

## Relaciones filogenéticas entre géneros de ciervos neotropicales (Artiodactyla: Cervidae) mediante secuenciación de ADN mitocondrial y marcadores microsatelitales

Manuel Ruiz-García<sup>1</sup>, Ettore Randi<sup>2</sup>, María Martínez-Agüero<sup>1</sup> & Diana Alvarez<sup>1</sup>

1 Unidad de Genética (Genética de Poblaciones-Biología Evolutiva), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Cra 7ª No 43-82, Bogotá DC, Colombia; mruiz@javeriana.edu.co

2 Instituto Nazionale per la Fauna Selvática, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italia.

Recibido 06-VII-2003. Corregido 18-IX-2006. Aceptado 10-XI-2006.

**Abstract: Phylogenetic relationships among Neotropical deer genera (Artiodactyla: Cervidae) by means of DNA<sub>mt</sub> sequences and microsatellite markers.** The current work shows two molecular phylogenetic analyses on Neotropical deers. In the first analysis, the mitochondrial control region (D-loop) was sequenced in six Odocoileinae species from Latin America, using the sequences of two Muntiacinae as outgroups. The results obtained were as follows: A sequence of *Mazama americana* showed a striking relationship with several sequences of *Odocoileus* in contrast to that expected, since this *M. americana* haplotype, from a Mexican origin, was not associated with several Bolivian *Mazama* sequences analyzed. This could put forward that this genera is not monophyletic. On the other hand, these Bolivian *Mazama* formed a clade with *Pudu puda* and *Ozotoceros bezoarticus*. Likely, an *Odocoileus virginianus* sequence from the Central area of Colombia showed a more strong relationship with a Northamerican *O. hemionus* sequence than with the other *O. virginianus* sequences of Colombian origin as well. This could be explained by means of various different hypotheses. The first is the existence of common ancestral haplotypes between both species. Another one is the reiterative hybridization among both *Odocoileus* species before the migration of *O. virginianus* from North America to South America. Moreover, the maximum parsimony analysis showed an intense relationship between the Muntiacinae and this Neotropical Cervidae clade. In addition, and adding credence to the relevant polyphyly found in *Mazama* by means of the mitochondrial control region DNA sequences, a second analysis with 16 DNA microsatellite loci also showed a higher genetic relationship between *M. americana* and *O. virginianus*, than between the first species regard to *Mazama gouazoubira*. Rev. Biol. Trop. 55 (2): 723-741. Epub 2007 June, 29.

**Key words:** molecular phylogeny, neotropical deers, DNA<sub>mt</sub>, microsatellites, *Mazama*, *Odocoileus*.

La sistemática de los cérvidos neotropicales ha sido poco estudiada y, además, es profundamente controvertida. Tradicionalmente los ciervos neotropicales han sido divididos en tres grupos de acuerdo con el tamaño corporal y a la forma de la ramificación de los cuernos. De este modo, los ciervos de alto porte (*Odocoileus*, *Blastocerus* y *Ozotoceros*) formarían un grupo, las dos especies del género *Hippocamelus* conformarían el grupo de mediano porte y las especies de los géneros *Mazama* y *Pudu* constituirían el tercer grupo (ciervos de pequeño porte) (Duarte y Merino 1997).

Sin embargo, no todos los autores coinciden con este esquema. Algunos ejemplos ponen en evidencia esta afirmación. Para diversos autores los géneros de ciervos *Blastocerus* (Wagner, 1844) y *Ozotoceros* (Ameghino, 1891), cuya distribución geográfica, para el primero, se da desde la Amazonía peruana, extendiéndose por el centro de Brasil y este de Bolivia, alcanzando Paraguay y norte de Argentina, mientras que para el segundo se da por el centro y sur de Brasil, Bolivia, Paraguay, Uruguay y noreste y centro de Argentina, se deberían fusionar al género *Odocoileus* (Rafinesque, 1832). Este

ultimo posee una distribución que abarca la mayor parte de Estados Unidos, buena parte de Canadá, Centroamérica y Suramérica al norte del Amazonas (Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam, Ecuador y Perú) (Ximenes *et al.* 1972). Por el contrario, otros autores basándose en otros datos morfológicos (Wilson y Reeder 1993) diferencian claramente los tres géneros. Más compleja, todavía, es la sistemática intra-genérica de *Mazama* (Rafinesque 1817). Este género de pequeños cérvidos es enormemente controvertido en cuanto al número de especies que puede contener en su seno. Allen (1915) separó a *Mazama* en dos grandes ensambles en función de la coloración del pelaje. El grupo de coloración rojiza contuvo las especies *M. americana*, *M. trinitatis*, *M. rufa*, *M. sheila*, *M. rufina*, *M. bricenii*, *M. sartorii*, *M. zetta*, *M. gualea*, *M. fuscata* y *M. zamora*. El grupo de coloración grisácea estuvo integrado por las especies *M. simplicicornis*, *M. murelia*, *M. tschudii*, *M. nemorivagus*, *M. superciliaris*, *M. cita* y *M. pandora*. Cabrera (1960) propuso la clasificación más aceptada todavía en nuestros días: *Mazama* contendría las especies *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. chunyi* y *M. rufina*. Las especies citadas por Allen (1915) serían simplemente subespecies de las cuatro especies nominadas por Cabrera (1960). Czernay (1987), más recientemente, definió la existencia de 6 especies para el género en cuestión: *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. rufina*, *M. bricenii*, *M. chunyi* y *M. nana*. Esta última substituiría a la población aislada de *M. rufina* en el sur del Brasil. Duarte (1992) y Duarte y Merino (1997) definieron cromosómicamente una nueva especie a partir del material analizado de un individuo capturado en la región de Capao Bonito (Sao Paulo). Este taxón fue denominado *M. bororo*. Es evidente que se hace necesario el análisis de representantes de esos géneros para intentar dilucidar las respectivas relaciones inter e intraespecíficas de los cérvidos sudamericanos desde una perspectiva molecular.

Caben resaltar algunos trabajos moleculares, que han incluido especies de cérvidos neotropicales, como los de Douzery y Randi

(1997) y Smith *et al.* (1986). En el primero se analizó la región de control (CR) del ADN mitocondrial, también conocida como D-loop, en seis especies de Cervidae, representantes de las subfamilias Cervinae (*Cervus elaphus*, 2 individuos; *Cervus nippon*, 1 y *Dama dama*, 1), Hydropotinae (*Hydropotes inermis*, 1) y Odocoileinae (tribu Odocoileini: *Odocoileus virginianus*, 1; *Odocoileus hemionus*, 1 y *Mazama americana*, 1; tribu Capreolini: *Capreolus capreolus*, 1 y *Capreolus pygargus*, 1). En el referido trabajo se determinó una fuerte relación entre las dos especies de *Odocoileus*, ambas de procedencia norteamericana, sustentada por un árbol de máxima parsimonia, y con un "bootstrap" para ese clado del 100 %. El taxón hermano de ese clado fue *M. americana* con un "bootstrap" del 99 %. Sin embargo, las restantes especies analizadas no pertenecieron a la fauna de cérvidos neotropicales, con lo que no se profundizó en la relación filogenética entre los géneros sudamericanos de cérvidos. En el segundo trabajo mencionado, utilizando datos morfológicos e isoenzimáticos, se constató una fuerte relación entre *M. americana* y *O. virginianus* del Surinam, mientras que la primera especie presentó menor relación con *M. gouazoubira*, y mientras la segunda especie presentó menor semejanza de la prevista con ejemplares de *O. virginianus* de Estados Unidos. Es decir, en ese estudio no se encontraron relaciones monofiléticas entre diferentes poblaciones, para ninguno de ambos géneros, *Odocoileus* y *Mazama*. Para intentar dilucidar algunas de esas incertidumbres filogenéticas, se muestra en el presente estudio un análisis a partir de la secuenciación de la región de control del ADN mitocondrial (1 133 pares de bases) de cuatro *O. virginianus* procedentes de la región central de Colombia, de un *O. hemionus* proveniente de Estados Unidos, de una *M. americana* procedente de México analizada por Douzery y Randi (1997), de dos individuos "a priori" clasificados morfológicamente como *M. americana*, muestreados en Bolivia en 1997 por dos de los autores (M. R-G y D. A), de un "a priori" clasificado morfológicamente *M. gouazoubira*, muestreado, también, en Bolivia

por los mismos autores, de un *Ozotoceros bezoarticus* de procedencia boliviana, y de un *Pudu puda* de origen chileno. Como especies externas ("outgroups") se utilizaron las secuencias de otros dos cérvidos, *Muntiacus reevesi* y *Elaphodus cephalophus* pertenecientes a la subfamilia de los Muntiacinae (= Cervulinae).

