

PATRONES DE VARIACIÓN GENÉTICA EN CUATRO SUBESPECIES DE VENADO COLA BLANCA DEL NORESTE DE MÉXICO

PATTERNS OF GENETIC VARIATION IN FOUR WHITE-TAILED DEER SUBSPECIES FROM NORTHEASTERN MEXICO

Karla Logan-López¹, Eugenia Cienfuegos-Rivas¹, Ana Sifuentes-Rincón², Maurilio González-Paz²,
Fernando Clemente-Sánchez³, German Mendoza-Martínez³ y Luis Tarango-Arámbula³

¹Universidad Autónoma de Tamaulipas. UAM Agronomía y Ciencias. División de Estudios de Postgrado e Investigación. CU Adolfo López Mateos. 87149. Ciudad Victoria, Tamaulipas. (ecienfue@uat.edu.mx) (egcr100@hotmail.com). ²Laboratorio de Biotecnología Animal I. Centro de Biología Genómica-IPN. Boulevard del Maestro, Colonia Narciso Mendoza, Reynosa, Tamaulipas. ³Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, Estado de México.

RESUMEN

La introducción de *Odocoileus virginianus texanus* en áreas fuera de su distribución, ha causado el entrecruzamiento de subespecies que podría afectar el germoplasma nativo. Para manejar adecuadamente estas poblaciones se determinó la variabilidad genética entre *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. carminis* y *O. v. miquihuanensis* en el noreste mexicano, utilizando la técnica Base Escision Sequence Scanning (BESS-T) para analizar la región mitocondrial (D-loop) en 106 muestras de ADN. Se encontraron 24 haplotipos: 17 en *O. v. texanus* (cuatro compartidos con las demás subespecies), tres haplotipos en *O. v. veraecrucis*, dos en *O. v. carminis* y dos en *O. v. miquihuanensis*. En *O. v. texanus* se evaluó la variabilidad inter- e intra-poblacional según su origen geográfico. Se concluye que la diversidad genética en el Estado de Tamaulipas fue mayor (0.89) que en los Estados de Coahuila (0.82) y Nuevo León (0.56).

Palabras clave: *O. v. carminis*, *O. v. miquihuanensis*, *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, distribución haplotipos.

INTRODUCCIÓN

El venado cola blanca texano (*Odocoileus virginianus texanus*) es la subespecie de mayor demanda cinegética en México, y en el noreste del país se realiza la mayor actividad cinegética. Sin embargo, esta especie sufrió una reducción importante e incluso la extirpación en algunas zonas del país en la década de 1960, cuando estaba catalogada bajo peligro de extinción (Villarreal, 1999). Después de una revaloración de la importancia ecológica y socioeconómica de la especie, se realizaron programas de conservación y repoblación de la subespecie *O. v. texanus*, logrando su reestablecimiento en el noreste del país.

Recibido: Enero, 2006. Aprobado: Noviembre, 2007.
Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 13-21. 2007.

ABSTRACT

The introduction of *Odocoileus virginianus texanus* in areas outside of its natural distribution has caused crossbreeding among subspecies that could affect native germplasm. To manage these populations correctly, genetic variability among *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. carminis* and *O. v. miquihuanensis* was determined in northeastern México using the Base Escision Sequence Scanning technique (BESS-T) to analyze the mitochondrial region (D-loop) in 106 DNA samples. Twenty-four haplotypes were found: 17 in *O. v. texanus* (four shared with the other subspecies), three haplotypes in *O. v. veraecrucis*, two in *O. v. carminis* and two in *O. v. miquihuanensis*. *O. v. texanus* inter- and intra-population variability was evaluated according to its geographic origin. It was concluded that the genetic diversity in the State of Tamaulipas (0.89) was higher than in the States of Coahuila (0.82) and Nuevo León (0.56).

Key words: *O. v. carminis*, *O. v. miquihuanensis*, *O. v. texanus*, *O. v. veraecrucis*, haplotype distribution.

INTRODUCTION

The texano white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) is the most demanded subspecies for hunting in México, and the northeast is where most hunting takes place. However, this species suffered an important reduction, and even extinction, in some areas of the country during the decade of the 1960s, when it was catalogued an endangered species (Villarreal, 1999). After a re-evaluation of the species' ecological and socio-economic importance, conservation and repopulation programs were implemented, and the subspecies *O. v. texanus* was re-established in the northeast of México.

In this region there are three other subspecies (*Odocoileus virginianus veraecrucis*, *O. v. carminis*, and *O. v. miquihuanensis*) (Goldman and Kellogg,

En esta región existen otras tres subespecies (*Odocoileus virginianus veraecrucis*, *O. v. carminis*, y *O. v. miquihuanensis*) (Goldman y Kellogg, 1940), cuyo aprovechamiento, estudio y conservación no se ha fomentado a la par del de la subespecie *O. v. texanus*. Ésto se debe a que no son consideradas trofeos de caza mayor entre los deportistas cinegéticos, quienes prefieren los ejemplares de mayor talla corporal y de astas. Esta situación ha propiciado la introducción de poblaciones de *O. v. texanus* como pie de cría en las UMAS (Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre) que se encuentran dentro de las zonas de distribución de las otras subespecies. Ésto ha puesto en duda el futuro de la diversidad genética de esta especie, dado que no hay estudios que fundamenten las diferencias genéticas entre las subespecies de venado cola blanca en esta región, ni de sus tamaños poblacionales, mediante las cuales se puedan establecer mejores estrategias de conservación para estas subespecies. Por tanto, la hipótesis de este estudio fue que existen diferencias genéticas entre subespecies, y que el establecimiento de poblaciones de *O. v. texanus* en las áreas de distribución de otras subespecies, y su entrecruzamiento, causa la hibridación entre ellas y la consecuente pérdida de germoplasma.

