



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**Instituto de Investigaciones Agropecuarias y
Forestales**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN: PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

Diversidad genética de Coyotes (*Canis latrans*) en diferentes zoológicos de México

TESIS

que como requisito parcial para obtener
el título profesional de

Maestro en Ciencias Biológicas

Que presenta

Biól. Julio Christopher Sendejas Cancino

Asesor de tesis: Dr. José Herrera Camacho.

Co-asesora: M. en C. Xóchitl Fabiola de la Rosa Reyna



Morelia, Michoacán;

**Comité sinodal:
Dr. Alejandro Pérez Arteaga
Dr. Omar Chassin Noria
Dr. Rodolfo Pérez Rodríguez
MPA. Josué Rangel Díaz**



Febrero 2022

DEDICATORIA

A mis padres por darme siempre su apoyo en la realización de mis estudios

A mi amigo Q. F. B. Fernando Dueñas Lara † por siempre confiar en mi,
otro paso mas adelante Fer

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Herrera Camacho agradezco por darme la oportunidad de ingresar a la maestría y poder asesorarme, así como la confianza que deposito en mi desde el principio brindándome su apoyo incondicional le agradezco todo lo que ha hecho por mi tanto en lo personal como en la tesis, se que no fue fácil ser mi asesor, gracias a usted hoy puedo avanzar con mas seguridad, confianza y entusiasmo.

M en C. Xóchitl Fabiola de la Rosa Reyna le agradezco por permitirme estar en su laboratorio en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en Reynosa, así como apoyándome con todo el material para los experimentos, gracias por su tiempo, dedicación y confianza ha sido un honor trabajar al lado suyo, gracias por su valiosa guía y asesoramiento en la realización de este proyecto de tesis.

Al Dr. Omar Chassin Noria agradezco su apoyo dedicación y aportes durante la maestría gracias por las sugerencias y recomendaciones en el desarrollo de la investigación y escrito de mi tesis.

Al Dr. Rodolfo Pérez Rodríguez agradezco su asesoramiento, y recomendaciones para el desarrollo del proyecto de tesis

Al MPA Josué Rangel Díaz agradezco su apoyo en con los zoológicos de México, así como asesorarme en la toma de muestras bajo el cuidado humano.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), agradezco el apoyo económico de la beca recibida para mi formación profesional de maestría.

Al Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), así como al Dr. Manuel Parra Bracamonte agradezco por permitirme realizar la estancia en sus instalaciones y poner a disposición todo lo necesario para el desarrollo de la investigación de mi proyecto de tesis.

Agradezco al personal de los zoológicos que me permitieron realizar la toma de muestras para este proyecto de tesis ya que sin ellos no seria posible la realización de esta investigación de maestría.

A si como también agradezco todas las atenciones recibidas por parte de mis compañeros y amigos que formaron parte para la realización de este proyecto.

Contenido

Índice de cuadros.....	iii
Índice de figuras.....	iv
Índice de anexos.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introducción.....	1
1.1. Historia natural de <i>Canis latrans</i>	1
1.2. Taxonomía.....	1
1.3. Importancia de la genética en los zoológicos.....	2
1.4. Marcadores moleculares estudiados en <i>Canis</i>	4
1.5. Diversidad y diferenciación genética.....	5
1.6. Sistemática molecular de la familia Canidae.....	6
2. Hipótesis.....	9
3. Objetivos.....	9
3.1. General.....	9
3.2. Objetivos particulares.....	9
4. Materiales y métodos.....	9
4.1. Material biológico.....	9
4.1.1. Material para toma de muestra.....	11
4.1.2. Procedimiento.....	11
4.2. Extracción de ADN.....	11
4.3. Electroforesis.....	12
4.4. Cuantificación.....	12
4.5. Amplificación de ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	12
4.6. Secuenciación.....	13
4.7. Análisis de diversidad genética.....	14
4.8. Análisis redes de haplotipos.....	15
4.9. Análisis filogenéticos.....	15
4.10. Distancias genéticas.....	17
5. Resultados.....	17
5.1. Extracción de ADN.....	17
5.2. Cuantificación.....	17
5.3. Amplificación por PCR.....	18
5.4. Secuenciación.....	19
5.5. Análisis de secuencias.....	20

5.5.1. Diversidad haplotípica.....	20
5.5.2. Diversidad nucleotídica.....	22
5.6. Análisis redes de haplotipos.....	23
5.7. Análisis filogenéticos.....	27
6. Discusión.....	38
6.1. Diversidad genética en <i>Canis latrans</i> de México.....	38
6.2. Relación de haplotipos en coyotes de los zoológicos de México.....	46
6.3. Análisis filogenéticos.....	48
7. Conclusiones.....	50
8. Literatura citada.....	51
9. Anexos.....	57

Índice de cuadros

Tabla 1. Nombre, ubicación y número de individuos de coyotes, presentes en los zoológicos de México.....	10
Tabla 2. Datos de los individuos de los zoológicos de México Se muestra un ejemplo de la muestra ZooMor1 del zoológico de Morelia.....	11
Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los iniciadores reportados para la región D-loop, DRB1 y COI. Tm ali= Temperatura de alineamiento, % GC= porcentaje de Guanina y Citosina y pb= pares de bases	12
Tabla 4. Reactivos con su concentración y volumen que se utilizaron para las PCR.....	13
Tabla 5. Haplotipos encontrados por distintos autores. Información tomada del NCBI con modificada.....	15
Tabla 6. Cuantificación del ADN genómico con NanoDrop 2000 de muestras sanguíneas de <i>Canis latrans</i> obteniendo una concentración mínima de 24.8 ng/µl en la muestra ZooNL1 y una máxima de 177.4 ng/µl con la muestra ZooGDL528.....	17
Tabla 7. Secuencia nucleotídica de los iniciadores reportados para la región ZDHHC16 diseñado para este trabajo. Tm ali= Temperatura de alineamiento, % GC= porcentaje de Guanina y Citosina y pb= pares de bases.....	19
Tabla 8. Número de haplotipos de <i>C. latrans</i> de los zoológicos de MX encontrados en este trabajo para cada gen y del NCBI.....	20
Tabla 9. Número de Haplotipos de los zoológicos de MX con su frecuencia absoluta (FA) y frecuencia relativa (FR).....	21
Tabla 10. Diversidad haplotípica (Hd) de <i>C. latrans</i> de los zoológicos de MX encontrados en este trabajo para cada gen y del NCBI.....	22
Tabla 11. Valores de la diversidad nucleotípica (Pi) de <i>C. latrans</i> de los zoológicos de MX encontrados en este trabajo para cada gen y del NCBI.....	22
Tabla 12. Número de posiciones polimórficas y mutaciones de los genes COI, D-loop, DRB1 y ZDHHC16 de los zoológicos de México.....	23
Tabla 13. Valores de distancias genéticas para el gen COI obtenidas con el modelo K2P. Valores mayores destacados en amarillo, menores en azul. Para las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....	34
Tabla 14. Valores de distancias genéticas para el gen D-loop obtenidas con el modelo K2P. Valores mayores destacados en amarillo, menores en azul. Para las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....	35
Tabla 15. Valores de distancias genéticas para el gen DRB1 obtenidas con el modelo K2P. Valores mayores destacados en amarillo, menores en azul. Para las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....	36
Tabla 16. Valores de distancias genéticas para el gen ZDHHC16 obtenidas con el modelo K2P. Valores mayores destacados en amarillo, menores en azul. Para las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....	37
Tabla 17. Estudios de diversidad genética de la familia Canidae.....	42