Igualmente, se construyeron árboles de máxima parsimonia a partir de 16 loci microsatélites analizados obtenidos en diversas especies de bóvidos, del reno (*Rangifer tarandus*) y del ciervo coli-blanco (*O. virginianus*). Estos marcadores microsatélites fueron RM012, BM757, INRA131, FCB193, TGLA337, HUI175, BOVIRBP, TGLA127, FEB, IDVGA055 (Bovidae; Slate *et al.* 1998), Cervid 1, Cervid 3 (*O. virginianus*; Dewoody *et al.* 1995), y NVHRT16, NVHRT30, NVHRT71 y NVHRT73 (renos; Roed y Midthjel 1998). La presencia-ausencia de los diversos alelos encontrados en esos 16 microsatélites fueron utilizados en conjunto para evaluar el grado de similitud con las filogenias obtenidas a partir de la región de control mitocondrial y de las filogenias obtenidas mediante el uso de isoenzimas y características biométricas por Smith *et al.* (1986). Aunque diferentes autores han mostrado que los marcadores microsatélites son excelentes marcadores para la realización de mapas de ligamiento y para estudios forenses, genético poblacionales y de parentesco, otros análisis han mostrado posibles restricciones de estos marcadores en tareas de reconstrucción filogenética. Esto estaría motivado, principalmente, por cambios en la estructura interna de los motivos de repetición sin afectar los tamaños globales de los alelos (Garza y Freimer 1996) o, por el hecho, de que mutaciones independientes pueden producir alelos de idénticos tamaños partiendo de alelos de diferentes tamaños (homoplasias) (Goldstein y Pollock 1997). Sin embargo, ciertos autores como Morin *et al.* (1993), Blanquer-Maumont y Crouau-Roy (1995), Fitzsimmons *et al.* (1995) y Goldstein *et al.* (1995), han mostrado la utilidad potencial en casos determinados de los microsatélites para realizar inferencias filogenéticas entre géneros relativamente diferenciados. En el

estudio de Goldstein *et al.* (1995), se mostró como 30 loci microsatélites reconstruyeron adecuadamente las relaciones filogenéticas entre humanos, chimpancés y gorilas. Morin *et al.* (1993) mostraron, utilizando microsatélites, que las subespecies actualmente reconocidas de chimpancés podrían, en realidad, ser reconocidas como especies diferentes debido a su fuerte diferenciación genética. Blanquer-Maumont y Crouau-Roy (1995) mostraron que tres microsatélites localizados en el cromosoma humano 6p están conservados en diferentes especies de dos superfamilias de Primates, los Hominoidea y los Cercopithecoidea. Los referidos autores concluyeron en la enorme utilidad de esos marcadores desde un punto de vista filogenético. Por último, Fitzsimmons *et al.* (1995) mostraron la existencia de loci microsatélites homólogos en seis especies de tortugas marinas pertenecientes a dos familias diferentes (Cheloniidae y Dermochelyidae), al igual que en una familia de tortugas dulceacuícolas (Emydidae), lo que indicó una conservación de las secuencias flanqueantes de esos microsatélites de, al menos, 300 millones de años. Igualmente, Ruiz-García (2007) ha mostrado que un microsatélite, AP68, reconstruye adecuadamente la evolución de la familia Atelidae en los últimos 16 millones de años. Aunque no se muestra con detalle aquí, las simulaciones de Di Rienzo *et al.* (1994), Nielsen (1997) y Nielsen & Palsboll (1999) revelaron que la mayoría de los marcadores microsatélites analizados en este estudio, al igual que los aplicados en otras especies neotropicales, como el oso andino (*Tremarctos ornatus*), el jaguar (*Panthera onca*), el delfin rosado (*Inia sp.*) o en algunas especies de Primates, como los aulladores (*Alouatta*) y monos araña (*Ateles*) (Ruiz-García 2003, 2005, Ruiz-García *et al.* 2005, 2006a,b,c,d), evolucionan preferentemente siguiendo el modelo mutacional de un paso ("one-step"), mientras que los modelos mutacionales en dos fases ("two-phase") o multipasos ("multistep") son mucho menos frecuentes. Si estos dos modelos mutacionales fueran importantes podrían causar solapamiento de alelos con el mismo tamaño sin coalescencia común (homoplasia).

Sin embargo, como estos modelos mutacionales son relativamente poco frecuentes, esto reduce la posibilidad de alelos homoplásicos. Adicionalmente, los resultados filogenéticos obtenidos con microsatélites fueron muy similares a los obtenidos con otros marcadores para los géneros *Odocoileus* y *Mazama*. Por ello son presentados en este estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Análisis de la región de control del ADN mitocondrial:** para el análisis filogenético llevado a cabo con cérvidos neotropicales se obtuvieron las siguientes muestras: Se obtuvo una muestra de ADN de *M. americana* (Y08209), de origen mexicano, del mismo tejido que utilizaron Douzery *et al.* (1995) en un estudio previo. Cuatro muestras de *O. virginianus* procedentes del área central de Colombia. Estas muestras consistieron en mechones de pelos con sus respectivos bulbos. La secuencia de un individuo norteamericano de *O. hemionus* fue obtenida por Feng *et al.* (no publicado, número de acceso U12865 en el banco de datos EMBL). Una muestra de pelos con bulbos de *O. bezoarticus* obtenida en la zona de Otuquis en Bolivia. Dos muestras de *M. americana*, de la misma naturaleza que la anterior, procedente de la región de Santa Cruz en Bolivia, una muestra de pelos de una *M. gouazoubira* procedente de la región de Isoso en Bolivia y una muestra de tejido de un *P. puda* procedente de Chile. Como grupos externos fueron utilizadas las secuencias obtenidas de tejidos de dos Muntiacinae, *M. reevesi* y *E. cephalophus*.

Las muestras de ADN, en el caso de los tejidos, fueron extraídas con el método estándar del fenol-cloroformo (Sambrock *et al.* 1989), mientras que las procedentes de los bulbos de pelo se obtuvieron con una solución de 200 µl Chelex al 10 %. Las secuencias de 1 133 pb de la región de control del ADN mitocondrial (D-loop) se amplificó vía PCR utilizando los cebadores (“primers”) L-Pro 5'-CGTCAGTCT CACCATCAACCCCAAAGC-3' y H-Phe 5'-GGGAGACTCATCTAGGCATTTTCAGTG-

3', los cuales están adyacentes a las posiciones 15 740 y 420 de los genes mitocondriales bovinos tRNA<sup>Pro</sup> y tRNA<sup>Phe</sup>. Las amplificaciones se realizaron con AmpliTaq DNA polimerasa y con MgCl<sub>2</sub> 3 mM, utilizando un termociclador 9.600 Perkin Elmer con los siguientes ciclos: 94 °C durante 2 min, y 30 ciclos a 94 °C durante 15 s, 55 °C durante 15 s y 72 °C durante 1 min. Finalmente, 10 min a 72 °C. Los productos obtenidos de esos PCR se purificaron en geles de agarosa de baja temperatura de fusión. Las secuencias fueron obtenidas por ciclos de ADN de dos cadenas con Δtaq Sequenase, utilizando los cebadores (“primers”) externos ya citados (L-Pro y H-Phe) y los cebadores adyacentes a la zona media de la región central conservada de los artiodáctilos (L-362 5'-AATCACCATGCCGCGTGAAACC-3' y H493 5'-TGAGATGGCCCTGAAGAAAGAACC-3').

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 de los análisis filogenéticos. Se utilizaron otros programas, como Aligner, Alignseq, DNANALYZE 1.8, MultiDNA, Seqvu 1.1 y Threalign 2.0, y siempre se obtuvieron los mismos resultados en la alineación de las secuencias.

**Análisis de los marcadores microsatélites:** como se comentó anteriormente, aunque los marcadores microsatélites pueden presentar problemas para desempeñar tareas de análisis filogenético, los resultados en el presente estudio coinciden notablemente con los obtenidos por Smith *et al.* (1986) haciendo uso de variables morfométricas e isoenzimáticas. Los microsatélites empleados fueron RM012, BM757, INRA131, IDVGA055, FCB193, TGLA337, HUU175, BOVIRBP, TGL127 y FSHB (diseñados para bóvidos; Slate *et al.* 1998), Cervid 1 y Cervid 3 (diseñados para *O. virginianus*; Dewoody *et al.* 1995), y NVHRT 16, NVHRT 30, NVHRT 71 y NVHRT 73

(diseñados para renos; Roed y Midthjell 1998). En otro trabajo (Ruiz-García *et al.* 2006e), se muestran las condiciones empleadas en las reacciones de PCR, las temperaturas utilizadas y el origen geográfico preciso de las 120 muestras de cérvidos neotropicales (71 muestras pertenecientes a *M. americana*, *M. gouzaoubira*, *M. rufina*, *O. virginianus*, *Hippocamelus antisensis*, *Pudu mephistopheles*, *O. bezoarticus*, *Blastoceros dichotomus*) y europeo-asiáticos (49 muestras pertenecientes a *Cervus elaphus*, *C. nippon*, *Capreolus capreolus*, *C. pygargus* y *Dama dama*).