Las herramientas moleculares ofrecen conceptos y metodologías que pueden usarse en combinación con información demográfica, geográfica y ecológica para la conservación y manejo de la biodiversidad (Honeycut, 2000; Anderson, *et al.*, 2002). Su aplicación para identificar individuos y poblaciones de venados es importante para su manejo reproductivo, sobre todo si se consideran factores como la fragmentación antropogénica derivada del aislamiento de las poblaciones confinadas en encierros de malla alta, así como por carreteras y la movilización artificial de las poblaciones (Leberg *et al.*, 1994; Smith y Rhodes 1994). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar los patrones de variabilidad genética entre las cuatro subespecies de venado cola blanca del noreste de México: *Odocoileus virginianus texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. carminis* y *O. v. miquihuanensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en tres Estados del noreste de México del 2001 al 2003. Se obtuvieron muestras de pelo de 105 individuos: 93 de *Odocoileus virginianus texanus*, en Coahuila (46), Nuevo León (35) y Tamaulipas (12), seis *O. v. veraecrucis* en Tamaulipas, dos de *O. v. carminis* en Coahuila, y cuatro de *O. v. miquihuanensis* (dos en Coahuila y dos en Nuevo León). Las subespecies se identificaron con base en la regionalización propuesta por Mearns (1898) y Goldman y Kellogg (1940) quienes las

1940), whose use, study and conservation have not been promoted on the same level as the subspecies *O. v. texanus*. This is because they are not considered big game by hunters, who prefer large specimens with large antlers. This situation has propitiated the introduction of populations of *O. v. texanus* as breeding stock in the UMAS (Units for Wildlife Conservation, Management and Sustainable Use) that are found in the natural distribution zones of the other subspecies. This has caused certain doubt about the future of the genetic diversity of this species, given that there are no studies on the genetic differences among white-tailed deer subspecies in this region, or on the population sizes, with which better conservation strategies for these subspecies can be established. Therefore, the hypothesis of this study was that there are genetic differences among subspecies and that the establishment of populations of *O. v. texanus* in the natural distribution areas of other subspecies, and their crossbreeding, causes hybridization among them and the consequent loss of germplasm.

Molecular tools offer concepts and methodologies that can be used in combination with demographic, geographic and ecological information for conservation and management of biodiversity (Honeycut, 2000; Anderson *et al.*, 2002). Application of these tools to identify individual deer and deer populations is important for their reproductive management, especially if we consider factors such as anthropogenic fragmentation derived from isolation of populations confined by high fences, highways and artificial movement of the populations (Leberg *et al.*, 1994; Smith and Rhodes, 1994). Therefore, the objective of this study was to determine patterns of genetic variability among the four subspecies of white-tailed deer in northeastern México: *Odocoileus virginianus texanus*, *O. v. veraecrucis*, *O. v. carminis*, and *O. v. miquihuanensis*.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in three States of northeastern México from 2001 to 2003. Hair samples were obtained from 105 individuals: 93 *Odocoileus virginianus texanus*, in Coahuila (46), Nuevo León (35), and Tamaulipas (12), six *O. v. veraecrucis* in Tamaulipas, two *O. v. carminis* in Coahuila, and four *O. v. miquihuanensis* (two in Coahuila and two in Nuevo León). The subspecies were identified on the basis of regionalization proposed by Mearns (1898) and Goldman and Kellogg (1940), who first described them. The sampling sites are shown in Figure 1.

The samples of the *O. virginianus texanus* were obtained from among animals captured by the National Association of Diversified Livestock and Wild Fauna Breeders (ANGADI, Asociación Nacional de Ganaderos Diversificados Criadores de Fauna, in Spanish), who

describieron por primera vez. Los sitios de muestreo se muestran en la Figura 1.

Las muestras de los individuos de *O. virginianus texanus* se obtuvieron de los animales capturados por la Asociación Nacional de Ganaderos Diversificados y Criadores de Fauna (ANGADI), quienes venden los excedentes poblacionales como pies de cría. Las capturas de los individuos se realizaron utilizando el método red de cañón (Halls, 1984), que consiste en lanzar una red desde un helicóptero, disparada por un rifle con salva. Las muestras de *O. v. carminis*, *O. v. miquihuanensis* y cuatro individuos de *O. v. veraecrucis*, fueron de animales cazados durante las temporadas cinegéticas 2001-2002 y 2002-2003. Otros dos individuos de *O. v. veraecrucis* fueron capturados con el método de red de caída (Halls, 1984), usando una red tipo carpa (144 m²) sostenida por ocho tubos de 1.80 m y uno central de 3.50 m; un dispositivo activa la caída de la red una vez que los venados están bajo ella, para lo cual el sitio debe ser cebado previamente con maíz. Las muestras se recolectaron desprendiendo un mechón de pelo de más de 20 filamentos con foliculo por individuo, y depositadas en una bolsa plástica con cerradura hermética y etiquetadas.

