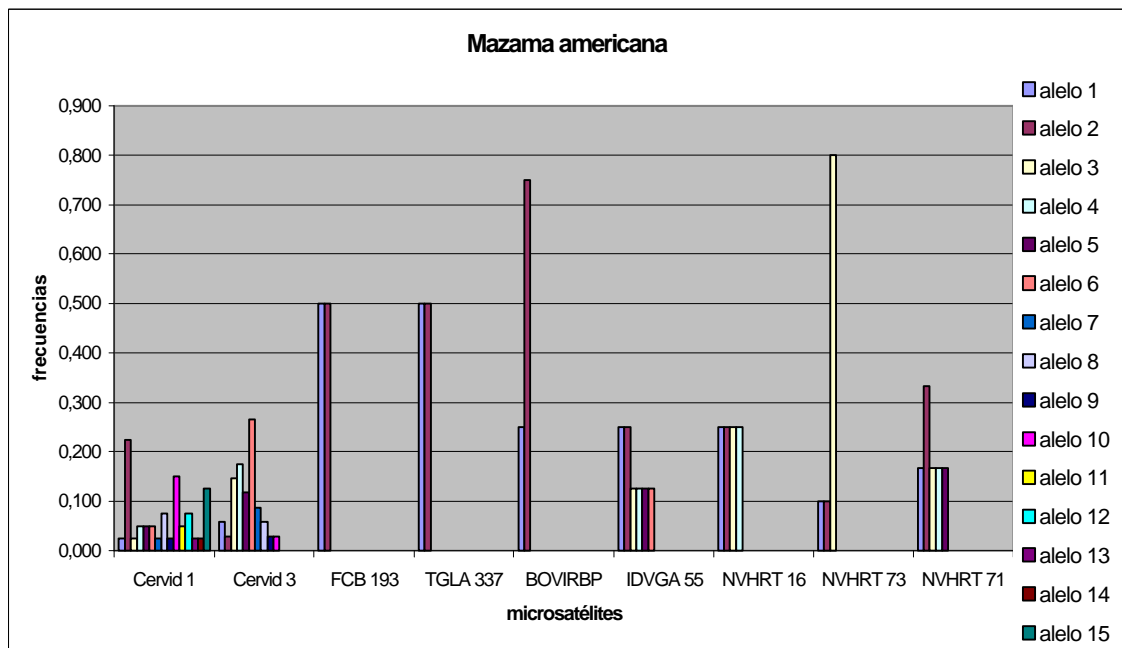
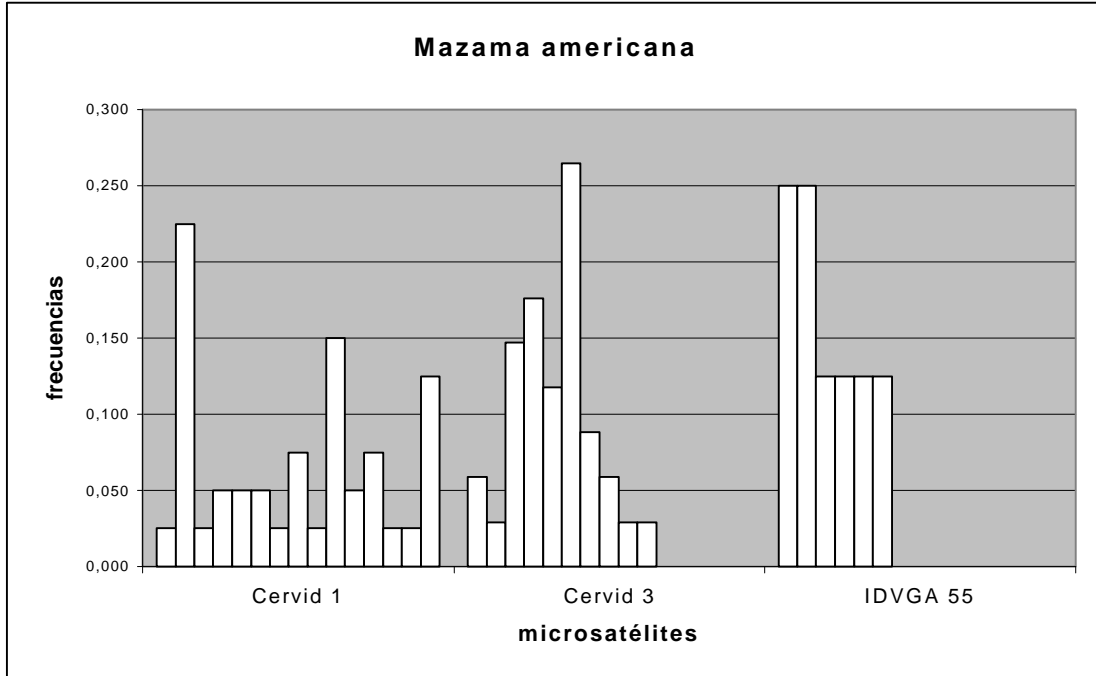


Figura 2 A y B: Frecuencias alélicas para *Mazama gouazoubira*.

7 loci microsatélites. 8 individuos.

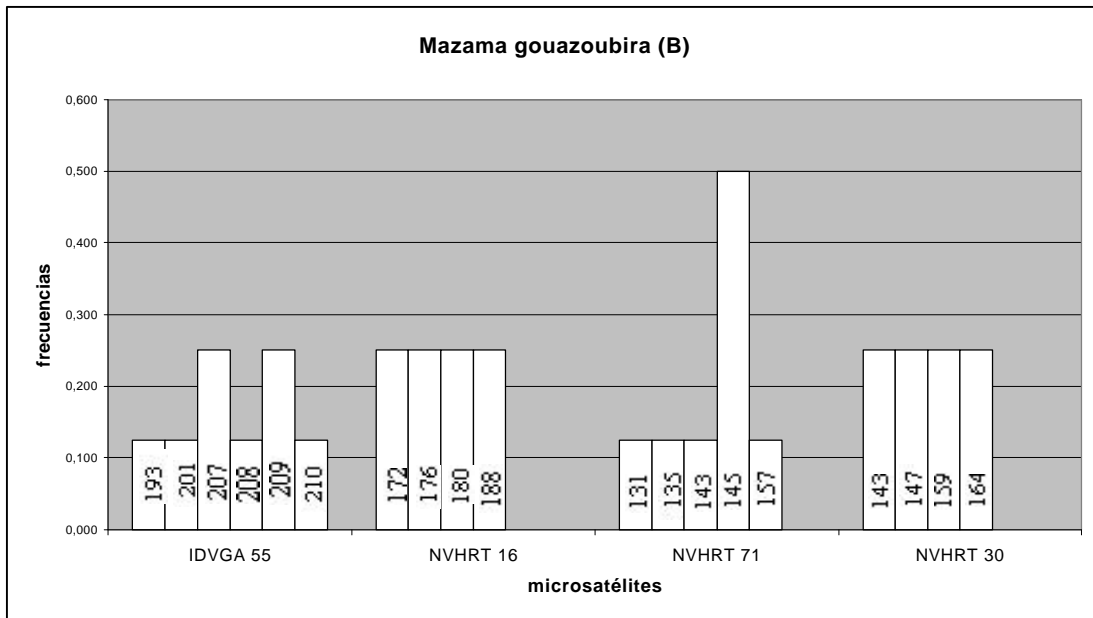
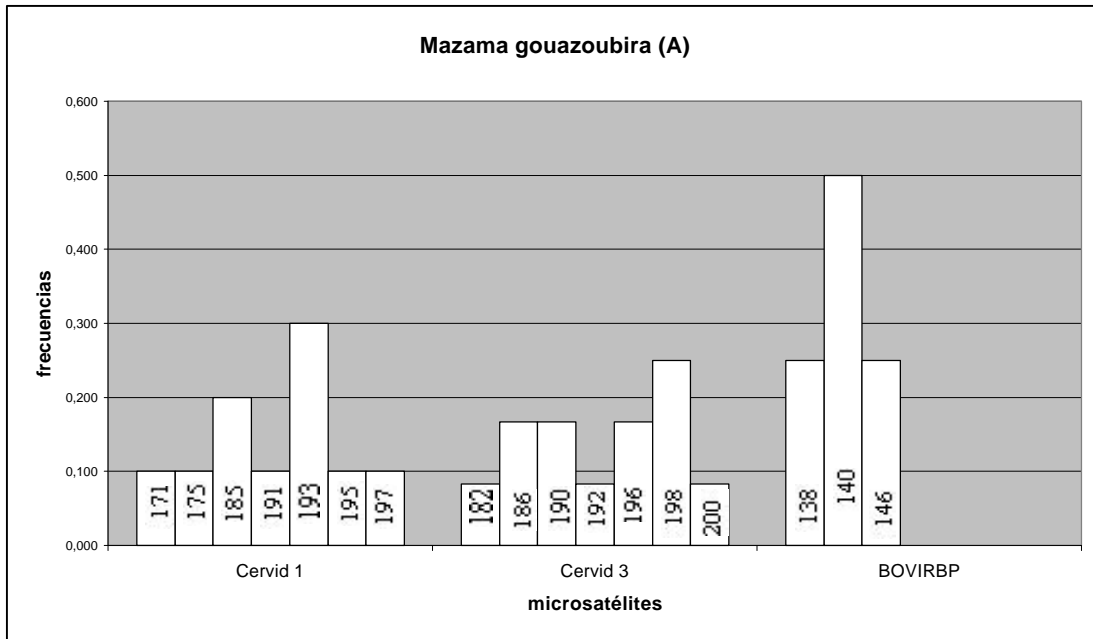


Figura 3: Frecuencias alélicas para *Mazama rufina*.

4 loci microsatélites. 2 individuos.

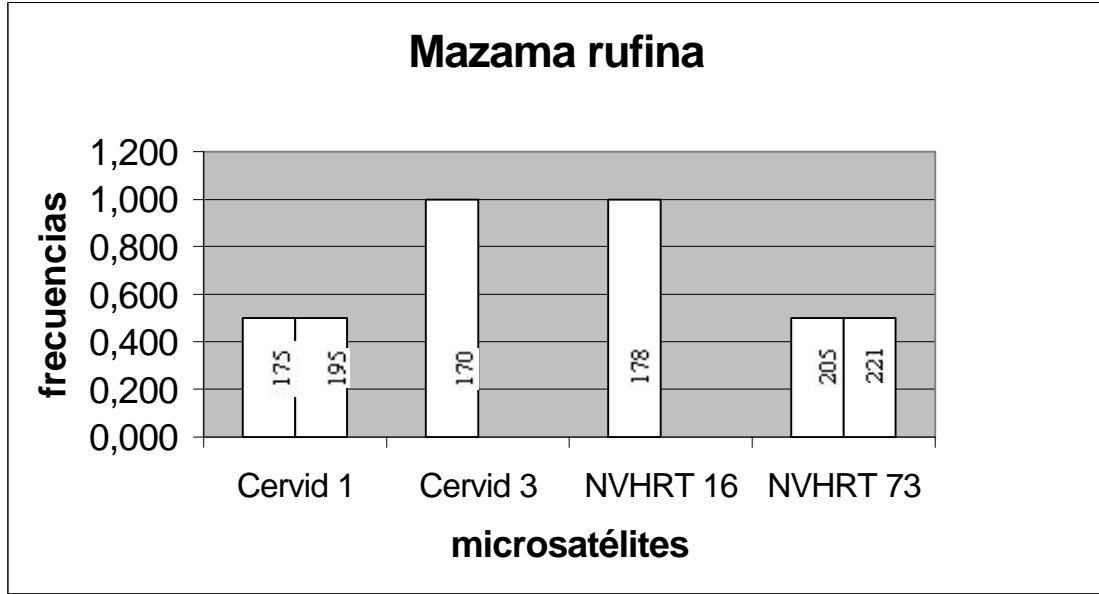
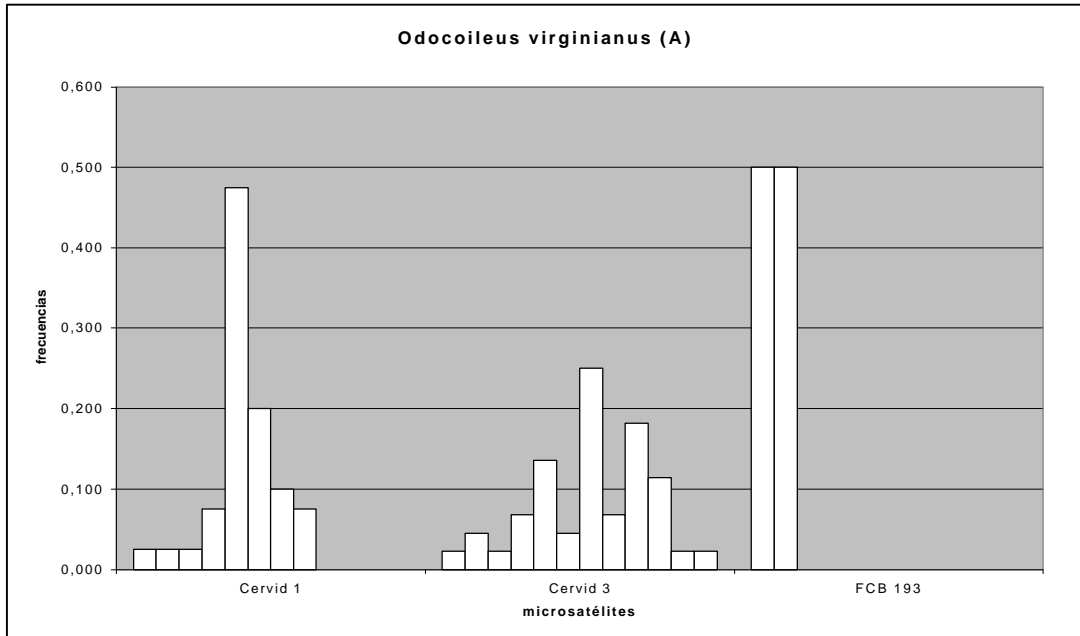
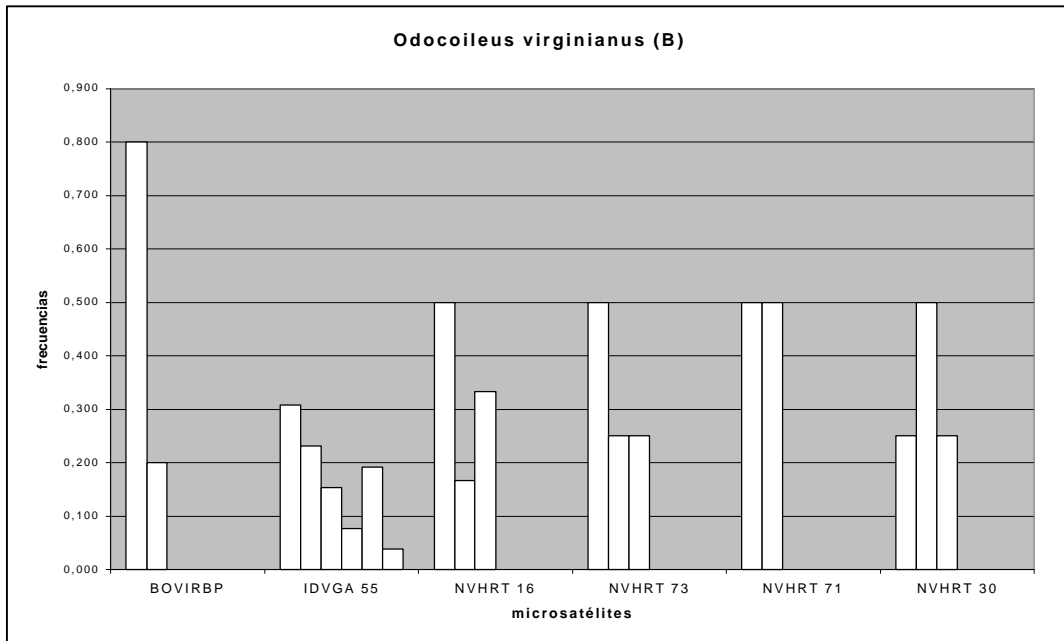


Figura 4 A y B: Frecuencias alélicas para *Odocoileus virginianus*.

9 loci microsatélites. 23 individuos.





igura 5: Frecuencias alélicas para *Blastocerus dichotomus*.

7 loci microsatélites. 8 individuos.

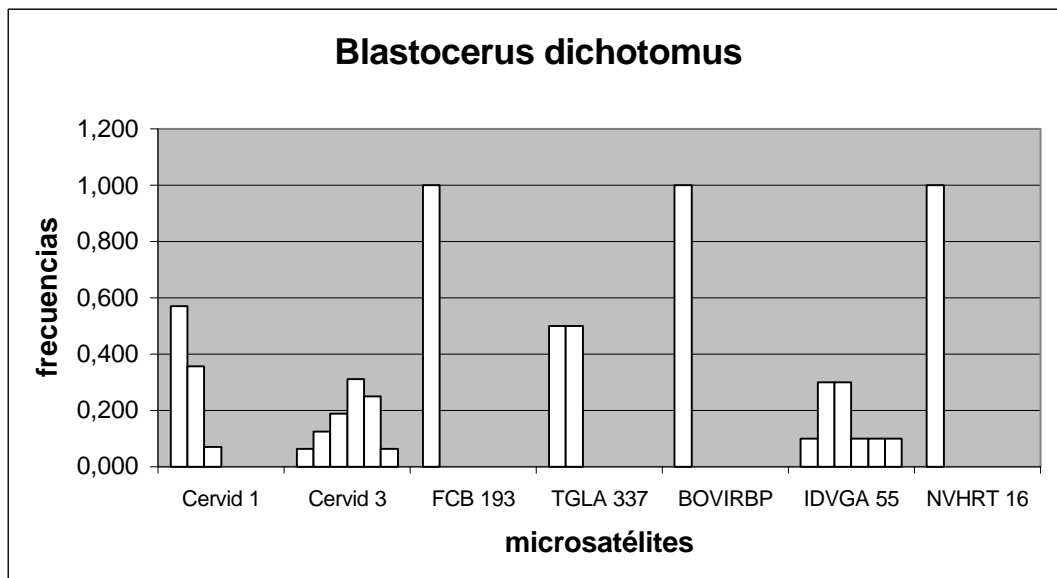
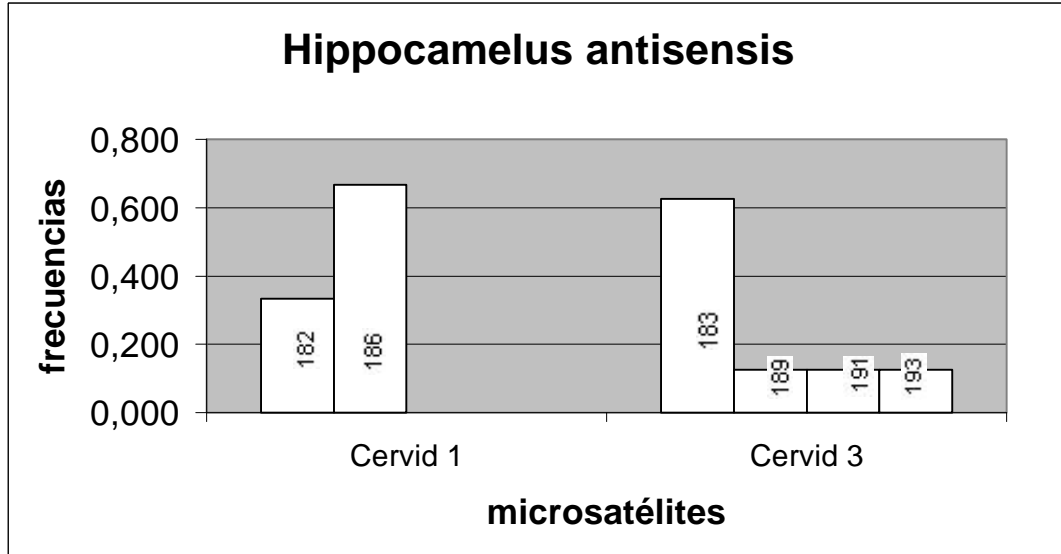


Figura 6: Frecuencias alélicas para *Hippocamelus antisensis*.

2 loci microsatélites. 4 individuos.



F

Figura 7: Frecuencias alélicas para *Pudu mephistopheles*.

4 loci microsatélites. 2 individuos.

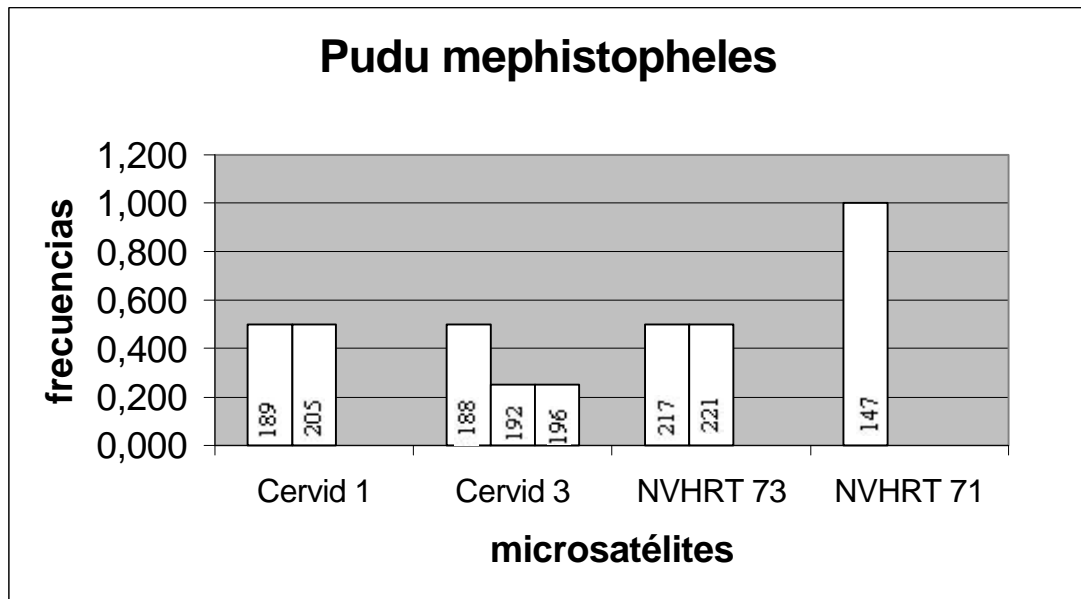


Figura 8: Frecuencias alélicas para *Ozotoceros bezoarticus*.

4 loci microsatélites. 2 individuos.

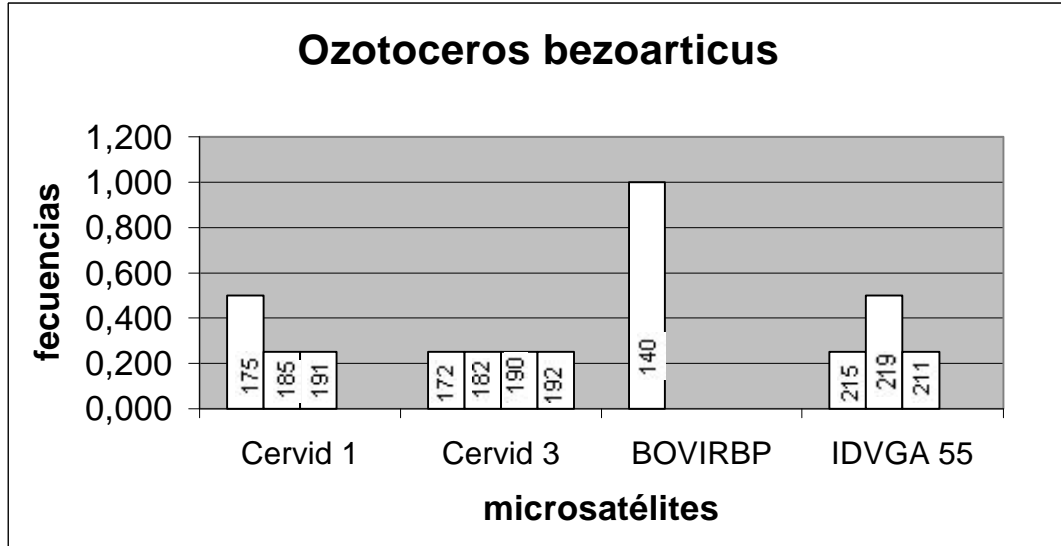


Figura 9: Frecuencias alélicas para *Capreolus capreolus*.

4 loci microsatélites. 27 individuos.

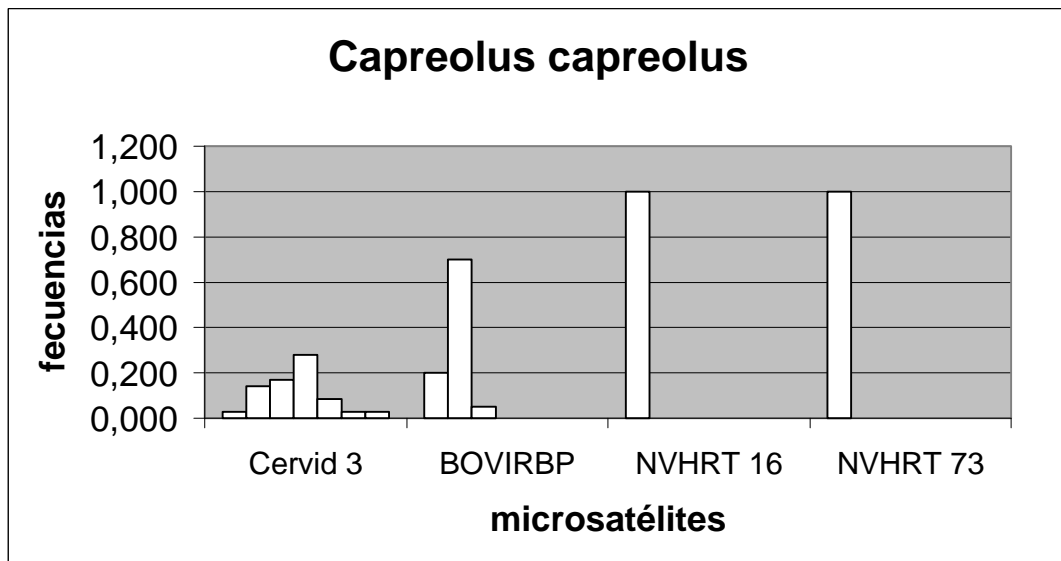
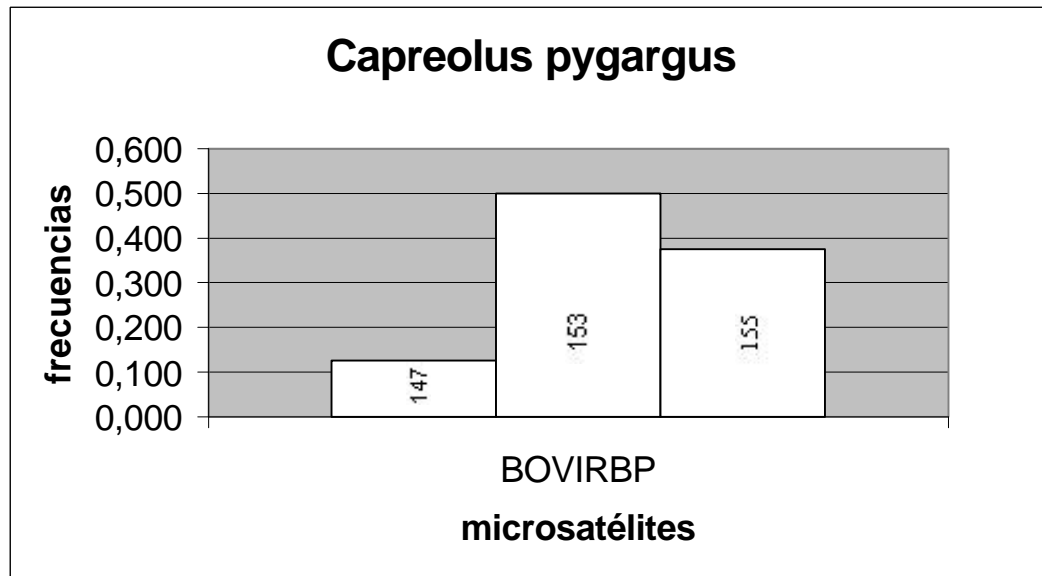


Figura 10: Frecuencias alélicas para *Capreolus pygargus*.

1 loci microsatélites. 4 individuos.



Es importante resaltar que dada la poca disponibilidad de algunos de los primers para los microsatélites se dio prioridad a los ejemplares de las especies americanas, en especial a las del género *Mazama* donde se encontraban muy bien representadas diferentes poblaciones de las especies *Mazama americana* y *Mazama gouazoubira*, y *Odocoileus virginianus*, el cual es el ciervo americano de más amplia distribución y del cual se tenían ejemplares de diversas procedencias geográficas. Es por esto que para otras especies no se encuentran reportados tantos loci (algunos tienen sólo un loci y otros dos).