**Análisis matemáticos de las secuencias mitocondriales:** en primer lugar, se obtuvieron los estadísticos  $\pi$  (diversidad nucleotídica, número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias escogidas al azar) con su varianza de muestreo y error estándar, theta ( $\theta$ ) por nucleótido,  $K$  (= número promedio de diferencias nucleotídicas, Tajima 1983) con sus varianzas de muestreo y estocásticas, y  $M$  ( $=2N_e\upsilon$  por secuencia, donde  $N_e$  es el número efectivo y  $\upsilon$  es la tasa de mutación nucleotídica por generación, con su correspondiente varianza sin recombinación, para los géneros *Odocoileus* (Colombia) y *Mazama* (Bolivia), respectivamente. Para cada uno de esos géneros se analizó el desequilibrio de ligamiento entre las variantes de diferentes sitios polimórficos con los siguientes estadísticos genético poblacionales:  $D$  (Lewontin y Kojima 1964),  $D'$  (Lewontin 1964) y los coeficientes de correlación y determinación de desequilibrio gamético,  $R$  y  $R^2$  (Hill y Robertson 1968). El nivel de significación estadística de  $D$  se midió, simultáneamente, con un test chi-cuadrado y con el test exacto de Fisher con dos colas. Finalmente, también, para ambos géneros, se aplicó el test  $D$  de Tajima (1989) para determinar si las secuencias analizadas siguen un modelo molecular neutral, o están afectadas por algún tipo de selección natural. Este test se fundamenta 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 estimó

este estadístico asumiendo que sigue una distribución beta. Todos esos estadísticos fueron calculados con el programa informático DnaSP3.0 (Rozas y 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 los 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 igual a

$K = (1/2) \ln(a) + (1/4) \ln(b)$ , donde  $a = 1/(1 - 2P - Q)$  y  $b = 1/(1 - 2Q)$ . En el segundo método, en el cual las frecuencias de los 4 nucleótidos pueden ser diferentes,

$K = -b \ln(1 - (p/b)_2)$ , donde  $b = (b_1 + p^2/h)/2$ , siendo  $b_1 = 1 - \sum q_i$ , con  $q_i$  siendo la frecuencia en equilibrio del nucleótido  $i$ th ( $i = 1, 2, 3, 4$ , 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 de ADN homólogas comparadas (Li 1997), siendo  $p$  la probabilidad que dos secuencias sean diferentes en un sitio nucleotídico dado en un tiempo  $t$  determinado.

Los resultados con otras distancias genéticas, como la de Jukes-Cantor (1969), la del modelo de los 6 parámetros de Kimura (1981), o la de Tamura y Nei (1993), ofrecieron resultados idénticos a los mostrados en este trabajo.

A esas matrices de distancias genéticas se les aplicaron los algoritmos UPGMA (Sneath y Sokal 1973) y neighbor-joining (Saitou y Nei 1987) para obtener diversos árboles filogenéticos entre los géneros de cérvidos 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 1 000 permutaciones. Valores por encima del 75 % se consideran altamente

significativos. También, se obtuvieron árboles filogenéticos utilizando el método 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.

**Análisis filogenéticos con marcadores microsatélites:** basándose en los alelos detectados (presencia-ausencia) para los diferentes marcadores microsatélites estudiados, se construyeron filogenias a partir de diversos métodos de máxima parsimonia. Esta técnica permite minimizar la longitud de la filogenia obtenida. Dos procedimientos principales fueron utilizados: “heuristic search” y “branch and bound search”. Con el primero, las estrategias empleadas fueron el procedimiento general con almacenamiento en cada paso del árbol, utilizando adición paso a paso. El método “branch and bound” fue computado 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. Con los diversos árboles de máxima parsimonia encontrados se construyeron árboles consenso con los métodos estricto, semiestricto, regla de la mayoría y Adams.

## RESULTADOS

**Análisis filogenético de la región control mitocondrial:** para los géneros representados por más de un individuo (*Odocoileus* y *Mazama*), se estimaron una serie de estadísticos básicos. En el caso de *O. virginianus* se presentaron 106 gaps en los 1 133 pb analizados. De los 1 027 pb restantes, 84 fueron sitios polimórficos y 943 monomórficos. De esos 84 sitios polimórficos, 24 fueron informativos filogenéticamente con dos variantes

y dos fueron informativos con tres variantes nucleotídicas. En el Cuadro 1 se muestran los estadísticos moleculares encontrados para esa especie. La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) fue de 0.0454,  $\theta$  por nucleótido de 0.0446,  $k$  fue 46.67 y  $M$  fue de 45.82. El análisis de desequilibrio de ligamiento para los 24 sitios nucleotídicos que fueron polimórficos para dos nucleótidos diferentes 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 g.l.,  $p<0.05$ ) (193/276=69.93 %). Este valor es significativamente mayor que el error I del 5 % ( $\chi^2=248.31$ , 1 g.l.,  $p<0.001$ ). Sin embargo, si utilizamos la corrección estándar de Bonferroni ( $\alpha=0.05/276=0.000181$ ), ninguno de los valores de desequilibrio individuales entre pares de nucleótidos resultó ser significativo.

En el caso del género *Mazama* procedente de Bolivia, sin incluir la muestra *Mazama americana* de origen mexicano, se presentaron 220 huecos en las 1 133 pb analizadas. De los 913 pb restantes, 30 fueron polimórficos para dos variantes nucleotídicas. En este caso no se encontraron sitios polimórficos para tres o cuatro variantes. Los niveles encontrados de diversidad genética a nivel de la región de control del ADN mitocondrial en esos *Mazama* de Bolivia fueron claramente inferiores a los mostrados por los ejemplares de *O. virginianus* procedentes de Colombia (Cuadro 1), 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 *M. americana* de origen mexicano. El número de huecos encontrados fue de 241 en la secuencia de 1 133 pb analizadas. La introducción de esta secuencia aumentó considerablemente el número de sitios polimórficos a 106 en los restantes 892 pb.

CUADRO 1

Diversidades nucleotídicas ( $\pi$ ),  $\theta$  por nucleótido ( $\theta$ ), número promedio de diferencias nucleotídicas ( $k$ ) y el parámetro  $M$  con sus respectivas varianzas para el conjunto de secuencias analizadas en *Odocoileus virginianus*, en Mazama proveniente de Bolivia y en el total de secuencias analizadas de Mazama

TABLE 1

Nucleotide diversities ( $\pi$ ),  $\theta$  per nucleotide ( $\theta$ ), average number of nucleotide differences ( $k$ ), and the  $M$  parameter with their respective variances for the set of the sequences analyzed in *Odocoileus virginianus*, in Mazama coming from Bolivia and in the overall sequences attributable to Mazama

	<i>Odocoileus virginianus</i>	Mazama Bolivia	Mazama Total
Diversidad nucleotídica ( $\pi_i$ )	0.0454	0.0219	0.0618
Varianza de la muestra de $\pi_i$	0.0001	0.0000	0.0005
Desviación estándar de $\pi_i$	0.0114	0.0063	0.0235
$\theta$ (por nucleótido)	0.0446	0.0219	0.0648
Varianza de $\theta$	0.0005	0.0001	0.0012
Desviación estándar de $\theta$	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

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 el cuadro 1 se muestran los parámetros moleculares correspondientes a esta agrupación. Como puede observarse, 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  $\theta$  por nucleótido,  $K$  y  $M$  (0.062, 55.17 y 57.82). Esto demuestra que la citada *Mazama* diverge considerablemente a nivel molecular en la región de control del ADN mitocondrial respecto de los ejemplares de *Mazama* de origen boliviano. Es posible, que estos últimos ejemplares, aun cuando presentaron aspectos diversos, unas más rojizas otras más grisáceas, en realidad pertenezcan únicamente al taxón designado como *M. gouzaoubira*. Adicionalmente, la introducción de

la muestra mexicana generó una cierta cantidad de desequilibrio de ligamiento entre los 5 sitios nucleótidos 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 g.l.,  $p<0.05$ ). Sin embargo, con el test exacto de Fisher ningún caso fue significativo estadísticamente y, tampoco, la aplicación de la corrección estándar de Bonferroni ( $\alpha=0.05/10=0.005$ ) a los tests ji-cuadrado, determinó algún caso de desequilibrio de ligamiento significativo.

El test de neutralidad de Tajima (1989) mostró valores iguales a 0.1936 (caso de *O. virginianus*), 0 (caso de *Mazama* bolivianas) y -0.4799 (caso de todas las *Mazama* consideradas simultáneamente). En los dos primeros casos, esos valores no fueron significativos, asumiendo que seguían una distribución beta. Luego se estima que el modelo mutacional es plenamente neutral. En el tercer caso, el valor fue

significativo y negativo, lo que podría indicar la presencia ligera de mutaciones deletéreas.

Los análisis filogenéticos llevados a cabo con los métodos de matrices de distancias genéticas (Kimura 1980, Tajima y Nei 1984), y los obtenidos con los métodos de máxima parsimonia pueden observarse en la Fig. 1. Todos los árboles generados con los métodos de distancias 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 Odocoileinos americanos. Esta separación es robusta ya que todos los porcentajes de "bootstraps" son del 100 %. En el seno de los Odocoileinos encontramos dos clados principales. En uno de ellos se observaron todas las secuencias de los *O. virginianus* colombianos, la del *O. hemionus* norteamericano y la del *M. americana* de origen mexicano ("bootstraps" del 75-92 %). Cabe resaltar que la secuencia del *O. virginianus* 2, procedente de la cordillera andina central de Colombia, estuvo significativamente ("bootstrap" del 96 %) más relacionada con la secuencia del *O. hemionus* de origen norteamericano que con las restantes secuencias de *O. virginianus*, también procedentes de Colombia. El otro gran clado ("bootstraps" del 97-100 %) presentó otros dos sub-clados. Uno constituido por un cérvido, de tamaño mediano de 28 a 35 kg de peso, *O. bezoarticus leucogaster* y el pequeño *P. puda*, de no más de 8 kg de peso, con un porcentaje de "bootstrap" que osciló entre el 86 y el 90 %. El otro sub-clado agrupó a las tres secuencias procedentes de los ejemplares de *Mazama* de origen boliviano. La secuencia, del morfológicamente reconocible como *M. americana* 2, presentó una más intensa relación con el *M. gouazoubira* 3 que con la secuencia del otro *M. americana* 3 ("bootstrap" 60-76 %). Esto puede concordar con la explicación anteriormente referida de que en realidad esos tres especímenes bolivianos pertenecen a un único taxón (*M. gouzaoubira*). Los análisis de máxima parsimonia, sin embargo, mostraron algunas diferencias importantes respecto a lo descrito con los métodos de distancias genéticas. Es de