Índice de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de los zoológicos de México que presentan individuos de *C. latrans* y fueron utilizados para este proyecto..... 10

Figura 2. ADN purificado de muestras biológicas de *Canis latrans* en gel de agarosa al 1%, en TBE 1X teñidos con Sybr Gold..... 17

Figura 3. Amplicones de DRB1, ZDHHC16, D-loop de *Canis latrans* en gel de agarosa al 1%, en TBE 1X teñidos con Sybr Gold. M) Marcador de tamaño molecular 1Kb DNA Plus Ladder..... 19

Figura 4. Amplicones de COI de *Canis latrans* en gel de agarosa al 1%, en TBE 1X teñidos con Sybr Gold. M) Marcador de tamaño molecular 1Kb DNA Plus Ladder..... 19

Figura 5 Electroferograma obtenidos en la secuenciación de fragmentos de ADN. Se muestra un ejemplo de la muestra EO1 de la región COI de uno de los electroferogramas visualizados con el software Bioedit, en donde se compararon y editaron las secuencias de las cadenas obtenidas...20

Figura 6. Red de haplotipos de MJN para el gen COI, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 653 pb de las secuencias concatenadas de gen COI. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que no fueron encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI-Bold en el anexo 2.....24

Figura 7. Red de haplotipos de MJN para el gen D-loop, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 478 pb de las secuencias concatenadas de gen D-loop. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI en el anexo 2.....25

Figura 8. Red de haplotipos de MJN para el gen DRB1, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 192 pb de las secuencias concatenadas de gen DRB1. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en los 2 polígonos podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI en el anexo 2.....26

Figura 9. Red de haplotipos de MJN para el gen ZDHHC16, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 848 pb del gen ZDHHC16. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en la red podemos observar las muestras de los zoológicos de México en el anexo 2.....27

Figura 13. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 653 caracteres de 26 taxones de COI (ADNmt). La especie hermana *Canis lupus* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). (*) valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....29

Figura 14. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 478 caracteres de 75 taxones de D-loop (ADNmt). La especie hermana *Canis lupus lupus* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). (*) valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....31

Figura 15. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 192 caracteres de 35 taxones de DRB1 (ADNn). La especie hermana *Vulpes vulpes* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). (*) valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....33

Figura 16. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 848 caracteres de 39 taxones de ZDHHC16 (ADNn). La especie hermana *Puma concolor* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). (*) valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.....35

Índice de anexos

Anexo 1. Haplotipos y origen de secuencias reportadas en NCBI.....	57
Anexo 2. Matriz considerada en los análisis filogenéticos con secuencias obtenidas en el presente trabajo con negritas y de NCBI.....	59
Anexo 3. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen COI de secuencias de los zoológicos de México.....	62
Anexo 4. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen D-loop de secuencias de los zoológicos de México.....	62
Anexo 5. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen D-loop de secuencias NCBI los números en amarillo son iguales a los de México.....	63
Anexo 6. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen DRB1 de secuencias de los zoológicos de México.....	63
Anexo 7. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen ZDHHC16 de secuencias de los zoológicos de México.....	64
Anexo 8. Red de haplotipos de MJN para el gen COI, que muestra las relaciones de los individuos de <i>C. latrans</i> , basado en 653 pb de las secuencias concatenadas de gen COI. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de MX.....	64
Anexo 9. Red de haplotipos de MJN para el gen D-loop, que muestra las relaciones de los individuos de <i>C. latrans</i> , basado en 478 pb de las secuencias concatenadas del gen D-loop. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de MX.....	65
Anexo 10. Red de haplotipos de MJN para el gen DRB1, que muestra las relaciones de los individuos de <i>C. latrans</i> , basado en 192 pb de las secuencias concatenadas de gen DRB1. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en los 2 polígonos podemos observar las muestras de los zoológicos de MX.....	66
Anexo 11. Red de haplotipos de MJN para el gen D-loop, que muestra las relaciones de los individuos de <i>C. latrans</i> , basado en 478 pb de las secuencias concatenadas del gen D-loop. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI y del Dr. Benjamín N. Sack...	67

RESUMEN

Los cánidos (Canidae) son una familia de mamíferos donde están agrupados los perros, lobos, coyotes y afines, incluyendo 35 especies (spp) en el mundo. México cuenta con 4 spp, de la cual el Coyote (*Canis latrans*) es una de estas especies que se encuentra altamente relacionada con el lobo (*Canis lupus*), siendo la especie con mayor distribución de América, desde Alaska hasta Panamá. En la República Mexicana se han reportado 10 subespecies de las 19 existentes en el mundo; sin embargo, aún no se han hecho estudios moleculares que lo confirmen. Taxonómicamente se descarta esta clasificación por el entrecruzamiento y localización de los individuos debido a que es una especie muy prolífera. El uso de marcadores moleculares como Citocromo Oxidasa I (COI) y Región Control (CR) del ADN mitocondrial (ADNmt) nos permite la identificación y caracterización de especies. En este trabajo, se analizó la diversidad genética y las relaciones filogenéticas de los coyotes mediante el uso de marcadores moleculares del ADNmt [Citocromo oxidasa I (COI), Región Control (CR)], y del ADN nuclear (DRB1 y ZDHHC16) ya que son los más reportados para la especie. El objetivo fue analizar la diversidad genética y filogenia de la especie *Canis latrans* presentes en los zoológicos de México, obtenidas de muestras de sangre de 23 individuos. Se identificó una alta diversidad genética, encontrándose que los coyotes de México tienen una diversidad nucleotídica y haplotípica alta para los genes COI, D-loop y DRB1, además que se encontraron nuevos haplotipos para *C. latrans* en los cuatro genes estudiados, asimismo en los análisis filogenéticos. Este trabajo representa una estrategia útil para la investigación de especies poco estudiadas, las cuales no necesariamente tienen que estar en algún estatus de amenazado o en peligro.

Palabras clave: *Canis latrans*, ADNn, ADNmt, zoológicos, México.

ABSTRACT

The Canidae are a family of mammals that include dogs, wolves, coyotes and others, including 35 species (spp) worldwide. Mexico has 4 spp, of which the Coyote (*Canis latrans*) is one of these species that is highly related to the wolf (*Canis lupus*), being the species with the greatest distribution in America, from Alaska to Panama. In the Mexican Republic, 10 subspecies of the 19 existing in the world have been reported; however, no molecular studies have yet been done to confirm this. Taxonomically, this classification is discarded due to the interbreeding and location of individuals because it is a very prolific species. The use of molecular markers such as Cytochrome Oxidase I (COI) and Control Region (CR) of mitochondrial DNA (mtDNA) allows us to identify and characterize species. In this work, the genetic diversity and phylogenetic relationships of coyotes were analyzed by using mtDNA molecular markers [Cytochrome oxidase I (COI), Control Region (CR)], and nuclear DNA (DRB1 and ZDHHC16) since are the most reported for the species. The objective was to analyze the genetic diversity and phylogeny of the *Canis latrans* species present in Mexican zoos, obtained from blood samples of 23 individuals. A high genetic diversity was identified, finding that coyotes from Mexico have a high nucleotide and haplotype diversity for the COI, D-loop and DRB1 genes, in addition to finding new haplotypes for *C. latrans* in the four genes studied, identified in the phylogenetic analyses. This work represents a useful strategy for the investigation of understudied species, which nevertheless have to be in some state of threatened or endangered.