Se obtuvo ADN (estuche comercial Genomic DNA Extraction de Promega) usando el protocolo descrito por Sifuentes *et al.* (2004). Cada muestra de ADN se sometió a amplificación por PCR utilizando iniciadores específicos para la región mitocondrial de control (D-loop). Las reacciones se hicieron en un volumen final de 25 µL usando 2.5 µL del ADN extraído, 1.25 unidades de Taq ADN Polimerasa (Promega Corporation, Madison, WI), 2 mM MgCl₂,

sell population surpluses as breeding stock. Captures of individuals were performed using the cannon net method (Halls, 1984), which consists of using a rifle to shoot a net from a helicopter. The samples of *O. v. carminis*, *O. v. miquihuanensis*, and four *O. v. veraecrucis* individuals were animals that were hunted during the 2001-2002 and 2002-2003 hunting seasons. Other two individuals of *O. v. veraecrucis* were captured with the fall net method (Halls, 1984), using a tent-type net (144 m²) supported by eight 1.8 m tubes and a 3.50 m central tube; a device triggers the fall of the net once the deer are under it, where the area was previously baited with corn. The samples were collected by pulling a tuft of hair of more than 20 filaments with follicle from each individual; the tufts were placed in a hermetically sealed and labeled plastic bag.

DNA was obtained with a Genomic DNA Extraction kit (Promega®) following the protocol described by Sifuentes *et al.* (2004). Each DNA sample was subjected to PCR amplification using specific primers for the mitochondrial control region (D-loop). The reactions were done in a final volume of 25 µL utilizing 2.5 µL of extracted DNA, 1.25 units of Taq DNA Polymerase (Promega Corporation, Madison, WI), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM BESS-T dNTPs and 0.1 µM of each primer. The reaction conditions were one cycle at 95 °C for 1 min followed by 30 cycles of 30 s each at 95, 50, and 72 °C. A single nucleotide polymorphism search was then conducted using the Base Excision Sequence Scanning technique (BESS-T, Hawkins and Hoffman, 1997, 1999) following the conditions recommended by the manufacturer of the BESS-T Base Reader Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI). Of the

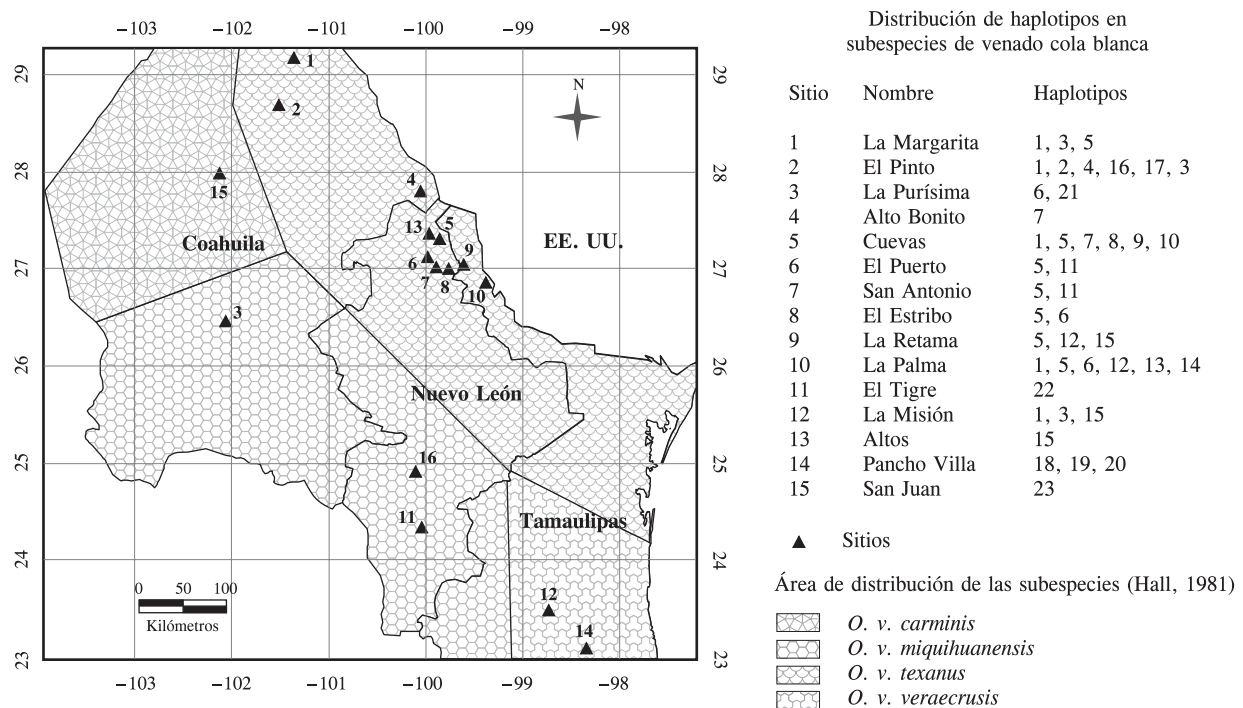


Figura 1. Distribución geográfica de los 24 haplotipos encontrados en cuatro subespecies de *Odocoileus virginianus*, por sitio de muestreo, en los Estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas del noreste de México.