A partir de las frecuencias alélicas se realizaron diversos análisis genético-poblacionales utilizando el programa Genepop versión 2. El primero de ellos fue un

análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg obteniendo los resultados que se observan en la Tabla 1. Allí pueden observarse las probabilidades frente a la prueba de χ^2 , con un α de 0.05. Se postularon dos hipótesis principales: la primera de ellas era que la población no se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg debido a un déficit de heterocigotos, y la segunda es que esto se debía a un exceso de heterocigoto. Adicionalmente se realizaron pruebas de probabilidad exacta para cada locus por separado, cada población por separado y para locus y poblaciones en conjunto. Dado la gran cantidad de dudas taxonómicas que se han reportado para las diferentes especies del género *Mazama* se trabajó este género como un grupo con diferentes poblaciones (por países sin importar la especie y por especies teniendo como parámetros las regiones de procedencia de las muestras o los países a los que pertenecen).

Es importante aclarar que Santa Cruz es una ciudad en Bolivia y de allí procede un importante número de individuos, y que las poblaciones denominadas J. Duque y Pereira se refieren al zoológico Jaime Duque (Briceño, Cundinamarca) y al zoológico de Pereira (en la ciudad del mismo nombre). La población denominada Córdoba se refiere a la región geográfica del Alto Sinú en el departamento de Córdoba en la costa Atlántica colombiana.

Tabla 1. Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg para loci microsátélites en las especies estudiadas.

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
<i>Mazama sp.</i>	Todas	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,0014	0,0010	0,242	0,149
	Todas	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 0,9855	0,0126		
	Todas	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,0041	0,0041		
	Todas	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,0000	0,0000	0,495	0,386
	Todas	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 1,0000	0,0000		
	Todas	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,0000	0,0000		
	Todas	IDVGA 55	Déficit heterocigotos	de 0,0028	0,0028	0,358	0,250
	Todas	IDVGA 55	Test probabilidad	de 0,0105	0,0093		
	Todas	BOVIRBP	Déficit heterocigotos	de 0,4286	0,0000	0,250	0,089
	Todas	BOVIRBP	Exceso heterocigotos	de 1,0000	0,0000		

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir & Robertson Cockerham & Hill	F
	Todas	BOVIRBP	Test	de 0,4286	-		
			probabilidad				
	Todas	NVHRT	Déficit	de 0,2525	0,0237	0,217	0,167
		16	heterocigotos				
	Todas	NVHRT	Exceso	de 0,9761	0,0078		
		16	heterocigotos				
	Todas	NVHRT	Test	de 0,3460	0,0198		
		16	probabilidad				
	Todas	NVHRT	Déficit	de 1,0000	0,0000	-0,530	-0,010
		73	heterocigotos				
	Todas	NVHRT	Exceso	de 0,9091	0,0000		
		73	heterocigotos				
	Todas	NVHRT	Test	de 1,0000	-		
		73	probabilidad				
	Todas	NVHRT	Déficit	de 0,1516	0,0299	0,231	0,083
		71	heterocigotos				
	Todas	NVHRT	Exceso	de 0,9305	0,0175		
		71	heterocigotos				
	Todas	NVHRT	Test	de 0,0104	0,0047		
		71	probabilidad				
	Todas	Todos	Test	0,0000	0,0000		
			multilocus				
<i>Mazama sp.</i>	Bolivia	Cervid 1	Déficit	de 1,0000	0,0000	-0,043	-0,034
			heterocigotos				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson Cockerham & Hill
Bolivia	Cervid 1	Exceso	de 0,7268	0,0443			
		heterocigotos					
Bolivia	Cervid 1	Test	de 1,0000	0,0000			
		probabilidad					
Bolivia	Cervid 3	Déficit	de 0,0008	0,0006	0,417	0,369	
		heterocigotos					
Bolivia	Cervid 3	Exceso	de 0,9997	0,0003			
		heterocigotos					
Bolivia	Cervid 3	Test	de 0,0422	0,0094			
		probabilidad					
Bolivia	IDVGA 55	Déficit	de 0,2884	0,0379	0,179	0,125	
		heterocigotos					
Bolivia	IDVGA 55	Exceso	de 0,9761	0,0108			
		heterocigotos					
Bolivia	IDVGA 55	Test	de 0,2583	0,0324			
		probabilidad					
Bolivia	BOVIRBP	Déficit	de 1,0000	-	0,000	0,000	
		heterocigotos					
Bolivia	BOVIRBP	Exceso	de 1,0000	-			
		heterocigotos					
Bolivia	BOVIRBP	Test	de 1,0000	-			
		probabilidad					
Bolivia	Todos	Probabilidad	0,3391				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir & Robertson Cockerham & Hill	F
	Bolivia	Todos	Test multilocus	0,1140	0,0191		
<i>Mazama sp.</i>	Guyana	NVHRT 71	Déficit heterocigotos	de 0,1098	0,0190	0,250	0,167
	Guyana	NVHRT 71	Exceso heterocigotos	de 1,0000	0,0000		
	Guyana	NVHRT 71	Test probabilidad	de 0,1390	0,0227		
<i>Mazama sp.</i>	Paraguay	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 1,0000	-	-0,333	-0,250
	Paraguay	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 0,6667	-		
	Paraguay	Cervid 1	Test probabilidad	de 1,0000	-		
	Paraguay	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	0,500	0,500
	Paraguay	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Paraguay	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,3333	-		
	Paraguay	IDVGA 55	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	1,000	2,000
	Paraguay	IDVGA 55	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir & Robertson Cockerham & Hill	F
	Paraguay	IDVGA 55	Test	de 0,3333	-		
			probabilidad				
	Paraguay	Todos	Probabilidad	0,6235			
<i>Mazama sp.</i>	Colombia	Cervid 1	Déficit	de 0,0518	0,0082	0,300	0,250
			heterocigotos				
	Colombia	Cervid 1	Exceso	de 0,9901	0,0032		
			heterocigotos				
	Colombia	Cervid 1	Test	de 0,0022	0,0011		
			probabilidad				
	Colombia	Cervid 3	Déficit	de 0,0130	0,0054	0,556	0,350
			heterocigotos				
	Colombia	Cervid 3	Exceso	de 1,0000	0,0000		
			heterocigotos				
	Colombia	Cervid 3	Test	de 0,0073	0,0034		
			probabilidad				
	Colombia	Todos	Probabilidad	0,0002			
	Colombia	Todos	Test	0,1248	0,0183		
			multilocus				
<i>Mazama sp.</i>	Perú	Cervid 1	Déficit	de 0,1429	-	0,368	0,361
			heterocigotos				
	Perú	Cervid 1	Exceso	de 0,9714	-		
			heterocigotos				
	Perú	Cervid 1	Test	de 0,3143	-		
			probabilidad				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir & Robertson Cockerham & Hill	F
	Perú	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,0012	0,0006	0,636	0,650
	Perú	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 1,0000	0,0000		
	Perú	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,0259	0,0066		
	Perú	NVHRT 71	Déficit heterocigotos	de 1,0000	-	0,000	0,000
	Perú	NVHRT 71	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Perú	NVHRT 71	Test probabilidad	de 1,0000	-		
	Perú	Todos	Probabilidad	0,1415			
	Perú	Todos	Test multilocus	0,0000	0,0000		
<i>Mazama sp.</i>	Venezuela	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	1,000	2,000
	Venezuela	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Venezuela	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,3333	-		
	Todas	Todos	Probabilidad	0,0011			
<i>M. rufina</i>	Todas	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	1,000	2,000

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir & Robertson Cockerham & Hill	F
	Todas	Cervid 1	Exceso	de 1,0000	-	1,000	2,000
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 1	Test	de 0,3333			
			probabilidad				
	Todas	Todos	Test	0,3330	0,0048		
			multilocus				
<i>M. americana</i>	Todas	Cervid 1	Déficit	de 0,1305	0,0326	0,123	0,039
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 1	Exceso	de 0,9053	0,0236		
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 1	Test	de 0,0501	0,0230		
			probabilidad				
	Todas	Cervid 3	Déficit	de -	0,0000	0,400	0,262
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 3	Exceso	de 1,0000	0,0000		
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 3	Test	de 0,0017	0,0016		
			probabilidad				
	Todas	IDVGA 55	Déficit	de 0,0218	0,0046	0,500	0,400
			heterocigotos				
	Todas	IDVGA 55	Exceso	de 1,0000	0,0000		
			heterocigotos				
	Todas	IDVGA 55	Test	de 0,0630	0,0118		
			probabilidad				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
	Todas	NVHRT 71	Déficit heterocigotos	de 1,0000	0,0000	-0,091	-0,063
	Todas	NVHRT 71	Exceso heterocigotos	de 0,7709	0,2000		
	Todas	NVHRT 71	Test probabilidad	de 1,0000	0,0000		
	Todas	Todos	Probabilidad	0,0021			
	Todas	Todos	Test multilocus	0,0000	0,0000		
<i>M. americana</i>	Santa Cruz	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 1,0000	0,0000	-0,500	-0,370
	Santa Cruz	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 0,6794	0,0446		
	Santa Cruz	Cervid 1	Test probabilidad	de 1,0000	0,0000		
	Santa Cruz	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,0828	0,0102	0,231	0,210
	Santa Cruz	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 0,9456	0,0082		
	Santa Cruz	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,1454	0,0196		
	Santa Cruz	IDVGA 55	Déficit heterocigotos	de 0,2203	0,0169	0,333	0,250

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
	Santa Cruz	IDVGA 55	Exceso	de 1,0000	0,0000		
			heterocigotos				
	Santa Cruz	IDVGA 55	Test	de 0,1813	0,0150		
			probabilidad				
	Santa Cruz	Todos	Probabilidad	0,5220			
	Santa Cruz	Todos	Test	0,0670	0,0185		
			multilocus				
<i>M. americana</i>	Perú	Cervid 1	Déficit	de 0,1429	-	0,368	0,361
			heterocigotos				
	Perú	Cervid 1	Exceso	de 0,9714	-		
			heterocigotos				
	Perú	Cervid 1	Test	de 0,3143	-		
			probabilidad				
	Perú	Cervid 3	Déficit	de 0,0010	0,0010	0,636	0,650
			heterocigotos				
	Perú	Cervid 3	Exceso	de 1,0000	0,0000		
			heterocigotos				
	Perú	Cervid 3	Test	de 0,0157	0,0049		
			probabilidad				
	Perú	NVHRT 71	Déficit	de 1,0000	-	0,000	0,000
			heterocigotos				
	Perú	NVHRT 71	Exceso	de 1,0000	-		
			heterocigotos				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
	Perú	NVHRT 71	Test probabilidad	de 1,0000	-		
	Perú	Todos	Probabilidad	0,1007			
	Perú	Todos	Test multilocus	0,0000	0,0000		
<i>M. americana</i>	Córdoba	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,7714	-	0,000	-0,028
	Córdoba	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 0,8000	-		
	Córdoba	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,3143	-		
	Córdoba	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,2000	-	0,500	0,250
	Córdoba	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Córdoba	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,2000	-		
	Córdoba	Todos	Probabilidad	0,2368			
	Córdoba	Todos	Test multilocus	0,2999	0,0160		
<i>M. gouazoubira</i>	Todas	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,0421	0,0113	0,368	0,250
	Todas	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 1,0000	0,0000		

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
Todas	Cervid 1	Test	de 0,0530	0,0107			
		probabilidad					
Todas	Cervid 3	Déficit	de 0,0000	0,0000	0,655	0,589	
		heterocigotos					
Todas	Cervid 3	Exceso	de 1,0000	0,0000			
		heterocigotos					
Todas	Cervid 3	Test	de 0,0014	0,0014			
		probabilidad					
Todas	IDVGA 55	Déficit	de 0,2386	0,0235	0,217	0,167	
		heterocigotos					
Todas	IDVGA 55	Exceso	de 0,9718	0,0070			
		heterocigotos					
Todas	IDVGA 55	Test	de 0,3486	0,0238			
		probabilidad					
Todas	BOVIRBP	Déficit	de 0,3333	-	0,500	0,500	
		heterocigotos					
Todas	BOVIRBP	Exceso	de 1,0000	-			
		heterocigotos					
Todas	BOVIRBP	Test	de 0,3333	-			
		probabilidad					
Todas	NVHRT	Déficit	de 1,0000	-	0,000	0,000	
	16	heterocigotos					
Todas	NVHRT	Exceso	de 1,0000	-			
	16	heterocigotos					

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
	Todas	NVHRT 16	Test probabilidad	de 1,0000	-		
	Todas	NVHRT 71	Déficit heterocigotos	de 0,0969	0,0129	0,400	0,167
	Todas	NVHRT 71	Exceso heterocigotos	de 1,0000	0,0000		
	Todas	NVHRT 71	Test probabilidad	de 0,0901	0,0901		
	Todas	Todos	Probabilidad	0,0052			
	Todas	Todos	Test multilocus	0,0000	0,0000		
<i>M. gouazoubira</i>	Bolivia	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 1,0000	-	0,000	0,000
	Bolivia	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 0,7268	0,0443		
	Bolivia	Cervid 1	Test probabilidad	de 1,0000	-		
	Bolivia	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	1,000	2,000
	Bolivia	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 0,9997	0,0003		
	Bolivia	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,3333	-		

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
	Bolivia	IDVGA 55	Déficit	de 1,0000	-	-0,333	-0,250
			heterocigotos				
	Bolivia	IDVGA 55	Exceso	de 0,9761	-		
			heterocigotos				
	Bolivia	IDVGA 55	Test	de 1,0000	-		
			probabilidad				
	Bolivia	Todos	Probabilidad	0,9007			
	Bolivia	Todos	Test	0,3404	0,0041		
			multilocus				
<i>M.</i>	Guyana	NVHRT	Déficit	de 0,2424	0,0176	0,333	0,250
<i>gouazoubira</i>		71	heterocigotos				
	Guyana	NVHRT	Exceso	de 1,0000	0,0000		
		71	heterocigotos				
	Guyana	NVHRT	Test	de 0,1785	0,0125		
		71	probabilidad				
	Guyana	Todos	Test	0,1851	0,0189		
			multilocus				
<i>M.</i>	Venezuela	Cervid 1	Déficit	de 0,3333	-	1,000	2,000
<i>gouazoubira</i>			heterocigotos				
	Venezuela	Cervid 1	Exceso	de 1,0000	-		
			heterocigotos				
	Venezuela	Cervid 1	Test	de 0,3333	-		
			probabilidad				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
	Venezuela	Todos	Test	0,3303	0,0041		
			multilocus				
<i>M.</i>	Todas	Todos	Probabilidad	0,9007			
<i>gouazoubira</i>							
<i>B. dichotomus</i>	Todas	Cervid 1	Déficit	de 0,6643	-	0,020	0,029
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 1	Exceso	de 0,7086	-		
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 1	Test	de 1,0000	-		
			probabilidad				
	Todas	Cervid 3	Déficit	de 0,8187	0,0136	-0,077	-0,071
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 3	Exceso	de 0,5359	0,0214		
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 3	Test	de 0,5690	0,0168		
			probabilidad				
	Todas	IDVGA 55	Déficit	de 1,0000	0,0000	-0,176	-0,100
			heterocigotos				
	Todas	IDVGA 55	Exceso	de 0,5254	0,0207		
			heterocigotos				
	Todas	IDVGA 55	Test	de 0,7778	0,0174		
			probabilidad				
	Todas	Todos	Test	0,8340	0,0133		
			multilocus				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
	Todas	Todos	Probabilidad	0,9504			
<i>H. antisensis</i>	Argentina	Todos	Test multilocus	0,0861	0,0052		
	Argentina	Todos	Probabilidad	0,5219			
	Argentina	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,2000	-	1,000	2,000
	Argentina	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Argentina	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,2000	-		
	Argentina	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 1,0000	-	-0,200	-0,067
	Argentina	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 0,5714	-		
	Argentina	Cervid 3	Test probabilidad	de 1,0000	-		
<i>O. bezoarticus</i>	Bolivia	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	0,500	0,500
	Bolivia	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Bolivia	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,3333	-		
	Bolivia	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 1,0000	-	0,000	0,000

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
	Bolivia	Cervid 3	Exceso	de 1,0000	-		
			heterocigotos				
	Bolivia	Cervid 3	Test	de 1,0000	-		
			probabilidad				
	Bolivia	IDVGA 55	Déficit	de 0,3333	-	0,500	0,500
			heterocigotos				
	Bolivia	IDVGA 55	Exceso	de 1,0000	-		
			heterocigotos				
	Bolivia	IDVGA 55	Test	de 0,3333	-		
			probabilidad				
	Bolivia	Todos	Test	0,1005	0,0049		
			multilocus				
	Bolivia	Todos	Probabilidad	0,6235			
<i>P.</i>	Todas	Cervid 3	Déficit	de 0,3333	-	0,500	0,500
<i>mephistopheles</i>			heterocigotos				
	Todas	Cervid 3	Exceso	de 1,0000	-		
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 3	Test	de 0,3333	-		
			probabilidad				
	Todas	Todos	Test	0,3449	0,0116		
			multilocus				
<i>C. capreolus</i>	Italia	Cervid 3	Déficit	de 0,0427	0,0101	0,130	0,144
			heterocigotos				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
	Italia	Cervid 3	Exceso	de 0,9763	0,0068		
			heterocigotos				
	Italia	Cervid 3	Test	de 0,0065	0,0026		
			probabilidad				
	Italia	BOVIRBP	Déficit	de 0,6533	-	-0,023	-0,045
			heterocigotos				
	Italia	BOVIRBP	Exceso	de 0,6588	-		
			heterocigotos				
	Italia	BOVIRBP	Test	de 0,1678	-		
			probabilidad				
	Italia	Todos	Test	0,0612	0,0169		
			multilocus				
	Italia	Todos	Probabilidad	0,0085			
<i>C. pygargus</i>	Todas	BOVIRBP	Déficit	de 0,7714	-	-0,125	-0,125
			heterocigotos				
	Todas	BOVIRBP	Exceso	de 0,5714	-		
			heterocigotos				
	Todas	BOVIRBP	Test	de 1,0000	-		
			probabilidad				
<i>O. virginianus</i>	Todas	Cervid 1	Déficit	de 0,0225	0,0066	0,368	0,134
			heterocigotos				
	Todas	Cervid 1	Exceso	de 0,9795	0,0070		
			heterocigotos				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
Todas		Cervid 1	Test	de 0,0000	0,0000		
			probabilidad				
Todas		Cervid 3	Déficit	de 0,0004	0,0004	0,227	0,256
			heterocigotos				
Todas		Cervid 3	Exceso	de 1,0000	0,0000		
			heterocigotos				
Todas		Cervid 3	Test	de 0,0022	0,0022		
			probabilidad				
Todas		IDVGA 55	Déficit	de 0,1365	0,0149	0,156	0,128
			heterocigotos				
Todas		IDVGA 55	Exceso	de 0,8826	0,0103		
			heterocigotos				
Todas		IDVGA 55	Test	de 0,1453	0,0117		
			probabilidad				
Todas		BOVIRBP	Déficit	de 0,1111	-	1,000	1,000
			heterocigotos				
Todas		BOVIRBP	Exceso	de 1,0000	-		
			heterocigotos				
Todas		BOVIRBP	Test	de 0,1111	-		
			probabilidad				
Todas		NVHRT	Déficit	de 0,2000	-	0,600	0,667
		16	heterocigotos				
Todas		NVHRT	Exceso	de 1,0000	-		
		16	heterocigotos				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
	Todas	NVHRT 16	Test probabilidad	de 0,2000	-		
	Todas	NVHRT 73	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	0,500	0,500
	Todas	NVHRT 73	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Todas	NVHRT 73	Test probabilidad	de 0,3333	-		
	Todas	NVHRT 30	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	0,500	0,500
	Todas	NVHRT 30	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Todas	NVHRT 30	Test probabilidad	de 0,3333	-		
	Todas	Todos	Probabilidad	0,0007			
<i>O. virginianus</i>	Venezuela	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,1429	-	1,000	1,000
	Venezuela	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Venezuela	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,1429	-	1,000	1,000
	Venezuela	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,1848	0,0139	0,333	0,250

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
	Venezuela	Cervid 3	Exceso	de 1,0000	0,0000		
			heterocigotos				
	Venezuela	Cervid 3	Test	de 0,1964	0,0156	0,333	0,250
			probabilidad				
	Venezuela	IDVGA 55	Déficit	de 1,0000	-	-0,200	-0,167
			heterocigotos				
	Venezuela	BOVIRBP	Exceso	de 0,6667	-		
			heterocigotos				
	Venezuela	BOVIRBP	Test	de 0,4667	-	-0,200	-0,167
			probabilidad				
	Venezuela	Todos	Probabilidad	0,1929			
<i>O. virginianus</i>	Guatemala	Cervid 1	Déficit	de 0,0000	-	0,636	0,607
	-Venez.		heterocigotos				
	Guatemala	Cervid 3	Déficit	de 0,0746	0,0074	0,455	0,361
	-Venez.		heterocigotos				
	Guatemala	FCB 193	Déficit	de 0,0000			
	-Venez.		heterocigotos				
	Guatemala	IDVGA 55	Déficit	de 1,0000	-	-0,200	-0,167
	-Venez.		heterocigotos				
<i>O. virginianus</i>	Colombia	Cervid 1	Déficit	de 0,1392	0,0108	0,291	0,091
			heterocigotos				
	Colombia	Cervid 1	Exceso	de 0,9006	0,0125		
			heterocigotos				

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
Colombia	Cervid 1	Test	de 0,0002	0,0002			
		probabilidad					
Colombia	Cervid 3	Déficit	de 0,0008	0,0008	0,156	0,203	
		heterocigotos					
Colombia	Cervid 3	Exceso	de 0,9969	0,0031			
		heterocigotos					
Colombia	Cervid 3	Test	de 0,0465	0,0173			
		probabilidad					
Colombia	IDVGA 55	Déficit	de 0,0917	-	0,239	0,231	
		heterocigotos					
Colombia	IDVGA 55	Exceso	de 0,9083	-			
		heterocigotos					
Colombia	IDVGA 55	Test	de 0,1698	-			
		probabilidad					
Colombia	BOVIRBP	Déficit	de 0,1111	-	1,000	1,000	
		heterocigotos					
Colombia	BOVIRBP	Exceso	de 1,0000	-			
		heterocigotos					
Colombia	BOVIRBP	Test	de 0,1111	-			
		probabilidad					
Colombia	NVHRT	Déficit	de 0,3333	-	0,500	0,500	
	73	heterocigotos					
Colombia	NVHRT	Exceso	de 1,0000	-			
	73	heterocigotos					

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir	F & Robertson & Hill
	Colombia	NVHRT 73	Test probabilidad	de 0,3333	-		
	Colombia	NVHRT 30	Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	0,500	0,500
	Colombia	NVHRT 30	Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
	Colombia	NVHRT 30	Test probabilidad	de 0,3333	-		
	Colombia	Todos	Test multilocus	0,0000	0,0000		
	Colombia	Todos	Probabilidad	0,0001			
<i>O. virginianus</i>	J. Duque	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,2000	0,0177	0,247	0,114
	J. Duque	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 0,8952	0,0095		
	J. Duque	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,0915	0,0120		
	J. Duque	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,1082	0,0199	0,089	0,100
	J. Duque	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 0,9189	0,0198		
	J. Duque	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,3292	0,0333		

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir Cockerham	F & Robertson & Hill
J. Duque	IDVGA	55	Déficit heterocigotos	de 0,2952	-	0,250	0,187
J. Duque	IDVGA	55	Exceso heterocigotos	de 0,8952	-		
J. Duque	IDVGA	55	Test probabilidad	de 0,6952	-		
J. Duque	BOVIRBP		Déficit heterocigotos	de 0,1429	-	1,000	1,000
J. Duque	BOVIRBP		Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
J. Duque	BOVIRBP		Test probabilidad	de 0,1429	-		
J. Duque	NVHRT		Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	0,500	0,500
		73					
J. Duque	NVHRT		Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
		73					
J. Duque	NVHRT		Test probabilidad	de 0,3333	-		
		73					
J. Duque	NVHRT30		Déficit heterocigotos	de 0,3333	-	0,500	0,500
J. Duque	NVHRT30		Exceso heterocigotos	de 1,0000	-		
J. Duque	NVHRT30		Test probabilidad	de 0,3333	-		

Especies	Región	Loci analizados	Hipótesis	P	Error estándar	F Weir & Robertson Cockerham	F & Hill
	J. Duque	Todos	Probabilidad	0,1904			
<i>O. virginianus</i>	Pereira	Cervid 1	Déficit heterocigotos	de 0,0959	0,0120	0,333	0,184
	Pereira	Cervid 1	Exceso heterocigotos	de 0,9575	0,0076		
	Pereira	Cervid 1	Test probabilidad	de 0,0866	0,0142		
	Pereira	Cervid 3	Déficit heterocigotos	de 0,1457	0,0071	0,333	0,314
	Pereira	Cervid 3	Exceso heterocigotos	de 0,9744	0,0063		
	Pereira	Cervid 3	Test probabilidad	de 0,0752	0,0094		
	Pereira	IDVGA 55	Déficit heterocigotos	de 0,3143	-	0,000	0,167
	Pereira	IDVGA 55	Exceso heterocigotos	de 0,7429	-		
	Pereira	IDVGA 55	Test probabilidad	de 0,0571	-		
	Pereira	Todos	Probabilidad	0,0149			

Es importante resaltar que no todos los loci para los cuales se obtuvieron las frecuencias alélicas se encuentran en los análisis de equilibrio Hardy-Weinberg, ni en

otros análisis genético-poblacionales, debido al bajo número de individuos genotipificados o al bajo número de alelos para cada marcador.

También debe resaltarse que la población denominada Guatemala-Venez. es una población artificial, que cobijaba al único ejemplar de *Odocoileus virginianus mayensis* proveniente de Guatemala y a los ejemplares de *Odocoileus virginianus gymnotys* venezolanos, con el fin de compararlos frente a los individuos colombianos.

Los resultados significativos para los loci que no están en EHW se resaltan en negrilla en la tabla. Para la población donde se agruparon artificialmente todas las *Mazama* (*Mazama* sp.) fueron estadísticamente significativos por no encontrarse en EHW al ser analizado bajo la hipótesis de déficit de heterocigotos los loci Cervid 1, Cervid 3, IDVGA 55 y NVHRT 71. Los otros marcadores no dieron resultados significativamente fuera del EHW, pero, al realizar un análisis multilocus este valor sí es significativo. Esto nos indica que globalmente, para todos los loci analizados, esta población no se encuentra en EHW.

Al ser agrupadas la totalidad de las *Mazama*, pero, haciendo una subdivisión por países se observan datos estadísticamente significativos, partiendo de la misma hipótesis planteada, para la población de Bolivia (*Mazama americana* y *Mazama gouazoubira*) en el locus Cervid 3. Para la población Colombiana (*Mazama americana* y un individuo *Mazama rufina*) encontramos falta de EHW en los loci Cervid 1 y Cervid 3 y en el análisis global multilocus. La siguiente población que muestra resultados no en EHW es la peruana (*Mazama americana*) para el locus Cervid 3, el test multilocus también es significativo.

Las *Mazama americana* fueron agrupadas globalmente y por regiones geográficas de procedencia. Al ser agrupadas globalmente mostraron resultados significativos para los loci Cervid 3 e IDVGA 55, así como para el análisis multilocus. Esto mismo se observó en la agrupación de las *Mazama americana* de procedencia peruana, donde los mismos loci se encontraron en desequilibrio.

Las *Mazama gouazoubira* fueron agrupadas y los resultados significativos se encontraron para Cervid 1, Cervid 3, y el test multilocus. Al realizar la separación por regiones geográficas todas se encontraron en EHW.

Las siguientes especies analizadas fueron *Blastocerus dichotomus*, *Hippocamelus antisensis*, *Ozotoceros bezoarticus* y *Pudu mephistopheles*. Todas ellas no presentan valores significativos para no encontrarse en EHW.

La siguiente especie analizada fue *Capreolus capreolus* donde sí encontramos datos significativos para la hipótesis mencionada. Estos se observaron en el locus Cervid 3 y en el análisis global. Debe recordarse que esta especie, así como *Capreolus pygargus* no amplificaron para Cervid 1. Esta última especie no presentó desequilibrio para el locus analizado.

En *Odocoileus virginianus* encontramos resultados significativos para los loci Cervid 1 y Cervid 3 al ser agrupados todos los ejemplares en una sola población. Los demás marcadores se encuentran en EHW. Sin embargo, al realizar el análisis multilocus, éste también fue significativo. Al ser agrupados los individuos de acuerdo a su país de origen se encuentran datos estadísticamente diferentes de EHW para la población artificial Guatemala-Venezuela cuando se miran los loci Cervid 1 y FCB 193. El locus Cervid 3 se encuentra cercano del valor significativo.

Para la población colombiana de *Odocoileus* encontramos datos significativos para los análisis de los loci Cervid 1, Cervid 3 y el test multilocus. Esta población, al ser separada por zoológicos, mostró resultados significativos solamente para la probabilidad total de la población de Pereira. Los análisis por loci se encuentran todos en el rango de aceptación del EHW.