Keywords: *Canis latrans*, nDNA, mtDNA, zoos, Mexico.

1. INTRODUCCIÓN

Los cánidos son una familia de mamíferos carnívoros que agrupa a 35 especies, México cuenta con cuatro (Ceballos, 2014); el lobo gris mexicano (*Canis lupus baileyi*), la zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), el zorro del desierto (*Vulpes macrotis*) y el coyote (*Canis latrans*).

1.1. Historia natural de *Canis latrans*

El coyote es un perro salvaje de la familia de los cánidos de tamaño mediano con longitud total de 107.5 a 115 cm y un peso de 8 a 16 Kg, en los años 70's la esperanza de vida en cautiverio era de 18 años, mientras que en vida silvestre es de 8 años (Bekoff, 1977). Estudios recientes reportan que llegan a vivir 16 años en vida silvestre y bajo el cuidado humano alcanzan los 21 años (Sillero-Zubiri *et al.* 2004). Esta especie tiene amplia distribución geográfica que abarca desde Alaska hasta Panamá, representada con 19 subespecies diferenciándose en su morfometría, tamaño y peso entre ellas (Hall, 1981), siendo una especie social con patrones de actividad crepuscular, es monógama con un periodo de reproducción de enero hasta abril. Su alimentación es generalista con variaciones estacionales. Dentro de los ecosistemas en áreas rurales, causa pérdidas económicas especialmente en ganaderías. Habita en planicies con matorral xerófilo y pastizales. Se encuentra desde el nivel del mar hasta 3000 msnm. En el norte de México se le cataloga como abundante y en ocasiones como plaga, aunque no existen datos de tendencia poblacional. En zonas boscosas y tropicales son menos abundantes (Ceballos, 2014).

1.2. Taxonomía

Reino: Animalia
Filo: Chordata
Subfilo: Vertebrata
Clase: Mammalia
Orden: Carnivora
Suborden: Caniformia
Familia: Canidae
Género: *Canis*

Especie: *C. latrans* Say, 1823

Subespecies de México: *C. l. cagottis* (Hamilton-Smith, 1839),
C. l. mearnsi Merriam, 1897,
C. l. microdon Merriam, 1897,
C. l. peninsulae Merriam, 1897,
C. l. vigilis Merriam, 1897,
C. l. clepticus Elliot, 1903,
C. l. impavidus J.A.Allen, 1903,
C. l. golmani Merriam, 1904,
C. l. texensis V. Bailey, 1905,
C. l. jamesi Townsend, 1912.

Hall (1981) describe que en México existen 10 subespecies, aunque debido a que los individuos son más móviles actualmente y han aumentado su capacidad de dispersión y al entrecruzamiento, se considera que puede ser impráctico el uso de está clasificación (Bekoff y Wells, 1980).

En México, existen estudios moleculares relacionados con la agricultura, la medicina, la conservación, la biotecnología y la genómica. Particularmente, en mamíferos se ha estudiado a los pinnípedos, manatíes, cetáceos, roedores y murciélagos (Piñero, 2008). Sin embargo; no se conoce con exactitud el grado de variación y diversidad genética de la mayoría de las poblaciones de especies de mamíferos en vida silvestre (Lorenzo *et al.* 2008).

1.3. Importancia de la genética en los zoológicos

El reconocimiento de la importancia del manejo genético comenzó en la década de los 70's. La fundación del Sistema Internacional de Inventario de Especies (ISIS por sus siglas en inglés), cuenta en su acervo con una base de datos computarizada sobre animales de zoológicos (Seal *et al.* 1977), así como la publicación de varios artículos que abogaron por el manejo genético y demográfico (Flesness, 1977; Foose, 1977; Seal y Flesness, 1978), los cuales fueron fundamentales para llamar la atención sobre los problemas de consanguinidad de las poblaciones pequeñas. El ISIS enfatizó la necesidad de mantener registros precisos, compartir información entre zoológicos y administrar poblaciones combinadas. El análisis de los registros de reproducción de los zoológicos subrayó la necesidad del manejo genético al demostrar que las tasas de mortalidad de crías

endogámicas excedían a las de crías no endogámicas en una variedad de mamíferos en el Parque Zoológico Nacional (NZP por sus siglas en inglés) en Washington D.C. de 1920 a 1984 (Ralls y Ballou, 1983).

En consecuencia, acciones como evitar la endogamia y mantener la diversidad genética dentro de las poblaciones bajo el cuidado humano se ha convertido en una prioridad para los zoológicos y acuarios (Ralls y Ballou, 1986; Soulé *et al.* 1986). La mayoría de los zoológicos en Estados Unidos de América han estado manejando cuidadosamente las poblaciones bajo el cuidado humano para maximizar el tamaño efectivo de la población y minimizar la endogamia mediante el intercambio de animales; sin embargo, con el espacio limitado disponible en los parques zoológicos y unidades de conservación, incluso las poblaciones cuidadosamente manejadas han experimentado cierto nivel de endogamia (Lacy *et al.* 1993; Ballou, 1997; Reed *et al.* 2002).

El objetivo de gestión de los zoológicos ha evolucionado desde albergar y exhibir una colección de especies tan diversa como sea posible, a crear poblaciones bajo el cuidado humano autosuficientes que algún día puedan una fuente para repoblar poblaciones silvestres (Ralls y Ballou, 1986; Soulé *et al.* 1986); sin embargo, un obstáculo para lograr una población bajo el cuidado humano autosuficiente es el espacio limitado para mantener poblaciones suficientemente grandes para evitar los impactos negativos de la endogamia y la pérdida de la variabilidad (Norton y Ashley, 2004).

Actualmente, la estrategia de manejo genético basado en minimizar o eliminar la endogamia se esta aplicando con éxito en algunas especies de zoológicos y en acuarios; sin embargo, se deben establecer estrategias precisas para manejar adecuadamente cualquier tipo de organismo de los cuales, además de los registros o fichas de ingreso, se incorporen datos de ADN para establecer el parentesco mediante redes de haplotipos, las relaciones evolutivas a través de análisis filogenéticos y con ello establecer las distancias genéticas, que permitan establecer diseños de esquemas de reproducción dirigida evitando la consanguinidad y la expresión de genes recesivos que pudieran comprender la viabilidad de la especie (Leus *et al.* 2011).

En este sentido, es preciso señalar que respecto al coyote (*Canis latrans*) incluso otras especies de zoológicos en México existen pocos datos disponibles sobre el tamaño y la estructura de las poblaciones silvestres ya que no se presenta en un estatus amenazado, lo que hace más difícil evaluar el impacto potencial de mezclar individuos que descienden de diferentes regiones de su distribución geográfica. Por ello se utilizó a *C. latrans* como modelo biológico para evaluar la diversidad genética y filogenia de la especie *Canis latrans* presentes en poblaciones bajo el cuidado humano de los zoológicos de México, haciendo uso de diversos marcadores y técnicas moleculares que se describen a continuación.