Figure 1. Geographical distribution of 24 haplotypes found in four subspecies of *Odocoileus virginianus*, by sampling site, in the States of Coahuila, Nuevo León and Tamaulipas in northeastern México.

0.2mM de BESS-T dNTPs y 0.1 μ M de cada iniciador. Las condiciones de reacción fueron un ciclo a 95 °C por 1 min seguidas de 30 ciclos de 30 s cada uno a 95, 50 y 72 °C. Luego se realizó un análisis de búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido usando la técnica Base Escision Sequence Scanning (BESS-T; Hawkins y Hoffman 1997, 1999) siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial BESS-T Base Reader Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI). Se escindieron 4.25 μ L de los productos de PCR, usando 0.5 μ L de amortiguador de escisión y 0.25 μ L de enzima; la reacción se incubó a 37 °C durante 30 min. A cada muestra se agregaron 2.5 μ L de solución de terminación de la reacción y las muestras se desnaturalizaron a 85 °C por 5 min. La electroforesis se efectuó por 8 h en un secuenciador automatizado (LI-COR IR2) en geles de poli(acrilamida a 6.5%, y condiciones de electroforesis de 1200 V, 25 W, 30 mA y 45 °C.

Los haplotipos presentes en la población se obtuvieron comparando los patrones de BESS-T contra la secuencia de la región D-loop reportada en el banco de genes (Num. de acceso AF016978). De esta comparación se detectaron las regiones polimórficas, que se analizaron en todos los individuos como patrones de presencia (1) o ausencia (0), para formar haplotipos. Con base en éstos, y usando el programa Arlequín versión 2.000 (Schneider *et al.*, 2000), se determinó la variabilidad genética de la población total por agrupamientos entre las cuatro subespecies, así como por Estado sólo para la población *O. virginianus texanus*. En este último análisis se evaluó la variabilidad genética inter-poblacional (comparación entre poblaciones, basándose en los datos de sus haplotipos). Además se determinó la variabilidad intra-poblacional, para lo cual se obtuvo la siguiente información: a) número de haplotipos compartidos (comparación de haplotipos encontrados en las poblaciones analizadas); b) frecuencias de haplotipos (P_i) (número de haplotipos observados en una muestra x_i que contiene n copias génicas, está dada por $P_i = x_i/n$; c) diversidad genética (probabilidad de que dos haplotipos sean diferentes en la muestra). Este parámetro es equivalente a la heterocigosidad para datos diploides y se determina con la fórmula descrita por Nei, 1987 (Schneider *et al.*, 2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de polimorfismos y definición de haplotipos

El análisis por BESS-T de la región mitocondrial amplificada permitió establecer ocho sitios polimórficos (Figura 2). Con base en la presencia o ausencia de cualquiera de ellos se definieron 24 haplotipos en la muestra estudiada (Cuadro 1).

Variabilidad inter-poblacional en cuatro subespecies de *O. virginianus*

Doce de los 24 haplotipos encontrados en las 105 muestras analizadas se ubican en el norte de la zona

PCR products, 4.25 μ L were excised using 0.5 μ L excision buffer and 0.25 μ L of enzyme. The reaction was incubated at 37 °C for 30 min. To each sample, 2.5 μ L of reaction finishing solution was added, and the samples were denaturalized at 85 °C for 5 min. Electrophoresis was performed for 8 h in an automatic sequencer (LI-COR IR2) in 6.5% polyacrylamide gels, with electrophoresis conditions of 1200 V, 25 W, 30 mA and 45 °C.

The haplotypes present in the population were obtained by comparing the BESS-T patterns against the sequence of the D-loop region reported in the genebank (Access num. AF016978). From this comparison, polymorphic regions were detected; these were analyzed in all of the individuals as patterns of presence (1) or absence (0), to form haplotypes. On the basis of these and using the Arlequin version 2.000 (Schneider *et al.*, 2000) software, genetic variability of the total population was determined by clustering the four subspecies, and for the *O. virginianus texanus* population this was determined also by State. In this latter analysis, the interpopulation genetic variability was evaluated (comparison among populations, based on the data of their haplotypes). Intrapopulation variability was also determined, for which the following information was obtained: a) number of shared haplotypes (comparison of haplotypes found in the analyzed populations); b) frequencies of haplotypes (P_i) (number of haplotypes observed in a sample x_i that contains n gene copies, given by $P_i = x_i/n$; c) genetic diversity (probability that two haplotypes in a sample are different). This parameter is equivalent to heterozygosity for diploid data, and is determined with the formula described by Nei, 1987 (Schneider *et al.*, 2000).