Tras realizar el análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg, y utilizando también el programa Genepop, se calculó la diferenciación genotípica entre los diversos alelos de cada locus. En la tabla 2 se ilustran en negrilla los resultados significativos ($p = 0.05$) para las especies y los loci cuyo número de alelos era suficiente.

En la tabla 2 se observa que la “población artificial” donde se incluyeron todas las *Mazama* (*Mazama* sp.) y que contiene todos los individuos de este género, subdivididos por el país de procedencia, fue altamente significativo para el locus Cervid 1. Para este mismo locus observamos datos significativos en la heterogeneidad de las subpoblaciones que componen el grupo *Mazama americana* por regiones geográficas de procedencia. Las otras poblaciones de las diferentes especies no mostraron significativa heterogeneidad entre poblaciones.

Tabla 2: Diferenciación genotípica entre alelos por locus (F_{ST})

Especie	Población	Locus	P	Error estándar
<i>Mazama sp.</i>	Por países	Cervid 1	0,02994	0,01096
		Cervid 3	0,24298	0,02659
	Por especies	Cervid 1	0,06312	0,00735
		Cervid 3	0,15230	0,01342
<i>Mazama americana</i>	Por región	Cervid 1	0,03742	0,01291
		Cervid 3	0,47606	0,03099
<i>Odocoileus virginianus</i>	Por países	Cervid 1	0,16108	0,00816
		Cervid 3	0,07152	0,00508
		IDVGA 55	0,25388	0,00839
		Todos	0,06980	
	Por zoológicos	Cervid 1	0,94424	0,00265
		Cervid 3	0,63468	0,00824
		IDVGA 55	0,37110	0,00459
		BOVIRBP	1,00000	0,00000
		Todos	0,93390	

La tabla número 3 muestra los resultados obtenidos al realizar la diferenciación génica entre los diferentes pares de poblaciones por especies. No de todas las especies se disponía de muestras de diferente procedencia geográfica, de modo que no se tienen poblaciones dentro de las especies sino sólo en el caso de *Odocoileus virginianus*, *Mazama americana*, *Mazama gouazoubira* y del género *Mazama*.

Tabla 3. Diferenciación génica entre pares de poblaciones.

Especie	Locus	Poblaciones		P	E. estándar
<i>Mazama sp.</i>	Cervid 1	Bolivia -	Guyana	0,56212	0,00974
	Cervid 1	Bolivia -	Paraguay	0,78474	0,00969
	Cervid 1	Bolivia -	Colombia	0,28660	0,01118
	Cervid 1	Bolivia -	Perú	0,06534	0,00477
	Cervid 1	Bolivia -	Ecuador	0,51180	0,01008
	Cervid 1	Bolivia -	Venezuela	0,89868	0,00787
	Cervid 1	Guyana -	Paraguay	0,46382	0,00607
	Cervid 1	Guyana -	Colombia	0,14716	0,00618
	Cervid 1	Guyana -	Perú	0,15050	0,00478
	Cervid 1	Guyana -	Ecuador	0,33482	0,00338
	Cervid 1	Guyana -	Venezuela	0,20026	0,00423
	Cervid 1	Paraguay -	Colombia	0,18380	0,00739
	Cervid 1	Paraguay -	Perú	0,07454	0,00352
	Cervid 1	Paraguay -	Ecuador	0,20184	0,00470
	Cervid 1	Paraguay -	Venezuela	0,08536	0,00285
	Cervid 1	Colombia -	Perú	0,04192	0,00393
	Cervid 1	Colombia -	Ecuador	0,36668	0,00791
	Cervid 1	Colombia -	Venezuela	0,16288	0,00705
	Cervid 1	Perú -	Ecuador	0,06808	0,00362
	Cervid 1	Perú -	Venezuela	0,01386	0,00153
Cervid 1	Ecuador -	Venezuela	0,20696	0,00343	

Especie	Locus	Poblaciones		P	E. estándar
	Cervid 1	Total		0,01938	0,00943
<i>Mazama sp.</i>	Cervid 3	Bolivia -	Guyana	0,30714	0,01000
	Cervid 3	Bolivia -	Paraguay	0,17252	0,00810
	Cervid 3	Bolivia -	Colombia	0,05054	0,00512
	Cervid 3	Bolivia -	Perú	0,39122	0,00923
	Cervid 3	Bolivia -	Venezuela	0,00580	0,00106
	Cervid 3	Guyana -	Paraguay	0,47838	0,00685
	Cervid 3	Guyana -	Colombia	0,69102	0,00894
	Cervid 3	Guyana -	Perú	0,09860	0,00540
	Cervid 3	Guyana -	Venezuela	0,20886	0,00466
	Cervid 3	Paraguay -	Colombia	0,08842	0,00527
	Cervid 3	Paraguay -	Perú	0,41820	0,00820
	Cervid 3	Paraguay -	Venezuela	0,14132	0,00407
	Cervid 3	Colombia -	Perú	0,03442	0,00329
	Cervid 3	Colombia -	Venezuela	0,02036	0,00217
	Cervid 3	Perú -	Venezuela	0,04104	0,00290
	Cervid 3	Total		0,00410	0,00408
<i>Mazama sp.</i>	IDVGA 55	Bolivia -	Paraguay	0,29460	0,00810
	IDVGA 55	Bolivia -	Venezuela	0,46258	0,00997
	IDVGA 55	Paraguay -	Venezuela	0,20320	0,00389
	IDVGA 55	Total		0,09256	0,00936
<i>Mazama sp.</i>	BOVIRBP	Bolivia -	Paraguay	1,00000	0,00000
	BOVIRBP	Bolivia -	Venezuela	1,00000	0,00000

Especie	Locus	Poblaciones	P	E. estándar
	BOVIRBP	Total	1,00000	0,00000
<i>Mazama sp.</i>	NVHRT 16	Bolivia - Paraguay	1,00000	0,00000
	NVHRT 16	Bolivia - Ecuador	0,33278	0,00395
	NVHRT 16	Bolivia - Venezuela	1,00000	0,00000
	NVHRT 16	Paraguay - Ecuador	0,33086	0,00365
	NVHRT 16	Paraguay - Venezuela	1,00000	0,00000
	NVHRT 16	Ecuador - Venezuela	0,33014	0,00377
	NVHRT 16	Total	0,24688	0,01395
<i>Mazama sp.</i>	NVHRT 73	Bolivia - Perú	1,00000	0,00000
	NVHRT 73	Bolivia - Ecuador	1,00000	0,00000
	NVHRT 73	Perú - Ecuador	0,37224	0,00599
	NVHRT 73	Total	0,57268	0,00931
<i>Mazama sp.</i>	NVHRT 71	Guyana - Perú	0,89896	0,00510
	NVHRT 71	Guyana - Venezuela	1,00000	0,00000
	NVHRT 71	Perú - Venezuela	0,47080	0,00630
	NVHRT 71	Total	0,88904	0,00789
<i>Mazama sp.</i>	Todos		0,01420	
<i>Mazama sp.</i>	Cervid 1	<i>M. americana</i> - <i>M. rufina</i>	0,03164	0,00393
	Cervid 1	<i>M. americana</i> - <i>M. gouazoubira</i>	0,12348	0,00922
	Cervid 1	<i>M. rufina</i> - <i>M. gouazoubira</i>	0,51570	0,00620
<i>Mazama sp.</i>	Cervid 1	Total	0,02492	0,00651
	Cervid 3	<i>M. americana</i> - <i>M. rufina</i>	0,01120	0,00234
	Cervid 3	<i>M. americana</i> - <i>M. gouazoubira</i>	0,04048	0,00485

Especie	Locus	Poblaciones		P	E. estándar
	Cervid 3	<i>M. rufina</i>	<i>M. gouazoubira</i>	0,08486	0,00511
	Cervid 3	Total		0,00388	0,00153
<i>Mazama sp.</i>	IDVGA 55	<i>M. americana</i> -	<i>M. gouazoubira</i>	0,18128	0,00572
	IDVGA 55	Total		0,18084	0,00701
<i>Mazama sp.</i>	BOVIRBP	<i>M. americana</i> -	<i>M. gouazoubira</i>	1,00000	0,00000
	BOVIRBP	Total		1,00000	0,00000
<i>Mazama sp.</i>	NVHRT 16	<i>M. americana</i> -	<i>M. rufina</i>	0,33044	0,00353
	NVHRT 16	<i>M. americana</i> -	<i>M. gouazoubira</i>	1,00000	0,00000
	NVHRT 16	<i>M. rufina</i>	<i>M. gouazoubira</i>	0,46188	0,00822
	NVHRT 16	Total		0,50396	0,01164
<i>Mazama sp.</i>	NVHRT 73	<i>M. americana</i> -	<i>M. rufina</i>	0,31530	0,00583
	NVHRT 73	Total		0,31092	0,00601
<i>Mazama sp.</i>	NVHRT 71	<i>M. americana</i> -	<i>M. gouazoubira</i>	0,06380	0,00558
	NVHRT 71	Total		0,06576	0,00412
<i>Mazama sp.</i>	Todos			0,00550	
<i>M. americana</i>	Cervid 1	Bolivia -	Córdoba	0,32686	0,01123
	Cervid 1	Bolivia -	Leticia	0,63966	0,01055
	Cervid 1	Bolivia -	Perú	0,09856	0,00659
	Cervid 1	Bolivia -	Guyana	0,26428	0,01012
	Cervid 1	Bolivia -	Paraguay	1,00000	0,00000
	Cervid 1	Bolivia -	Huila	0,75640	0,00853
	Cervid 1	Córdoba -	Leticia	0,01198	0,00152
	Cervid 1	Córdoba -	Perú	0,01306	0,00171

Especie	Locus	Poblaciones	P	E. estándar
	Cervid 1	Córdoba - Guyana	0,24034	0,00638
	Cervid 1	Córdoba - Paraguay	0,15614	0,00615
	Cervid 1	Córdoba - Huila	0,15304	0,00575
	Cervid 1	Leticia - Perú	0,21262	0,00616
	Cervid 1	Leticia - Guyana	0,20336	0,00531
	Cervid 1	Leticia - Paraguay	0,60634	0,00509
	Cervid 1	Leticia - Huila	1,00000	0,00000
	Cervid 1	Perú - Guyana	0,16450	0,00541
	Cervid 1	Perú - Paraguay	0,34324	0,00850
	Cervid 1	Perú - Huila	0,32394	0,00822
	Cervid 1	Guyana - Paraguay	1,00000	0,00000
	Cervid 1	Guyana - Huila	1,00000	0,00000
	Cervid 1	Paraguay - Huila	1,00000	0,00000
	Cervid 1	Total	0,00576	0,00484
<i>M. americana</i>	Cervid 3	Bolivia - Córdoba	0,23160	0,00928
	Cervid 3	Bolivia - Leticia	0,19996	0,00691
	Cervid 3	Bolivia - Perú	0,56392	0,00728
	Cervid 3	Bolivia - Paraguay	0,11550	0,00612
	Cervid 3	Córdoba - Leticia	0,21210	0,00701
	Cervid 3	Córdoba - Perú	0,01548	0,00175
	Cervid 3	Córdoba - Paraguay	0,20828	0,00574
	Cervid 3	Leticia - Perú	0,59978	0,00698
	Cervid 3	Leticia - Paraguay	1,00000	0,00000

Especie	Locus	Poblaciones		P	E. estándar
	Cervid 3	Perú -	Paraguay	0,30270	0,00861
	Cervid 3	Total		0,03494	0,00681
<i>M. americana</i>	IDVGA 55	Bolivia -	Paraguay	0,28506	0,00570
	IDVGA 55	Total		0,27758	0,00548
<i>M. americana</i>	BOVIRBP	Bolivia -	Paraguay	1,00000	0,00000
	BOVIRBP	Total		1,00000	0,00000
<i>M. americana</i>	NVHRT 73	Bolivia -	Perú	1,00000	0,00000
	NVHRT 73	Total		1,00000	0,00000
<i>M. americana</i>	NVHRT 71	Perú -	Guyana	1,00000	0,00000
	NVHRT 71	Total		1,00000	0,00000
<i>M. americana</i>	Todos			0,06710	
<i>M. gouazoubira</i>	Cervid 1	Bolivia -	Venezuela	0,48710	0,00607
	Cervid 1	Bolivia -	Paraguay	1,00000	0,00000
	Cervid 1	Venezuela -	Paraguay	0,20258	0,00398
	Cervid 1	Total		0,27030	0,01086
<i>M. gouazoubira</i>	Cervid 3	Bolivia -	Guyana	0,19958	0,00348
	Cervid 3	Bolivia -	Venezuela	0,02506	0,00150
	Cervid 3	Bolivia -	Paraguay	0,19356	0,00319
	Cervid 3	Guyana -	Venezuela	0,20052	0,00624
	Cervid 3	Guyana -	Paraguay	0,33352	0,00397
	Cervid 3	Venezuela -	Paraguay	0,06878	0,00251
	Cervid 3	Total		0,00046	0,00032
<i>M. gouazoubira</i>	IDVGA 55	Bolivia -	Venezuela	0,47834	0,00727

Especie	Locus	Poblaciones		P	E. estándar
	IDVGA 55	Bolivia - Paraguay		0,19826	0,00433
	IDVGA 55	Venezuela - Paraguay		0,33230	0,00335
	IDVGA 55	Total		0,08652	0,00584
<i>M. gouazoubira</i>	BOVIRBP	Bolivia - Venezuela		0,33494	0,00357
	BOVIRBP	Total		0,34162	0,00374
<i>M. gouazoubira</i>	NVHRT 16	Venezuela - Paraguay		1,00000	0,00000
<i>M. gouazoubira</i>	NVHRT 71	Guyana - Venezuela		1,00000	0,00000
<i>O. virginianus</i>	Cervid 1	Colombia - Otros		0,11908	0,00781
	Cervid 1	Total		0,12218	0,00639
<i>O. virginianus</i>	Cervid 3	Colombia - Otros		0,00556	0,00125
	Cervid 3	Total		0,00510	0,00110
<i>O. virginianus</i>	IDVGA 55	Colombia - Otros		0,02378	0,00228
	IDVGA 55	Total		0,01872	0,00167
<i>O. virginianus</i>	NVHRT 16	Colombia - Otros		0,06658	0,00263
	NVHRT 16	Total		0,06502	0,00259
<i>O. virginianus</i>	Todos			0,00050	
<i>O. virginianus</i>	Cervid 1	Colombia - Venezuela		0,29934	0,00943
	Cervid 1	Total		0,30002	0,00979
<i>O. virginianus</i>	Cervid 3	Colombia - Venezuela		0,07310	0,00640
	Cervid 3	Total		0,06186	0,00770
<i>O. virginianus</i>	IDVGA 55	Colombia - Venezuela		0,01914	0,00175
	IDVGA 55	Total		0,02566	0,00212
<i>O. virginianus</i>	NVHRT 16	Colombia - Venezuela		0,06362	0,00256

Especie	Locus	Poblaciones		P	E. estándar
	NVHRT 16	Total		0,06316	0,00218
<i>O. virginianus</i>	Todos			0,00710	
<i>O. virginianus</i>	Cervid 1	J. Duque -	Pereira	0,93364	0,00258
	Cervid 1	Total		0,93718	0,00357
<i>O. virginianus</i>	Cervid 3	J. Duque -	Pereira	0,65622	0,00994
	Cervid 3	Total		0,66078	0,00866
<i>O. virginianus</i>	IDVGA 55	J. Duque -	Pereira	0,24436	0,00425
	IDVGA 55	Total		0,25472	0,00489
<i>O. virginianus</i>	BOVIRBP	J. Duque -	Pereira	1,00000	0,00000
	BOVIRBP	Total		1,00000	0,00000
<i>O. virginianus</i>	Todos			0,85710	

En esta tabla observamos las diferencias génicas ente las poblaciones. Los valores en negrilla son los significativamente diferentes. Podemos observar que para el locus Cervid 1 las poblaciones de Perú y Venezuela, pertenecientes al grupo *Mazama* sp. son significativas, así como las poblaciones de Colombia y Perú. Para Cervid 3 encontramos más poblaciones significativamente diferentes: Bolivia y Venezuela, Colombia y Perú (nuevamente), Colombia y Venezuela y Perú y Venezuela (de nuevo). El análisis general para esta población *Mazama* sp. también es significativo al ver globalmente tanto loci como poblaciones.

Al realizar las comparaciones por especies de *Mazama* observamos que para el locus Cervid 1 son muy diferentes *Mazama americana* y *Mazama rufina*, para Cervid 3

encontramos diferencias entre las tres especies de *Mazama*, y al hacer el análisis global podemos ver un resultado también significativo.

Al realizar los análisis para *Mazama americana* observamos que la población de Córdoba se diferencia significativamente de Leticia y Perú para Cervid 1. Y para Cervid 3 encontramos diferencias entre Córdoba y Perú. En las *Mazama gouazoubira* la única diferencia significativa se encuentra para el locus Cervid 3 y las poblaciones de Bolivia y Venezuela.

Odocoileus virginianus muestra diferencias génicas significativas al comparar las poblaciones de Colombia con Venezuela y Guatemala para Cervid 3 y para IDVGA 55. La diferencia para IDVGA 55 se repite cuando se comparan sólo Colombia y Venezuela. Entre las poblaciones de los zoológicos colombianos no se encontraron datos significativamente diferentes.

Dada la importancia de tratar de dilucidar las razones por las cuales algunos de los loci en las diferentes poblaciones no se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg se procedió a realizar un análisis de desequilibrio genotípico (desequilibrio gamético) con el fin de observar si los diferentes loci se encontraban ligados de alguna manera (tabla 4). Se conocía que para las especies que habían sido diseñados estos loci se encontraban en cromosomas diferentes y que parecían no tener ningún tipo de ligamiento.

Tabla 4. Desequilibrio genotípico entre pares de loci en las especies estudiadas.

Especie	Población	Par de loci	X ²	g.d.l.	P	Error estándar	
Mazama sp.	Todas	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000	
		Cervid 3 - NVHRT 73	1,008	2	0,60418	0,00560	
	Colombia	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000	
		<i>M. americana</i>	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000
		Cervid 3 - NVHRT 73	1,033	2	0,59646	0,00669	
M. americana	Córdoba	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000	
B. dichotomus	Todas	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000	
		Cervid 1 - IDVGA 55	0,000	2	1,00000	0,00000	
		Cervid 3 - IDVGA 55	0,000	2	1,00000	0,00000	
O. virginianus	Todas	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000	
		Cervid 1 - IDVGA 55	0,497	2	0,77984	0,02583	
		Cervid 3 - IDVGA 55	2,305	2	0,31584	0,03762	
	Colombia	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000	
		Cervid 1 - IDVGA 55	0,000	2	1,00000	0,00000	
		Cervid 3 - IDVGA 55	1,949	2	0,37744	0,02417	
	J. Duque		Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000
	Pereira	Cervid 1 - Cervid 3	0,000	2	1,00000	0,00000	
		Cervid 3 - IDVGA 55	0,000	2	1,00000	0,00000	

gdl: grados de libertad.

Sin embargo dado el alto número de recombinaciones cromosómicas presentes en las especies de ciervos, en general, era conveniente revisar si la falta de equilibrio Hardy – Weinberg para algunos de los marcadores se debía a estar de algún modo ligados. Los pares de loci no reportados no presentan suficientes valores para ser comparados. Todos estos datos son no significativos frente a la hipótesis de ligamiento con un $\alpha=0.05$, luego la dinámica de cada uno de los genes estudiados fue independiente de los otros.

Conocer el número de migrantes entre poblaciones puede ser importante para poder dilucidar el estado de aislamiento que tenemos entre poblaciones, de una misma especie. Si $Nm > 1$ entonces se considera que los niveles de flujo génico entre las poblaciones son elevados. Por el contrario, si $1 > Nm > 0.5$ se considera que el flujo génico es muy restringido. Y si $Nm < 0.5$ se considera que este es prácticamente nulo.

Tabla 5. Número de migrantes usando alelos privados.

Especie	Poblaciones	Nm
<i>Mazama sp.</i>	Por países	0,6004866
	Por especies	0,6511415
<i>Mazama americana</i>	Por regiones	0,8577548
<i>Mazama gouazoubira</i>	Por regiones	0,3800028
<i>Odocoileus virginianus</i>	Por países	0,3593426
	Por zoológicos	1,4388010

Por lo tanto en la tabla observamos el número en negrilla del flujo entre las poblaciones colombianas de *Odocoileus virginianus*, el cual es elevado, por ser $N_m > 1$, mientras que entre países para esta misma especie el flujo es prácticamente nulo. Respecto a las *Mazama*, podemos observar que entre las poblaciones de *Mazama* como género, si hay un flujo moderado, así como entre las diferentes regiones de las cuales provienen muestras de *Mazama americana*.

Al comparar los datos obtenidos para el número promedio de alelos por locus, la heterocigosidad promedio esperada y los números efectivos (N_e), con el estado reportado por CITES o la UICN para cada una de las especies, utilizando el programa REGR (del paquete estadístico MULTICUA) que permite una regresión con variables mixtas (cualitativas, binarias cuantitativas) utilizando distancias se obtuvieron los datos que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: Regresión Basada en Distancias con Variables Mixtas

Distancias calculadas con la medida de similitud de Gower (3 coordenadas principales).

Heterocigosis		Alelos		Ne 1		Ne 2		
promedio		promedio		(alelos infinitos)		(modelo step-wise)		
coeficiente		Coeficiente		coeficiente		coeficiente		
determ.	= 0,24178	determ.	=0,80781	determ.	=0,68162	determ.	=0,70837	
Especie	Valor observado	Estimación	Valor observado	Estimación	Valor observado	Estimación	Valor observado	Estimación
<i>O. virgi-</i>	0,3148	0,5527	4,5556	5,0476	2660,100	3185,000	4782,900	6309,700
<i>nianus</i>								
<i>M. ame-</i>	0,6429	0,5527	5,4444	5,0476	3000,600	3185,000	5701,600	6309,700
<i>ricana</i>								
<i>M. goua-</i>	0,7003	0,5527	5,1429	5,0476	3894,400	3185,000	8444,500	6309,700
<i>zoubira</i>								
<i>M.</i>	0,1250	0,3606	1,5000	2,5000	238,100	1147,800	255,100	1740,500
<i>rufina</i>								
<i>O. bezo-</i>	0,5000	0,4300	2,7500	2,8035	1666,700	1301,900	2500,000	1850,300
<i>articus</i>								
<i>B. dicho-</i>	0,3599	0,4300	2,8571	2,8035	937,090	1301,900	1200,500	1850,300
<i>tomus</i>								
<i>H.</i>	0,5030	0,5030	3,0000	3,0000	1686,800	1686,800	2540,400	2540,400
<i>antisensis</i>								
<i>P.mephis-</i>	0,4062	0,3607	2,0000	2,5000	1140,100	1147,800	1530,100	1740,500
<i>topheles</i>								
<i>C.</i>	0,3173	0,3607	3,5000	2,5000	774,620	1147,800	954,630	1740,500
<i>capreolus</i>								
<i>C.</i>	0,5940	0,3607	3,0000	2,5000	2438,400	1147,800	4222,200	1740,500
<i>pygargus</i>								
suma de cuadrados residual	de =0,21027		Suma de cuadrados residual	de = 2,9143		suma de cuadrados residual	de =0,37116 x 10 ⁺⁷	
							suma de cuadrados residual	
							de =0,17130 x 10 ⁺⁸	

El coeficiente de determinación nos muestra el grado de relación que encuentra el programa entre la variable dependiente y las independientes. Esto es muy importante, ya que si el coeficiente es alto (0,80781 es igual a que en el 80,78% de las ocasiones las variables si se encuentran relacionadas) podemos realizar inferencias sobre el comportamiento de otras especies, en este caso, sobre las que no tengamos un conocimiento tan profundo.

Debido al alto grado de desconocimiento sobre el estado actual de las poblaciones de ciervos neotropicales, utilizando el programa Bottleneck para determinar cuellos de botella recientes, se obtuvieron los datos presentados en la tabla 7. Se utilizaron diferentes estadísticos para calcular los resultados. Puede verse que ninguna de las poblaciones parece haber atravesado por cuellos de botella recientes, pero, es importante resaltar que varias de las especies no tenían un número de individuos, o de marcadores, recomendados por el programa para arrojar resultados confiables. Este programa se empleó ya que se encuentran diferentes trabajos donde a pesar del escaso número de muestras analizadas los cuellos de botella de las poblaciones analizadas son evidentes (Ruiz-García, 2000).

Tabla 7: Determinación de cuellos de botella recientes en las poblaciones analizadas.

Especie	País o Localid.	locus	K ₀	He	IAM				SMM			
					Heq.	SD	DH/sd	Prob.	Heq.	SD	Dh/sd	Prob.
<i>O. virginianus</i>	Total	Cervid 1	8	0.747	0.743	0.088	0.043	0.4290	0.820	0.041	-1.785	0.0600
		Cervid 3	12	0.877	0.845	0.049	0.658	0.2800	0.893	0.020	-0.755	0.1940
		IDVGA55	6	0.815	0.706	0.099	1.106	0.0670	0.769	0.060	0.774	0.2150
		BOVIRBP	2	0.356	0.349	0.138	0.044	0.5930	0.376	0.137	-0.152	0.6840
		NVHRT16	3	0.733	0.682	0.071	0.732	0.5840	0.703	0.067	0.448	0.7230
	Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test		
		IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM	
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	
		2.98	0.0750	2.93	0.3399	1.155	0.1240	-0.658	0.2553	0.0156	0.6875	
<i>O. virginianus</i>	Colomb.	Cervid 1	7	0.786	0.736	0.084	0.601	0.3130	0.803	0.047	-0.366	0.2780
		Cervid 3	10	0.852	0.822	0.057	0.541	0.3570	0.872	0.027	-0.708	0.1990
		IDVGA55	4	0.779	0.589	0.123	1.554	0.0060	0.648	0.090	1.443	0.0160
		BOVIRBP	2	0.356	0.342	0.139	0.101	0.5620	0.369	0.138	-0.094	0.6570
		NVHRT16	2	0.500	0.543	0.073	-0.588	1.0000	0.552	0.077	-0.675	1.0000
	Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test		
		IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM	
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	
		2.63	0.2118	2.48	0.1855	0.988	0.1616	-0.179	0.4290	0.0781	0.8906	
<i>O. virginianus</i> y	J. Duque	Cervid 1	6	0.835	0.798	0.058	0.644	0.3630	0.828	0.041	0.170	0.6180
		Cervid 3	6	0.835	0.799	0.058	0.637	0.3830	0.830	0.040	0.141	0.6300
		Pereira	IDVGA55	3	0.750	0.602	0.099	1.492	0.0770	0.636	0.090	1.269
	Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test		
		IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM	
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	
		1.86	0.2332	1.80	0.2134	1.601	0.0547	0.913	0.1807	1.0000	1.0000	

Especie	País o Localid.	locus	K ₀	IAM				SMM					
				He	Heq.	SD	DH/sd	Prob.	Heq.	SD	Dh/sd	Prob.	
<i>O. virginianus</i>	Jaime	Cervid 1	6	0.817	0.774	0.070	0.615	0.3570	0.812	0.049	0.102	0.6000	
	Duque	Cervid 3	9	0.874	0.863	0.040	0.281	0.5330	0.889	0.024	-0.639	0.2160	
		IDVGA55	4	0.778	0.701	0.084	0.914	0.2940	0.733	0.068	0.661	0.4480	
		BOVIRBP	2	0.429	0.384	0.128	0.345	0.5540	0.407	0.129	0.171	0.6320	
	Total	Sing test			Standarized difference test				Wilcox test				
		IAM		SMM		IAM		SMM		IAM		SMM	
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	
		2.45	0.1396	2.52	0.5275	1.078	0.1406	0.148	0.4412	1.0000	0.9062		
	<i>Mazama sp.</i>	Todas	Cervid 1	16	0.925	0.885	0.035	1.128	0.0830	0.922	0.014	0.183	0.5210
			Cervid 3	14	0.897	0.868	0.043	0.673	0.2730	0.910	0.017	-0.720	0.2140
		IDVGA55	11	0.950	0.941	0.017	0.556	0.4640	0.946	0.011	0.380	0.6420	
		BOVIRBP	4	0.643	0.753	0.063	-1.755	0.2040	0.775	0.054	-2.462	0.0960	
		NVHRT16	6	0.929	0.925	0.030	0.107	0.6740	0.919	0.016	0.585	0.7450	
		NVHRT73	3	0.318	0.526	0.125	-1.672	0.1710	0.570	0.112	-2.256	0.0840	
		NVHRT71	9	0.912	0.917	0.022	-0.225	0.4250	0.925	0.016	-0.780	0.2840	
Total		Sing test			Standarized difference test				Wilcox test				
		IAM		SMM		IAM		SMM		IAM		SMM	
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.		
	4.17	0.5911	4.24	0.2780	-0.449	0.3267	-1.917	0.0276	0.4688	0.0547			
<i>M. americana</i>	Todas	Cervid 1	15	0.909	0.899	0.030	0.327	0.4640	0.924	0.014	-1.109	0.1290	
		Cervid 3	10	0.872	0.828	0.055	0.796	0.2020	0.875	0.026	-0.130	0.3930	
		IDVGA55	6	0.929	0.924	0.027	0.188	0.6740	0.919	0.016	0.589	0.7420	
		BOVIRBP	2	0.500	0.542	0.072	-0.580	1.0000	0.557	0.079	-0.719	1.0000	
	Total	Sing test			Standarized difference test				Wilcox test				
		IAM		SMM		IAM		SMM		IAM		SMM	
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.		
		2.15	0.3634	2.24	0.2149	0.365	0.3577	-0.685	0.2468	0.9062	0.0938		