1.4. Marcadores moleculares estudiados en *Canis*

Los marcadores moleculares son segmentos del ADN con una ubicación física identificable (Locus) en un cromosoma y cuya herencia genética se puede rastrear. El ADN mitocondrial (ADNmt) es el marcador genético más utilizado en análisis moleculares presentando 37 genes a lo largo de una molécula circular cerrada en los animales. Dos de estos genes codifican para ARN ribosomal (12S y 16S), 22 codifican diferentes moléculas de ARN de transferencia (ARNt), y 13 codifican subunidades de proteínas que colaboran el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa para generar energía celular (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, COI, COII, COIII, Cyt b, ATPasa6 y ATPasa8). La molécula también incluye una región control (CR o D-Loop) donde se inicia la replicación del ADNmt. La replicación es asíncrona con las dos cadenas H y L, y es frecuente, de tal modo que cientos o miles de copias de ADNmt se encuentran normalmente en las mitocondrias de cada célula somática o germinal de un individuo (Avise, 2009).

Entre los marcadores moleculares del ADNmt más utilizados en mamíferos se encuentra: el gen molecular citocromo oxidoreductasa subunidad b (Cytb) que es utilizado en la comparación de las relaciones de congéneres siendo el más utilizado en la sistemática de mamíferos por ser es un gen estable (Bradley y Baker, 2001). El gen Cytb está codificado por la cadena H del ADNmt, mide 1140 pares de bases (pb), codifica un promedio de 380 aminoácidos y el producto proteico es parte del complejo III de la cadena de electrones de la membrana interna mitocondrial. El

Cytb es la única proteína de la membrana celular que no interactúa con ninguna proteína nuclear (Scotto, 2006). La región control (D-loop) es una secuencia no codificadora con un tamaño de 1100 nucleótidos aproximadamente. El D-loop funciona como el lugar de inicio de la transcripción de la cadena H del ARNmt presentando secuencias homólogas entre diferentes especies (Scotto, 2006). El gen ribosomal 12S, el cual se encuentra flanqueado por los genes de fenilalanina y valina en mamíferos (Allard y Honeycutt, 1992) con un tamaño aproximado de 950 pb (Lavergne *et al.* 1996).

En el ADN nuclear (ADNn) se han estudiado genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) considerado el mecanismo de defensa contra patógenos y parásitos más importantes en vertebrados (Hedrick *et al.* 2000). Por su alta diversidad, los alelos del gen MHC clase II DRB1 han sido descritos en varios linajes de lobo, coyote y en híbridos de especies del género *Canis* (Hedrick *et al.* 2000). Debido a la importancia del coyote en los ecosistemas de Estados Unidos, recientemente se describió el gen ZDHHC16. Es un locus atípico, que tiene funciones putativas relacionadas con el desarrollo ocular, la respuesta celular al daño del ADN, el desarrollo del corazón y la palmitatodilación proteica, siendo monomórfico en las poblaciones históricas, pero polimórfico en poblaciones con expansión reciente (Heppeneimer *et al.* 2018).

1.5. Diversidad y diferenciación genética

Los análisis moleculares contribuyen en la elaboración de la diversidad genética, diferenciación de especies y de poblaciones y en la filogenia de las especies. Los marcadores mitocondriales están dirigidos en su mayoría a resolver problemas filogenéticos (Pumo *et al.* 1998; Bradley y Baker, 2001; Hooper *et al.* 2008; Clare *et al.* 2011). Las variantes o haplotipos del ADN mitocondrial (ADNmt) registran la historia matrilineal de eventos mutacionales y pueden conectarse filogenéticamente, el cual puede a su vez sobreponerse a la distribución geográfica del grupo de estudio, a fin de interpretar los procesos evolutivos responsables de la distribución actual de la especie o grupos de especies (Avice, 2000). Esta es la base

para posteriores estimaciones de flujo y deriva génica que afectan la variabilidad en las poblaciones.

Para la identificación de especies se emplean secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) tales como el Barcoding, que es un sistema en el cual se emplea un fragmento del gen de Citocromo oxidasa I (Hebert *et al.* 2003); de esta manera, se facilita la identificación precisa de especies o unidades filogenéticas para manejo (ej. subespecies o poblaciones), lo cual puede contribuir de manera importante a lograr objetivos de conservación como el realizar inventarios, construir índices de biodiversidad a diferentes escalas y detectar el tráfico ilegal de especies (Allendorf y Luikart, 2007).

A pesar de la limitada disponibilidad de datos moleculares para mamíferos en México, existen avances en diversos grupos, principalmente en roedores de la vertiente del Pacífico Norte, Occidente y el Norte, Centro y Golfo de México (Riddle *et al.* 2000; Tiemann-Boege *et al.* 2000), murciélagos en la vertiente del Pacífico Norte, Occidente, Pacífico Sur, y el Centro, Golfo de México y Sureste (Redondo *et al.* 2008), así como para felinos en la vertiente del Pacífico Norte, Occidente y el Golfo de México y Sureste (Eizirik *et al.* 2001; Monterrubio-Rico *et al.* 2012). Mientras que en el caso de los coyotes no hay estudios moleculares para la República Mexicana solo de morfometría (González, 2004).

1.6. Sistemática molecular de la familia Canidae

Algunos estudios realizados previamente, Drago y Honeycutt (1997) realizaron una sistemática molecular del orden de los Carnívoros donde utilizaron las regiones Cyt-b, 12S y 16S hicieron análisis filogenéticos, distancias genéticas, demostrando que los cánidos son el grupo ancestral en el suborden Caniformia con individuos de Estados Unidos de América (USA).

En otro estudio (Wayne *et al.* 1997), realizaron una sistemática molecular de la familia Canidae utilizando las regiones Citocromo b (Cyt-b), citocromo oxidasa I (COI) y citocromo oxidasa II (COII), utilizando análisis filogenéticos (Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud (ML) y Neighbor-Joining (NJ) y distancias genéticas, encontraron que el lobo gris, el coyote y el chacal son un grupo

proveniente de un mismo ancestro en común (monofilético) con individuos de Sudamérica.

En cuanto a Naidu *et al.* (2012) hicieron nuevos oligonucleótidos para la secuenciación completa del gen mitocondrial Cyt-b en mamíferos, para las especies de cánidos obtuvieron 4 especies (*Canis lupus familiaris*, *C. l. baileyi*, *Urocyon cinereoargenteus* y *Vulpes macrotis*).

Por otro lado, Amaike *et al.* (2018) realizaron una evaluación genética de la población del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) en la isla de Hokkaido, Japón, examinaron los genotipos del exón 2 del gen DRB1 de la clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) analizaron 232 individuos e identificaron 17 alelos nuevos. La subpoblación en el área del sur se diferenció genéticamente de todas las demás áreas además de que tiene menor diversidad genética, posiblemente como resultado de una selección y/o un cuello de botella reciente. Adicionalmente, los mismos autores, mostraron la variabilidad local y la presencia de selección en el gen MHC en esta población, lo que contribuye a la comprensión de los antecedentes históricos y la evolución molecular.