resaltar que los análisis filogenéticos basados en distancias y en máxima parsimonia asumen diferentes hechos con respecto a los procesos evolutivos que han podido acontecer en y entre las especies analizadas de cérvidos. Se obtuvieron dos árboles 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 agrupaciones. La primera gran diferencia, respecto al análisis anterior, viene dada por la pertenencia de los géneros Muntiacinae a uno de los dos clados integrados por Odocoileinos. En esa agrupación se encontraron las secuencias de los ejemplares de *Mazama* procedentes de Bolivia, *O. bezoarticus* y *P. puda*. En este caso, *Ozotoceros* presentó mayor relación con *Mazama* que con *Pudu*. Al igual que con la técnica anterior, no existió una diferenciación clara entre ambas formas de *Mazama*. En el segundo clado se obtuvieron relaciones idénticas a las encontradas con los métodos de distancias (*O. virginianus*, *O. hemionus* y *M. americana* de origen mexicano). Utilizando el procedimiento "branch and bound search" se obtuvo un panorama muy similar. La diferencia principal fue que se obtuvo una tritomía no resuelta en el primer clado constituida por *Mazama-Ozotoceros*, *Pudu* y *Muntiacus-Elaphodus*. La otra diferencia fue, que, en este caso, sí se diferenciaron las secuencias de *M. americana* y *M. gouazoubira* ambas procedentes de Bolivia. Todos los porcentajes de "bootstraps" obtenidos en este análisis fueron del 100 %, lo cual significa que las agrupaciones obtenidas son altamente significativas.

Análisis filogenético de los marcadores microsatélites: Con los resultados para los loci microsatélites, y tomando los tamaños alélicos reportados para 5 especies de cérvidos europeos y asiáticos y para ocho especies de cérvidos neotropicales (Ruiz-García *et al.* 2006e), se obtuvieron árboles de máxima parsimonia utilizando la presencia-ausencia de alelos de los 16 loci microsatélites empleados. Se obtuvieron 15 árboles de máxima parsimonia, todos con 191 pasos de longitud sin importar cual fuera



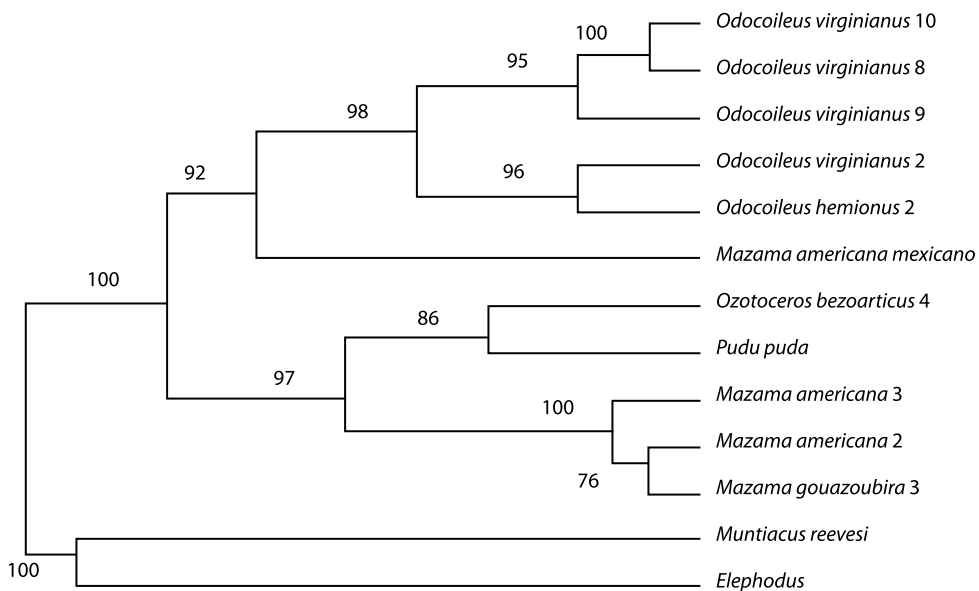
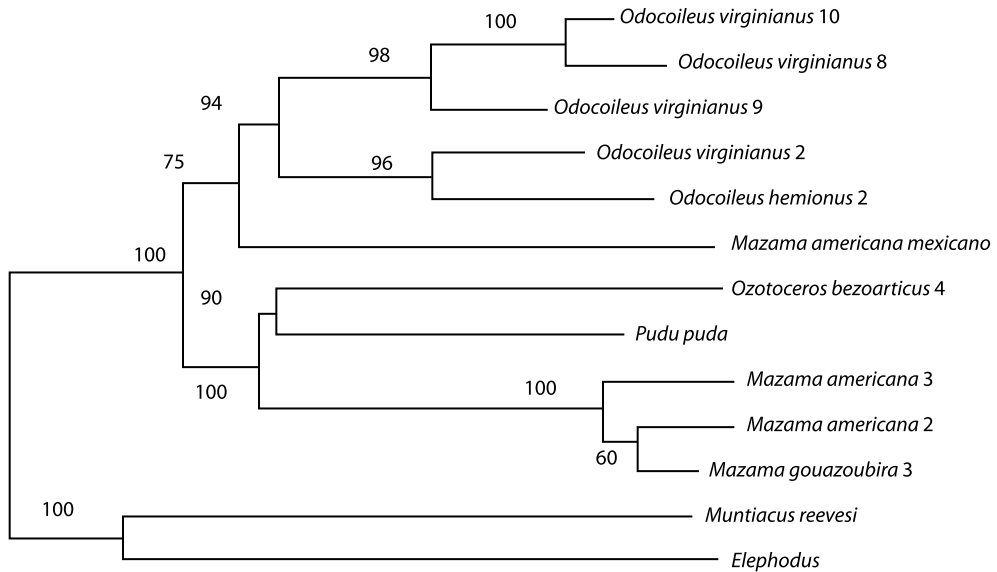
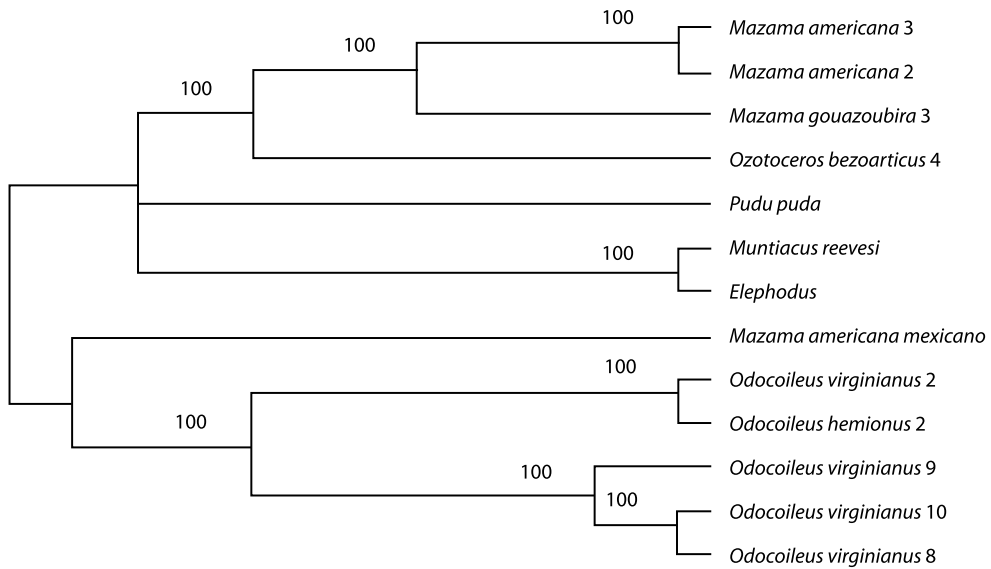


Fig. 1. Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de la región de control del ADN mitocondrial en varias especies de Odocoileinae, utilizando métodos de matrices de distancias (A y B) y máxima parsimonia (C y D). A/ Árbol "neighbor-joining" con la distancia de Tajima y Nei (1984). B/ Árbol UPGMA con la distancia de Tajima y Nei (1984). Los valores sobre los nódulos indican los porcentajes de "bootstrap".

Fig. 1. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the mtDNA control region in several Odocoileinae species, using distance matrix procedures (A and B) and maximum parsimony (C and D). A/ Neighbor-joining tree with the Tajima y Nei (1984)'s distance. B/ UPGMA tree with the Tajima y Nei (1984)'s distance. The values on the nodules show the bootstrap percentages.