RESULTS AND DISCUSSION

Detection of polymorphisms and definition of haplotypes

The BESS-T analysis of the amplified mitochondrial region allowed establishment of eight polymorphic sites (Figure 2). On the basis of the presence or absence of any of these sites, 24 haplotypes were defined in the sample studied (Table 1).

Inter-population variability of four subspecies of *O. virginianus*

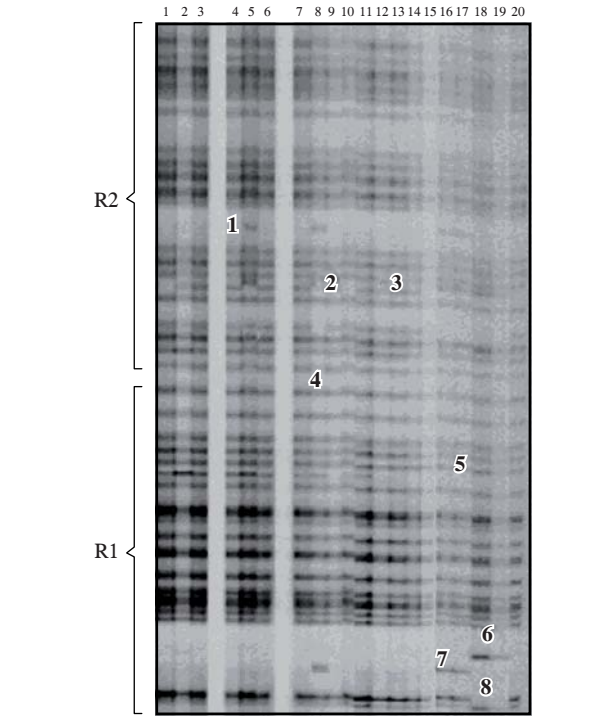
Twelve of the 24 haplotypes found in the 105 analyzed samples are located in the northern zone where the three States converge (Figure 1). Thirteen of the 24 haplotypes were present only in the subspecies *O. virginianus texanus*; haplotype 5 was of greatest frequency in 32 individuals (Table 1). Haplotype 1 was shared by *O. v. texanus*, *O. v. miquihuanensis* and *O. v. veraecrucis*, while haplotypes 3 and 15 were shared only by *O. v. texanus* and *O. v. veraecrucis* individuals, and

Figura 2. Identificación de los sitios polimórficos en 14 muestras de *Odocoileus virginianus texanus* en los Estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas del noreste de México.

Figura 2. Identification of the polymorphic sites in 14 samples of *Odocoileus virginianus texanus* in the States of Coahuila, Nuevo León and Tamaulipas in northeastern México.

de convergencia de los tres Estados (Figura 1). Trece de los 24 se presentaron sólo en la subespecie *O. virginianus texanus*, y el haplotipo 5 fue el de mayor frecuencia en 32 individuos (Cuadro 1). El haplotipo 1 fue compartido entre *O. v. texanus*, *O. v. miquihuanensis* y *O. v. veraecrucis*, mientras que los haplotipos 3 y 15 fueron compartidos sólo entre individuos *O. v. texanus* y *O. v. veraecrucis*, y el haplotipo 6 se compartió entre *O. v. texanus* y *O. v. miquihuanensis*.

La región sureste de Nuevo León es considerada la zona de distribución de la subespecie *O. virginianus miquihuanensis* (Goldman y Kellogg, 1940; Halls, 1984). La presencia de haplotipos compartidos entre individuos *O. v. miquihuanensis* nativos de esta zona con *O. v. texanus* puede deberse a que en esta región existe un encierro de aproximadamente 20 ejemplares de la subespecie *O. v. texanus* introducidos en



haplotype 6 was shared by *O. v. texanus* and *O. v. miquihuanensis*.

Cuadro 1. Distribución de haplotipos encontrados en cuatro subespecies de *Odocoileus virginianus* en los Estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas del noreste de México.

Table 1. Distribution of haplotypes found in four subspecies of *Odocoileus virginianus* in the States of Coahuila, Nuevo León and Tamaulipas in northeastern México.

Haplotipo	Número de individuos				Total
	<i>O. v. texanus</i>	<i>O. v. veraecrucis</i>	<i>O. v. miquihuanensis</i>	<i>O. v. carminis</i>	
1	15	1	1	0	17
2	12	0	0	0	12
3	7	1	0	0	8
4	2	0	0	0	2
5	32	0	0	0	32
6	2	0	1	0	3
7	8	0	0	0	8
8	2	0	0	0	2
9	1	0	0	0	1
10	1	0	0	0	1
11	2	0	0	0	2
12	2	0	0	0	2
13	1	0	0	0	1
14	1	0	0	0	1
15	3	1	0	0	4
16	1	0	0	0	1
17	1	0	0	0	1
18	0	1	0	0	1
19	0	1	0	0	1
20	0	1	0	0	1
21	0	0	1	0	1
22	0	0	1	0	1
23	0	0	0	1	1
24	0	0	0	1	1
Total	93	6	4	2	105

1986. Así, posiblemente se trata de un ejemplar de esta subespecie que escapó accidentalmente del confinamiento, o quizás producto de la cruce de *O. v. miquihuanensis* y *O. v. texanus*. Por tanto, se sugiere que los casos de haplotipos compartidos entre *O. v. texanus* y *O. v. veraecrucis* se expliquen de la misma forma que para los *miquihuanensis*, especialmente considerando que estas tres subespecies tienen distribuciones adyacentes (Figura 1).