En otro estudio Pang *et al.* (2009), hicieron una revisión del origen del perro doméstico en al sur del río Yangtze utilizaron la CR para hacer análisis filogenéticos con los métodos de máxima verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) y de vecinos cercanos (NJ, por sus siglas en inglés) y redes de haplotipos usando al coyote como grupo externo sin indicar el origen de este.

Previamente Vila *et al.* (1997) realizaron análisis de la región control (CR) en secuencias de lobos, perros domésticos y semejantes para saber el origen del perro doméstico, para coyotes se encontró una divergencia genética de 0.075 a 0.002 encontraron que su separación fue hace un millón de años aproximadamente utilizando individuos de USA.

Adicionalmente, Björnerfeldt *et al.* (2006) realizaron una revisión de la domesticación del perro, donde utilizaron la región mitocondrial CR, haciendo análisis de ML, NJ e Inferencia Bayesiana (IB) y utilizando al coyote como grupo externo con dos individuos de USA, encontrando un valor de soporte de 1 entre los clados de *Canis*.

Por otro lado, Heppeneimer *et al.* (2018) realizaron una evaluación de dos frentes de expansión de coyotes recientes y distintos hacia el Este de USA, para investigar patrones de diversidad genómica e identificar variantes que pueden haber estado en bajo selección durante su expansión. Usando una secuenciación de ADN asociada a la restricción (RADseq) de 394 individuos con 22,935 SNP descubrieron que la estructura general de la población correspondía a su rango histórico del siglo XIX y dos poblaciones distintas que se expandieron durante el siglo XX observando evidencia mínima de una diversidad genómica entre los coyotes, lo que probablemente sea hibridación con otras especies del género *Canis*. Además, identificaron 12 SNP, ubicados dentro de genes o regiones reguladoras putativas, que se asocian consistentemente con su rango de expansión. También observaron que el alelo de menor frecuencia del locus ZDHHC16 estaba ausente del rango histórico, pero presente en frecuencias apreciables, tanto en poblaciones recientemente expandidas.

Igualmente, Heppeneimer *et al.* (2018) dió a conocer tres explicaciones generales para el origen de esta variante en las poblaciones de coyotes orientales: 1) la mutación estaba presente en el rango histórico, pero a una frecuencia extremadamente baja que no fue capturada en el muestreo, 2) se produjo una mutación de *novo*, ya sea convergentemente a lo largo de ambos frentes de expansión, o a lo largo de una fuente y luego fue transferido a través de flujo genético interespecífico, o 3) este alelo introgresado de una especie de *Canis* estrechamente relacionada después de un evento de hibridación y posteriormente fue transferido a través del flujo genético, pudiendo ser que un caso adicional de introgresión adaptativa. En general, los estudios de cánidos se han realizado para ordenar la familia y las especies (Wayne *et al.* 1997), así como la ancestría del perro doméstico (Vila *et al.* 1997), en la mayoría de los trabajos que incluyen a *C. latrans* lo consideran como grupo externo (Vila *et al.* 1997), además en la mayoría de estudios los individuos son de Estados Unidos de América (Dragoo y Honeycutt 1997; Björnerfeldt *et al.* 2006; Bidlack *et al.* 2007) y Canadá (Hopken *et al.* 2016) algunos solo dicen Norteamérica (Koepfli *et al.* 2015) mientras que en otros no se demuestran de donde fueron colectadas las muestras (Pang *et al.* 2009; Thalmann

et al. 2013). Para el conocimiento de la sistemática de coyotes esto es un limitante ya que no se tiene información exacta para el país. Aunque es una especie con amplia distribución, siendo de los animales tope en la cadena trófica, se ha dado poca importancia a su estudio.

El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad genética y filogenia de la especie *Canis latrans* presentes en poblaciones de los zoológicos de México.

2. HIPÓTESIS

Los individuos de la especie *Canis latrans* en los zoológicos de México, presentan una alta diversidad genética.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Analizar la diversidad genética y filogenia de la especie *Canis latrans* presentes en los Zoológicos de México.

3.2. Objetivos específicos

1. Analizar la diversidad genética de la especie de *Canis latrans* de los Zoológicos de México empleando diferentes marcadores moleculares de ADNmt (CR y COI) y ADN nuclear (DRB1 y ZDHHC16).
2. Establecer los análisis de haplotipos con los marcadores moleculares de ADNmt (CR y COI) y ADN nuclear (DRB1 y ZDHHC16), en *Canis latrans* de los zoológicos de México.
3. Determinar, mediante los análisis filogenéticos, la relación de individuos de *Canis latrans* de los zoológicos de México.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material biológico

Se analizaron secuencias del ADNmt (CR y COI), y ADNn (DRB1 y ZDHHC16), obtenidas de muestras sangre de individuos de la especie *Canis latrans*, que fueron

colectados a partir de individuos de zoológicos georreferenciados de la República Mexicana (Tabla 1 y Figura 1). Adicionalmente se realizó una búsqueda de las secuencias reportadas en base de datos del GenBank-NCBI para la obtención de secuencias reportadas de la especie.

Tabla 1. Nombre, ubicación y número de individuos de coyotes, presentes en los zoológicos de México

No.	Zoológicos de México	Posible subespecie	Municipio	Estado	No. individuos
1	Zoo. Guadalajara (ZooGDL)	<i>C. l. impavidus-vigilis</i>	Guadalajara	Jalisco	3
2	Zoo. Morelia Parque Benito Juárez (ZooMor)		Morelia	Michoacán	3
3	Mundo Granjero y Zoológico (MGZ)	<i>C. l. catottis-vigilis</i>	Contepec	Michoacán	4
4	Zoo. Moroleón áreas verdes (ZooMLeon)		Moroleón	Guanajuato	3
5	Zacango (Z)	<i>C. l. catottis</i>	Calimaya	EdoMex	2
6	Zoo. El Ocotil (EO)		San Andrés Timilpan	EdoMex	2
7	Zoo. Nuevo Laredo (ZooNL)	<i>C. l. microdon-texensis</i>	Nuevo Laredo	Tamaulipas	3
8	Parque Ecológico la Encantada (PELE)	<i>C. l. impavidus-mearnsi-vigilis</i>	Zacatecas	Zacatecas	3
Total					23



Figura 1. Distribución geográfica de los zoológicos de México que presentan individuos de *C. latrans* y fueron utilizados para este proyecto.

4.1.1. Material para la toma de muestra

Hielera convencional con gradilla	Liga hemostática
Hielo o Gel refrigerante	Lazos
Jeringas de 3 ml con aguja gris No 22, 32 mm	Rasuradora inalámbrica Plumón permanente
Equipo Vacutainer (Agujas No 21, 1.5", Camisa, Tubos EDTA)	Libreta de campo Lápiz
Torundas de Algodón con Alcohol	

4.1.2. Procedimiento

Los ejemplares de cada zoológico que se sometieron a muestreo, con previo ayuno de 12 h. Se verificó el estado físico de cada individuo y se registraron los datos en un cuaderno de campo y se rotuló el tubo vacutainer de cada ejemplar (Tabla 2).