**Máxima Parsimonia "Heuristic Search"**

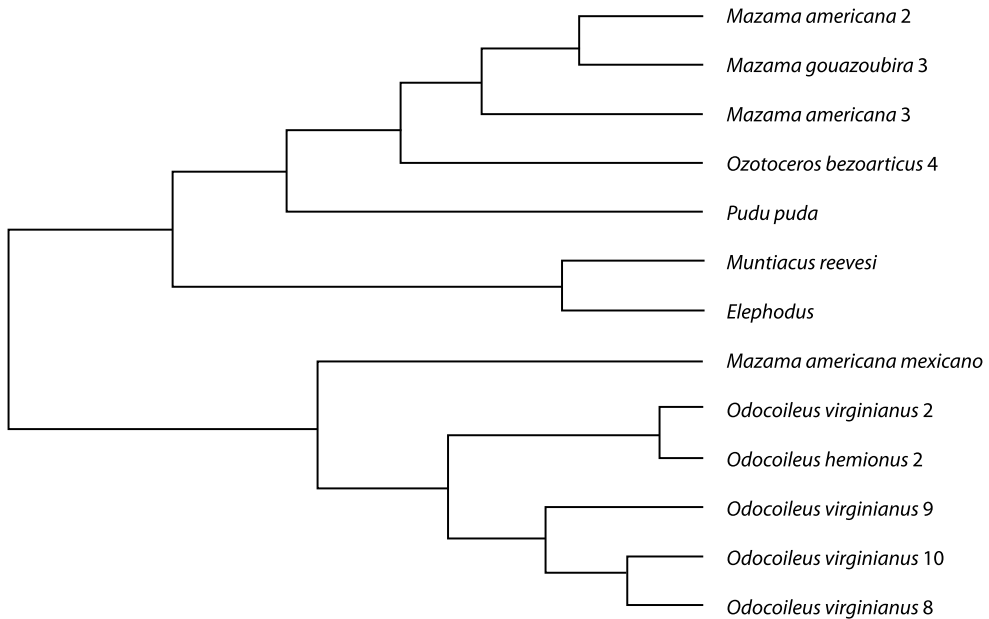


Fig. 1. Análisis filogenéticos de las secuencias nucleotídicas de la región de control del ADN mitocondrial en varias especies de Odocoileinae, utilizando métodos de matrices de distancias (A y B) y máxima parsimonia (C y D). C/ Con el procedimiento de máxima parsimonia "branch and bound". Número mínimo de pasos 714. CI=0.867, RI=0.668. D/ Con el procedimiento de máxima parsimonia "heuristic search".

Fig. 1. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the mtDNA control region in several Odocoileinae species, using distance matrix procedures (A and B) and maximum parsimony (C and D). C/ Tree with the maximum parsimony "branch and bound" procedure. Minimum step number 714. CI=0.867, RI=0.668. D/ Tree with the maximum parsimony "heuristic search" procedure.

el método de análisis utilizado. Los índices fueron idénticos para todos los árboles obtenidos, con los siguientes valores: CI=0.702, HI=0.298, RI=0.430, RC=0.302. A partir de estos árboles se procedió a realizar el análisis consenso por diferentes procedimientos, obteniéndose dos modelos de árboles diferentes, uno con los métodos estricto y de Adams (Fig. 2A) y otro para los métodos semiestricto y regla de la mayoría (Fig. 2B). Como se puede observar, al igual, que se detectó en el análisis de la región de control mitocondrial, *M. americana* presentó una más alta relación genética con *O. virginianus* que con *M. gouazoubira*. Idéntica relación fue detectada por Smith *et al.* (1986) mediante isoenzimas y características morfométricas.

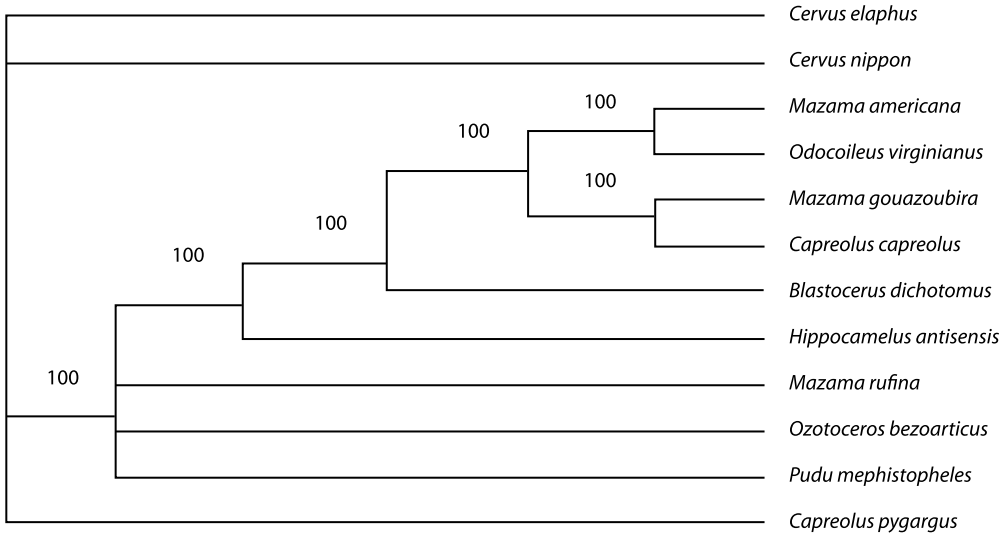
## DISCUSIÓN

En los dos taxones en los que se midió la variabilidad genética a nivel de la región de control mitocondrial (*O. virginianus* y ejemplares de *Mazama* obtenidos en Bolivia) se observó la existencia de mayor diversidad nucleotídica en la primera especie ( $\pi=0.0454$ ) que en la segunda ( $\pi=0.0219$ ), aun cuando, en este segundo género, aparentemente, se distinguieron dos morfotipos atribuibles, a *M. americana* y *M. gouazoubira*. Las muestras de ambas especies se obtuvieron en la Chiquitania de Santa Cruz (Bolivia) en un lugar simpátrico. La escasa diferenciación molecular entre ellas podría sugerir dos posibles explicaciones, al menos. La primera de ellas es que existió hibridación entre ambas especies de *Mazama*. De hecho, las muestras obtenidas pertenecen a una población, dónde ambos morfotipos se encontraban en una situación geográfica muy cercana. Los ejemplares de *M. americana*, reconocibles morfológicamente como tales, podrían portar ADN mitocondrial de alguna hembra ancestral de *M. gouazoubira* que se reprodujo con algún macho de *M. americana* en el seno de ese linaje, o viceversa. También pudo existir introgresión genética en *M. gouazoubira* proveniente de alguna hembra de *M.*

*americana*. Quizá, sin embargo, el primer caso de introgresión pudiera ser más factible que el segundo, debido al tamaño de los animales. Los machos de *M. americana* de mayor porte pueden alcanzar los 40 kg, excepcionalmente hasta 55 kg en el Surinam (Smith *et al.* 1986), mientras que los de *M. gouazoubira* alcanzan hasta los 25 kg de peso, por lo que resultaría más complejo que pudiera cruzarse con una hembra de *M. americana*. Una segunda posibilidad es que, en realidad, los animales muestreados pertenezcan a una única especie con una variabilidad morfológica muy amplia y que se sobrelape con las características de esta naturaleza que han utilizado los zoólogos tradicionalmente para distinguir ambas especies de *Mazama*. Si fuera así, probablemente, las muestras bolivianas analizadas pertenecerían a la forma *M. gouazoubira*. Esta segunda hipótesis puede ser muy importante como se mostrará más adelante. Este hecho debe tenerse en consideración para el manejo de las poblaciones de *Mazama* en Bolivia.

La cantidad de diversidad nucleotídica estimada en esos dos géneros de cérvidos puede compararse a la encontrada en otras especies de Mamíferos. Recordemos, que un valor mínimo de  $\pi=0.02-0.03$  entre especies diferentes de un mismo género es usual. Para otros cérvidos se han encontrado los siguientes valores. Entre el alce (*Alces alces*) y el reno (*Rangifer tarandus*),  $\pi=0.111$ ; entre tres especies de Cervinae (*Cervus elaphus elaphus*, *C. e. canadiensis* y *C. nippon*), los valores de  $\pi$  oscilaron entre 0.0502 y 0.056. Entre wapitis de Norteamérica y Siberia (*C. e. manitobensis* vs. *C. e. sibiricus*),  $\pi=0.0123$  (Polziehn y Strobeck 1998). El valor de  $\pi$  fue de 0.084 entre *O. virginianus* y *Cervus elaphus* (Cronin 1986), por citar algunos ejemplos en cérvidos. En otros mamíferos algunos de los valores encontrados han sido los siguientes. Entre los bóvidos,  $\pi$  fue de 0.065 entre la vaca y el bisonte (*Bison bison*), o de  $\pi=0.0056$  para *Rupicapra rupicapra* y *R. pyrenaica*; entre poblaciones de la nutria *Enhydra lutris* ( $\pi=0.00004-0.0041$ ); para poblaciones de liebre europea (*Lepus europaeus*),  $\pi=0.01$  (Hartl *et al.* 1993); para *Ovis canadiensis*,

**Microsatélites consenso: Semiestricto**



**Microsatélites consenso: Regla de la Mayoría**

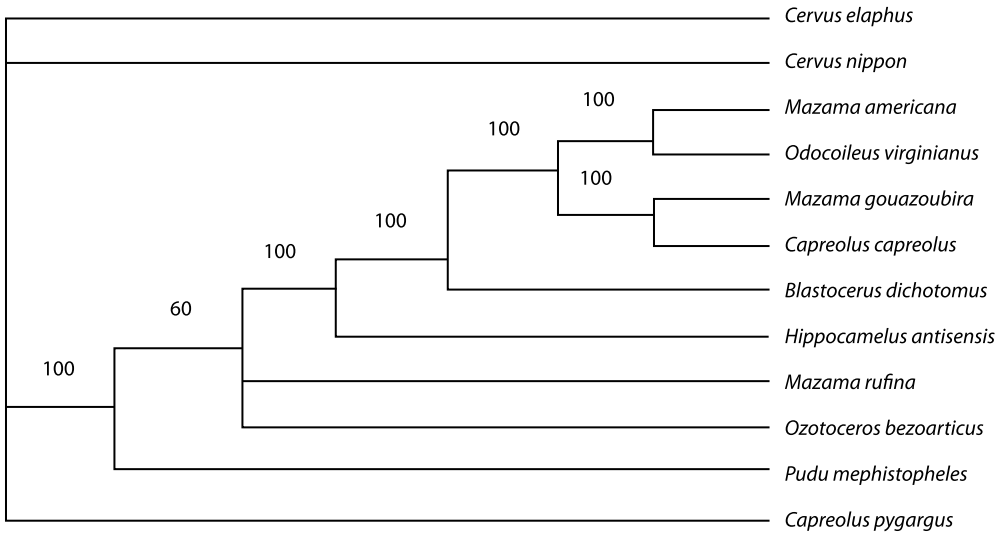


Fig. 2. Análisis filogenético utilizando 16 loci microsatélites en varias especies de cérvidos, utilizando métodos de máxima parsimonia. A/ Consenso estricto y de Adams. B/ consenso semiestricto y Regla de la mayoría. Número mínimo de pasos 191. CI=0.702, RI=0.430. Los valores sobre los nódulos indican los porcentajes de “bootstrap”.