Especie	País o Localid.	locus	K ₀	He	IAM				SMM			
					Heq.	SD	DH/sd	Prob.	Heq.	SD	Dh/sd	Prob.
<i>M. americana</i>	Bolivia	Cervid 1	10	0.956	0.945	0.017	0.624	0.2860	0.945	0.011	1.002	0.3140
		Cervid 3	6	0.848	0.828	0.049	0.419	0.5520	0.847	0.037	0.038	0.7290
	Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test		
		IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM			
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	
		0.90	0.1938	1.04	0.2289	0.737	0.2304	0.735	0.2312	1.0000	1.0000	
<i>M. americana</i>	Colomb.	Cervid 1	6	0.846	0.800	0.056	0.812	0.2340	0.828	0.043	0.426	0.4410
		Cervid 3	5	0.786	0.847	0.037	-1.647	0.2420	0.858	0.032	-2.234	0.1330
	Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test		
		IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM			
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	
		1.34	0.5619	0.90	0.7236	-0.590	0.2775	-1.278	0.1005	0.2500	0.2500	
<i>M. americana</i>	Córdoba	Cervid 1	4	0.750	0.750	0.064	-0.052	0.7940	0.774	0.053	-0.466	0.4410
		Cervid 3	3	0.600	0.685	0.071	-1.203	0.3950	0.696	0.068	-1.412	0.3190
	Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test		
		IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM			
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	
		1.03	0.2279	1.24	0.1407	-0.887	0.1876	-1.327	0.0922	0.1250	0.1250	
<i>M. americana</i>	Leticia	Cervid 1	2	0.500	0.544	0.074	-0.600	1.0000	0.549	0.076	-0.647	1.0000
		Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test	
		IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM			
		Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	
			0.27	0.7350	0.30	0.7050	-0.600	0.2742	-0.647	0.2590	0.2500	0.2500
<i>M. americana</i>	Perú	Cervid 1	4	0.750	0.752	0.062	-0.030	0.7960	0.771	0.056	-0.371	0.4690
		Cervid 3	6	0.864	0.823	0.051	0.792	0.2840	0.847	0.038	0.445	0.4750
	NVHRT73	2	0.250	0.374	0.126	-0.980	0.4780	0.404	0.128	-1.207	0.3710	
	Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test		
		IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM	IAM	SMM			
	Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.		
		1.44	0.5310	1.88	0.3137	-0.126	0.4498	-0.654	0.2566	0.1875	0.1875	

Especie	País o Localid.	locus	K ₀	He	IAM				SMM			
					Heq.	SD	DH/sd	Prob.	Heq.	SD	Dh/sd	Prob.
<i>M. goua-zoubira</i>	Todas	Cervid 1	7	0.911	0.916	0.025	-0.203	0.8670	0.920	0.016	-0.539	0.9530
		Cervid 3	7	0.909	0.874	0.036	0.981	0.2220	0.899	0.026	0.787	0.3730
		IDVGA55	6	0.929	0.926	0.029	0.100	0.7030				
		Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test	
			IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM
	Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.		
		1.78	0.6466	1.10	0.7030	0.507	0.3061	0.175	0.4305	0.8750	0.8750	
<i>M. goua-zoubira</i>	Guyana	NVHRT71	5	0.933	0.960	0.042	-0.635	1.000				
		Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test	
			IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM
			Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.
				0.44	0.5600		-0.635	0.2627			0.2500	
<i>M. goua-zoubira</i>	Venez.	Cervid 1	2	0.667	0.545	0.074	1.656	0.2670	0.553	0.078	1.460	0.3190
		Cervid 3	2	0.500	0.546	0.075	-0.617	1.000	0.554	0.078	-0.689	1.0000
		Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test	
			IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM
			Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.
		0.54	0.4700	0.64	0.5383	0.735	0.2310	0.546	0.2927	0.8750	0.8750	
<i>M. goua-zoubira</i>	Bolivia	Cervid 1	4	1.000	1.097	0.064	-1.499	0.2320				
		Cervid 3	2	0.667	0.540	0.071	1.779	0.2400				
		Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test	
			IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM
			Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.
		0.63	0.5379		0.198	0.4215			0.8750			
<i>M. rufina</i>	Todas	Cervid 1	2	0.667	0.548	0.075	1.583	0.2850	0.557	0.079	1.380	0.3440
		Total	Sing test				Standarized difference test				Wilcox test	
			IAM		SMM		IAM		SMM		IAM	SMM
			Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.
				0.29	0.2850	0.34	0.3440	1.583	0.0567	1.380	0.0838	1.0000

Especie	País o Localid.	locus	K ₀	IAM				SMM							
				He	Heq.	SD	DH/sd	Prob.	Heq.	SD	Dh/sd	Prob.			
<i>B. dichotomus</i>	Todas	Cervid 1	3	0.582	0.507	0.131	0.570	0.4100	0.552	0.118	0.257	0.5240			
		Cervid 3	6	0.817	0.771	0.069	0.660	0.3170	0.812	0.048	0.102	0.5890			
		IDVGA55	6	0.867	0.863	0.035	0.095	0.6000	0.875	0.029	-0.295	0.3700			
	Total	Sing test			Standarized difference test				Wilcox test						
				IAM		SMM		IAM		SMM		IAM		SMM	
			Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.
			1.76	0.2027	1.83	0.6600	0.765	0.2220	0.037	0.4854	1.0000	0.6250			
<i>C. pygargus</i>	Todas	BOVIRBP	3	0.679	0.614	0.097	0.671	0.4580	0.634	0.090	0.495	0.5350			
		Total	Sing test			Standarized difference test				Wilcox test					
					IAM		SMM		IAM		SMM		IAM		SMM
				Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.
			0.46	0.4580	0.54	0.5350	0.671	0.2512	0.495	0.3102	1.0000	1.0000			
<i>C. capreolus</i>	Todas	Cervid 3	8	0.827	0.758	0.084	0.824	0.1930	0.827	0.040	0.001	0.4180			
		BOVIRBP	4	0.489	0.579	0.129	-0.699	0.2430	0.646	0.095	-1.650	0.0810			
		Total	Sing test			Standarized difference test				Wilcox test					
				IAM		SMM		IAM		SMM		IAM		SMM	
			Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	
			1.19	0.6444	1.21	0.6358	0.089	0.4646	-1.166	0.1218	0.8750	0.2500			
<i>H. antisensis</i>	Argent.	Cervid 1	2	0.533	0.434	0.112	0.882	0.04580	0.446	0.113	0.770	0.5070			
		Cervid 3	3	0.607	0.603	0.098	0.045	0.07090	0.638	0.089	-0.350	0.4460			
		Total	Sing test			Standarized difference test				Wilcox test					
				IAM		SMM		IAM		SMM		IAM		SMM	
			Nº	Prob.	Nº	Prob.	T2	Prob.	T2	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	Prob.	
			1.17	0.3247	1.06	0.7191	0.656	0.2559	0.297	0.3831	1.0000	0.8750			

Estos son los parámetros que se ilustran: IAM: Modelo mutacional de alelos infinitos, SMM: modelo mutacional step-wise. K₀: número de alelos por locus, He: heterocigosis esperada, Heq: heterocigosis esperada en una población en equilibrio de

acuerdo al número de alelos, SD: desviación estándar, DH/sd: estadístico para determinar la diferencia de magnitud entre las dos heterocigosis calculadas, Prob: probabilidad, N°: número esperado de loci con exceso de heterocigotos.

En esta tabla podemos observar resaltados con negrilla los valores significativos. Es importante anotar que ninguna de las población presentó datos significativos para la totalidad de sus alelos, de hecho sólo encontramos dos casos aislados.

El primero de ellos se da en la población colombiana de *Odocoileus virginianus*, donde para el locus IDVGA 55 se obtuvieron probabilidades significativas para el modelo de los alelos infinitos, con el método de diferencia estandarizada, y con el modelo step-wise, para el test de Wilcox. Sin embargo estos valores son insignificantes si se realiza una corrección de Bonferroni, donde $\alpha = \alpha/n$, donde n es el número total de pruebas realizadas.

El otro caso se observa en *Hippocamelus antisensis* para el locus Cervid 1. En esta especie el valor significativo se observa sólo bajo el modelo de alelos infinitos en el test de diferencia estandarizada. Este valor también puede ser corregido por el test de Bonferroni.

Con los resultados obtenidos para los microsatélites y tomando como parámetro los alelos reportados por Slate y colaboradores (1998) (tabla 8) para *Cervus elaphus* y

Cervus nippon y los reportados por Røed y Midthjell (1998) (tabla 9) para *Cervus elaphus* y *Capreolus capreolus* se realizaron los árboles de máxima parsimonia.

Al aplicar el método “Heuristic” se obtuvieron 8970 árboles diferentes, mientras que con el método “Step-wise addition simple” y “closest” se obtuvieron 8979 árboles; con “Step-wise addition” y “asis” 10114 y con “step-wise” y “random” 94801.

Con el método “Branch swapping” y “tree bisection reconnection” obtuvimos 104612 árboles, “branch swapping” y “subtree pruning regrafting” arrojó 70435 árboles y “Branch swapping nearest neighbor interchange” arrojó 16946 árboles. Se obtuvieron, como los más parsimoniosos, 15 árboles, todos con 191 pasos sin importar cuál de los métodos de análisis fuera utilizado. Los índices fueron constantes con los siguientes valores: CI = 0.702, HI = 0.298, RI = 0.430, RC = 0.302.

Tabla 8. Número de alelos y rango medio de tamaños en *Cervus nippon* y *Cervus elaphus* detectados previamente para 4 loci microsatélites. (Slate et al., 1998)

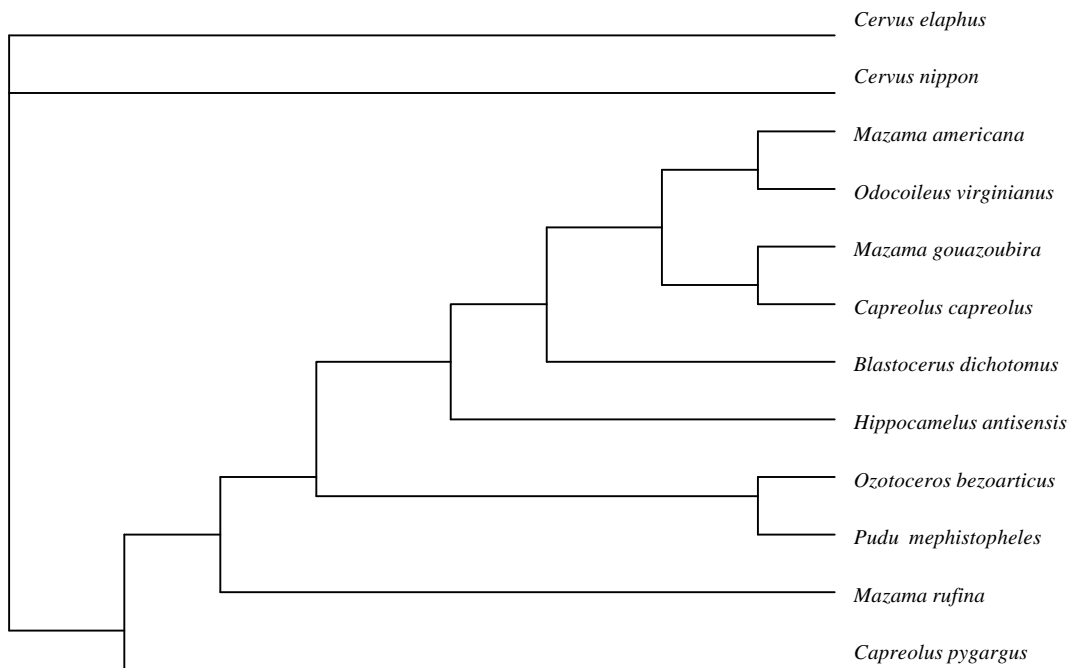
Locus	Nº de alelos en C. nippon	Rango de alelos de C. nippon	Nº de alelos en C. elaphus	Rango de alelos de C. elaphus
IDVGA 55	1	213	5	193-201
FCB 193	4	123-139	12	97-121
TGLA 337	1	128	5	132+
BOVIRBP	3	142-146	8	148-166

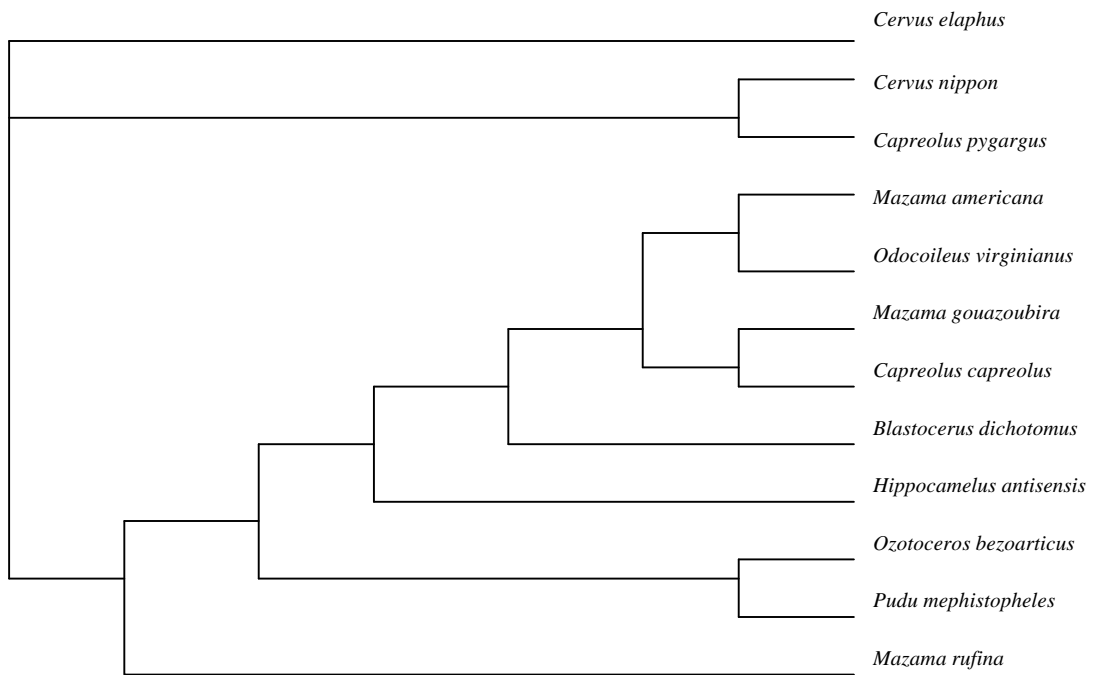
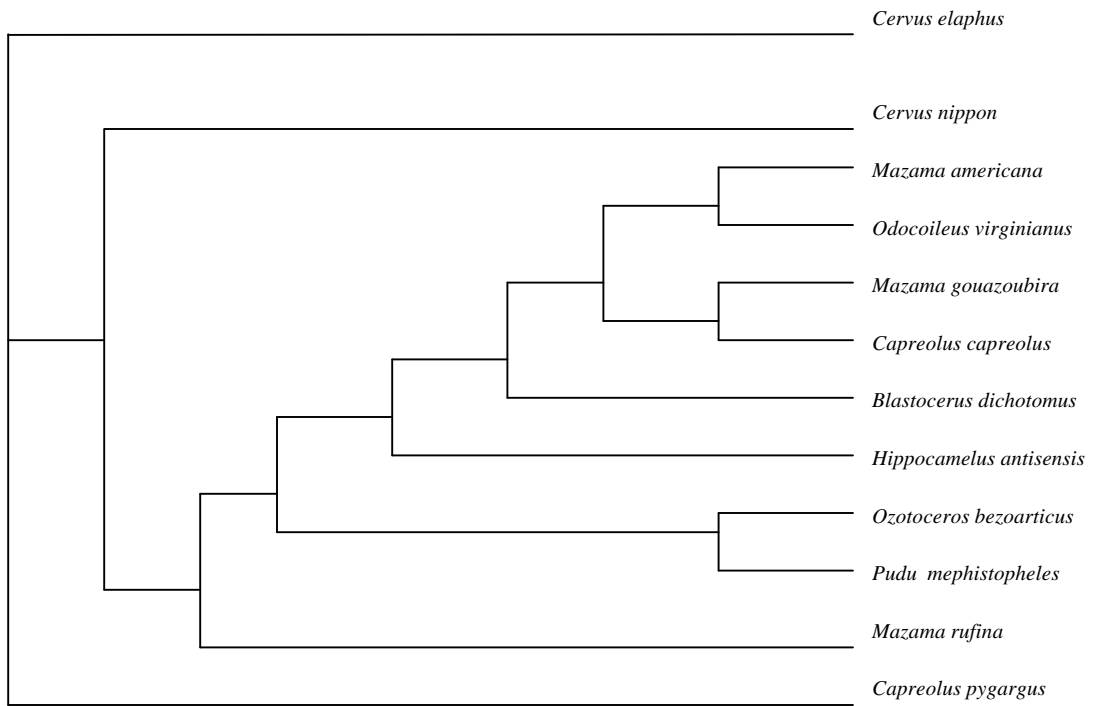
Tabla 9. Número de alelos y rango medio de tamaños en *Cervus elaphus* y *Capreolus capreolus* detectados previamente para 4 loci microsatélites. (Røed & Midthjell., 1998)

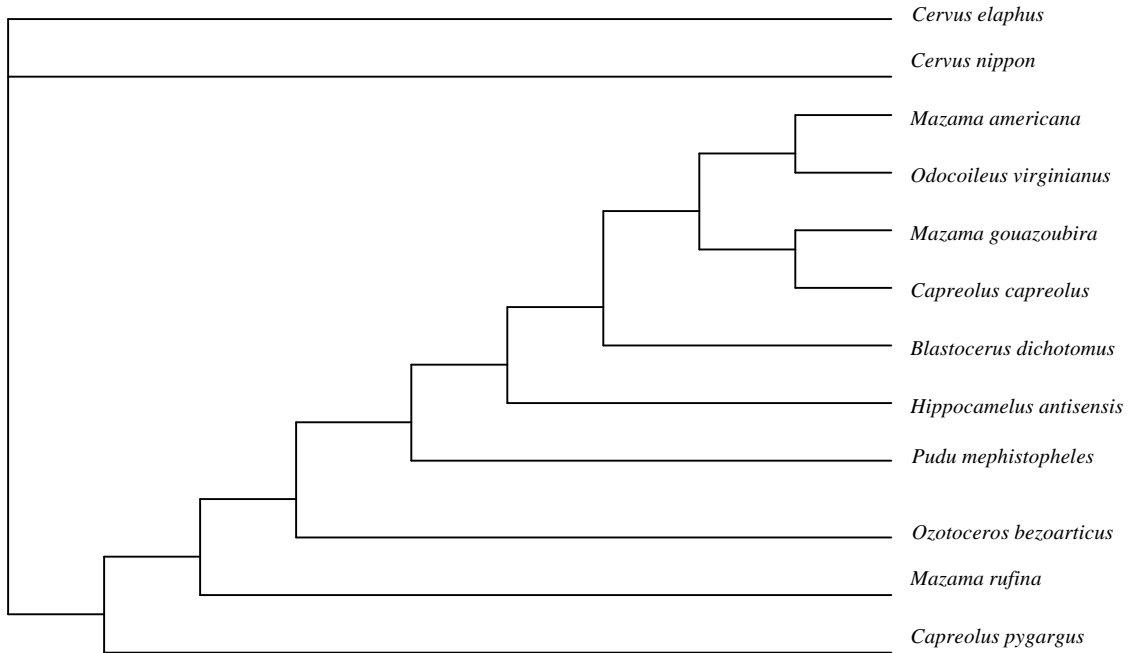
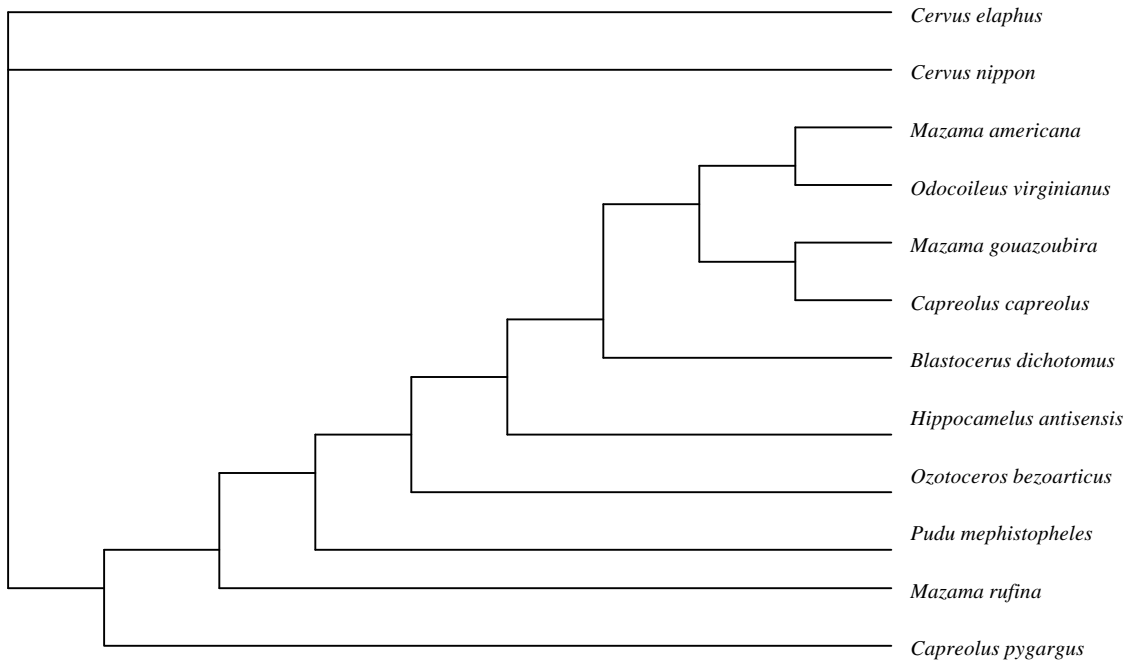
<u>Locus</u>	<u><i>Cervus elaphus</i></u>			<u><i>Capreolus capreolus</i></u>		
	<u>N_a</u>	<u>H_e</u>	<u>Rango</u>	<u>N_a</u>	<u>H_e</u>	<u>Rango</u>
<u>NVHRT 16</u>	<u>3</u>	<u>0.31</u>	<u>151-155</u>	<u>3</u>	<u>0.57</u>	<u>157-171</u>
<u>NVHRT 73</u>	<u>4</u>	<u>0.66</u>	<u>205-227</u>	<u>5</u>	<u>0.72</u>	<u>229-257</u>
<u>NVHRT 71</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>-</u>	<u>3</u>	<u>0.22</u>	<u>109-119</u>
<u>NVHRT 30</u>	<u>1</u>	<u>0.00</u>	<u>133</u>	<u>3</u>	<u>0.50</u>	<u>156-166</u>

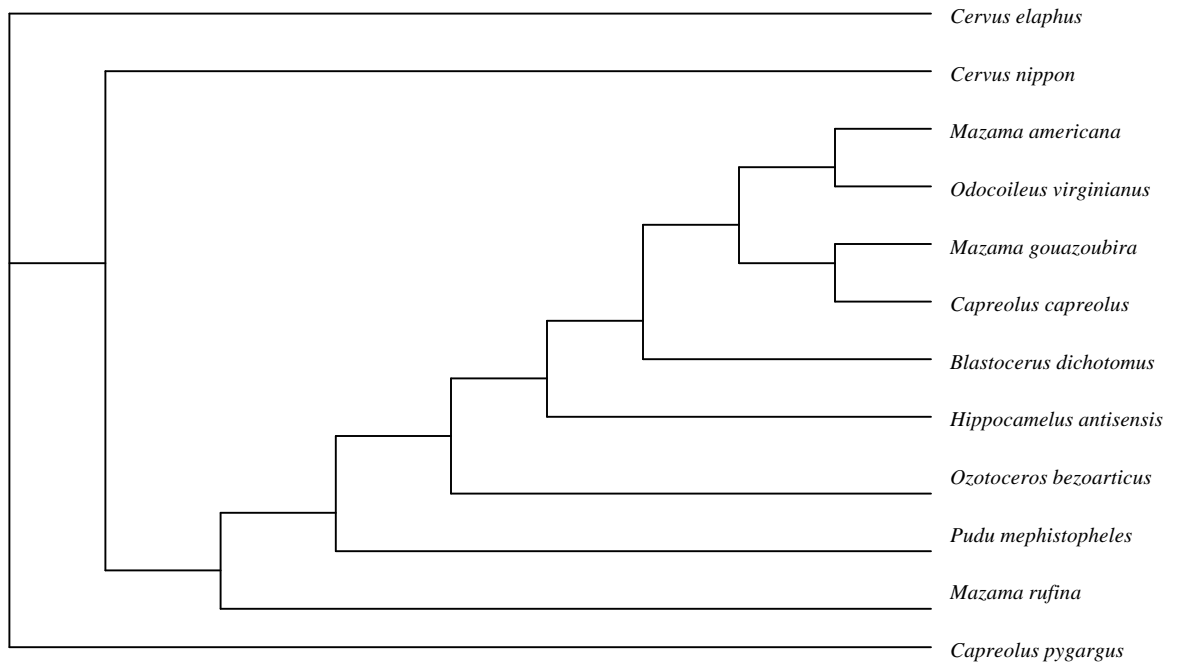
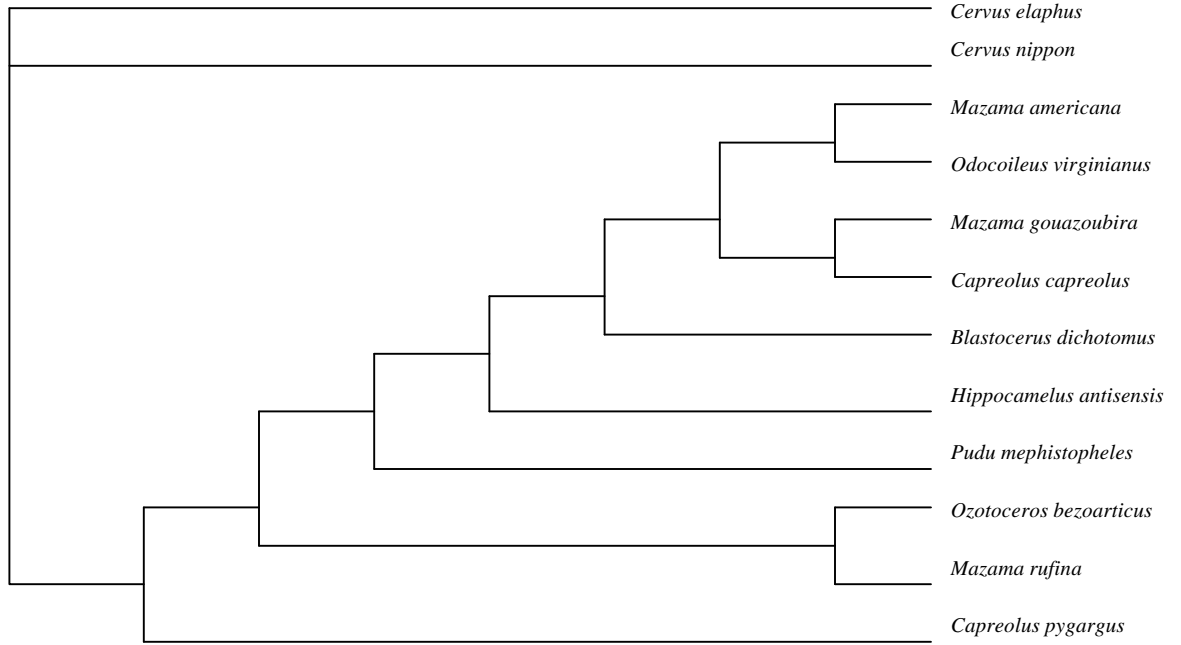
N_a: Número de alelos, H_e: heterocigosidad esperada, -: producto no amplificado.

Arbol 1.