Tabla 2. Datos de los individuos de los zoológicos de México Se muestra un ejemplo de la muestra ZooMor1 del zoológico de Morelia.

Zoológicos	Etiqueta	Sexo	Edad aprox.	Historia
Zoo Morelia	ZooMor1	M	4 años	Decomiso de Profepa

La inmovilización de los ejemplares se realizó mediante contención física y la muestra sanguínea se colectó de la extremidad anterior derecha, previo higiene, rasurado y desinfección para la punción de la vena cefálica, y con un tubo vacutainer (BD, USA) se colectaron 4 ml de sangre. Las muestras de sangre fueron colocadas en un medio con refrigerante para su traslado al laboratorio y posterior análisis filogenéticos. Adicionalmente, de cada individuo se registró una medida longitudinal (cm), el peso (kg) y la presencia de ectoparásitos. La estandarización para la PCR se realizó en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en Reynosa, Tamaulipas.

4.2. Extracción de ADN

A partir de muestras colectadas, se tomaron 300 microlitros (μ l) de sangre con EDTA colocándolo en un microtubo de 1.5 ml, la extracción de ADN genómico

total se realizaron por medio de kit Mammalian Genomic DNA Extraction Kit (Sigma G1N350, USA).

4.3. Electroforesis

Para verificar la calidad de ADN, las muestras se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con SyBr Gold, en TBE 1X (Tris-borato 0.040 M, EDTA 0.001 M a pH 8), aplicando una corriente de 80 Volts durante 60 minutos (min).

4.4. Cuantificación

Para hacer la cuantificación del ADN, se colocó 1 µl de la extracción del ADN en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

4.5. Amplificación de ADN por Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En las reacciones para la amplificación de ADN por PCR se utilizaron juegos de oligonucleótidos reportados previamente para amplificar el marcador mitocondrial CR, COI y DRB1 (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los iniciadores reportados para la región D-loop, DRB1 y COI. Tm ali= Temperatura de alineamiento, % GC= porcentaje de Guanina y Citosina y pb= pares de bases.

Referencia	Región	Sentido 5' a 3'	Primer	Nombre del haplotipo	Tm ali.	%GC	pb
Rashleich <i>et al.</i> , 2008	D-loop	Forward	TATATTGAATCACCCCTACTGTG	CalaCRF	35	43	533
		Reverse	GGCATATYCCCTGAGAGCAG	CalaCRR			
Hedrick <i>et al.</i> , 2000	DRB1	Forward	AAGTCCGAGTGCTATTTACC	DM1	57	63	249
		Reverse	TCGCCGCTGCACCGTGAAGCT	DM2			
	COI	Forward	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	FishF2	54	43	704

Las concentraciones de los diferentes reactivos que se utilizaron para la PCR se muestran en la tabla 4 donde se utilizó un total de 15 μ l para cada muestra.

Tabla 4. Reactivos con su concentración y volumen que se utilizaron para las PCR.

Reactivos	Volumen
H ₂ O _{miliQ}	9.775 μ l
Buffer PCR 5X	1 μ l
MgCl ₂ 3 mM	1.2 μ l
dNTPs 200 μ m	0.4 μ l
Oligos 0.2 pmol directo y reverso	0.3 μ l + 0.3 μ l
ADN 50	2 μ l
God Taq DNA polimerasa 0.125 U	0.025 μ l
Total	15 μl

Las condiciones utilizadas en las amplificaciones consistieron en 5 min a 95 °C, seguido de 5 ciclos de desnaturalización 45 segundos (seg) a 95° C, alineamiento 45 seg a 62° C disminuyendo 2° C cada ciclo, extensión 1.5 min a 72° C seguido de 30 ciclos de desnaturalización 45 seg a 95° C, alineamiento 45 seg a 55° C, extensión 1.5 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72° C, incubando a 16° C por 5 min. Para llevar a cabo la reacción, las muestras se colocaron en un termociclador MJ Research DNA engine TETRAD2 (Bio-Rad). Los productos de amplificación se revisaron por medio de electroforesis con las condiciones antes mencionadas.

4.6. Secuenciación

La secuenciación del ADN se realizó por el método de dideoxy (Sanger *et al.* 1977), mediante el sistema comercial ABI TaqMan 7500 (Thermofisher) a través de la empresa comercial Eurofins Genomics USA.

4.7. Análisis de diversidad genética

Las secuencias de ADN se editaron y alinearon con el programa Bioedit v7.2.6 (Hall, 1999). Posteriormente, para la obtención del número de sitios polimórficos, sitios invariables y sitios parsimoniosamente informativos se utilizó el programa DnaSP v6.0.76 (Rozas, 2017).

Para cada gen se utilizó la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (Pi) según las fórmulas de Nei (1987):

$$h = \frac{n(1 - \sum x_i)}{n - 1}$$

$$Pi = \frac{n}{n - 1} \sum_{ij} x_i x_j d_{ij}$$

Donde:

n = número total de individuos en la población.

x_i = la frecuencia en la población de la secuencia i -ésima.

x_j = la frecuencia en la población de la secuencia j -ésima.

d_{ij} = el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre las secuencias i -ésima y j -ésima.

Para el cálculo de diversidad genética, se incluyeron secuencias de coyotes de los zoológicos de los Estados Unidos Mexicanos (MX) obtenidas en este estudio y secuencias reportadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) utilizando solo una parte del haplotipo como referencia y poder hacer la comparación (Anexo 1). Para el gen COI se analizaron 16 secuencias de MX y 8 secuencias de Canadá y USA (16 MX / 8 CA y USA), en D-loop (22 MX / 64 USA), en DRB1 (18 MX / 10 USA) y en ZDHHC16 únicamente se utilizaron 19 secuencias de los zoológicos de MX, ya que no se encontró ningún registro en el NCBI.

La información depositada en NCBI, acerca de la diversidad haplotípica y nucleotídica de *C. latrans*, fue limitada en algunos aspectos como número de muestras y secuencias analizadas por los autores para los diferentes genes

utilizados, por ello, la información obtenida de las secuencias correspondiente al gen D-loop de las muestras analizadas en el presente estudio, fue comparada con la información proporcionada directamente por los autores señalados en la tabla 5.

Tabla 5. Haplotipos encontrados por distintos autores. Información tomada del NCBI con modificaciones.

Gen	No. Access	n	Haplotipo	Autor	Lugar	Haplotipo NCBI	Origen NCBI
D-loop	AY172675.1	1	D-loop_hap1	Kim <i>et al.</i> , 2011	Corea	haplotipo 2	completo
	AY172674.1	1	D-loop_hap2			haplotipo 1	completo
	JX987491.1	1	D-loop_hap3	Wengert <i>et al.</i> , 2013	California y Nebraska EUA	mitocondrial	parcial
	AF098154.1	1	D-loop_hap4	Koop <i>et al.</i> , 1998	-	clone Coyote16	parcial
	KF661096.1	1		Thalmann <i>et al.</i> , 2013	EUA	isolate coyote1	parcial mitocondrion
	AF098153.1	1	D-loop_hap5	Koop <i>et al.</i> , 1998	-	clone COYOTE14	parcial

4.8. Análisis redes de haplotipos

Para la red de haplotipos se consideró una matriz de datos constituida con las secuencias para cada uno de los genes Cytb, COI, DRB1 y ZDHHC16. El número de unidades taxonómicas operativas (OTUs) generado fue cada una de las secuencias obtenidas en el presente trabajo para los haplotipos únicos pertenecientes a la especie *Canis latrans* para los genes COI, DRB1, D-loop y ZDHHC16, además de secuencias reportadas en el banco de datos NCBI (Anexo 1 y 2). La relación entre los haplotipos fue determinada mediante la construcción de redes de haplotipos bajo el método Median Joining Network (MJN) con el Software PopART v1.7 (Leigh y Bryant, 2015).