Fig. 2. Phylogenetic analysis using 16 microsatellite loci in several deer species, employing maximum parsimony methods. A/ Strict and Adams consensus tree. B/ Semistrict and Majority rule consensus tree. Minimum step number 191. CI=0.702, RI=0.430. The values on the nodules show the bootstrap percentages.

$\pi=0.0043$  (Luikart y Allendorf 1996). De este modo, la diversidad nucleotídica encontrada para los ejemplares de *Mazama* procedentes de la región de Chiquitania en Bolivia está dentro de los límites intraespecíficos.

Sin embargo, cuando se introdujo en el análisis la secuencia perteneciente a la *M. americana* de origen mexicano, la diversidad nucleotídica y otros estadísticos genético-poblacionales aumentaron considerablemente ( $\pi=0.0618$ ), superando, incluso, a los obtenidos cuando las secuencias de *O. virginianus* colombiano fueron analizadas conjuntamente con *O. hemionus* norteamericano (datos no mostrados en este estudio). Esta es una primera indicación de que el género *Mazama* podría no ser monofilético, si no más bien polifilético. El análisis de los árboles filogenéticos, tanto utilizando las distancias de los dos parámetros de Kimura (1980) o de Tajima y Nei (1984), como los métodos de máxima parsimonia, pusieron en evidencia este hecho. El *Mazama* de origen mexicano siempre quedó afiliado de forma robusta a las secuencias de *Odocoileus*, mientras que las tres secuencias de *Mazama* procedentes de Bolivia siempre estuvieron en otra agrupación bien diferenciada y separada del anterior, mostrando mucha mayor relación con las secuencias de *Ozotoceros* y *Pudu*, y sin mostrar especial filiación con las secuencias de *Odocoileus*. El análisis de máxima parsimonia con los loci microsátelites también reveló una conspicua asociación entre *M. americana* y *O. virginianus*, estando *M. gouzaoubira* más distantemente relacionada. En el estudio de Smith *et al.* (1986), con isoenzimas y datos biométricos, también se encontró mayor relación entre *M. americana* y *O. virginianus* en Surinam, que de esa *M. americana* con *M. gouzaoubira*, también de la misma zona del norte de Sudamérica. Incluso, esa fuerte relación entre *M. americana* y *O. virginianus* en ese país neotropical fue mayor que entre la segunda especie y representantes de *O. virginianus* 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 la bulla auditiva, éstas son mayores en *Odocoileus* que en *Mazama*, además de las diferencias ostensibles en la cornamenta de los machos, y 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 (*O. virginianus* del Sudeste USA, *O. virginianus* del Surinam y *M. americana* del Surinam), otras características diferenciales esperadas entre ambas especies no se dieron. Por ejemplo, con las mismas 31 variables craneométricas, un cráneo de *M. americana* del Surinam reclasificó con un 100 % de probabilidades con los *O. virginianus* del Surinam (con datos directos no transformados), y con un 99.75 % con los *O. virginianus* de Sudeste USA (datos ajustados por tamaño), y no con la agrupación compuesta por *M. gouzaoubira*. Los ejemplares de *O. virginianus* del Surinam poseen una anchura maxilar más estrecha que los especímenes de la misma especie procedente del Sudeste de USA, mientras que ocurre, exactamente, lo mismo, entre las dos especies de *Mazama* de ese mismo país. *M. americana* posee una menor anchura maxilar que *M. gouzaoubira*. Esos mismos autores (Smith *et al.* 1986), usando 19 loci bioquímicos y la distancia genética de Nei (1972), encontraron que ésta era igual a 0.236 entre las dos especies de *Mazama*, mientras que esa distancia genética era notablemente inferior entre *O. virginianus* del Sudeste USA y *M. americana* ( $D=0.148$ ), y entre *O. virginianus* del Surinam y *M. americana* ( $D=0.063$ ). Las distancias entre las dos formas de *Odocoileus* respecto a *M. gouzaoubira* del Surinam fueron considerablemente mayores ( $D=0.378$  y  $D=0.271$ , respectivamente). Los resultados de esos autores y, especialmente, los datos reportados en el presente análisis con la región de control mitocondrial y los loci nucleares microsátelites, induce a pensar que se debe realizar una profunda revisión taxonómica del género *Mazama*, ya que podría ser un género polifilético. Esto es, el ejemplar de *Mazama* de origen mexicano podría ser un verdadero representante de *M. americana*, mientras que los animales bolivianos pudieran

ser únicamente representativos de *M. gouazoubira*. Eso indicaría que esos dos taxones, no únicamente son especies diferentes, si no que el género *Mazama* podría ser desdoblado en dos géneros diferentes, al menos. Se conocen restos asignables a *M. gouazoubira* procedentes del Pleistoceno de Lagoa Santa y del valle del Rio das Velhas (Brasil) (Lund 1950). Luego, este es un taxón antiguo. Además, aunque en algunos lugares se puede dar simpatria entre ambas formas, por ejemplo, en Tucumán (Argentina) o en la zona boliviana objeto de estudio, *M. gouazoubira* vive hasta los 600-900 m de altitud, a partir de la cual, es reemplazada por *M. americana* (Richard *et al.* 1995). La primera forma prefiere zonas abiertas y alteradas, mientras que la segunda prefiere zonas primarias y selvas más cerradas. En las zonas secas como El Chaco, la forma *gouazoubira* prefiere zonas xerófitas, y la forma *americana* zonas húmedas. Todo ello conjuntamente nos induce a pensar en que ambos taxones forman, en realidad, dos géneros diferentes. El primer género estaría más íntimamente relacionado con *Odocoileus*, y el segundo estaría más relacionado con *Ozotoceros* y *Pudu* y, quizá, presumiblemente, con *Blastocerus*.

Un segundo aspecto filogenético interesante hace referencia a la mayor relación existente entre el haplotipo mitocondrial de *O. virginianus* 2 (Colombia) con el haplotipo mitocondrial de *O. hemionus* norteamericano que con los restantes haplotipos de *O. virginianus* (también colombianos). Este es un género que presenta una extensa variabilidad genética en su seno revelada por diversos trabajos llevados a cabo con poblaciones y subespecies norteamericanas. Por ejemplo, Cronin *et al.* (1988) descubrieron que dos *O. virginianus* procedentes de Illinois ( $\pi=0.0051$ ) presentaban mayor divergencia genética mitocondrial entre ellos que con respecto a algunos ejemplares de Illinois y Georgia ( $\pi=0.0026-0.0055$ ). En las muestras de los especímenes colombianos, la divergencia genética es todavía más considerable a nivel mitocondrial que en el caso citado anteriormente con ejemplares norteamericanos de *O. virginianus*, aunque no así a nivel de los

microsatélites nucleares para los que no fueron heterogéneos significativamente. Las diferencias moleculares detectadas, para la región de control del ADN mitocondrial, entre ejemplares norteamericanos de *O. virginianus* y *O. hemionus columbianus* fueron 69 transiciones, 21 transversiones y seis deleciones/inserciones con  $\pi=0.0758$  y un tiempo de divergencia estimado entre ambos taxones de 351 000 años (Polziehn y Strobeck 1998). Valores de divergencia genética similares, entre esas dos formas biogeográficamente separadas, han sido encontradas por otros autores (Carr *et al.* 1986, 1993, Cronin *et al.* 1988). También, utilizando 18 isoenzimas, Vaughan *et al.* (1994) encontraron distancias genéticas elevadas entre muestras de *O. virginianus* procedentes de Georgia (USA), la isla San Lucas (Costa Rica) y Surinam, especialmente entre las muestras de Estados Unidos y Costa Rica. Sin embargo, entre otras subespecies de *O. virginianus* en Norteamérica, y entre éstas y algunas poblaciones de *O. hemionus*, las diferencias genéticas son muy pequeñas. Por ejemplo, Hillestad (1984) encontró una distancia de Nei ( $D=0.023$ ) muy pequeña entre cuatro subespecies de *O. virginianus* norteamericanos. Incluso, Baccus *et al.* (1983) detectaron una distancia genética no excesivamente grande entre *O. virginianus* y *O. hemionus* en Norteamérica ( $D=0.149$ ). Este valor encontrado corresponde a una distancia genética típicamente de especies congénéricas o subespecies. Cronin *et al.* (1988), haciendo uso de un análisis con endonucleasas de restricción aplicadas al ADN mitocondrial, encontraron un valor de diversidad nucleotídica sumamente pequeña ( $\pi=0.0057$ ) entre ambas especies, valor parecido al encontrado por Carr *et al.* (1986) entre ambas formas en Texas ( $p=0.008$ ). Cruzamientos en cautiverio entre esas dos especies han sido reportados por diversos autores (Whitehead 1972, Wallmo 1981, Derr *et al.* 1991). Pero, también, se ha encontrado hibridación interespecífica entre ambas formas de *Odocoileus* en poblaciones naturales de la Columbia Británica (Cowan 1962), Alberta (Wishart 1980, Hughes 1990), Sur Oeste USA (Derr 1991), Pacífico Noroeste (Cronin 1991)