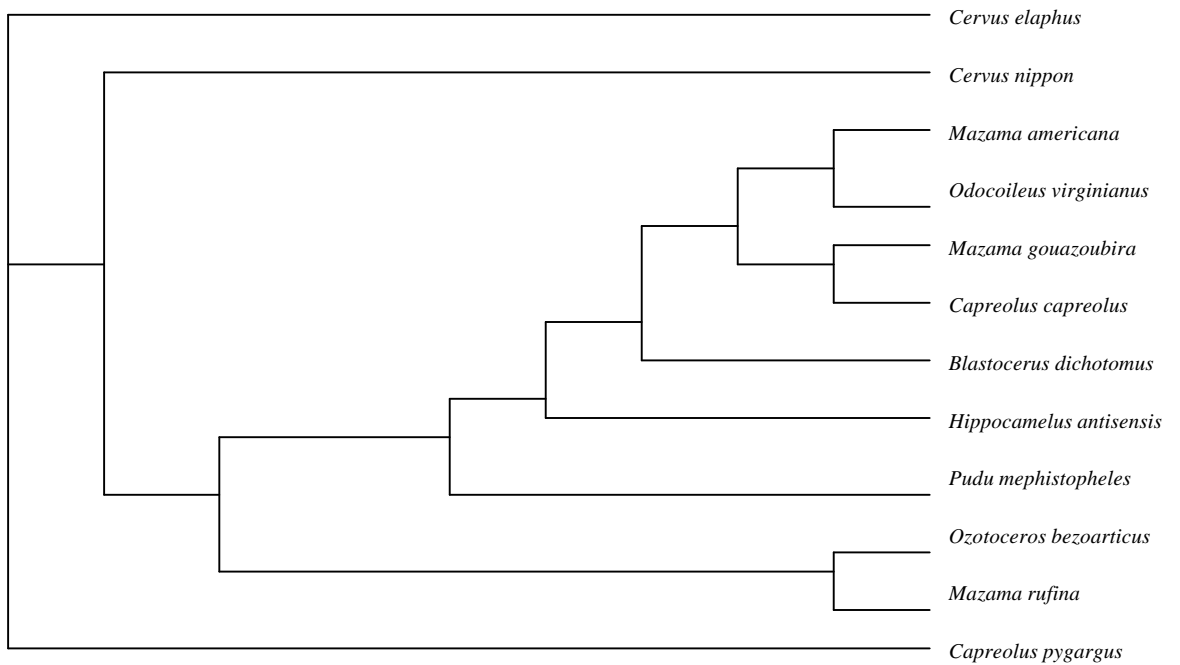
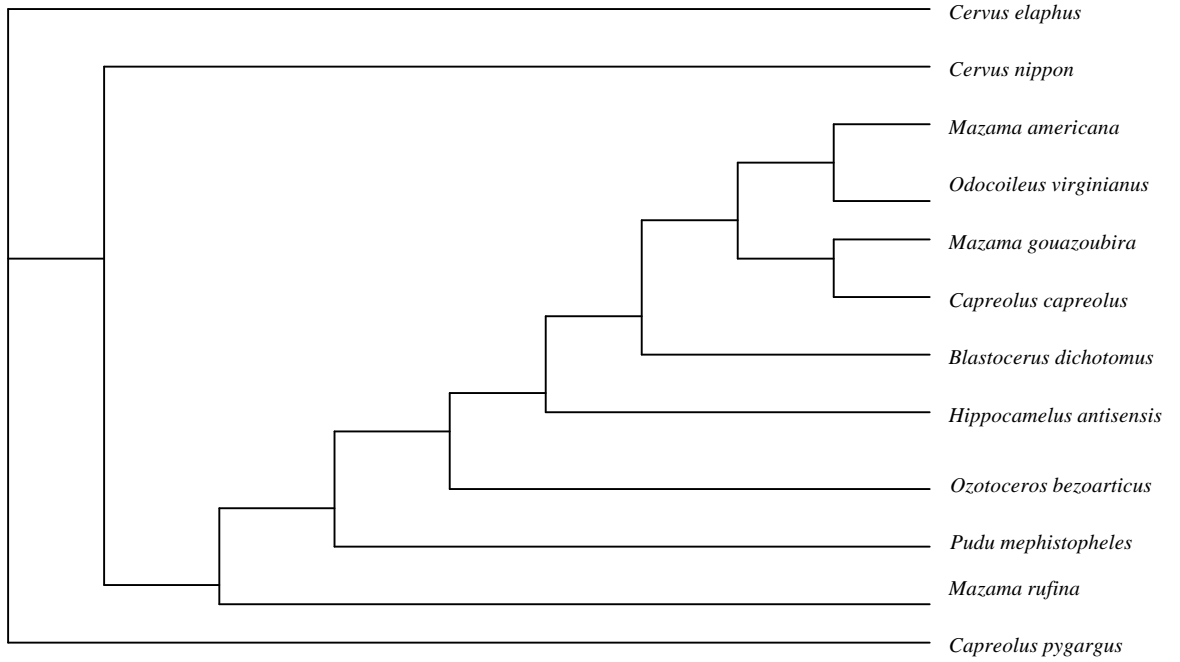


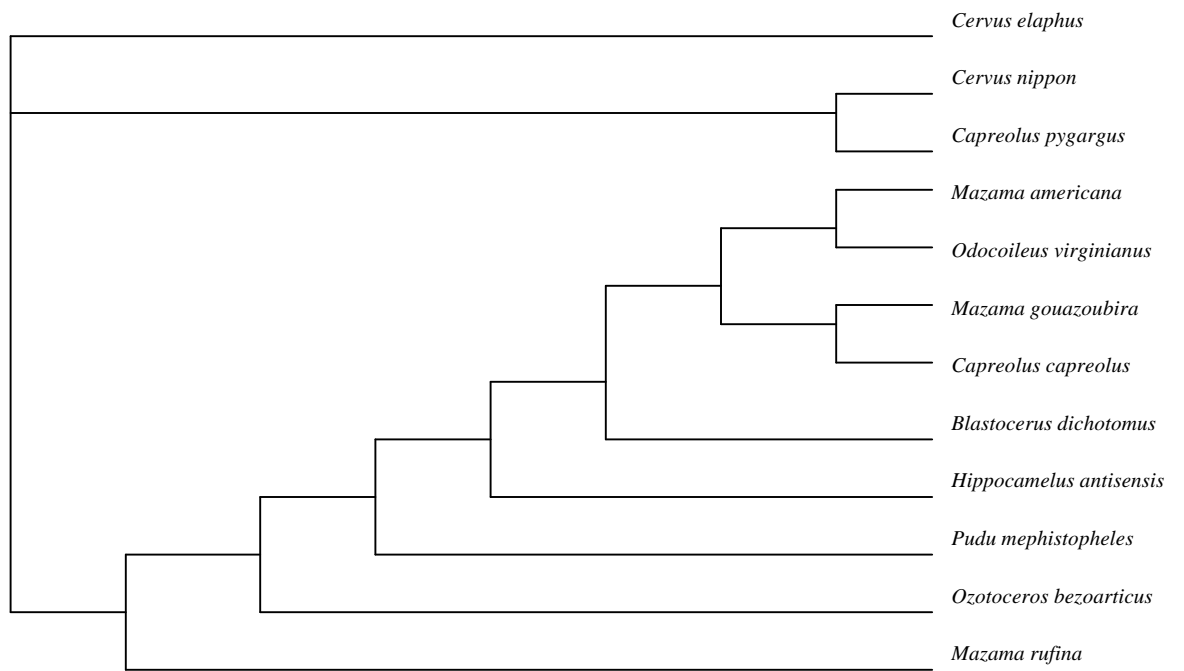
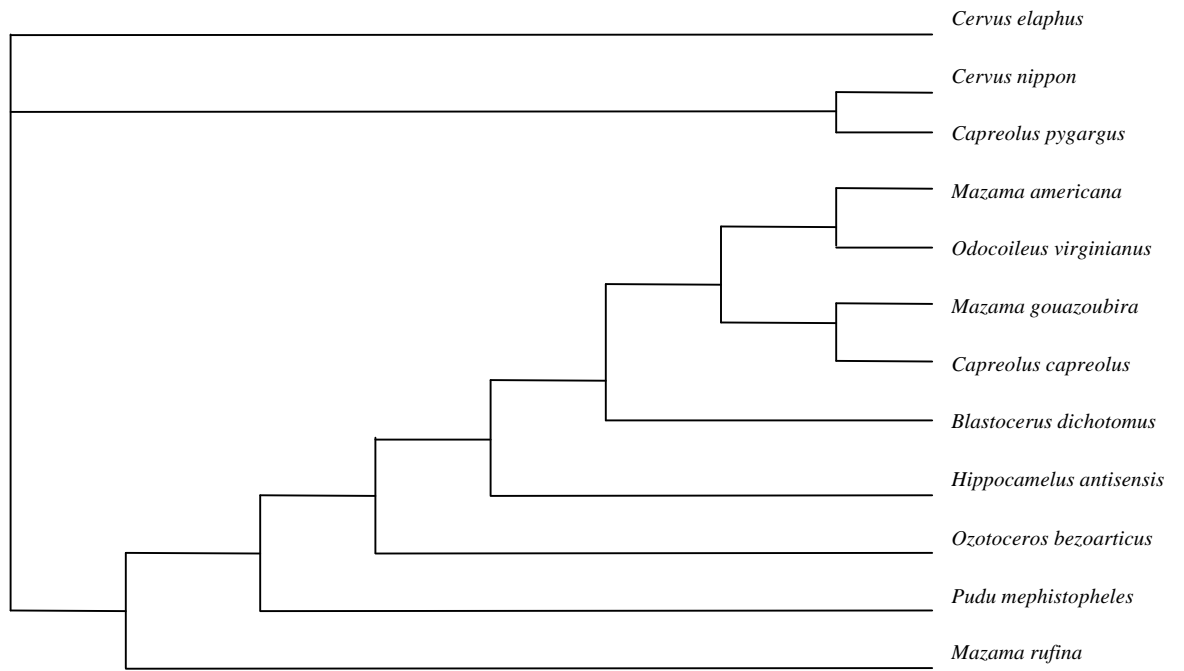


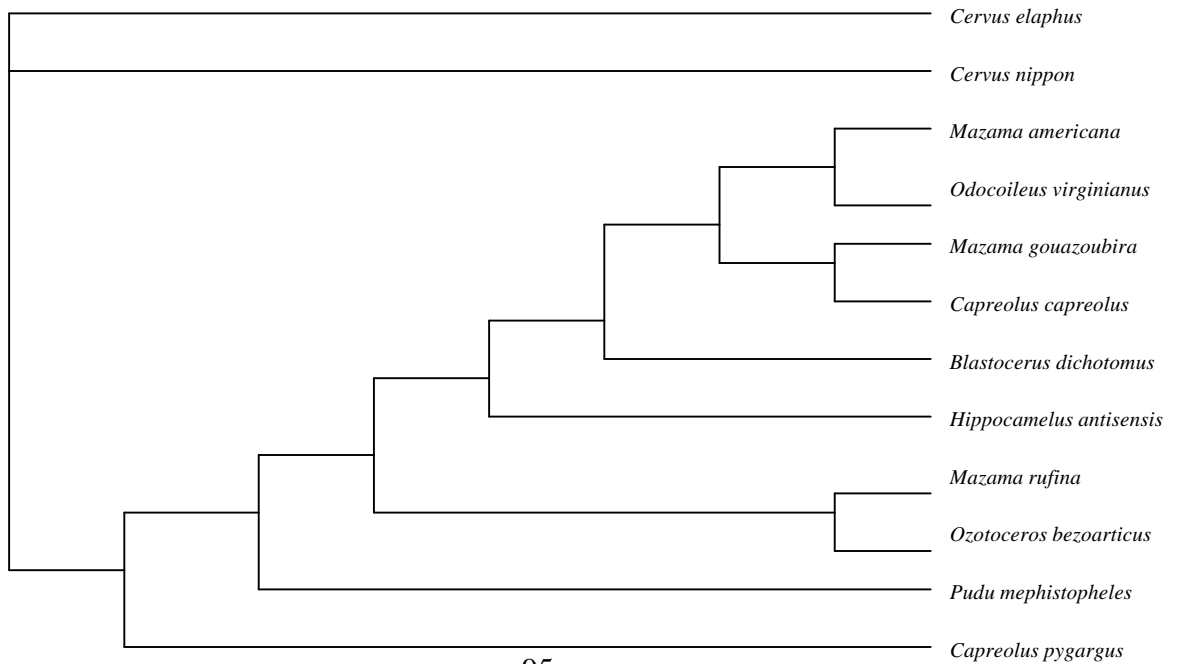
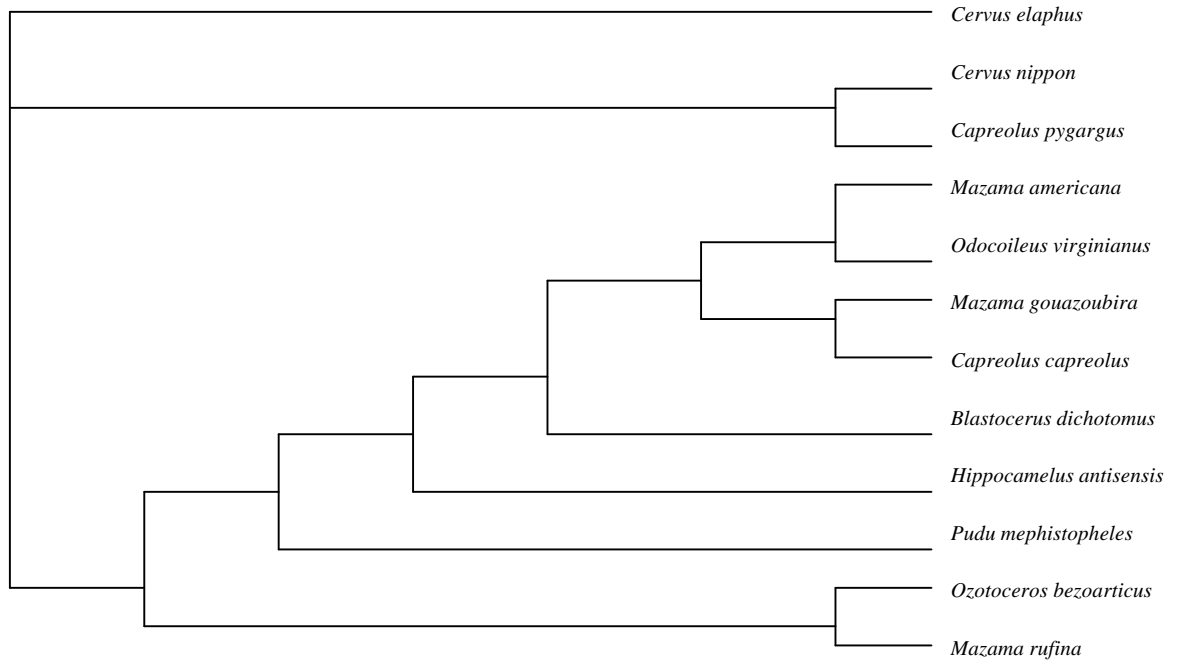


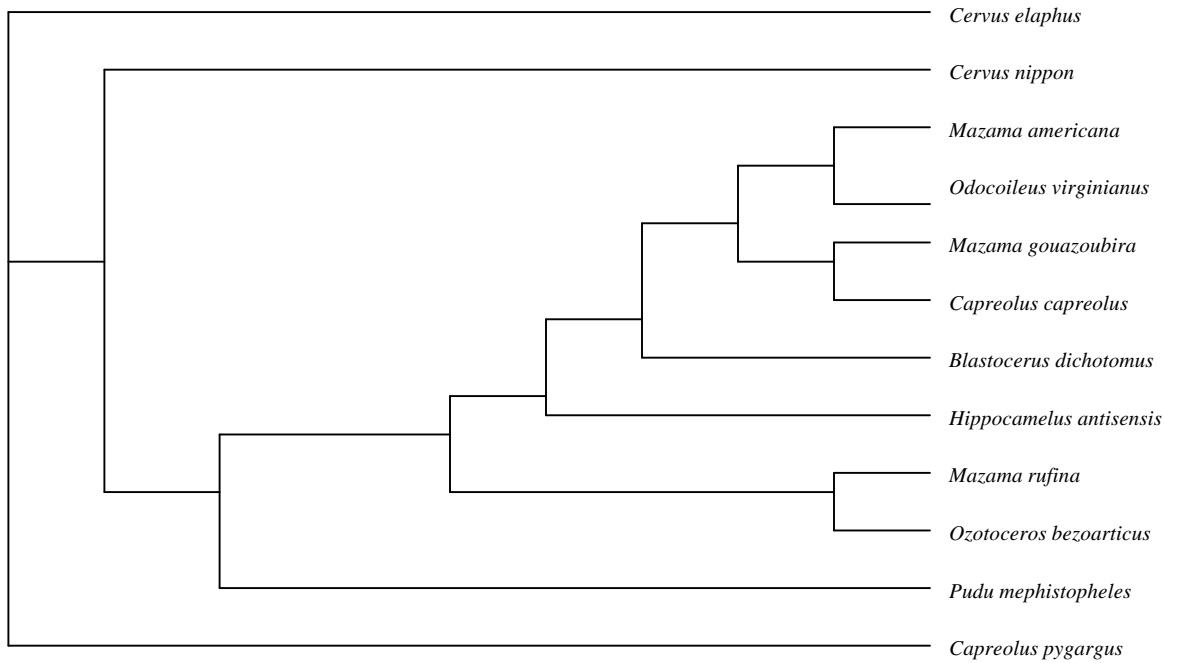
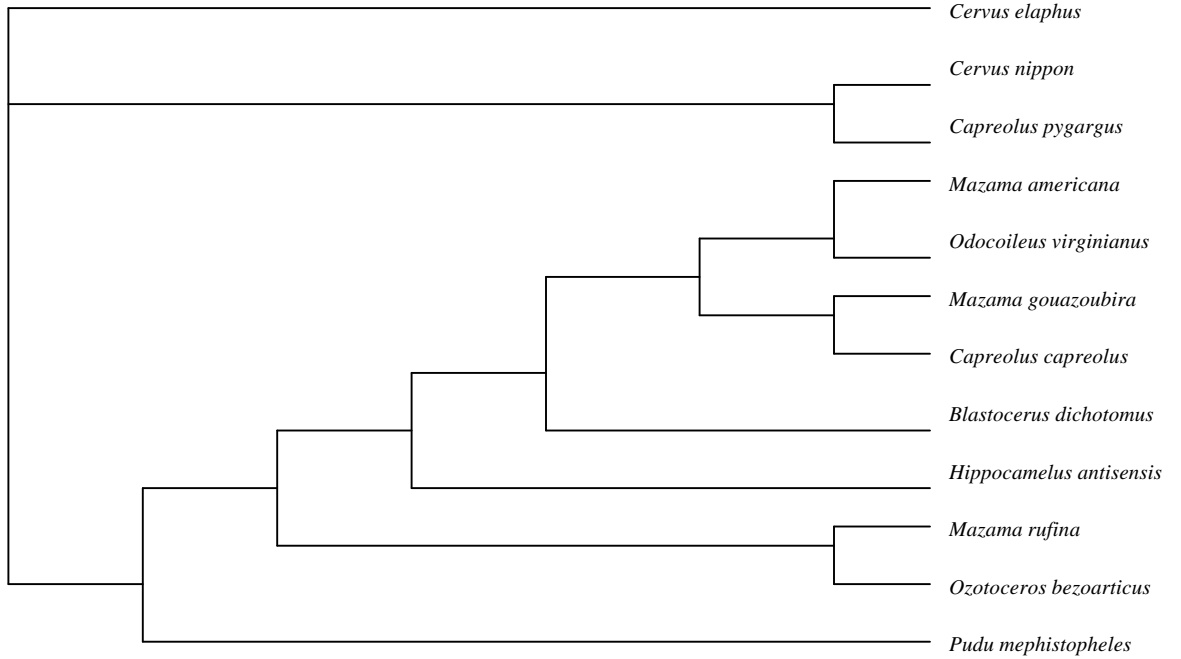


A



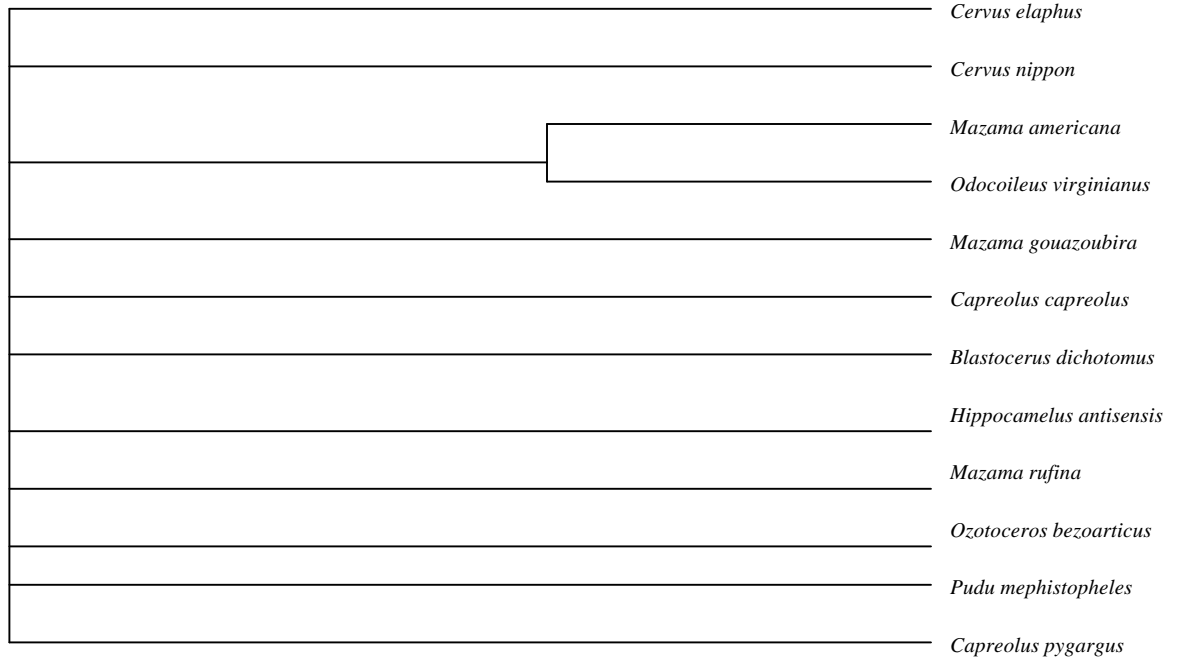




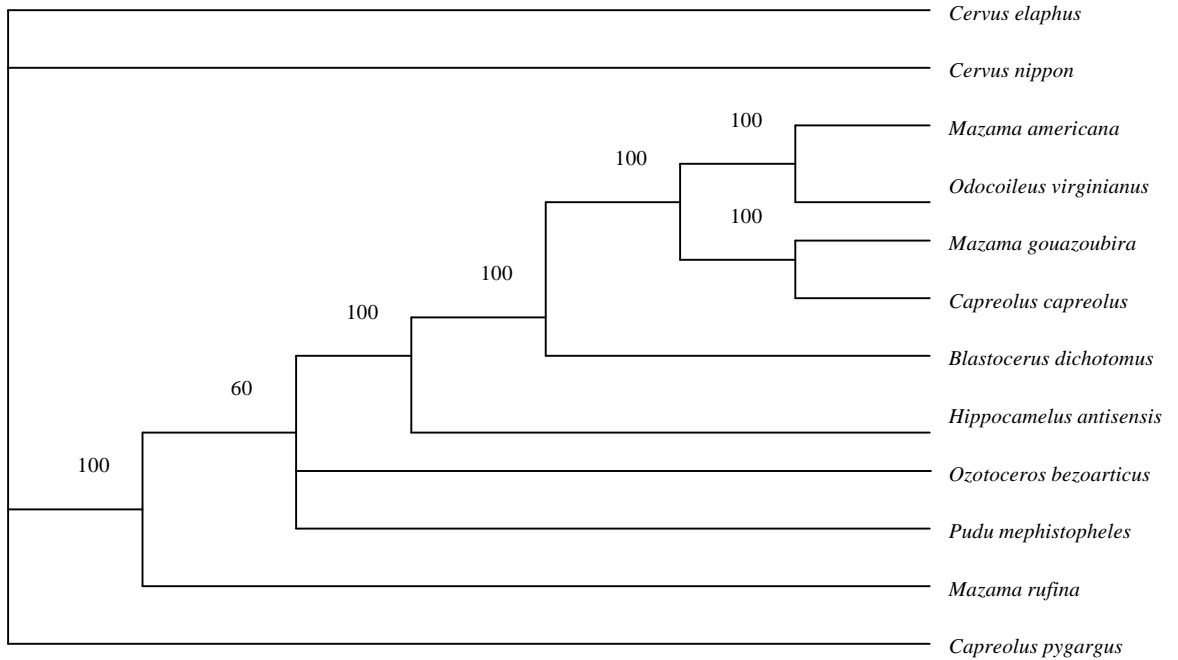


Para probar la estabilidad de los clados se realizó un árbol con las máximas restricciones (Bootstrap > 97%) obteniendo como resultado el árbol 16.

Arbol 16. Máximas restricciones

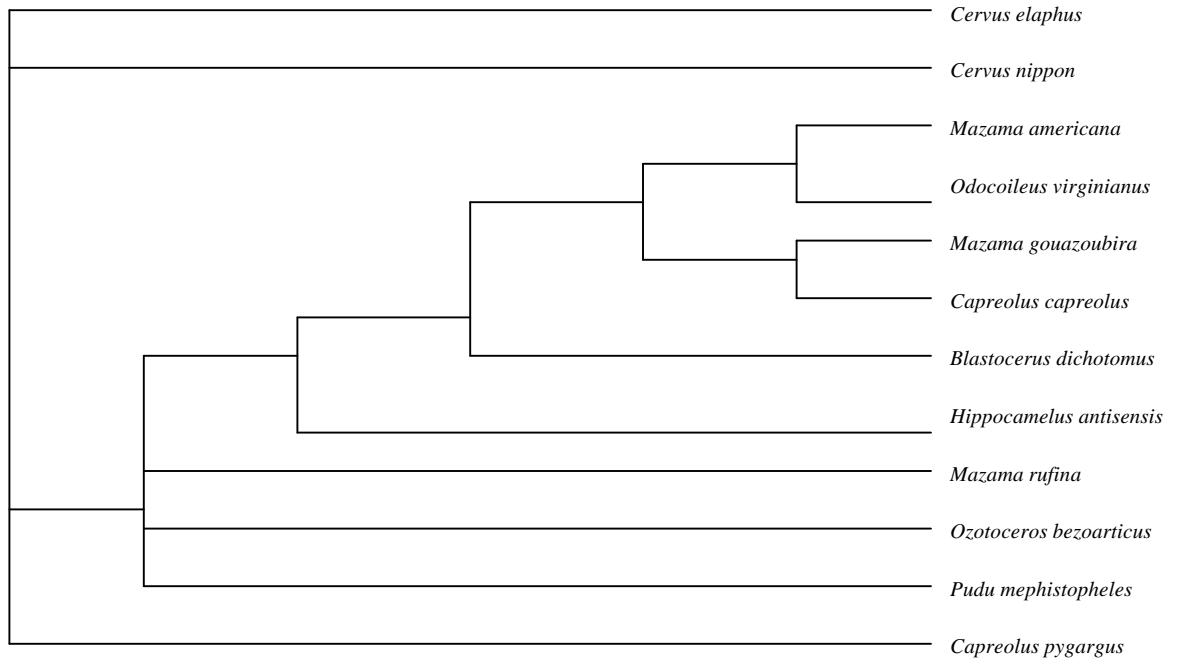


Arbol 17: Microsatélites consenso: Semiestricto

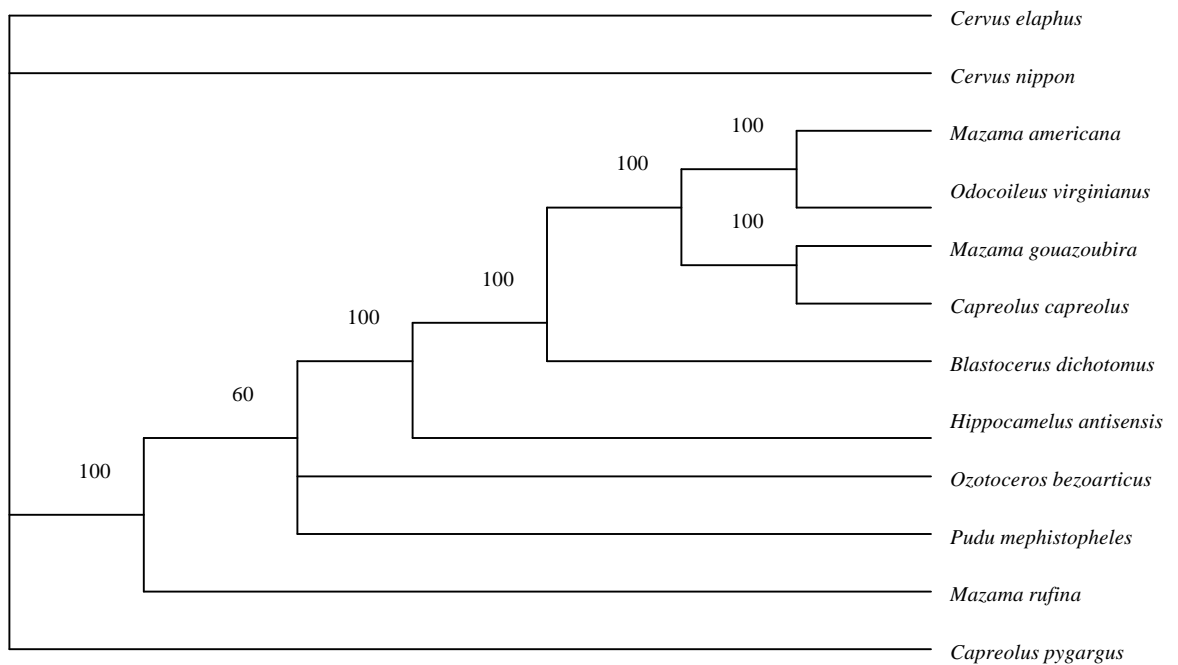


Con los 15 árboles más parsimoniosos se procedió a realizar árboles consenso por diferentes métodos. Los métodos Semiestricto, árbol 17; Estricto en el árbol 18, Regla de la mayoría en el árbol 19 y Adams en el árbol 20 fueron empleados.