4.9. Análisis filogenéticos

Para realizar las reconstrucciones filogenéticas se consideró una matriz de datos constituida para cada uno de los genes: 26 (OTUs) y 653 caracteres del gen COI, 75 OTUs y 478 caracteres del gen D-loop, 35 OTUs y 192 caracteres del gen DRB1, 39 OTUs y 848 caracteres del gen ZDHHC16 (Tabla 5). El número de OTUs comprendió todas las secuencias obtenidas en el presente trabajo y haplotipos únicos pertenecientes a la especie *Canis latrans* para los genes COI y D-loop, mientras que el gen DRB1 se considero los taxones del género *Canis*, y para

ZDHHC16 los OTUs del suborden Caniformia reportadas en banco de datos (NCBI). Adicionalmente se incluyó a la especie *Canis lupus* para la matriz del gen COI (KX156588) y D-loop (MH746950), la especie *Vulpes vulpes* para el gen DRB1 (KU519432) y la especie *Puma concolor* para el gen ZDHHC16 (XM025918097), como grupo externo, también reportadas y tomadas de NCBI (Anexo 1 y 2).

Los árboles filogenéticos se construyeron mediante los métodos de probabilísticos como lo es la inferencia bayesiana (IB), así como los métodos de caracteres de Máxima Verosimilitud (ML), Neighbor-Joining (NJ) y el método de grupo de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA). Los programas utilizados fueron el jModeltest v.2.1.10 (Darriba *et al.*, 2012) para los modelos de evolución molecular y se seleccionaron utilizando los Criterio de Información Akaike (AIC) corregido (AICc) (Alfaro y Huelsenberck, 2006), el Criterio de Información Bayesiano (BIC) (Huelsenbeck, 2004), y el método decisión teórica (DT) (Minin *et al.* 2003). El modelo para COI fue TPM1uf (Kimura, 1981+ frecuencias de bases desiguales) con los criterios (AICc, BIC y DT), para D-loop, HKY+G (Hasegawa *et al.* 1985)+ distribución gamma) con los criterios (BIC y DT), para DRB1, TPM2uf+I+G (Kimura, 1981) + sitios invariables + distribución gamma) con los criterios (AICc, BIC y DT), y para ZDHHC16, TrN+I (Tamura, 1993) + sitios invariables) con los criterios (AIC y AICc). Para el gen D-loop fueron proporcionadas muestras del Dr. Benjamín N. Sacks (Unidad de Ecología y Conservación de Mamíferos/Laboratorio de Genética Veterinaria y Departamento de Salud y Reproducción de la Población, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de California, Davis, CA, USA), donde el método fue TrN+I (Tamura, 1993) + sitios invariables) con el criterios AIC, K80 (Kimura, 1980) con AICc, HKY+G (Hasegawa, 1985)+ distribución gamma) con BIC y TPM2+I (Kimura, 1981) + sitios invariables) con DT.

MEGA X (Kumar *et al.* 2018), y MrBayes v.3.2.7a (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). Los soportes de los nodos se estimaron con análisis bootstrap (BP) de 500 réplicas y con probabilidad posterior (PP). Los análisis bayesianos se corrieron con 1×10^6 generaciones usando dos Cadenas de Markov de Montecarlo (MCMC) con las opciones predeterminadas en Mr. Bayes v3.2. Los árboles se muestrearon cada

1,000 generaciones, descartando el 10% para obtener un árbol de consenso de mayoría. Para visualizar los árboles se utilizó el programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012).

4.10. Distancias genéticas

Para el cálculo de las distancias genéticas se usó el modelo K2P (Kimura 2 Parámetros) en el programa MEGA X (Kumar *et al.* 2018). La selección del modelo K2P se basó en la tasa de transiciones, la cual es frecuentemente más alta que las transversiones en ADN mitocondrial (Brown *et al.* 1982; Kumar *et al.* 1993).

5. RESULTADOS

5.1. Extracción de ADN

Se extrajo ADN genómico de 23 muestras de *C. latrans* obtenidas de diferentes zoológicos de la República Mexicana observándose ADN de buena calidad (Figura 2).

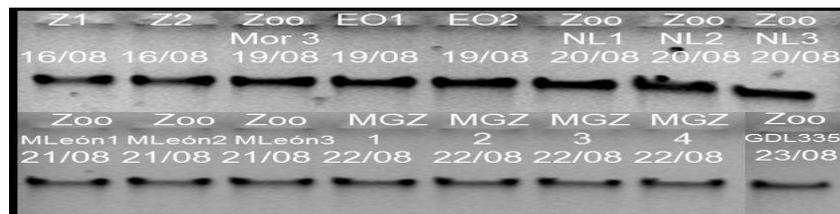


Figura 2. ADN purificado de muestras biológicas de *Canis latrans* en gel de agarosa al 1%, en TBE 1X teñidos con Sybr Gold.

5.2. Cuantificación

El resultado de la cuantificación y calidad del ADN genómico se muestra en la tabla 6. Observándose ADN de buena calidad ~ 1.8 (A260/280).

Tabla 6. Cuantificación del ADN genómico con NanoDrop 2000 de muestras sanguíneas de *Canis latrans* obteniendo una concentración mínima de 24.8 ng/ μ l en la muestra ZooNL1 y una máxima de 177.4 ng/ μ l con la muestra ZooGDL528.