A diferencia de la subespecie *O. virginianus texanus*, en las otras tres subespecies estudiadas sólo se observaron siete haplotipos no compartidos, tres de los cuales se presentaron en individuos *veraecrucis* y dos en cada población de *miquihuanensis* y *carminis*. Dado que el tamaño de muestra de estas tres subespecies es pequeño, es difícil establecer que la frecuencia y distribución de los haplotipos sean exclusivos de cada una de éstas, por lo que se recomienda que en estudios posteriores se incremente el tamaño de muestra de las subespecies *O. v. carminis*, *O. v. miquihuanensis* y *O. v. veraecrucis*.

Variabilidad genética inter- e intra- poblacional en *O. virginianus texanus*

En el Cuadro 2 se muestra la diversidad inter-poblacional obtenida en *O. v. texanus* en tres poblaciones. Solamente los haplotipos 1 y 5 se encuentran compartidos en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas; Nuevo León (65.7%) y Coahuila (28.3%) tienen las mayores frecuencias. El haplotipo 6 se comparte entre Nuevo León (2.86%) y Tamaulipas (8.33%) y el haplotipo 7 entre Nuevo León (11.42%) y Coahuila (8.69%).

Además hay al menos cuatro haplotipos exclusivos para cada Estado: los de mayor frecuencia absoluta son el haplotipo 2 en Coahuila (26.08%), los 8 y 11 para Nuevo León (5.71% para ambos) y el 15 (25%) en Tamaulipas. Aunque algunos haplotipos se comparten entre los Estados (Figura 1), hay carreteras y superficies considerables con malla que podrían ser un obstáculo para los desplazamientos de individuos, restringiendo el flujo genético entre poblaciones.

Aun cuando la presencia de cada haplotipo por Estado merece un análisis detallado, la distribución en la población de *O. virginianus texanus* estudiada mostró el siguiente patrón:

Haplotipos compartidos entre Estados. Los haplotipos 1 y 5 que se compartieron en los tres Estados también se caracterizaron por presentar una amplia distribución en el área de estudio (Figura 1). Ésto podría indicar haplotipos característicos de la especie

The southeastern region of Nuevo León is considered the area of natural distribution of the subspecies *O. virginianus miquihuanensis* (Goldman and Kellogg, 1940; Halls, 1984). The presence of haplotypes shared by native *O. v. miquihuanensis* of this area and *O. v. texanus* individuals could be due to the fact that in this region there are approximately 20 specimens of the subspecies *O. v. texanus* in confinement, which were introduced in 1986. Thus, possibly, the specimen may be of this subspecies that escaped accidentally from the confinement, or it may be the product of a cross between *O. v. miquihuanensis* and *O. v. texanus*. Therefore, it is suggested that the cases of haplotypes shared by *O. v. texanus* and *O. v. veraecrucis* be explained in the same way as for *miquihuanensis*, especially considering that these three subspecies have adjacent distributions (Figure 1).

Unlike the subspecies *O. virginianus texanus*, in the other three subspecies studied only seven unshared haplotypes were observed, three of which appeared in *veraecrucis* individuals and two in each of the *miquihuanensis* and *carminis* populations. Given that the sample size of these three subspecies is small, it is difficult to establish that the frequency and distribution of the haplotypes are exclusive of each of these. It is recommendable, therefore, that for further studies, the sample size of *O. v. carminis*, *O. v. miquihuanensis* and *O. v. veraecrucis* should be increased.

Inter- and intra- population genetic variability in *O. virginianus texanus*

The inter-population diversity in *O. v. texanus* in three populations is shown in Table 2. Only haplotypes 1 and 5 are found to be shared in Coahuila, Nuevo León, and Tamaulipas; Nuevo León (65.7%) and Coahuila (28.3%) have the highest frequencies. Haplotype 6 is shared by Nuevo León (2.86%) and Tamaulipas (8.33%), and haplotype 7 is shared by Nuevo León (11.42%) and Coahuila (8.69%).

Moreover, there are at least four haplotypes that exist exclusively in each State: those of highest absolute frequency are haplotype 2 in Coahuila (26.08%), haplotypes 8 and 11 in Nuevo León (5.71% for each), and haplotype 15 (25%) in Tamaulipas. Although some haplotypes are shared by the States (Figure 1), there are a considerable number of highways and fenced areas, which could pose an obstacle to movements of individuals, limiting the genetic flow among populations.

Even though the presence of each haplotype in a State deserves detailed analysis, their distribution in the *O. virginianus texanus* population studied exhibits the following pattern:

Cuadro 2. Distribución de la frecuencia absoluta (Fa) y relativa (Fr) de haplotipos en las poblaciones de *O. v. texanus* por Estado.
Table 2. Distribution of absolute (Fa) and relative (Fr) frequency of haplotypes in the *O. v. texanus* populations by State.