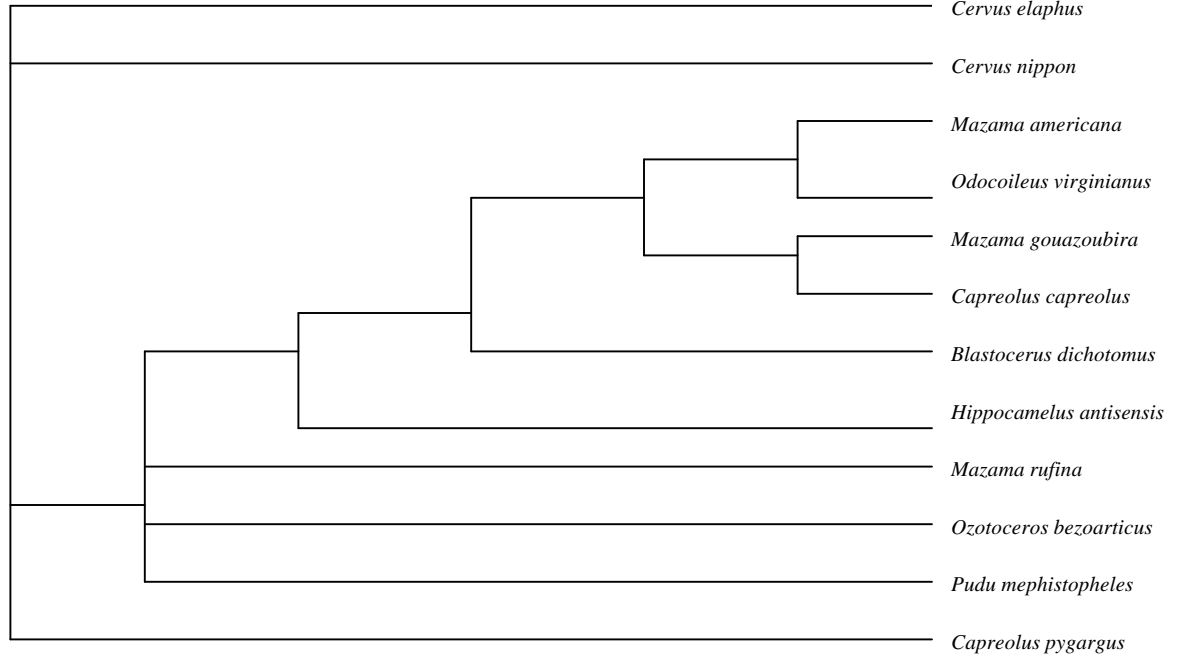
Arbol 18: Microsatélites consenso: Estricto



Arbol 19: Microsatélites consenso: Regla de la mayoría



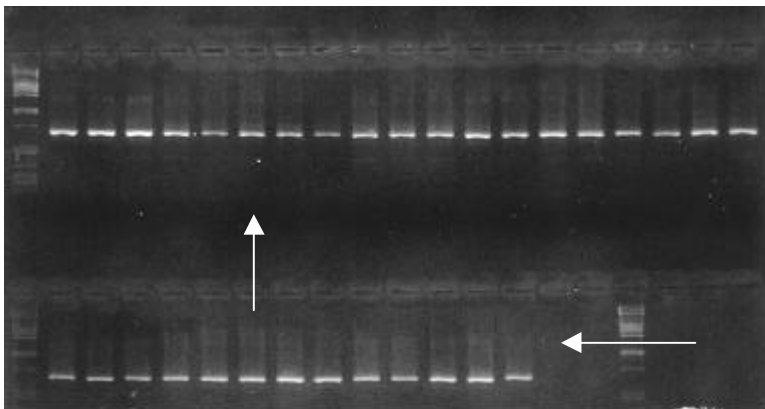
Arbol 20: Microsatélites consenso: Adams



Los números que se muestran dentro de los árboles son aquellos bootstraps con más del 50% de consistencia.

Secuenciación de la región control del DNA mitocondrial.

Foto 2. Gel de Agarosa: DNA región D-Loop.



En la foto podemos ver un gel de agarosa donde se muestran con las bandas blancas intensas (indicadas por las flechas) la presencia de DNA en la muestra tras su amplificación.

A continuación será purificada y secuenciada.

Se secuenció la totalidad de la región D-Loop (1133pb) de los 10 individuos analizados.

Para los géneros representados por más de un individuo (*Odocoileus* y *Mazama*), se presenta aquí una serie de resultados básicos. En el caso de *Odocoileus virginianus* se presentaron 106 huecos (gaps) en las 1133 pb analizadas. De las 1027 pb restantes, 84 fueron sitios polimórficos y 943 monomórficos. De esos 84 sitios polimórficos, 24 fueron informativos filogenéticamente con 2 variantes y 2 fueron informativos con tres variantes nucleotídicas. En la Tabla 10 se muestran los parámetros moleculares encontrados para esa especie. La diversidad nucleotídica (π) fue de 0.0454, θ por nucleótido de 0.0446, k fue 46.67 y M fue de 45.82. El análisis de desequilibrio de ligamento para los 24 sitios nucleotídicos que fueron polimórficos para dos nucleótidos diferentes (Tabla 10) mostró 276 pares de comparaciones. Con el test exacto de Fisher no se detectó ningún par de nucleótidos que presentara desequilibrio significativo. Por el contrario, al utilizar el test ji-cuadrado se detectaron 193 pares de comparaciones significativas ($\chi^2 = 4.0$, 1 gdl, $P < 0.05$) (193/276 = 69.93%). Este valor es significativamente mayor que el error I del 5% ($\chi^2 = 248.32$, 1gdl, $P < 0.001$). Sin embargo, si utilizamos la corrección estándar de Bonferroni ($\alpha = 0.05/276 = 0.000181$), ninguno de los valores de desequilibrio individuales de pares de nucleótidos resultó ser significativo. En el caso del género *Mazama* procedente de Bolivia, sin incluir la muestra *Mazama americana* Y08209 de origen desconocido, se presentaron 220 huecos en las 1133 pb analizadas. De los 913 pb restantes, 30 fueron polimórficos para dos variantes nucleotídicas.

Tabla 10. Diversidades Nucleotídicas (π), theta por nucleótido (θ), número promedio de diferencias nucleotídicas (k) y el parámetro M con sus respectivas varianzas para el conjunto de secuencias analizadas.

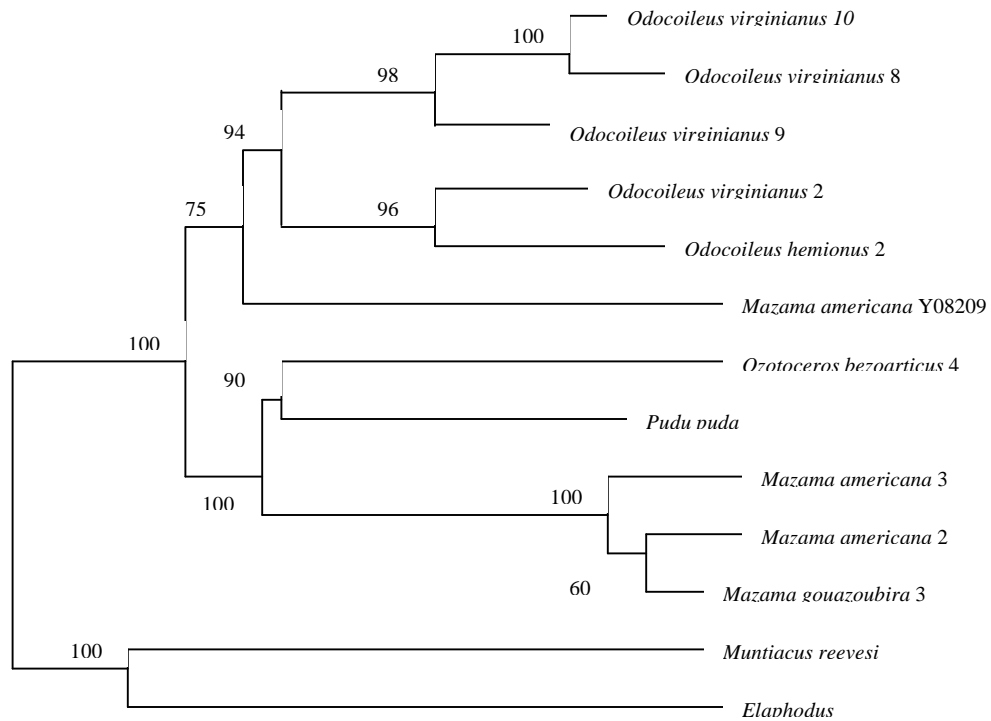
	<i>O. virginianus</i>	<i>Mazama</i> de Bolivia	<i>Mazama</i> Total
Diversidad nucleotídica (π_i)	0.0454	0.0219	0.0618
Varianza de la muestra de π_i	0.0001	0.0000	0.0005
Desviación estándar de π_i	0.0114	0.0063	0.0235
θ (por nucleótido)	0.0446	0.0219	0.0648
Varianza de θ	0.0005	0.0001	0.0012
Desviación estándar de θ	0.0243	0.0134	0.0352
Número promedio de diferencias nucleotídicas (k)	46.667	20.000	55.167
Varianza estocástica de k	350.909	61.905	487.903
Varianza de muestreo de k	317.778	89.524	442.647
M = 4Nv (por secuencia)	45.818	20.000	57.818
Varianza de M	622.882	151.429	986.001

En este caso no se encontraron sitio polimórficos para tres o cuatro variantes. Los niveles de diversidad genética encontrada a nivel de la región D-loop en esos

Mazama de Bolivia fueron claramente inferiores a los mostrados por los ejemplares estudiados de *Odocoileus virginianus* de Colombia (Tabla 10), aun cuando, supuestamente, pertenecen a dos especies morfológicamente diferentes (*M. americana* y *M. gouazoubira*). La diversidad nucleotídica fue 0.0219, es decir menos de la mitad de la encontrada en la especie anterior, mientras que k y M fueron igual a 20. No se presentó ningún caso de desequilibrio de ligamiento. También, se analizaron esos mismos estadísticos, incluyendo la secuencia del ejemplar de *Mazama* Y08209 de origen desconocido. El número de huecos encontrados fue de 241 en la secuencia de 1133 pb analizadas. La introducción de esta secuencia aumentó considerablemente el número de sitios polimórficos a 106 de las restantes 892 pb. Cinco de ellos correspondieron a variantes de dos nucleótidos que fueron filogenéticamente informativos. Además, se dieron 4 sitios polimórficos con tres variantes nucleotídicas, todas ellas informativas. En la Tabla 10 se muestran los parámetros moleculares correspondientes a esta agrupación. Como se puede ver, el incremento de la diversidad nucleotídica fue elevada ($\pi = 0.0618$), tres veces superior a la encontrada sin incluir esa muestra. También se incrementaron los valores de fi por nucleótido, k y M (0.062, 55.17 y 57.82). Esto demuestra que la citada *Mazama* diverge considerablemente a nivel molecular de la región D-loop de las *Mazama* de origen boliviano. Adicionalmente la introducción de esta muestra genera una cierta cantidad de desequilibrio de ligamiento entre los 5 sitios nucleotídicos polimórficos para dos variantes (10 pares de combinaciones), al utilizar el test ji-cuadrado ($4/10 = 40\%$; cada par significativo con $\chi^2 = 4.00$, 1 gdl, $p < 0.05$; Tabla 10). Sin embargo ,

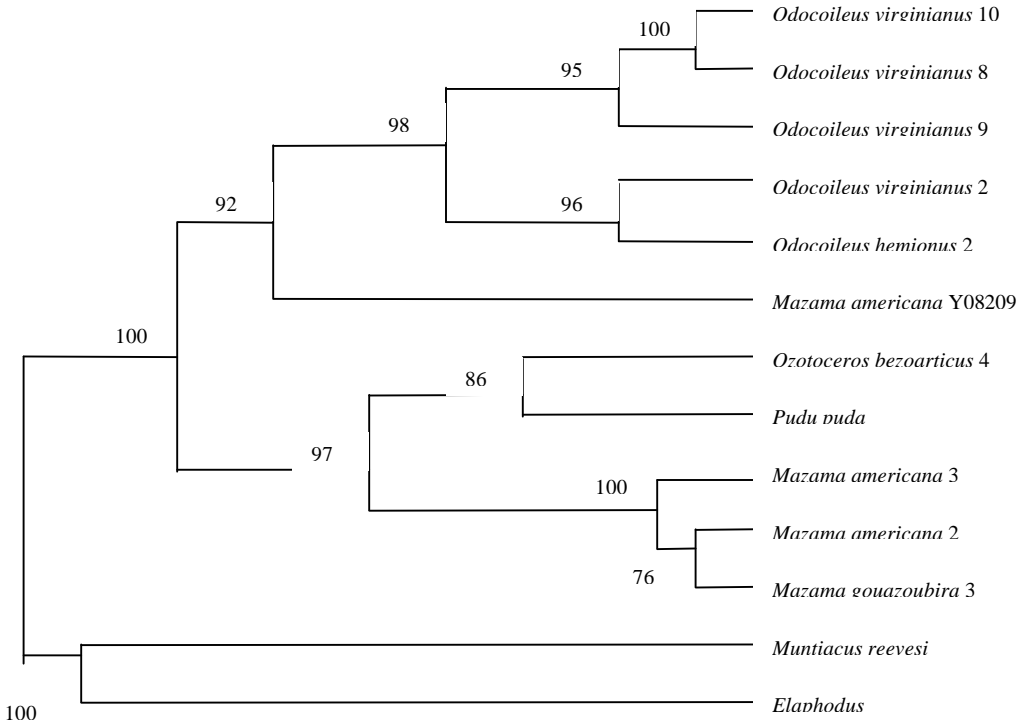
con el test exacto de Fisher ningún caso fue significativo y , tampoco, al aplicar la corrección estándar de Bonferroni ($\alpha = 0.05/10=0.005$) a los test ji-cuadrado. El test de neutralidad de Tajima mostró valores de $D = 0.1936$ (caso *Odocoileus virginianus*), 0.0000 (caso *Mazama* bolivianas) y -0.4799 (caso de todas las *Mazama*). En los dos primeros casos, esos valores fueron no significativos, asumiendo que seguían una distribución beta, luego se asume que el modelo mutacional es plenamente neutral. En el tercer caso, el valor fue mas elevado y negativo, lo que podría indicar la presencia ligera de mutaciones deletéreas.

Arbol 21

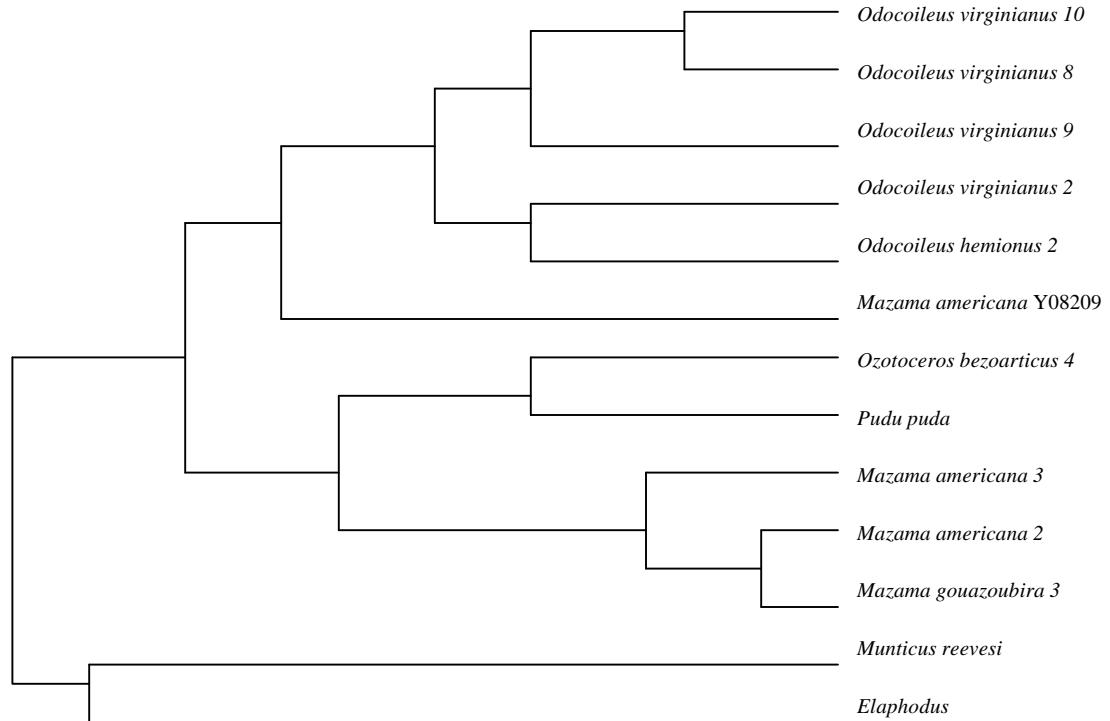


Los análisis filogénicos llevados a cabo con los métodos de matrices de distancias genéticas (Tajima & Nei, 1984 y Kimura, 1980) y los obtenidos con los métodos de máxima parsimonia pueden verse, respectivamente, en los árboles 21 a 25. Todos los arboles generados con los métodos de distancias (árboles 21, 22 y 23) muestran que el primer clado en divergir corresponde al integrado por las secuencias de los Muntiacinae asiáticos (*Muntiacus* y *Elaphodus*) respecto a las restantes secuencias todas ellas de *Odocoileus* americanos. Esta separación es robusta ya que todos los bootstraps son de 100%. Ya dentro del seno de los *Odocoileus* encontramos dos clados principales. En uno de ellos se encontraron todas las secuencias de los *Odocoileus virginianus* colombianos, la del *Odocoileus hemionus* norteamericano y la del *Mazama americana* Y08209 (bootstrap 75-92%).

Arbol 22



Arbol 23.

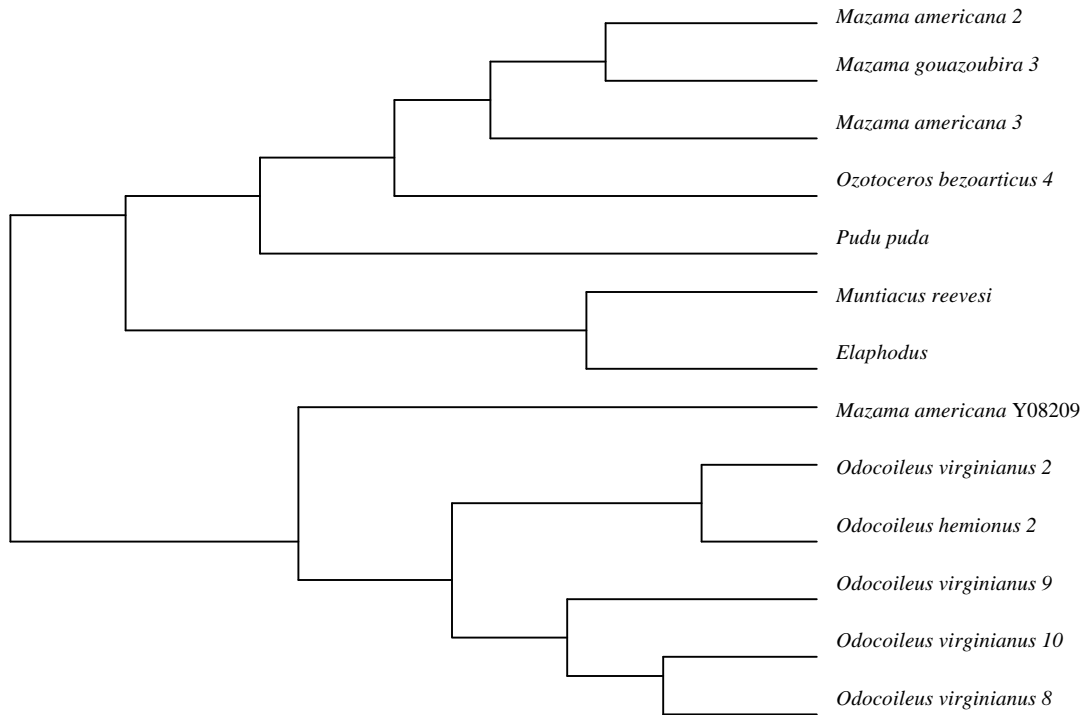


Cabe resaltar que la secuencia del *Odocoileus virginianus*2 estuvo significativamente (bootstrap 96%) mas relacionada con la del *Odocoileus hemionus* que con las restantes secuencias del *Odocoileus virginianus*. El otro gran clado (bootstrap 97-100%) presento otros dos sub-clados. Uno constituido por un Cervidae, de tamaño mediano e 28 a 35 kg de peso, *Ozotoceros bezoarticus* y el pequeño *Pudu puda*, de no más de 8 kg de peso, con un porcentaje de bootstrap que oscilo entre el 86 y el 90%. El otro sub-clado agrupo a las tres secuencias procedentes de *Mazama* de Bolivia. La secuencia, del morfológicamente reconocible como *Mazama americana* 2, presentó

una más intensa relación con el *Mazama gouazoubira*3 que con la secuencia del otro *Mazama americana* 3 (bootstrap 60-76%).

Los análisis de máxima parsimonia, sin embargo, mostraron algunas diferencias importantes respecto a lo descrito en los métodos de distancias. Se obtuvieron dos arboles de máxima parsimonia con un número mínimo de 714 pasos. Se presentan los árboles consenso con la regla de la mayoría del 50%. Utilizando el procedimiento “Heuristic search” se observaron dos grandes clados.

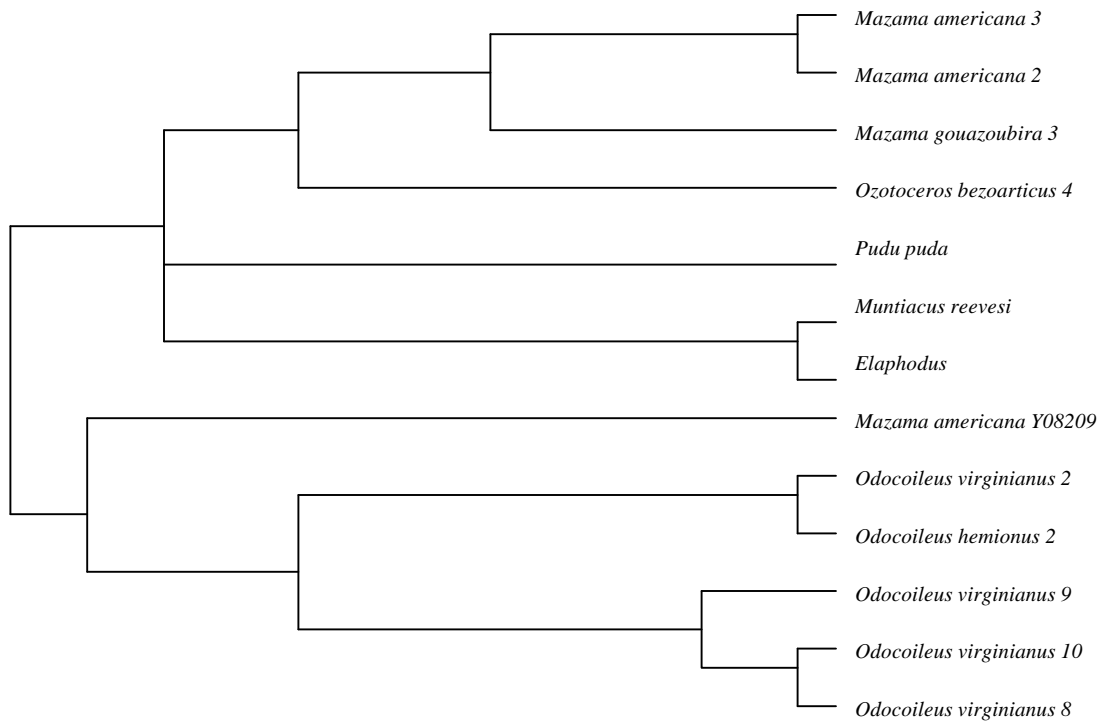
Arbol 24: Máxima Parsimonia “Heuristic Search”



La primera gran diferencia, respecto al análisis anterior, viene dada por la pertenencia de los géneros Muntiacinae a uno de los clados integrados por Odocoilinae. En este clado encontraríamos los ejemplares de *Mazama* procedentes de Bolivia, *Ozotoceros bezoarticus* y *Pudu puda*. En este caso, *Ozotoceros* presento mayor relación con

Mazama que con Pudu. Al igual que en la técnica anterior, no existió una diferencia clara entre ambas formas de *Mazama*. En el segundo clado se obtuvieron unas relaciones idénticas a las encontradas con los métodos de distancias (*Odocoileus virginianus*, *O. hemionus* y *Mazama americana* Y08209). Utilizando el procedimiento “branch and bound search” se obtuvo un panorama muy similar.

Arbol 25: Máxima Parsimonia. “Branch and Bound Search”



La diferencia principal fue que se obtuvo una tricotomía en el primer clado constituida por *Mazama* - *Ozotoceros*, *Pudu* y *Muntiacus* - *Elaphodus*. La otra diferencia fue, que en este caso, si se diferenciaron las secuencias de *Mazama*

americana y *Mazama gouazoubira* de Bolivia. Todos los bootstraps obtenidos en este análisis fueron de 100%, lo cual significa que este árbol es muy significativo.

DISCUSIÓN

Análisis Genético-Poblacionales con Microsatélites:

Las limitaciones en la cantidad de primers impidieron que los marcadores de renos y bóvidos pudiesen ser aplicados a la totalidad de los individuos muestreados, sin embargo, es importante aclarar que excepto las dos especies del género *Capreolus* – quienes no amplificaron para Cervid 1- todas las especies amplificaron para los marcadores probados. Es importante resaltar que la nitidez de las amplificaciones no fue la misma en todas las especies, y de esta forma, por ejemplo, los marcadores para renos amplificaron mejor en individuos del género *Mazama*, mientras que su resolución de amplificación fue menor en los *Capreolus*. Por otro lado, para los marcadores Cervid 1 y Cervid 3 los individuos que mejor amplificaron fueron los *Odocoileus* y los *Hippocamelus*, mientras que en *Mazama* y *Blastocerus* se observaron gran cantidad de bandas inespecíficas.

Puede observarse que la mayor cantidad de resultados se tienen para *Mazama americana* y para *Odocoileus virginianus*. Esto no sólo se debe a la mayor cantidad de muestras por especie, sino al alto polimorfismo encontrado entre las diferentes regiones geográficas de procedencia. Los ejemplares de *Mazama gouazoubira* presentaron también un alto polimorfismo, aunque debe recordarse que la procedencia de las muestras implicaba menos poblaciones.

Para el marcador Cervid 1 se obtuvo el mayor polimorfismo en *Mazama americana*, 15 alelos diferentes, con tamaños entre 165 y 205 pb, lo que hace que sea un rango

extraordinariamente amplio. DeWoody y colaboradores (1995) reportaron para este microsatélites un tamaño de 187 pb. *Odocoileus virginianus* también mostró un gran polimorfismo (8 alelos diferentes), y sus tamaños, estuvieron dentro del rango esperado por DeWoody –un poco por lo bajo-, ya que los alelos que obtuvimos se encuentran entre 173 y 191 pb; todos los *Odocoileus virginianus* presentaron una banda inespecífica de 167 pb al realizar el proceso de tinción. *Mazama gouazoubira* presentó 7 alelos diferentes para este marcador, pero su rango es más amplio que el de *Mazama americana*, tiene alelos desde 171 hasta 197 pb. Tal como se mencionó antes, las dos especies del género *Capreolus* no amplificaron para este marcador.