y Texas (Carr *et al.* 1986, Ballinger *et al.* 1992). Carr y Hughes (1993) amplificaron 359 pb del gen citocromo b mitocondrial de 157 ejemplares de *Odocoileus*. Estos autores mostraron que en el oeste de Texas, donde viven simpátricamente las formas *O. virginianus texanus* y *O. hemionus crooki*, todos los individuos analizados poseyeron un único haplotipo mitocondrial común y que perteneció al clado de los haplotipos de *O. hemionus*. Esto indica que existió introgresión genética de ADN mitocondrial desde *O. hemionus* a *O. virginianus*. Las poblaciones del Sur Oeste USA y, especialmente, las de Texas son las que muestran un mayor grado de hibridación entre ambas especies de *Odocoileus*. Para el locus Albúmina, ambas especies están fijadas para diferentes alelos (Cronin *et al.* 1988). Sin embargo, en la localidad texana de Pecos Co, el 13 % de *O. hemionus* y el 24 % de los *O. virginianus* mostraron genotipos heterocigotos con ambos alelos (Ballinger *et al.* 1992) y todos los *O. hemionus*, y la mayoría de los *O. virginianus*, compartieron un mismo mapa de restricción del ADN mitocondrial (Carr *et al.* 1986). Una posibilidad es que algunos de esos haplotipos mitocondriales (linajes maternos) estuvieran ya presentes en las formas ancestrales que darían, posteriormente, a ambas especies de *Odocoileus* y que se hubieran repartido asimétricamente. Una segunda posibilidad es que se haya dado extensiva hibridación entre ambas especies y en el proceso de colonización de *O. virginianus* hacia Centro y Suramérica, esta especie haya portado haplotipos mitocondriales característicos de los *O. hemionus* norteamericanos. Una tercera posibilidad es que *O. virginianus* se haya derivado recientemente de *O. hemionus*, aunque los datos paleontológicos no parecen estar en concordancia con esta última hipótesis (Kurtén y Anderson 1980). Cualquiera de las diversas hipótesis invocadas podría explicar la existencia de una fuerte relación entre un haplotipo mitocondrial en un *O. virginianus* colombiano y *O. hemionus*.

Con los métodos de máxima parsimonia, se observó que los Muntiacinae (*Muntiacus* y *Elaphodus*) formaron un clado sólido con cierto grupo de *Odocoileinae*, concretamente con los *Mazama* bolivianos, *Ozotoceros* y *Pudu*. Polziehn y Strobeck (1998) observaron que otro género de Cervidae, *Hydropotes* (subfamilia *Hydropotinae*), en algunos análisis, se agrupaba con *Mazama*. Ellos justificaron este hecho porque la estructura telemetacarpal, la gran apertura del canal temporal, tamaño similar, hembras con cuatro mamas, caninos como colmillos y gran habilidad para nadar son comunes para el *Odocoileinae*, *Mazama* y el *Hydropotinae*, *Hydropotes*. Algo similar podría ocurrir entre los *Muntiacinae* y algunos *Odocoileinae*. De hecho, Comincini *et al.* (1996), utilizando RAPD con ocho cebadores diferentes, detectaron una considerable relación entre *O. hemionus hemionus* y *M. muntjac vaginalis*, aunque la relación de este último con *C. capreolus*, un *Odocoileinae* europeo, fue ostensiblemente menor.

A partir de los árboles de máxima parsimonia obtenidos con los alelos de los loci microsatélites se observó también la citada y considerable relación entre *O. virginianus* y *M. americana*, más otras relaciones filogenéticas interesantes. Por ejemplo, se presenta una relación estrecha entre *M. gouazoubira* y *C. capreolus*. Estos dos clados siempre forman un grupo hermano y, a continuación, encontramos la divergencia de *B. dichotomus* seguido por la divergencia de *H. antisensis*. Las relaciones entre las demás especies no fueron tan claras, especialmente debido al bajo número de muestras analizadas para cada una de ellas. Aunque los marcadores microsatélites no se utilizan tradicionalmente para la configuración de filogenias intergenéricas, observamos en este caso una fuerte congruencia con lo encontrado a partir de la secuenciación de la región de control mitocondrial. Un exhaustivo análisis molecular, empleando genes nucleares y mitocondriales, es requerido para clarificar

definitivamente la sistemática y la filogenia de los ciervos neotropicales.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la ayuda prestada por K.H. Roed, de Noruega, por el envío de cebadores de microsatélites diseñados para *Rangifer tarandus*, los cuales fueron aplicados en los ciervos neotropicales. A la Pontificia Universidad Javeriana agradecemos los apoyos prestados por la Decanatura de la Facultad de Ciencias y de la Vicerectoría Académica en la financiación parcial de un viaje a Bolivia, en 1997, que permitió obtener buena parte de las muestras aquí analizadas.

## RESUMEN

El presente trabajo muestra dos análisis moleculares sobre la filogenia de los cérvidos neotropicales. En uno se secuenció la región control del mtDNA (D-loop) de seis especies de Odocoileinae, utilizándose las secuencias de dos Muntiacinae como elementos externos. Se evidenciaron los siguientes resultados: La secuencia de una *Mazama americana*, de origen mexicano, presentó una fuerte relación filogenética con las diversas secuencias estudiadas de *Odocoileus*, contrario a lo esperado ya que, a priori, debería haberse asociado con las secuencias analizadas de otros ejemplares de *Mazama* de origen boliviano. Esto pone en evidencia que este género no es monofilético. A su vez, las secuencias de los ejemplares bolivianos de *Mazama* formaron una agrupación con secuencias de *Pudu puda* y *O. bezoarticus*. Una secuencia de *O. virginianus*, del área central de Colombia, presentó más relación con la secuencia de un *O. hemionus* norteamericano que con las restantes secuencias analizadas de *O. virginianus*, también de origen colombiano. Esto puede reflejar varias explicaciones hipotéticas, tales como la existencia de haplotipos ancestrales comunes entre ambas especies de *Odocoileus*, hasta la hibridación en Norteamérica entre ambos taxones antes de su penetración en Sudamérica. Los análisis de máxima parsimonia presentan una especial relación entre los Muntiacinae y el clado de los ciervos sudamericanos. El segundo análisis filogenético hizo uso de 16 marcadores nucleares microsatélites. Aunque, en principio, estos marcadores no son los más recomendables para estudios filogenéticos intergenéricos, los resultados muestran, al igual que el ADN mitocondrial, una mayor relación entre *M. americana* y *O. virginianus* que entre la primera especie y *M. gouzaoubira*.

**Palabras clave:** filogenia molecular, ciervos neotropicales, ADN mitocondrial, microsatélites, *Mazama*, *Odocoileus*.

## REFERENCIAS

- Allen, J.A. 1915. Notes on American deer of the genus *Mazama*. B. Am. Mus. Nat. Hist. 34: 521-553.
- Baccus, R., N. Ryman, M.H. Smith, C. Reuterwall & D. Cameron. 1983. Genetic variability and differentiation of large grazing mammals. J. Mammal. 64: 109-120.
- Ballinger, S.W., L.H. Blankenship, J.W. Bickham, & S.M. Carr. 1992. Allozyme and mitochondrial DNA analysis of a hybrid zone between white-tailed deer and mule deer (*Odocoileus*) in West Texas. Biochem. Genet. 30: 1-11.
- Blanquer-Maumont A., & B. Crouau-Roy. 1995. Polymorphism, monomorphism, and sequences in conserved Microsatellites in Primate species. J. Mol. Evol. 41: 492-497.
- Cabrera, A. 1960. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. Rev. Mus. Argent. Cien. Nat. "Bernardino Rivadavia" 4: 309-732.
- Carr, S.M., S.W. Ballinger, J.N. Derr, L.H. Blankenship & J.W. Bickham. 1986. Mitochondrial DNA analysis of hybridization between sympatric white-tailed deer and mule deer in West Texas. Proc. Nat. Acad. Scien. USA 83: 9576-9580.
- Carr, S.M. & G.A. Hughes. 1993. Direction of introgressive hybridization between species of North American deer (*Odocoileus*) as inferred from mitochondrial-Cytochrome-b sequences. J. Mammal. 74: 331-342.
- Comincini, S., M. Sironi, C. Bandi, C. Giunta, M. Rubini & F. Fontana. 1996. RAPD analysis of systematic relationships among the Cervidae. Heredity 76: 215-221.
- Cowan, I.M. 1962. Hybridization between the black-tail deer and the white-tail deer. J. Mammal. 43: 539-541.
- Cronin, M. 1986. Genetic relationships between white-tailed deer, mule deer and other large mammals inferred from mitochondrial DNA analysis. Tesis de MSc, Montana State University, Bozeman, Montana, EEUU. 49 p.
- Cronin, M. 1991. Mitochondrial DNA phylogeny of deer (Cervidae). J. Mammal. 72: 553-556.