Haplotipo	Coahuila (n=46)		Nuevo León (n=35)		Tamaulipas (n=12)	
	Fa (n)	Fr %	Fa (n)	Fr %	Fa (n)	Fr %
1	13	28.26	1	2.86	1	8.33
2	12	26.08	0	0.00	0	0.00
3	7	15.21	0	0.00	0	0.00
4	2	4.34	0	0.00	0	0.00
5	6	13.04	23	65.71	3	25.00
6	0	0.00	1	2.86	1	8.33
7	4	8.69	4	11.42	0	0.00
8	0	0.00	2	5.71	0	0.00
9	0	0.00	1	2.86	0	0.00
10	0	0.00	1	2.86	0	0.00
11	0	0.00	2	5.71	0	0.00
12	0	0.00	0	0	2	16.7
13	0	0.00	0	0	1	8.33
14	0	0.00	0	0	1	8.33
15	0	0.00	0	0	3	25.00
16	1	2.17	0	0	0	0.00
17	1	2.17	0	0	0	0.00

O. virginianus, o puede ser el resultado de su manejo poblacional. Por ejemplo, en 1999 se introdujeron 20 ejemplares en Coahuila de la subespecie *O. v. texanus* procedentes de Tamaulipas.

Haplotipos específicos por Estado. Los haplotipos 2, 4, 16 y 17 se encontraron solamente en individuos de Coahuila y sólo en la subespecie *O. virginianus texanus*. Pero tres de ellos se caracterizaron por una frecuencia relativa baja (Cuadro 2).

Haplotipos fuera del área de distribución específica de la subespecie. El haplotipo 3 se registró en Coahuila y Tamaulipas; este último Estado es el área de distribución de la subespecie *O. virginianus veraecrucis*. Por tanto, esto podría soportar la hipótesis de la introducción de individuos de la subespecie *O. v. texanus* en Tamaulipas, ya que el haplotipo 3 no se presentó en otros individuos de la subespecies *O. v. veraecrucis*, *carminis* y *miquihuanensis* (Figura 1).

Diversidad genética o intra-poblacional en *O. virginianus texanus*

La diversidad genética es el equivalente a la heterocigosidad para datos diploides, y los resultados se resumen en el Cuadro 3. La población de *O. v. texanus* muestra una mayor diversidad genética en Tamaulipas (0.894) y menor en Nuevo León (0.561), aún cuando en Tamaulipas el número de muestras fue dos veces menor.

En Tamaulipas, posiblemente la mayor diversidad genética se deba a la reintroducción de la subespecie con individuos de poblaciones más diversas.

Haplotypes shared among the States. Haplotypes 1 and 5, which are shared by the three States are also characterized by a wide distribution in the study area (Figure 1). This could indicate characteristic haplotypes of the *O. virginianus* species, or it could be the result of population management. For example, in 1999, 20 specimens of the subspecies *O. v. texanus* from Tamaulipas were introduced into Coahuila.

Haplotypes specific per State. Haplotypes 2, 4, 16 and 17 were found only in individuals of Coahuila and only in the subspecies *O. virginianus texanus*. But three of them were characterized by a low relative frequency (Table 2).

Haplotypes outside the species-specific area of distribution. Haplotype 3 was recorded in Coahuila and Tamaulipas. The latter State is the area of distribution of the subspecies *O. virginianus veraecrucis*. Therefore, this could support the hypothesis of the introduction of individuals of the subspecies *O. v. texanus* in Tamaulipas since haplotype 3 was not

Cuadro 3. Índices de diversidad genética de las poblaciones de *Odocoileus virginianus texanus*.

Cuadro 3. Indexes of genetic diversity of *Odocoileus virginianus texanus* populations.

	Coahuila	Nuevo León	Tamaulipas
Núm. de copias genéticas	46	35	12
Núm. de haplotipos	8	8	7
Núm. de sitios polimórficos	6	8	6
Diversidad genética	0.8193	0.5613	0.8939

En Nuevo León por el contrario, la reintroducción de la subespecie *O. virginianus texanus* pudo haber sido menor. Además, estas poblaciones pueden estar sujetas a presiones de selección derivadas de la actividad cinegética, como la eliminación de ejemplares con determinadas características fenotípicas no deseadas y, por el contrario, fomentar la concentración de individuos con fenotipos deseados; ésto, a largo plazo, contribuye a restringir el intercambio genético natural de las poblaciones.

CONCLUSIONES

El patrón de variabilidad genética inter-poblacional encontrado en las cuatro subespecies de venado cola blanca muestra que existen haplotipos específicos y compartidos entre cada subespecie. Ésto puede deberse principalmente a: i) son haplotipos de alta frecuencia dentro de la especie *O. virginianus* en el noreste mexicano; ii) la introducción de los animales de la subespecie *texanus* en estos sitios.

En la subespecie *O. virginianus texanus*, los patrones de variabilidad genética en Tamaulipas y Coahuila fueron mayores a los encontrados en Nuevo León.