Para los diferentes análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) tomando como hipótesis el déficit de heterocigotos, las “poblaciones artificiales”, donde se han mezclado poblaciones de diferentes procedencias geográficas, no se encuentran en EHW. Esto puede explicarse con la existencia de un efecto Wahlund positivo. El efecto Wahlund se presenta cuando más de una población se está tomando como si fuese una sola. Este efecto se caracteriza por la presencia de un exceso de homocigotos en la población, lo que conlleva a un defecto de heterocigotos, que es en este caso la hipótesis planteada.

Para Cervid 3 se obtuvo el mayor polimorfismo con las muestras de *Odocoileus virginianus*, 12 alelos diferentes, con tamaños entre 184 y 203 pb. DeWoody y colaboradores (1995) reportaron para este microsatélites un tamaño de 190 pb lo que hace que el rango encontrado se encuentre por encima de lo esperado por estos mismos autores. *Mazama americana* mostró un gran polimorfismo (10 alelos diferentes), y sus tamaños también estuvieron sobre el rango esperado por DeWoody,

ya que los alelos que obtuvimos se encuentran entre 184 y 206 pb. *Mazama gouazoubira* presentó 7 alelos diferentes para este marcador, y su rango es más bajo que el de *Mazama americana*, tiene alelos desde 182 hasta 200 pb.

Respecto a los análisis de EHW podemos decir que ante la misma hipótesis (defecto de heterocigotos) las poblaciones que fueron estadísticamente significativas fueron aquellas donde más de una población diferenciada se agruparon. Tal vez la única población donde este efecto no es muy claro es la población de *Odocoileus virginianus* de Colombia, ya que las muestras corresponden a individuos de Zoológicos de la zona Andina. Podría pensarse que esto se debe a que uno de ellos tiene ejemplares de posible procedencia de la cordillera Oriental y los llanos colombianos, mientras que en el otro zoológico los ejemplares pueden proceder de las cordilleras occidental y central.

Para el marcador microsatélite FCB 193 sólo encontramos desvío del EHW en la población que contiene los ejemplares de *Odocoileus virginianus* de Guatemala y Venezuela (dos subespecies reconocidas como diferentes, *Odocoileus virginianus mayensis* y *Odocoileus virginianus gymnotis*, respectivamente). Debe agregarse aquí que la cantidad de ejemplares genotipificados para este marcador fue reducida. Es importante agregar que dado que los marcadores son diseñados para bóvidos, la cantidad de alelos es menor. Esto se debe, a la relación curvilínea que se encuentra entre la proporción de loci polimórficos y la distancia evolutiva entre las especies, medida como hibridización DNA-DNA (Primmer et al., 1996). De esta forma cuanto más cercanas sean las especies o grupos trabajados, mayor será el polimorfismo encontrado. Esto se evidencia en otros de los marcadores de bóvidos, como TGLA

337, donde también fueron procesadas muy pocas muestras por especie, y BOVIRBP, aunque en éste último el número de muestras procesadas fue mucho mayor y cercano al de Cervid 1. Para este último marcador el grupo que presentó el más alto polimorfismo fue *Mazama gouazoubira*, quien mostró 3 alelos. Debe hacerse una aclaración sobre estos dos marcadores microsatélites, y es que independiente de la cantidad de alelos encontrados en todas las especies, éstos son especialmente pequeños en tamaño al ser comparados por los presentados por Slate y colaboradores (1998).

El otro marcador de bóvidos (IDVGA 55) mostró un comportamiento muy diferente. Amplificó en la mayoría de las especies y presentó un alto polimorfismo. Varias de las especies tuvieron 6 alelos diferentes para este locus y sus tamaños son muy diferentes dependiendo de la especie muestreada. Al comparar estos tamaños con los reportados por Slate y colaboradores (1998) para otros ciervos se puede ver que los alelos se encuentran más o menos dentro del mismo rango, siendo un poco más altos que los de *Cervus elaphus* e, incluso, en algunas de las especies más altos que los de *Cervus nippon*. Los análisis de EHW mostraron significancia frente a la hipótesis propuesta cuando se trataba de las “poblaciones artificiales” antes mencionadas.

Respecto a los marcadores diseñados para *Rangifer tarandus*, podemos decir que para NVHRT 16 y NVHRT 71 los alelos encontrados en este trabajo, para todas las especies, son más altos que los reportados por Røed y Midthjell (1998). Para NVHRT 73 son más altos los alelos que encontramos para *Odocoileus virginianus*, mientras que las otras especies se encuentran dentro del rango reportado por los autores mencionados; en NVHRT 30 los alelos se encuentran dentro del rango reportado. Es

importante observar que estos cuatro marcadores fueron aplicados en muy pocos individuos por especie, sin embargo, la cantidad de polimorfismo por locus fue alta y hace recomendable realizar más pruebas con ellos en ejemplares de especies neotropicales. El análisis de EHW fue significativo para la “población artificial” del género *Mazama* con el marcador NVHRT 71.

Es importante mencionar que en los microsátélites se han reportado alelos nulos. Éstos son aquellos alelos en los cuales se ha perdido una parte de la secuencia de acotamiento –a la cual se une el primer- o el microsátélite total se ha perdido. Debido a esto, el homocigoto para el alelo nulo se ve como un producto no amplificado y el heterocigoto como un homocigoto para el alelo no nulo (Engel et al., 1996). En principio para los marcadores aplicados en este trabajo no parece haberse dado constancia de esto.

Frente a los resultados obtenidos para el EHW deben hacerse dos anotaciones. La primera de ellas es que la población colombiana y la peruana de *Mazama* sólo contienen animales fenotípicamente pertenecientes a *Mazama americana*. Sería explicable la falta de EHW en la población colombiana ya que los animales muestreados en el Alto Sinú (Córdoba) y en Leticia (Amazonas) provienen de áreas geográficas muy separadas. La segunda es que las *Mazama* de Perú sólo vienen de la población de Iquitos, en la Amazonía, por lo tanto se debe tratar de una población natural, ya que las muestras fueron obtenidas a partir de carne de monte de venta en el mercado de la ciudad antes mencionada. Esta falta de EHW debe explicarse por otro tipo de fenómenos.

Al realizar los análisis de diferenciación genotípica entre alelos por locus, tal como se ilustran en la tabla número 2, podemos ver que de nuevo el grupo artificial que contiene la totalidad de ejemplares del género *Mazama* es significativamente diferente para el locus Cervid 1 al ser comparadas las *Mazama* por países de procedencia, y que las diferencias que encontramos entre las diferentes regiones donde se distribuye *Mazama americana* también son significativas. Esto puede deberse a la amplia distribución de esta especie y de las muestras que se han trabajado. Por otro lado, resulta extraño que entre las poblaciones de *Odocoileus virginianus* no se encuentren diferencias significativas entre alelos por cada locus cuando esta especie también es de amplia distribución.

En la tabla 3 se comparan las diferenciaciones génicas entre poblaciones, por pares. Es así como de nuevo las “poblaciones artificiales” del género *Mazama*, tanto si éstas han sido tomadas por país, o por especie, son significativamente diferentes para Cervid 1 y Cervid 3 (los dos marcadores microsatélites con más resultados).

Por otro lado, las *Mazama americana* de Córdoba (Colombia) mostraron diferencias significativas con las de procedencia Peruana o de Leticia. Esto nos lleva a pensar en la posibilidad de estar hablando de grupos separados geográficamente durante mucho tiempo, de modo que las poblaciones se han diferenciado suficientemente. De hecho, las muestras procedentes de Córdoba pertenecen a la subespecie *Mazama americana zetta*, mientras que las de la Amazonía pertenecen a la subespecie *Mazama americana carrikeri*, por lo tanto se ha iniciado un proceso de especiación. Esto también se observa al comparar las poblaciones de *Mazama gouazoubira* de procedencia

boliviana contra las que se obtuvieron en Venezuela, siendo ambas subespecies bien diferenciadas (*Mazama gouazoubira medemi* y *Mazama gouazoubira cita*, respectivamente).

Para los *Odocoileus virginianus* las diferencias significativas se encuentran con los marcadores Cervid 3 e IDVGA 55 comparando las poblaciones colombiana y venezolana o al comparar la colombiana con el grupo artificial de Venezuela y Guatemala. Por lo tanto, nos haría pensar que las diferencias entre las poblaciones de Colombia y Venezuela son significativas. Esto es especialmente importante ya que se considera la subespecie de Venezuela (*Odocoileus virginianus gymnotis*) como diferente de las colombianas aunque se tienen reportes de ésta última en el oriente Colombiano.

El análisis posterior de desequilibrio gamético, o desequilibrio genotípico, no fue significativo para ninguno de los marcadores empleados, ni para ninguna de las especies trabajadas, por lo tanto, estos marcadores, al menos para las especies estudiadas, no se encuentran ligados. Este era uno de los factores que debía ser tenido en cuenta, ya que este grupo de artiodáctilos presenta una elevada fragilidad cromosómica y por esto se podría prever que en alguno de los rearreglos hubiesen quedado ligados, así como en el caso de los *Capreolus* se perdió el fragmento correspondiente a Cervid 1.

Uno de los factores que puede afectar el EHW es la migración entre poblaciones con acervos genéticos diferentes. Para esto se realiza el análisis del número de migrantes

que se muestra en la tabla 5. Es importante resaltar que de todas las poblaciones comparadas sólo se encontró un relativamente alto nivel de migración entre las poblaciones del Zoológico de Pereira y el Jaime Duque. Seguramente se deba a que ambas poblaciones provienen de sectores cercanos a los zoológicos y por lo tanto hasta hace, más o menos, 150 años, cuando se inició la colonización masiva de las cordilleras colombianas, es posible que hubiera algún tipo de flujo migratorio entre estas poblaciones.

Dado el alto desconocimiento que se tiene de las especies de ciervos neotropicales, muchas de ellas no se encuentran en listados de CITES o UICN debido a no conocer el estado actual de las especies (número de individuos, distribución e incluso en algunos casos su uso por parte de los colonos o indígenas). Sin embargo, debido a que se tienen resultados para algunas de las especies listadas por alguna, o ambas, entidades se realizó el análisis de variables mixtas que se muestra en la tabla 6. Es importante mostrar aquí que el número de alelos promedio por locus y el modelo mutacional Step-wise dieron los más altos coeficientes de determinación, lo que nos indica que estas variables se encuentran asociadas con el estado de vulnerabilidad de las especies. Es importante recalcar la importancia que tienen este tipo de análisis, ya que dado el alto grado de desconocimiento, la amenaza inminente para algunas de las especies y la situación política (que influye en la seguridad de los investigadores en campo) es importante poder hacer injerencias sobre el estado genético de los animales, y esto se puede hacer a partir de muestras muy pequeñas de las cuales se obtiene el DNA. En un momento determinado a partir de muestras obtenidas en

poblaciones específicas puede evaluarse el riesgo en el cual se encuentra esa población específica, ya que los análisis a partir de DNA permiten calcular los tamaños efectivos de las poblaciones. Comparar las variables genéticas con variables ecológicas puede ser útil para realizar comparaciones desde diferentes puntos de vista sobre las mismas poblaciones y realizar proyecciones a partir de cualquier variable, cuyas relaciones sean conocidas, sobre aspectos desconocidos de la especie en estudio.

La heterocigosis promedio, contrario a lo esperado, no dio resultados de asociación con los listados mencionados. Es importante hablar un poco sobre la heterocigosis esperada promedio, ya que este es un aspecto fundamental dentro de los análisis genético poblacionales. La especie que presentó la mayor heterocigosis esperada promedio fue *Mazama gouazoubira*, seguida por *Mazama americana*; en el otro extremo encontramos a *Mazama rufina* con los más bajos valores de heterocigosis. En este último caso puede deberse al bajo número de ejemplares analizados. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que de *Pudu mephistopheles* también sólo se consiguieron muestras de 2 individuos y la heterocigosis es mayor que la de la *Mazama* en cuestión. Por otro lado, tenemos el caso de *Capreolus capreolus* donde a pesar de tener el mayor número de individuos muestreados (27) la heterocigosis es muy baja, sólo mayor que la de *Mazama rufina*. Entre mayor sea el valor de heterocigosis en una población se está reflejando un mejor estado genético, ya que ésta refleja el estado interno de las poblaciones. Esto se debe a que una población con mayor número de alelos para un marcador muy polimórfico (como los microsatélites) tendrá también polimorfismo en otros alelos que más adelante puedan servir como

amortiguadores ante los cambios del entorno. Los animales que han perdido la variabilidad se encuentran muy expuestos frente a los cambios del entorno. Esto puede sucederle, por ejemplo, a la población de los *Capreolus capreolus*, de los cuales se obtuvieron las muestras para este estudio. Aunque se trataba de muestras de dos procedencias geográficas, la heterocigosidad es tan baja que los animales son muy homogéneos entre sí.

Con los datos de las heterocigosidades esperadas y el programa Bottleneck se realizaron los análisis para poder determinar si las muestras de las poblaciones estudiadas atravesaron recientemente un cuello de botella. Los resultados que se muestran en la tabla 7 fueron no significativos para todas las poblaciones. Sin embargo, es importante considerar que las poblaciones de algunas especies son muy pequeñas y por lo tanto estos valores podrían llegar a ser significativos al aumentar el muestreo.

Análisis filogenético a partir de los microsátélites.

Con los alelos encontrados para los 10 marcadores, y utilizando los reportados (Slate et al., 1998; Røed & Midthjell, 1998) se realizaron árboles de máxima parsimonia y se encontraron cosas poco esperadas.

La primera de ellas es el estable clado formado entre *Mazama americana* y *Odocoileus virginianus*, antes que entre *Mazama americana* y las otras *Mazama*. Por otro lado *Mazama gouazoubira* tiene relación de grupo hermano en los árboles con *Capreolus capreolus*. Estos dos clados forman siempre un grupo hermano y a continuación siempre encontramos la divergencia de *Blastocerus dichotomus* seguido

por *Hippocamelus antisensis*. Las relaciones entre las otras especies no son tan claras y presentan diversas asociaciones dependiendo del método utilizado. Es importante aclarar aquí que la falta de inclusión en estos grupos bien definidos de *Mazama rufina* y *Capreolus pygargus* se debe en el primer caso a la baja cantidad de muestras y en el segundo al bajo número de marcadores amplificadas. Por lo tanto, sobre estas dos especies no se puede concluir nada definitivo. *Cervus elaphus* fue utilizado como grupo ajeno y es importante ver que en 6 de los árboles, éste se asocia con *Cervus nippon* y en 5 más forma una tricotomía con el clado definido de las especies del grupo Odocoilinae y con *Cervus nippon*. Sobre las otras especies *Ozotoceros bezoarticus* y *Pudu mephistopheles* no se puede concluir nada aún, ya que las muestras y los marcadores empleados son muy pocos en ambos casos.

Respecto a los árboles de consenso podemos ver la estabilidad de los clados antes mencionados, ya que las parejas *Mazama americana* – *Odocoileus virginianus* y *Mazama gouazoubira* – *Capreolus capreolus*, y el clado que forman estas dos son estables, así como el clado de éstos con *Blastocerus dichotomus* y el siguiente con *Hippocamelus antisensis*. Las otras 3 especies forman una politomía lo que muestra que sus relaciones no son muy claras. *Cervus elaphus* y *Cervus nippon* quedan siempre como grupo ajeno, lo que es de esperar ya que se trata de especies de una subfamilia diferente.

Estas relaciones entre algunos taxa del género *Mazama* y *Odocoileus virginianus* ya habían sido reportadas por Smith y colaboradores (1986) cuando trabajando con muestras de Surinam de *Mazama americana* y *Mazama gouazoubira*, y de *Odocoileus virginianus* de Surinam y Norteamérica, se evidenció -tras utilizar

marcadores isoenzimáticos y morfológicos- que las *Mazama americana* se encontraban más relacionadas con los *Odocoileus* que con los individuos de la otra especie de *Mazama*.

Análisis filogenético con los resultados de la Secuenciación de región D-Loop.

En las dos taxa donde se midió la variabilidad genética, *Odocoileus virginianus* y *Mazama americana*, se puso en evidencia la existencia de mayor diversidad nucleotídica en la primera especie ($d = 0.0454$) frente a la obtenida para las *Mazama* procedente de Santa Cruz ($d = 0.0219$). Esto no deja de ser extraño, ya que en Santa Cruz se observaban dos fenotipos aparentemente bien distinguibles que fueran atribuidos a *Mazama americana* y *Mazama gouazoubira*. Esta pequeña diferenciación molecular haría pensar en la posibilidad de hibridación entre las especies, de modo que el DNA mitocondrial (de herencia materna) podría evidenciar un cruzamiento ancestral donde *Mazama americana* portara un haplotipo de *Mazama gouazoubira* o viceversa. Una segunda posibilidad es que todos los animales muestreados pertenezcan a una sola especie con una variabilidad morfológica muy amplia. Otra opción es que el haplotipo compartido perteneciese al ancestro común.

La cantidad de diversidad nucleotídica introducida por estos dos géneros (*Odocoileus* y *Mazama*) se puede comparar con la encontrada para otras especies de mamíferos. Teniendo como parámetro que un valor mayor que $d = 0.01$ nos separa dos especies, al introducir la *Mazama americana* Y08209, de origen presumiblemente mexicano, la diversidad nucleotídica y otros parámetros genético-poblacionales aumentaron considerablemente, de modo que $d = 0.0618$, superando con este valor el encontrado

incluso para especies diferentes, como es el caso de *Odocoileus virginianus* y *Odocoileus hemionus*. Esta diversidad nucleotídica es otro indicio, que sumado al discutido para los microsatélites nos podría estar indicando que el género *Mazama* no es monofilético.

El análisis de los árboles filogenéticos utilizando las distancias de Tajima & Nei (1984), o de los dos parámetros de Kimura (1980), con los métodos de máxima parsimonia evidenciaron esto. El individuo de *Mazama americana* Y08209 siempre quedó afiliado al clado de los *Odocoileus*, mientras que los otros individuos de *Mazama* quedaron siempre afiliados entre sí mostrando mayor relación con *Pudu* y *Ozotoceros*. En el estudio citado anteriormente de Smith y colaboradores (1986) ya se evidenció este mismo fenómeno al trabajar con datos morfológicos e isoenzimáticos.

Otro aspecto interesante que se presenta con los resultados obtenidos a partir de este análisis filogenético es el hecho de que el *Odocoileus virginianus* 2, de procedencia colombiana, quedó como grupo hermano de la secuencia del *Odocoileus hemionus* de procedencia norteamericana. Este género se ha caracterizado por tener una extensa variabilidad genética. Cronin y colaboradores (1988) reportaron dos *Odocoileus virginianus* de la misma procedencia geográfica que se diferenciaban entre sí conspicuamente más ($\pi = 0.0051$), que otros individuos de esa población con individuos de poblaciones totalmente aisladas geográficamente ($\pi = 0.0026$). La diversidad nucleotídica entre *Odocoileus virginianus* y *Odocoileus hemionus*, ambos de procedencia norteamericana, fue $\pi = 0.0758$. Esta estimación permite calcular un tiempo de divergencia de 351.000 años (Polziehn & Strobeck, 1998).

Cronin y colaboradores (1991) en un nuevo estudio utilizando secuenciación de DNA mitocondrial encontraron dos individuos, un *Odocoileus virginianus* y un *Odocoileus hemionus* que presentan el mismo haplotipo mitocondrial, al parecer de *Odocoileus virginianus*. Estos autores propusieron que estas dos especies presentan hibridización, lo cual se ha reportado en diferentes lugares, y que debido a esto se presentó ese haplotipo “raro” en *Odocoileus hemionus*. Carr & Huges (1993) mostraron que en el oeste de Texas las dos especies comparten un único haplotipo mitocondrial, al parecer de origen *hemionus*.

Otra hipótesis que se puede generar sobre el agrupamiento del *Odocoileus virginianus* 2 con el *Odocoileus hemionus* es que se haya dado una extensiva hibridización entre los dos linajes y en el proceso de colonización, por parte de *Odocoileus virginianus*, de Centro y Sur América, ésta especie hubiese portado haplotipos mitocondriales correspondientes al linaje *hemionus*.

Los métodos de máxima parsimonia mostraron que los Muntiacinae, utilizados como grupo ajeno para las filogenias, formaron un clado estable con aquel formado por las *Mazama* de Bolivia, *Pudu* y *Ozotoceros*. Ya Polziehn & Strobeck (1998) observaron que otro género de ciervos asiáticos (*Hydropotes*), en algunos análisis se agrupaba con individuos de *Mazama*. Ellos justificaron este hecho en el tipo de estructura telemetacarpal, el tamaño del canal temporal, un tamaño corporal similar, caninos como colmillos y hembras con cuatro mamas. Algo similar podría estar pasando en este caso entre los Odocoilinae y los Muntiacinae. De hecho Comincini y colaboradores (1996) utilizando RAPDs detectaron una relación ostensible entre *Muntiacus muntjac* y *Odocoileus hemionus*, aunque al realizar las comparaciones del

primero con *Capreolus capreolus* las relaciones fueron mucho menores. Al realizar análisis con la secuenciación de la región D-Loop, Douzery & Randi (1997) encontraron que *Hydropotes* se encontraba más cercano a los Odocoilinae que los Cervinae, y que el Odocoilinae más cercano es *Capreolus capreolus*. De esta forma se puede estar entrando a reevaluar la separación tradicional entre los ciervos asiáticos y los americanos.

Comparando los resultados obtenidos con los marcadores microsatélites y con la secuenciación de la región D-Loop vemos que hay puntos en común bajo los dos aspectos. El más notorio es el problema de la diferenciación de las especies del género *Mazama*.

Este problema no es reciente, ya Allen (1915) había tratado de hacer el primer recuento general para el género *Mazama*. Este autor recopiló toda la información disponible en el Museo Americano de Historia Natural, en Nueva York (Estados Unidos), y publicó un boletín con las principales características fenotípicas y ecológicas de las especies de *Mazama* descritas hasta aquel momento. En esta publicación Allen declara la dificultad de ubicar correctamente ejemplares de diferentes procedencias geográficas y dice haberlas descrito como una nueva especie, aunque no se encuentra totalmente convencido de ello. Él reporta 11 *Mazama* del grupo rojo y 7 del grupo gris. Estos dos grupos se han mantenido estables a lo largo del siglo, aunque no así las especies que se encuentran dentro de ellos. Posteriormente, esta clasificación fue revaluada y es así como desde mediados del siglo XX se consideraban sólo 3 especies en el género: *Mazama americana*, *Mazama*

gouazoubira y *Mazama rufina* (Redford & Eisenberg, 1992). Con el advenimiento de las primeras técnicas cariotípicas se encontraron gran cantidad de rearrreglos cromosómicos dentro del género y el grupo de Barbant y Merino (1997) reportan, además de las especies mencionadas, dos nuevas especie, *Mazama boroboro* y *Mazama nana*, a partir de estos rearrreglos. Pero, a la vez, hacen claridad sobre las dificultades que se presentan al encontrar que dos animales fenotípicamente idénticos tienen cariotipos muy diferentes, no sólo en cuanto a bandeo sino también en cuanto al número de cromosomas encontrados y a la cantidad de cromosomas B (partes fraccionadas de cromosomas). Esto se debe a la fragilidad cromosómica que se ha reportado para los ciervos en general (Groves y Grubb, 1987) y que en las *Mazama* parece tener una enorme importancia en los fenómenos de especiación. Para la Asociación de Colecciones Sistemáticas (Honacki et al., 1992) este género presenta 4 especies: *Mazama americana*, *Mazama gouazoubira*, *Mazama rufina* y *Mazama chunyi*, esta última de distribución restringida a los Andes Bolivianos y el sur del Perú.

Parte de los problemas que se presentan con las diferentes especies de este género se deben a la amplia distribución de algunas especies, ya que *Mazama americana* tendría distribución desde la península de Yucatán hasta Argentina y *Mazama gouazoubira* en toda Sudamérica, así que es difícil para los taxónomos definir si las variaciones encontradas en los ejemplares son reflejo de especiación o de los factores altitudinales y latitudinales, como se ha evidenciado en otros ciervos (Geist, 1966) donde el color y el tamaño se encuentran relacionados con estos factores. Es importante aclarar que el color del pelaje que en un principio definió los grupos

(grupo rojo y grupo gris) se encuentra revaluado por algunos investigadores ya que se considera un carácter sujeto a convergencia o evolución paralela (Emerson & Tate, 1993), al igual que la forma ramificada o no de los cuernos (Eisenberg, 1987). Esto se puede evidenciar cuando vemos que en la península de Yucatán existe una forma roja y grande (*Mazama americana sartorii*) y una gris algo más pequeña (*Mazama americana pandora*), aunque para algunos investigadores se trata de *Mazama americana* y *Mazama gouazoubira*, respectivamente. En los años 80 cuando se empezaron a realizar los primeros análisis con isoenzimas, el panorama se complicó aún más. Uno de los pocos estudios realizados con este género (Smith et al., 1986) utiliza muestras de procedencia de Surinam de *Mazama americana*, *Mazama gouazoubira* y *Odocoileus virginianus*, y muestras norteamericanas de ésta última especie. Al realizar los análisis isoenzimáticos y morfológicos (craneales) se observa que, contrario a lo esperado, las *Mazama americana* se encuentran más cercanas a *Odocoileus virginianus* que a las *Mazama gouazoubira*.

Incluso, esa fuerte relación entre *Mazama americana* y *Odocoileus virginianus* en ese país Neotropical fue mayor que entre la segunda especie y representantes de esa misma especie procedentes del sudoeste de los Estados Unidos. Aunque para algunas características, tales como los arcos supraorbitales, hueso frontal, espacio de la parte posterior de las suturas frontales y bulla auditiva, éstas son mayores en *Odocoileus* que en *Mazama*; además el hecho de que un análisis discriminante lineal basado en 31 variables reclasificó con una probabilidad del 100% los 39 cráneos analizados en tres grupos “a priori” designados (*Odocoileus virginianus* del sudeste de Estados Unidos, *Odocoileus virginianus* del Surinam y *Mazama americana* de Surinam), otras

características diferenciales esperadas entre ambas especies no se dieron. Por ejemplo, con las mismas 31 variables craneométricas, un cráneo de *Mazama americana* del Surinam reclasificó con un 100% de probabilidades con los *Odocoileus virginianus* del Surinam (con datos crudos), y con un 99.75% con los *Odocoileus virginianus* del sudeste de Estados Unidos (datos ajustados por tamaño), y no con la agrupación compuesta por la otra especie de *Mazama* (supuestamente *Mazama gouazoubira*). Los *Odocoileus virginianus* del Surinam poseen una anchura maxilar menor que los especímenes de la misma especie procedentes del sudeste norteamericano, mientras que ocurre exactamente lo mismo entre las dos especies de *Mazama* de ese mismo país. *Mazama americana* posee una menor anchura maxilar que *Mazama gouazoubira*. Esos mismos autores (Smith et al., 1986), usando 19 loci bioquímicos y la distancia genética de Nei (1972), encontraron que la distancia genética (D) era igual a 0.236 entre las dos especies de *Mazama*, mientras que esa distancia genética era notablemente inferior entre *Odocoileus virginianus* del sudeste de Estados Unidos y *Mazama americana* (D = 0.148), y entre *Odocoileus virginianus* del Surinam y *Mazama americana* (D= 0.063). Las distancias entre las dos formas de *Odocoileus* respecto a *Mazama gouazoubira* del Surinam fueron extraordinariamente mayores (D= 0.378 y D= 0.271, respectivamente). Los resultados de estos autores y, especialmente, los datos que reportamos con este trabajo nos llevan a pensar que se debería realizar una profunda revisión taxonómica del género *Mazama*, ya que podría ser un género parafilético. Esto es, el *Mazama americana* de posible origen mexicano, que se utilizó en la secuenciación de la región D-Loop, podría ser un verdadero representante de esa especie (*Mazama americana*), mientras que los

animales bolivianos utilizados en este análisis pudieran ser únicamente representativos de *Mazama gouazoubira*. Esto también podría ser la causa de la diferencia entre las *Mazama americana* de Córdoba (*Mazama americana zetta*) y las de Iquitos y Leticia. Eso demostraría que esas dos taxa, no únicamente son especies diferentes, sino que el género *Mazama* debería ser desdoblado en dos géneros diferentes, al menos.

CONCLUSIONES

1. El polimorfismo de loci microsátélites en *Mazama americana*, *Odocoileus virginianus* y *Mazama gouazoubira* fue muy alto, tal como se esperaba para este tipo de marcadores moleculares, contrario a lo observado en *Capreolus capreolus* donde resultó ser extremadamente bajo.
2. Las poblaciones se encontraron en EHW para los diferentes marcadores, excepto aquellas donde se incluyeron poblaciones de procedencias geográficas diferentes, mostrando con ello un marcado efecto Wahlund.
3. Los análisis de diferenciación génica entre poblaciones de *Mazama americana* mostraron ser significativos entre la población del Alto Sinú y las de la amazonía.
4. Solamente se encontró un moderado flujo génico entre las poblaciones de *Odocoileus virginianus* pertenecientes a los Zoológicos Jaime Duque y Pereira, ambos de Colombia.
5. El análisis de regresión múltiple entre las variables genético-poblacionales y el estado de vulnerabilidad de las especies fue significativo para las comparaciones entre número promedio de alelos por locus y N_e , contrario a lo observado con la heterocigosis esperada. Esto permite realizar futuras predicciones a partir del

número de alelos promedio sobre el estado de vulnerabilidad de las especies o poblaciones que no son suficientemente conocidas.