- Cronin, M., E. Vyse & D. Cameron. 1988. Genetic relationships between mule deer and white-tailed deer in Montana. *J. Wildlife Manage.* 52: 228-237.
- Czernay, S. 1987. Die spießhirsche und pudus. *Die Neue Brehm Bucherei* 581: 1-84.
- Derr, J.N. 1991. Genetic interactions between white-tailed and mule deer in the southwestern United States. *J. Wildlife Manage.* 55: 228-237.
- Derr, J.N., D.W. Hale, D.L. Ellesworth & J.W. Bickham. 1991. Fertility in an F1 male hybrid of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) x mule deer (*O. hemionus*). *J. Reprod. Fertil.* 93: 111-117.
- DeWoody J.A., R.L. Honeycutt & L.C. Skow. 1995. Microsatellite markers in White-Tailed Deer. *J. Hered.* 86: 317-319.
- DiRienzo A., A.C. Peterson, J.C. Garza, A. Valdes, M. Slatkin & N.B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc. Nat. Acad. Scien. USA* 91: 3166-3170.
- Douzery, E., J.D. Lebreton & F.M. Catzeflis. 1995. Testing the generation time hypothesis using DNA/DNA hybridization between artiodactyls. *J. Evolution. Biol.* 8: 511-529.
- Douzery, E. & E. Randi. 1997. The mitochondrial control region of Cervidae: Evolutionary Patterns and Phylogenetic content. *Mol. Biol. Evol.* 14: 1154-1166.
- Duarte, J.M.B. 1992. Aspectos taxonomicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros. Tesis de Maestría, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Brasil. 153 p.
- Duarte, J.M.B. & M.L. Merino. 1997. Taxonomia e evolucion. In J.M.B. Duarte (ed) *Biología e conservacao de Cérvidos Sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, Brasil. 238 p.
- FitzSimmons N.N., C. Moritz & S.S. Moore. 1995. Conservation and dynamics of Microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol. Biol. Evol.* 12: 432-440.
- Garza, J.C. & N.B. Freimer. 1996. Homoplasy for size at Microsatellite loci in humans and Chimpanzees. *Genome Res.* 6: 211-217.
- Goldstein D.B. & D.D. Pollock. 1997. Launching Microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.* 88: 335-342.
- Goldstein D.B., A. Ruiz-Linares, L.L. Cavalli-Sforza & M.W. Feldman. 1995. Genetic absolute dating based on Microsatellites and the origin of modern humans. *Proc. Nat. Acad. Scien. USA* 92: 6723-6727.
- Hartl, G.B., F. Suchentrunk, K. Nadlinger & R. Willing. 1993. An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Acta Theriologica* 38: 33-57.
- Hill, W.G. & A. Robertson. 1968. Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet.* 38: 226-231.
- Hillestad, H.O. 1984. Stocking and genetic variability of white-tailed deer in the southeastern United States. Disertación de PhD, University of Georgia, Athens, EEUU. 121 p.
- Hughes, G.A. 1990. A molecular genetic analysis of hybridization between two species of deer (*Odocoileus*) in western Canada. Tesis MSc, Memorial University of Newfoundland, St. John, Newfoundland, Canada 93 p.
- Jukes, T.H. & C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 21-132. In H.N. Munro (ed). *Mammalian Protein Metabolism*. Academic, Nueva York, Nueva York, EEUU.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 78: 454-458.
- Kumar, S., K. Tamura & M. Nei. 1993. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* 10: 189-191.
- Kurten, B. & E. Andersson. 1980. Pleistocene mammals of North America. Columbia University, Nueva York, Nueva York, EEUU. 442 p.
- Lewontin, R.C. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations: heterotic models. *Genetics* 49: 49-67.
- Lewontin, R.C. & K. Kojima. 1964. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms. *Evolution* 14: 458-472.
- Li, W.H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, EEUU. 515 p.

- Luikart, G. & F. Allendorf. 1996. Mitochondrial -DNA variation and genetic-population structure in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*). *J. Mammal.* 77: 109-123.
- Lund, P.W. 1950. Memórias sobre a palentologia Brasileira. Instituto Nacional do Livro. Rio de Janeiro, Brasil. 592 p.
- Morin P.A., J. Wallis, J. Moore, R. Chakraborty & D. Woodruff. 1993. Non-invasive sampling and DNA amplification for paternity exclusion, community structure, and phylogeography in wild chimpanzees. *Primates* 34: 347-356.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292.
- Nielsen R. 1997. A likelihood approach to populations samples of Microsatellite alleles. *Genetics* 146: 711-716.
- Nielsen R & P.J. Palsbol. 1999. Single-locus tests of Microsatellite evolution: Multi-step mutations and constrains on allele size. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11: 477-484.
- Polziehn, R.O. & C. Strobeck. 1998. Phylogeny of Wapiti, red deer, sika deer, and other North American Cervids as determined from mitochondrial DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10: 249-258.
- Richard, E., J.P. Julia, J. Samaniego & P. Aceñolaza. 1995. La Corzuela Parda. Serie Monográfica y Didáctica N° 22. Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Roed K.H. & L. Midthjell. 1998. Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. *Mol. Ecol.* 7: 1773-1776.
- Rozas, J. & R. Rozas. 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphisms: an interactive program for estimating population genetics parameters from DNA sequence data. *Comput. Appl. Biosci.* 11: 621-625.
- Ruiz-Garcia, M. 2003. Molecular population genetic analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) in the Northern Andean Area. *Hereditas* 138 :81-93.
- Ruiz-Garcia, M. 2005. The use of several microsatellite loci applied to 13 Neotropical Primates revealed a strong recent bottleneck event in the woolly monkey (*Lagothrix lagotricha*) in Colombia. *Primate Report* 71: 27-55.
- Ruiz-Garcia M., A. Parra, N. Romero-Alean, P. Escobar-Armel & J. Shostell. 2006c. Genetic Characterization and phylogenetic relationships between *Ateles* species (Atelidae, Primates) by means of DNA microsatellite markers and craniometric data. *Primate Report* 73: 3-47.
- Ruiz-Garcia M., C.E. Payan, A. Murillo & D. Alvarez. 2006a. DNA Microsatellite characterization of the Jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. *Genes and Genetics Systems* 81: 115-127.
- Ruiz-Garcia M., M. Gaviria, M. Martinez-Aguero, P. Escobar-Armel & E. Banguera. 2006b Genetic structure of *Inia geoffrensis* and *Inia boliviensis* by means of heterologous DNA microsatellites. (sometido).
- Ruiz-Garcia, M., M. Martinez-Aguero, D. Alvarez, S. Goodman. 2006e Análisis de la variabilidad genética en diversos géneros de Cervidae neotropicales mediante el uso de loci microsatélites (sometido).
- Ruiz-Garcia M., P. Escobar-Armel, D. Alvarez, M. Mudry, M. Ascunce, G. Gutierrez-Espeleta & J.M. Shostell. 2006d Genetics variability in four *Alouatta* species measured by means of nine DNA microsatellites markers: Genetic structure and recent bottlenecks. *Folia Primatologica* 78: 73-87.
- Ruiz-Garcia, M., P. Orozco-ter Wengel, A. Castellanos & L. Arias. 2005. Microsatellite analysis of the spectacled bear (*Tremarctos ornatus*) across its range distribution. *Genes Genetics Syst.* 80: 57-69.
- Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, Nueva York, EEUU.
- 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*). *Anim. Genet.* 28: 307-315.
- Smith, M.H., W.V. Branan, R.L. Marchinton, P.E. Johns & M. Wooten. 1986. Genetic and Morphologic comparisons of red brocket, brown brocket, and white-tailed deer. *J. Mammal.* 67: 106-111.
- Sneath, P.H.A. & R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco, California, EEUU. 718 p.

- Swofford, D.L. 1993. PAUP 3.1.1: Phylogenetic analysis using parsimony. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois, EEUU.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship 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. *Mol. Biol. Evol.* 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. *Mol. Biol. Evol.* 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 Res.* 22: 4673-4680.
- Vaughan, C., K. Fisher, M.A. Rodriguez, P. Johns & M. Smith. 1994. Variabilidad genética en la población de venado de cola blanca en la isla San Lucas, Costa Rica, y las implicaciones para su manejo. *In* C.Vaughan & M.A. Rodríguez (eds.). *Ecología y Manejo del venado de cola blanca en México y Costa Rica*, Heredia, Costa Rica.
- Wallmo, O.C. 1981. Mule and black-tailed deer distribution and habitats. *In* O.C. Wallmo (ed). *Mule and black-tailed deer of North-America*. University Nebraska, Lincoln, Nebraska, EEUU.
- Whitehead, G.K. 1972. *Deer of the world*. Constable, Londres, Inglaterra. 194 p.
- Wilson, D.E. & D. Reeder. 1993. *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*. Smithsonian Institution, Washington DC, EEUU. 1312 p.
- Wishart, W.D. 1980. Hybrids of white-tailed and mule deer in Alberta. *J. Mammal.* 61: 716-720.
- Ximenez, P., A. Langguth & R. Praderi. 1972. Lista sistemática de los mamíferos del Uruguay. *An. Mus. Hist. Nat. Montevideo* 5: 1-49.