La fragmentación del hábitat de esta región, es otro factor que puede estar induciendo un índice de diversidad genético más bajo en Nuevo León. Esta fragmentación es producto del aislamiento de poblaciones confinadas en encierros de malla alta, así como las carreteras que obstaculizan el flujo natural de individuos dentro de su área de distribución.

AGRADECIMIENTOS

A la Asociación Nacional de Ganaderos Diversificados Criadores de Fauna por todas las facilidades y entusiasmo mostrados y a la Universidad Autónoma de Tamaulipas por el apoyo logístico y económico otorgados para la realización del proyecto Conservación de la Biodiversidad Genética de Venado Cola Blanca (*Odocoileus virginianus*) en el Noreste de México.

LITERATURA CITADA

- Anderson, J. D., R. Honeycutt, R. A., González, K. L. Gee, R. L. Gallagher, D. A. Honeycutt, and R. DeYoung. 2002. Development of microsatellite DNA markers automated genetic characterization of white-tailed deer populations. *J. Wildlife Manag.* 66(1): 67-74.
- Arriaga, L., J. M. Espinoza, C. Aguilar, E. Mtz., L. Gómez, y E. Loa. (Coordinadores). 2000. Regiones Terrestres Prioritarias. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de Biodiversidad de México. Escala 1:1000 000.
- Goldman, E. A., and R. Kellogg. 1940. Ten white-tailed deer from North and Middle America. *Proc. Biol. Soc. of Washington* 53: 81-89.
- Halls, L. K. (ed). 1984. *White-Tailed Deer: Ecology and Management*. Stackpole Books, Harrisburg. Pennsylvania. 870 p.
- present in other individuals of the subspecies *O. v. veraecrucis*, *carminis* or *miquihuanensis* (Figure 1).
- Genetic, or intra-population, diversity in *O. virginianus texanus***
- Genetic diversity is equivalent to heterozygosity for diploid data, and the results are summarized in Table 3. The *O. v. texanus* population exhibits greater genetic diversity in Tamaulipas (0.894) and lesser in Nuevo León (0.561), even though the number of samples from Tamaulipas was half that from Nuevo León.
- In Tamaulipas, the greater genetic diversity may be due to the reintroduction of individuals of the subspecies from more diverse populations. In Nuevo León, in contrast, the reintroduction of the subspecies *O. virginianus texanus* may have been in lower numbers. Also, these populations may be subject to selection pressure derived from hunting, eliminating specimens with undesirable phenotypic characteristics and, on the other hand, promoting the concentration of individuals with desirable phenotypes. This, in the long term, contributes to a restriction of natural gene exchange among the populations.
- CONCLUSIONS**
- The pattern of inter-population genetic variability found in the four subspecies of white-tailed deer shows that there are specific and shared haplotypes between each subspecies. This could be due, mainly, to: i) they are high frequency haplotypes within the *O. virginianus* species in northeastern México; ii) the introduction of the *texanus* subspecies into these sites.
- In the subspecies *O. virginianus texanus*, the genetic variability patterns in Tamaulipas and Coahuila were higher than those found in Nuevo León.
- Fragmentation of the habitat of this region is another factor that could induce a lower genetic diversity index in Nuevo León. This fragmentation is product of the isolation of populations confined in fenced areas and of highways that obstruct the natural flow of individuals within their area of distribution.
- End of the English version—
- *—
- Hawkins, G. A., and L. M. Hoffman. 1997. Base excision sequence scanning: a new method for rapid sequence scanning and mutation detection. *Nature Biotech.* 15: 803-804.
- Hawkins, G. A., and L. M. Hoffman. 1999. Rapid DNA mutation identification and fingerprinting using base excision sequence scanning. *Electrophoresis* 20: 1171-1176.

- Honeycutt, R. L. 2000. Genetic applications for large mammals. *In: Ecology and Management of Large Mammals in North America*. Demarais, S., and P. R. Krausman, (eds). Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. pp: 233-259.
- Leberg, L. P., P. W. Stangel, H. O. Hillestad, R. L. Marchinton and M. H. Smith. 1994. Genetic structure of reintroduced wild turkey and white-tailed deer populations. *J. Wildlife Manag.* 58(4): 698-711.
- Mearns, E. A. 1898. Description of a new deer (*Dorcelaphus texanus*) from Texas and northern Mexico. *Proc. Biol. Soc. Washington* 12: 23-26.
- Schneider, S., D. Roessli, and L. Excoffier. 2000. Arlequin version 2.0: a software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland*. pp: 22-23.
- Sifuentes-Rincón A. M., A. Sánchez Varela, and E. G. Cienfuegos Rivas. 2004. PCR-ready genomic DNA isolation from hair samples using the ReadyAmp™ Genomic DNA Purification System. Promega e-Notes, <http://www.promega.com/enotes/applications/shell.htm?article=app55>.
- Smith, M. H. and E. Rhodes, JR. 1994. The subspecies. *In: Deer*. Gerlach, D., S. Atwater, and J. Schnell (eds). Stackpole Books, PA. pp: 90-91.
- Villarreal, J. G. 1999. Venado Cola Blanca. Manejo y Aprovechamiento. Unión Ganadera Regional de Nuevo León. 401 p.