6. Las filogenias obtenidas a partir de los alelos de los microsatélites y la secuenciación de la región D-Loop difieren de las tradicionales filogenias morfológicas en cuanto a las relaciones intra e intergenéricas para el género *Mazama*.
7. El clado observado entre *Mazama americana* y *Odocoileus virginianus* es consistente en ambas filogenias (microsatélites y región D-Loop).
8. El género *Mazama* puede dividirse en por lo menos dos géneros diferentes.
9. Las diferentes poblaciones analizadas no muestran haber pasado por cuellos de botella recientes.

RECOMENDACIONES

1. Para próximos trabajos se recomienda realizar más pruebas con los marcadores diseñados para renos, los cuales resultaron ser altamente polimórficos en las pruebas preliminares con especies Neotropicales.
2. Las especies con bajo número de ejemplares deben ser remuestreadas, ya que los resultados presentados y su significancia podrían variar al aumentar el tamaño de las muestras.
3. La necesidad de reevaluar el género *Mazama* y las relaciones entre las especies que se encuentran en él es inminente. Para esto es fundamental realizar un estudio exhaustivo recolectando la totalidad de la información sobre este género a través de toda América, en todos los aspectos que se pueda, no sólo desde el punto de vista genético.

BIBLIOGRAFÍA.

- ALLEN, J. A. 1915. Notes on American Deer of the Genus *Mazama*. Bulletin of the American Museum of Natural History. 34: 521-553.
- ARENAS, C., C. M. CUADRAS, & J. FORTIANA. 1991. MULTICUA: Paquete No Estándar de Análisis Multivariante. Programa REGR: Regresión con Variantes Mixtas Utilizando Distancias. Publicacions del Departament D'estadística N°4 Regr1-Regr12.
- BARBANTY, J. M. & M. L. MERINO. 1997. Biología e Conservação de Cervídeos Sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. Taxonomía e Evolução. Jabotical. FUNEP, Brasil.
- CARR, S. M., & G. A. HUGHES. 1993. Direction of Introgressive Hybridization between Species of Northamerican Deer (*Odocoileus*) as Inferred from Mitochondrial-Cytochrome-b Sequences. Journal of Mammalogy, 74: 331-342.
- CRONIN, M. A., M. E. NELSON & D. F. PAC. 1991. Spatial Heterogeneity of Mitochondrial DNA and Allozymes among Populations of white-tailed Deer and Mule Deer. Journal of Heredity, 82:118-127.
- CRONIN, M. A., R. V. ERNEST, & D. G. CAMERON. 1988. Genetic Relationships between Mule Deer and white-tailed Deer in Montana. Journal of Wildlife Management, 52: 320-328.
- DE WOODY, J., R. L. HONEYCUTT, & L. C. SKOW. 1995. Microsatellite Markers in white-tailed Deer. The Journal of Heredity, 86:317-322.

DOUZERY, E. J.D. LEBRETON & F.M. CATZEFLIS. 1995. Testing the Generation Time Hypothesis Using DNA/DNA Hybridization between Artiodactyls. *Journal of Evolutionary Biology*, 8:511-529.

DOUZERY, E., & E. RANDI. 1997. The Mitochondrial Control Region of Cervidae: Evolutionary Patterns and Phylogenetic Content. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1154-1166.

EISENBERG, J. F., & REDFORD, K. H.. 1992. *Mammals of the Neotropics. The Southern Cone. Volume II: Chile, Argentina, Uruguay, Paraguay.* The University Chicago Press. Chicago and London.

EISENBERG, J. F. 1987. The Evolutionary History of the Cervidae with Special Reference to the South American Radiation. En (Ed. WEMMER, C.) "Biology and Management of the Cervidae" Pp. 60-64.

EISENBERG, J. F. 1989. *Mammals of the Neotropics. The Northern Neotropics: Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana.* The University of Chicago Press. Chicago and London.

EMERSON, B. C., & M. L. TATE. 1993. Genetic Analysis of Evolutionary Relationships among Deer (Subfamily *Cervinae*). *Journal of Heredity*, 84: 266- 273.

EMMONS, L. H. 1990. *Neotropics Rainforest Mammals: A Field Guide.* The University of Chicago Press, Chicago.

EMMONS, L.H. & F. FEER. 1990. *Neotropical Rainforest Mammals. A Field Guide.* 1ª Edición. The University of Chicago Press.

- ENGEL, S. R., R. A. LINN, J. F. TAYLOR, & S. K. DAVIS. 1996. Conservation of Microsatellite Loci across Species of Artiodactyls: Implications for Populations Studies. *Journal of Mammalogy*, 77: 504-518.
- ERGUETA, P. & C. MORALES. (Eds.). 1996. Libro Rojo de los Vertebrados de Bolivia. Centro de Datos para la Conservación, La Paz.
- GEIST, V. 1966. The Evolution of Horn-like Organs. *Behavior*, 27:175-215.
- GLENN, T. C., & D. R. SMITH. 1993. Genetic Variation and Subspecific Relationships of Michigan ELK (*Cervus elaphus*). *Journal of Mammalogy*, 74: 782-792.
- GROVES, C. P., & P. GRUBB. 1987. Relationships of Living Deer. En (Ed. WEMMER, C.). "Biology and Management of the Cervidae" Pp. 21-57.
- HARTL, D. L., & CLARK, A. G. 1987 Principles of Population Genetics. Sinauer Associates Inc. I.P. Sunderland Massachusetts.
- HILL, W.G. & A. ROBERTSON. 1968. Linkage Disequilibrium in Finite Populations. *Theoretical Applied Genetics*, 38:226-231.
- HOELZEL, A.R. (Ed.). 1998. Molecular Genetics Analysis of Populations. Second Edition. The Practical Approach Series. Oxford University Press. Oxford.
- HONAKI, J. H., K. E. KINMAN, & J. W. KOEPPL EDITORS. 1992. Mammals Species of the World. Association of Systematics Collections. Lawrence, Kansas. USA.
- JUKES, T.H. & C.R. CANTOR. 1969. Evolution of Protein Molecules. En (Eds. MUNRO, H.N.) Mammalian Protein Metabolism. Academic Press, New York, pp. 21-132.

- KIMURA, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- KIMURA, M. 1981. Estimation of Evolutionary Distances between Homologous Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120.
- KUMAR, S., TAMURA, K. & NEI, M. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software for Microcomputers. *Computer Application Bioscience*, 10:189-191.
- LARA, J. M. 1977. *Historia De La Humanidad*. Editorial Planeta S. A. España.
- LEWONTIN, R. C. & KOJIMA, K. 1964. The Evolutionary Dynamics of Complex Polymorphisms. *Evolution*, 14: 458-472.
- LEWONTIN, R. C. 1964. The Interaction of Selection in Linkage. I. General Considerations: Heterotic Models. *Genetics*, 49:49-67.
- LI, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- LUIKART, G. & CORNUET, J.M. 1998. Empirical Evaluation of a Test for Identifying Recently Bottleneck Populations from Allele Frequency Data. *Conservation Biology*, 12: 228-237.
- NEI, M. (1972). Genetic Distance between Populations. *American Naturalist*. 106:283-292.
- PIRY, S., LUIKART, G. & CORNUET, M. 1999. Bottleneck: a Computer Program for Detecting Recent Reductions in the Effective Populations Size Using Allele Frequency Data. *The Journal of Heredity*, 90: 502-503.

- POLZIEHN, R.O. & C. STROBECK. 1998. Phylogeny of Wapiti, Red Deer, Sika Deer, and Other North American Cervids as Determined from Mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10:249-258.
- PRIMMER, C.R., A.P. MOLLER & H. ELLEGREN. 1996. A Widerange Survey of Cross-species Microsatellite Amplification in Birds. *Molecular Ecology*, 5: 365-378.
- RAYMOND, M., & F. ROUSSET. 1995. An Exact Test for Population Differentiation. *Evolution*, 48: 1280-1283.
- REDFORD, K. H. & J. F. EISENBERG. 1992. *Mammals of the Neotropics*. The University of Chicago Press. Chicago.
- RICHARD, E., J. P. JULIA, J. SAMANIEGO & P. ACEÑOLAZA. 1996. *La Corzuela Parda*. Serie Monográfica y Didáctica N° 22. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- ROBERTSON, A. & W.G. HILL. 1984. Deviations from Hardy-Weinberg Proportions, Sampling Variances and Use in Estimation of Inbreeding Coefficients. *Genetics*, 107:703-718.
- RØED, K. H., & L. MIDTHJELL. 1998. Microsatellites in Reindeer, *Rangifer tarandus*, and Their Use in Other Cervids. *Molecular Ecology*, 7: 1773-1776.
- ROZAS, J. & R. ROZAS. 1995. DnaSP, DNA Sequence Polymorphisms: An Interactive Program for Estimating Population Genetics parameters from DNA Sequence Data. *Computer Application Bioscience*, 11:621-625.
- RUIZ-GARCÍA, M. 2000. The Use of Several Microsatellite Loci Applied to Eight Neotropical Primates Revealed a Strong Recent Bottleneck Event in the Woolly Monkey in Colombia. *Folia primatológica*. Submitted.

SAITOU N & M. NEI. (1987). The Neighbor-joining method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.

SLATE, J., D. W. COLTMAN, S. J. GOODMAN, I. MACLEAN, J. M. PEMBERTON, & J. L. WILLIAMS. 1998. Bovine Microsatellite Loci are highly conserved in Red Deer (*Cervus elaphus*), Sika Deer (*Cervus nippon*) and Soay Sheep (*Ovis aries*). *International Society for Animal Genetics*, 29: 307-315.

SLATKIN, M. 1. 1985. Rare Alleles as Indicators of Gene Flow. *Evolution*, 39: 53-65.

SMITH, M. H., W. V. BRANAN, R. L. MARCHINTON, P. E. JOHNS, & M. C. WOOTEN. 1986. Genetic and Morphologic Comparison of Red Brocket, Brown Brocket, and White-tailed Deer. *Journal of Mammalogy*, 67: 103-111.

SNEATH P.H.& R.R. SOKAL. (1973). *Numerical Taxonomy*. W.H.Freeman, San Francisco.

SWOFFORD, D.L. 1993. PAUP 3.1.1. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*. Illinois Natural History Survey. Champaign.

TAJIMA, F. 1983. Evolutionary Relationships of DNA Sequences in Finite Populations. *Genetics*, 105:437-460.

TAJIMA, F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphisms. *Genetics*, 123:585-595.

TAJIMA, F. & M. NEI. 1984. Estimation of Evolutionary Distance between Nucleotide Sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1:269-285.

- TAMURA, K & M. NEI. 1993. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions in the Control Region of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10:512-526.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, & T. J. GIBSON .1994. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- TIRIRA, S. D. 1999. Mamíferos Del Ecuador. Museo De Zoología. Centro De Biodiversidad y Ambiente, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ecuador.
- WALSH, P. S., D. A. METZGER, & R. HIGUCHI. 1991. Chelex ® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR Based Typing from Forensic Material. *Bio Techniques*, 10: 506-513.
- WEIR B.S. & C.C. COCKERHAM. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- WEIR, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II*. Sinauer Associates, Inc. Ip. Sunderland, Massachusetts.
- WEMMER, C. M. (Ed.). 1987. *Biology and Management of the Cervidae*. Research Symposium of the National Zoological Park. Smithsonian Institution Press. Washington D. C., London.
- WRIGHT, S. 1965. The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regards to System of Mating. *Evolution*, 19:395-420.

Anexo 1: Frecuencias de los alelos encontrados para cada microsatélites en las diferentes especies trabajadas, Heterocigosidad (H), heterocigosidad promedio número promedio de alelos.

Mazama americana: H prom. 0.6429

Alelos prom. 5.4444

Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	165	0.025	0.886
	167	0.225	
	169	0.025	
	171	0.050	
	173	0.050	
	175	0.050	
	177	0.025	
	179	0.075	
	183	0.025	
	185	0.150	
	189	0.050	
	191	0.075	
	193	0.025	
	197	0.025	
	205	0.125	
Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	184	0.059	0.846

	188	0.029	
	190	0.147	
	192	0.176	
	194	0.118	
	196	0.265	
	200	0.088	
	202	0.059	
	204	0.029	
	206	0.029	
FCB 193	Alelo	Frec.	H
	101	0.500	0.500
	119	0.500	
TGLA 337	Alelo	Frec.	H
	120	0.500	0.500
	162	0.500	
BOVIRBP	Alelo	Frec.	H
	136	0.250	0.375
	140	0.750	
IDVGA 55	Alelo	Frec.	H
	193	0.250	0.812
	199	0.250	
	203	0.125	
	211	0.125	

	214	0.125	
	215	0.125	
NVHRT 16	Alelo	Frec.	H
	168	0.250	1.000
	174	0.250	
	178	0.250	
	188	0.250	
NVHRT 73	Alelo	Frec.	H
	205	0.100	0.200
	209	0.100	
	221	0.800	
NVHRT 71	Alelo	Frec.	H
	117	0.167	1.000
	123	0.333	
	133	0.167	
	141	0.167	
	143	0.167	

Mazama gouazoubira: H prom. 0.7003

Alelos prom. 5.1429

Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	171	0.100	0.820
	175	0.100	

	185	0.200	
	191	0.100	
	193	0.300	
	195	0.100	
	197	0.100	
Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	182	0.083	0.833
	186	0.167	
	190	0.167	
	192	0.083	
	196	0.167	
	198	0.250	
	200	0.083	
BOVIRBP	Alelo	Frec.	H
	138	0.250	0.625
	140	0.500	
	146	0.250	
IDVGA 55	Alelo	Frec.	H
	193	0.125	0.812
	201	0.125	
	207	0.250	
	208	0.125	
	209	0.250	

	210	0.125	
NVHRT 16	Alelo	Frec.	H
	172	0.250	1.000
	176	0.250	
	180	0.250	
	188	0.250	
NVHRT 71	Alelo	Frec.	H
	131	0.125	0.500
	135	0.125	
	143	0.125	
	145	0.500	
	157	0.125	
NVHRT 30	Alelo	Frec.	H
	143	0.250	1.000
	147	0.250	
	159	0.250	
	164	0.250	
Mazama rufina: H prom. 0.1250		Alelos prom. 1.5000	
Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	175	0.5	0.500
	195	0.5	

Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	170	1.000	0.000
NVHRT 16	Alelo	Frec.	H
	178	1.000	0.000
NVHRT 73	Alelo	Frec.	H
	205	0.500	1.000
	221	0.500	

Pudu mephistopheles: H prom. 0.4062

Alelos prom. 2.0000

Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	189	0.500	0.500
	205	0.500	
Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	188	0.500	0.625
	192	0.250	
	198	0.250	
NVHRT 73	Alelo	Frec.	H
	217	0.500	0.500
	221	0.500	1.000
NVHRT 71	Alelo	Frec.	H
	147	1.000	0.000

Odocoileus virginianus: H prom. 0.61480

Alelos prom. 4.5556

Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	173	0.025	0.711
	177	0.025	
	179	0.025	
	183	0.075	
	185	0.475	
	187	0.200	
	189	0.100	
	191	0.075	
Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	184	0.023	0.857
	186	0.045	
	188	0.023	
	192	0.068	
	194	0.136	
	195	0.045	
	196	0.250	
	197	0.068	
	198	0.182	
	200	0.114	
	202	0.023	

	203	0.023	
FCB 193	Alelo	Frec.	H
	111	0.500	0.500
	117	0.500	
BOVIRBP	Alelo	Frec.	H
	140	0.800	0.320
	142	0.200	
IDVGA 55	Alelo	Frec.	H
	199	0.038	0.784
	201	0.231	
	203	0.154	
	204	0.077	
	205	0.192	
	206	0.038	
NVHRT 16	Alelo	Frec.	H
	160	0.500	0.611
	164	0.167	
	178	0.333	
NVHRT 73	Alelo	Frec.	H
	219	0.500	0.625
	221	0.250	
	245	0.250	
NVHRT 71	Alelo	Frec.	H

	135	0.500	0.500
	149	0.500	
NVHRT 30	Alelo	Frec.	H
	149	0.250	0.625
	163	0.500	
	171	0.250	

Ozotoceros bezoarticos: H prom. 0.5000

Alelos prom. 2.7500

Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	175	0.500	0.625
	185	0.250	
	191	0.250	
Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	172	0.250	0.750
	182	0.250	
	190	0.250	
	192	0.250	
BOVIRBP	Alelo	Frec.	H
	140	1.000	0.000
IDVGA 55	Alelo	Frec.	H
	211	0.250	0.625
	215	0.500	

219 0.250

Blastocerus dichotomus: H prom. 0.3599

Alelos prom. 2.8571

Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	167	0.571	0.458
	170	0.357	
	171	0.071	
Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	185	0.063	0.781
	186	0.125	
	190	0.188	
	192	0.313	
	194	0.250	
	198	0.063	
FCB 193	Alelo	Frec.	H
	119	1.000	0.000
TGLA 337	Alelo	Frec.	H
	108	0.500	0.500
	122	0.500	
BOVIRBP	Alelo	Frec.	H
	140	1.000	0.000

IDVGA 55	Alelo	Frec.	H
	209	0.100	0.780
	211	0.300	
	213	0.300	
	214	0.100	
	217	0.100	
	219	0.100	

NVHRT 16	Alelo	Frec.	H
	178	1.000	0.000

Hippocamelus antisensis: H prom. 0.5030

Alelos prom. 3.0000

Cervid 1	Alelo	Frec.	H
	182	0.333	0.444
	186	0.667	

Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	183	0.625	0.562
	189	0.125	
	191	0.125	
	193	0.125	

Capreolus capreolus: H prom. 0.3173

Alelos prom. 3.5000

Cervid 3	Alelo	Frec.	H
	186	0.028	0.804
	188	0.139	
	190	0.167	
	192	0.250	
	194	0.278	
	196	0.083	
	198	0.028	
	200	0.028	
BOVIRBP	Alelo	Frec.	H
	138	0.200	0.465
	144	0.700	
	160	0.050	
	170	0.050	
NVHRT 16	Alelo	Frec.	H
	160	1.000	0.000
NVHRT 73	Alelo	Frec.	H
	219	1.000	0.000

Capreolus pygargus: H prom. 0.5940

Alelos prom. 3.0000

BOVIRBP	Alelo	Frec.	H
	147	0.125	0.594

153 0.500

155 0.375

Anexo 2: Guía para la categorización de especies amenazadas (UICN). (Ergueta & Morales, 1996)

A partir de noviembre de 1994 estos son los parámetros utilizados por la UICN para la categorización de especies.

Extinta (EX): cuando no queda duda de que el último individuo ha muerto.

Extinta en vida silvestre (EW): cuando la especie sobrevive exclusivamente en cultivo, cautiverio o en poblaciones naturalizadas fuera de su rango histórico original. La certificación se basa en la evidencia de que no existen registros en la naturaleza y en el área original, luego de exhaustivas búsquedas en los hábitats conocidos o esperados en los momentos apropiados al ciclo de vida y formas de vida de la especie.

En peligro crítico (CR): cuando enfrenta una elevadísima probabilidad de extinción en la vida silvestre (riesgo extremadamente alto) en un futuro muy próximo, de acuerdo a lo definido por los siguientes criterios:

- Reducción de la población por cualquiera de las formas siguientes:
 1. Reducción observada, estimada o inferida en por lo menos un 80% durante los últimos 10 años o 3 generaciones, seleccionando la opción que sea más larga, basada en cualquiera de los siguientes elementos, los cuales deben ser especificados:
 - a. Observación directa
 - b. Índice de abundancia apropiado para la especie
 - c. Reducción del área de ocupación, extensión de presencia o calidad del

hábitat.

d. Niveles de explotación reales o potenciales

e. Efectos de especies introducidas, hibridación, patógenos, contaminantes, competidores o parásitos.

2. Reducción en por lo menos un 80% proyectada o que se sospecha será alcanzada en los próximos 10 años o 3 generaciones, seleccionando la opción que sea más larga, basada en cualquiera de los puntos b, c, d o e anteriores (los cuales deben ser especificados).

➤ Una extensión de presencia (área de distribución geográfica) estimada como menor de 100 km² o un área de ocupación estimada menor de 10 km² y estimaciones de que se están dando por lo menos dos de las siguientes características:

1. Población severamente fragmentada o que se sabe sólo existe en una única localidad.
2. En declinación continua, observada, inferida o proyectada, por cualquiera de los siguientes elementos:
 - a. extensión o presencia
 - b. área de ocupación
 - c. área, extensión o calidad de hábitat.
 - d. número de localidades o subpoblaciones
 - e. número de individuos maduros.
3. Fluctuaciones extremas en cualquiera de los siguientes componentes:
 - a. extensión de presencia

b. área de ocupación

c. número de localidades o subpoblaciones

- Población estimada en números menores de 250 individuos maduros y cualquiera de los siguientes elementos:
 1. En declinación continua estimada en por lo menos 25% en un período de 3 años o en el tiempo de una generación, seleccionando el periodo que sea mayor de los dos.
 2. En declinación continua, observada, inferida o proyectada, en el número de individuos maduros y con una estructura poblacional de cualquiera de las siguientes formas:
 - a. severamente fragmentada
 - b. todos los individuos están en una única subpoblación.
- Población estimada en un número menor de 50 individuos maduros.
- Análisis cuantitativos muestran que la probabilidad de extinción en el estado silvestre es de por lo menos el 50% dentro de los siguientes 10 años o 3 generaciones, seleccionando el periodo que sea mayor de los dos.

En peligro (EN): cuando no llega a estar en “Peligro Crítico”, pero enfrenta una muy alta probabilidad de extinción en un futuro cercano, según lo que queda definido por cualquiera de los siguientes criterios:

- Reducción de la población por cualquiera de las formas siguientes:
 1. Reducción observada, estimada o inferida en por lo menos un 50% durante los últimos 10 años o 3 generaciones, seleccionando la opción que sea más

larga, basada en cualquiera de los siguientes elementos, los cuales deben ser especificados:

- a. Observación directa
- b. Índice de abundancia apropiado para la especie
- c. Reducción del área de ocupación, extensión de presencia o calidad del hábitat.
- d. Niveles de explotación reales o potenciales
- e. Efectos de especies introducidas, hibridación, patógenos, contaminantes, competidores o parásitos.

2. Reducción en por lo menos un 50% proyectada o que se sospecha será alcanzada en los próximos 10 años o 3 generaciones, seleccionando la opción que sea más larga, basada en cualquiera de los puntos b, c, d o e anteriores (los cuales deben ser especificados).

➤ Una extensión de presencia (área de distribución geográfica) estimada como menor de 5.000 km² o un área de ocupación estimada menor de 500 km² y estimaciones de que se están dando por lo menos dos de las siguientes características:

1. Población severamente fragmentada o que se sabe sólo existe en una única localidad.
2. En declinación continua, observada, inferida o proyectada, por cualquiera de los siguientes elementos:
 - a. extensión o presencia
 - b. área de ocupación

- c. área, extensión o calidad de hábitat.
 - d. número de localidades o subpoblaciones
 - e. número de individuos maduros.
- 3. Fluctuaciones extremas en cualquiera de los siguientes componentes:
 - a. extensión de presencia
 - b. área de ocupación
 - c. número de localidades o subpoblaciones
- Población estimada en números menores de 2.500 individuos maduros y cualquiera de los siguientes elementos:
 - 1. En declinación continua estimada en por lo menos 20% en un período de 5 años o en el tiempo de dos generaciones, seleccionando el periodo que sea mayor de los dos.
 - 2. En declinación continua, observada, inferida o proyectada, en el número de individuos maduros y con una estructura poblacional de cualquiera de las siguientes formas:
 - a. severamente fragmentada
 - b. todos los individuos están en una única subpoblación.
- Población estimada en un número menor de 250 individuos maduros.
- Análisis cuantitativos muestran que la probabilidad de extinción en el estado silvestre es de por lo menos el 20% dentro de los siguientes 20 años o 5 generaciones, seleccionando el periodo que sea mayor de los dos.

Vulnerable (VU): cuando no llega a ser considerada como en “Peligro Crítico” o en “Peligro”, pero enfrenta una alta probabilidad de extinción en un mediano plazo, según queda definido por cualquiera de los siguientes criterios:

- Reducción de la población por cualquiera de las formas siguientes:
 1. Reducción observada, estimada o inferida en por lo menos un 20% durante los últimos 10 años o 3 generaciones, seleccionando la opción que sea más larga, basada en cualquiera de los siguientes elementos, los cuales deben ser especificados:
 - a. Observación directa
 - b. Índice de abundancia apropiado para la especie
 - c. Reducción del área de ocupación, extensión de presencia o calidad del hábitat.
 - d. Niveles de explotación reales o potenciales
 - e. Efectos de especies introducidas, hibridación, patógenos, contaminantes, competidores o parásitos.
 2. Reducción en por lo menos un 20% proyectada o que se sospecha será alcanzada en los próximos 10 años o 3 generaciones, seleccionando la opción que sea más larga, basada en cualquiera de los puntos b, c, d o e anteriores (los cuales deben ser especificados).
- Una extensión de presencia (área de distribución geográfica) estimada como menor de 20.000 km² o un área de ocupación estimada menor de 2.000 km² y estimaciones de que se están dando por lo menos dos de las siguientes características:

1. Población severamente fragmentada o que se sabe sólo existe en no más de 10 localidades.
 2. En declinación continua, observada, inferida o proyectada, por cualquiera de los siguientes elementos:
 - a. extensión o presencia
 - b. área de ocupación
 - c. área, extensión o calidad de hábitat.
 - d. número de localidades o subpoblaciones
 - e. número de individuos maduros.
 3. Fluctuaciones extremas en cualquiera de los siguientes componentes:
 - a. extensión de presencia
 - b. área de ocupación
 - c. número de localidades o subpoblaciones
- Población estimada en números menores de 10.000 individuos maduros y cualquiera de los siguientes elementos:
1. En declinación continua estimada en por lo menos 10% en un período de 10 años o en el tiempo de tres generaciones, seleccionando el periodo que sea mayor de los dos.
 2. En declinación continua, observada, inferida o proyectada, en el número de individuos maduros y con una estructura poblacional de cualquiera de las siguientes formas:
 - a. severamente fragmentada
 - b. todos los individuos están en una única subpoblación.

➤ Población muy pequeña o restringida en la forma de cualquiera de las siguientes dos condiciones:

1. Población estimada en números menores de 1.000 individuos maduros.
2. La población está caracterizada por una aguda restricción en su área de ocupación (típicamente menor a 100 km²) o en el número de localidades (típicamente menos de 5). De esta manera dicha especie tiene posibilidades de ser afectada por actividades humanas (o por eventos estocásticos, cuyo impacto es agravado por el hombre) dentro de un período muy corto de tiempo en un futuro impredecible, llegando así a estar en “Peligro Crítico” o aún “Extinto” en un tiempo muy breve.

➤ Análisis cuantitativos muestran que la probabilidad de extinción en el estado silvestre es de por lo menos el 10% dentro de los siguientes 100 años.

Menor riesgo (LR): cuando habiendo sido evaluada la especie no corresponde a ninguna de las categorías de “Peligro Crítico”, “En Peligro” o “Vulnerable”, pero tampoco corresponde a “Datos Insuficientes”. Las especies que se incluyen en esta categoría de “Menor Riesgo” pueden dividirse en tres subcategorías:

1. Dependiente de la conservación (dc): especies que son el centro de un programa específico de conservación o de protección estricta del hábitat. El mantenimiento de la especie en esta categoría depende de dichos esfuerzos de conservación y si éstos cesan se estima que la especie calificará para alguna de las categorías de amenaza antes citadas, en un período de cinco años.

2. Casi amenazada (ca): especies que no pueden ser calificadas como “Dependientes de la Conservación”, pero que se aproximan a ser calificadas como “Vulnerables”.
3. Preocupación menor (pm): especies que no califican en las subcategorías de “Dependiente de la Conservación” o “Casi Amenazado”.

Datos insuficientes (DD): una especie pertenece a esta categoría cuando la información es inadecuada para hacer la evaluación, directa o indirecta, de su riesgo de extinción con base en la distribución de la población y su condición. Puede estar bien estudiada en cuanto a su biología, pero se carece de datos sobre la abundancia y distribución poblacional. Al incluir el taxón en esta categoría se indica que se requiere más información y se reconoce la probabilidad que investigaciones futuras permitirán asignarle una categoría de amenaza. Es importante hacer un uso real de todos los datos disponibles. En muchos casos habrá que tener mucho cuidado en elegir entre “Datos Insuficientes” y la condición de amenazado. Si se sospecha que la distribución de un taxón está relativamente circunscrita, y si ha transcurrido un período considerable de tiempo desde el último registro del taxón, entonces la condición de amenazado puede estar bien justificada.

No Evaluado (NE): una especie se debe incluir en esta categoría cuando, independientemente de tener o no información suficiente y apropiada, no ha sido evaluada con relación a estos criterios.