#	ID de muestra	Nombre de usuario	Fecha y hora	Concentración de ácido nucleico	Unidad	A260	A280	260/280	260/230	Tipo de muestra	Factor	DNA	H ₂ O
1	ZooMor1	Estacion256	15/08/2019 11:52:48 a.m.	39.5	ng/μl	0.791	0.452	1.75	0.69	DNA	50	31.65	18.35
2	ZooMor2	Estacion256	15/08/2019 11:54:54 a.m.	46.4	ng/μl	0.928	0.488	1.9	0.97	DNA	50	26.94	23.06
1	Z1	Estacion256	16/08/2019 11:18:25 a.m.	33.7	ng/μl	0.674	0.392	1.72	0.35	DNA	50	37.09	12.91
2	Z2	Estacion256	16/08/2019 11:20:06 a.m.	29.2	ng/μl	0.583	0.356	1.64	0.42	DNA	50	42.81	7.19
1	ZooMor3	Estacion256	19/08/2019 11:10:31 a.m.	26.6	ng/μl	0.531	0.294	1.81	0.84	DNA	50	46.99	3.01
2	EO1	Estacion256	19/08/2019 11:13:53 a.m.	32.7	ng/μl	0.654	0.357	1.83	0.99	DNA	50	38.23	11.77
3	EO2	Estacion256	19/08/2019 11:15:12 a.m.	39	ng/μl	0.781	0.43	1.82	1.08	DNA	50	32.05	17.95
1	ZooNL1	Estacion256	20/08/2019 10:47:12 a.m.	24.8	ng/μl	0.497	0.271	1.83	0.8	DNA	50	50.00	0.00
2	ZooNL2	Estacion256	20/08/2019 10:49:26 a.m.	58.4	ng/μl	1.168	0.643	1.82	1.27	DNA	50	21.40	28.60
3	ZooNL3	Estacion256	20/08/2019 10:50:45 a.m.	39.4	ng/μl	0.788	0.43	1.83	1.07	DNA	50	31.73	18.27
1	ZooMLEón1	Estacion256	21/08/2019 11:13:45 a.m.	46.9	ng/μl	0.938	0.515	1.82	1.15	DNA	50	26.65	23.35
2	ZooMLEón2	Estacion256	21/08/2019 11:15:09 a.m.	48.8	ng/μl	0.976	0.56	1.74	0.84	DNA	50	25.61	24.39
3	ZooMLEón3	Estacion256	21/08/2019 11:17:22 a.m.	37.6	ng/μl	0.752	0.409	1.84	1.02	DNA	50	33.24	16.76
1	MGZ1	Estacion256	22/08/2019 11:12:42 a.m.	37.4	ng/μl	0.747	0.399	1.87	1.02	DNA	50	33.42	16.58
2	MGZ2	Estacion256	22/08/2019 11:13:54 a.m.	42.2	ng/μl	0.843	0.468	1.8	1.08	DNA	50	29.62	20.38
3	MGZ3	Estacion256	22/08/2019 11:15:14 a.m.	43	ng/μl	0.86	0.474	1.81	1.04	DNA	50	29.07	20.93
4	MGZ4	Estacion256	22/08/2019 11:17:14 a.m.	42.4	ng/μl	0.848	0.468	1.81	1.07	DNA	50	29.48	20.52
1	ZooGDL335	Estacion256	23/08/2019 10:52:04 a.m.	36.3	ng/μl	0.725	0.394	1.84	1.01	DNA	50	34.44	15.56
2	ZooGDL528	Estacion256	23/08/2019 10:53:37 a.m.	177.4	ng/μl	3.547	1.933	1.84	1.86	DNA	50	7.05	42.95
3	ZooGDL8284	Estacion256	23/08/2019 10:54:58 a.m.	152.6	ng/μl	3.052	1.659	1.84	1.81	DNA	50	8.19	41.81
1	PELE1	Estacion256	10/10/2019 11:54:30 a.m.	55.3	ng/μl	1.105	0.583	1.9	1.35	DNA	50	22.60	27.40
2	PELE2	Estacion256	10/10/2019 11:55:54 a.m.	67.4	ng/μl	1.347	0.725	1.86	1.28	DNA	50	18.55	31.45
3	PELE3	Estacion256	10/10/2019 11:57:05 a.m.	54.6	ng/μl	1.092	0.594	1.84	1.22	DNA	50	22.89	27.11

5.3. Amplificación por PCR

Se sintetizaron los iniciadores para los genes D-loop, COI, DRB1 y ZDHHC16 en la empresa Eurofins Genomics (Tabla 7), para las 23 extracciones obteniéndose un total de 92 amplicones de *Canis latrans* (Figura 3 y 4).

Tabla 7. Secuencia nucleotídica de los iniciadores reportados para la región ZDHHC16 diseñado para este trabajo. T_m ali= Temperatura de alineamiento, % GC= porcentaje de Guanina y Citosina y pb= pares de bases.

Referencia	Región	Sentido	Primer	Nombre	T _m ali.	GC	pb
Presente trabajo	ZDHHC16	F	TTGCCATTCTGTCCAGACCT	ZDHHC16F	55	48	889
		R	CTGAGCAGTAAAGACCCACCA	ZDHHC16R			

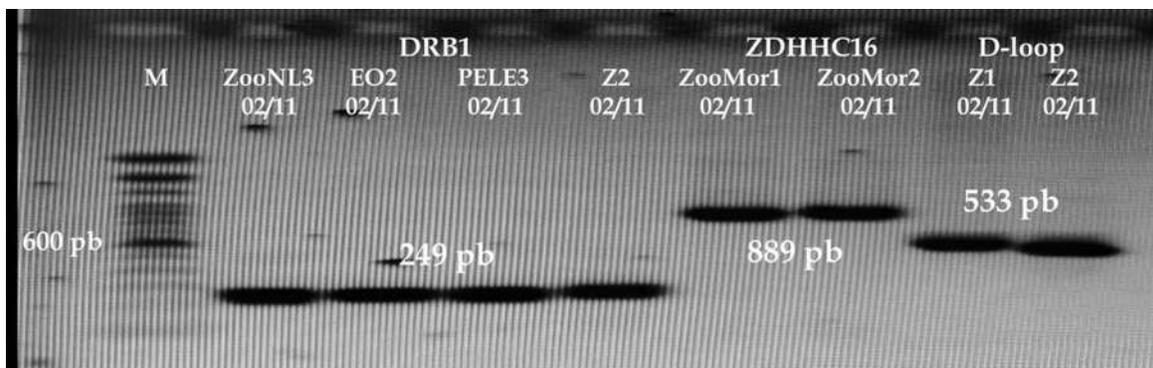


Figura 3. Amplicones de DRB1, ZDHHC16, D-loop de *Canis latrans* en gel de agarosa al 1%, en TBE 1X teñidos con Sybr Gold. M) Marcador de tamaño molecular 1Kb DNA Plus Ladder.

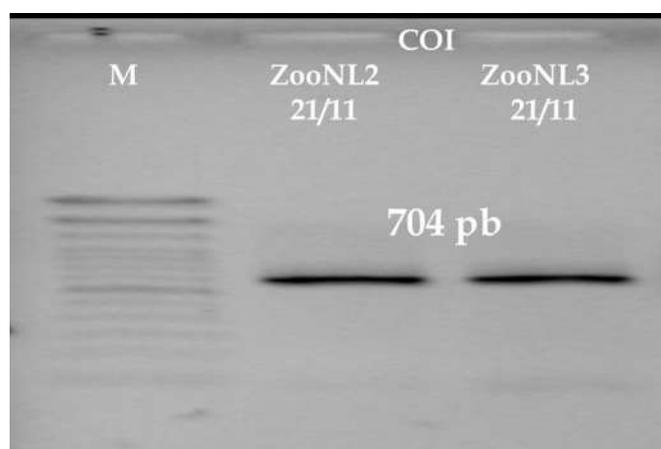


Figura 4. Amplicones de COI de *Canis latrans* en gel de agarosa al 1%, en TBE 1X teñidos con Sybr Gold. M) Marcador de tamaño molecular 1Kb DNA Plus Ladder.

5.4. Secuenciación

Se obtuvieron secuencias de los genes COI, D-loop, ZDHHC16 y DRB1 de 23 muestras de *Canis latrans* (Figura 5).

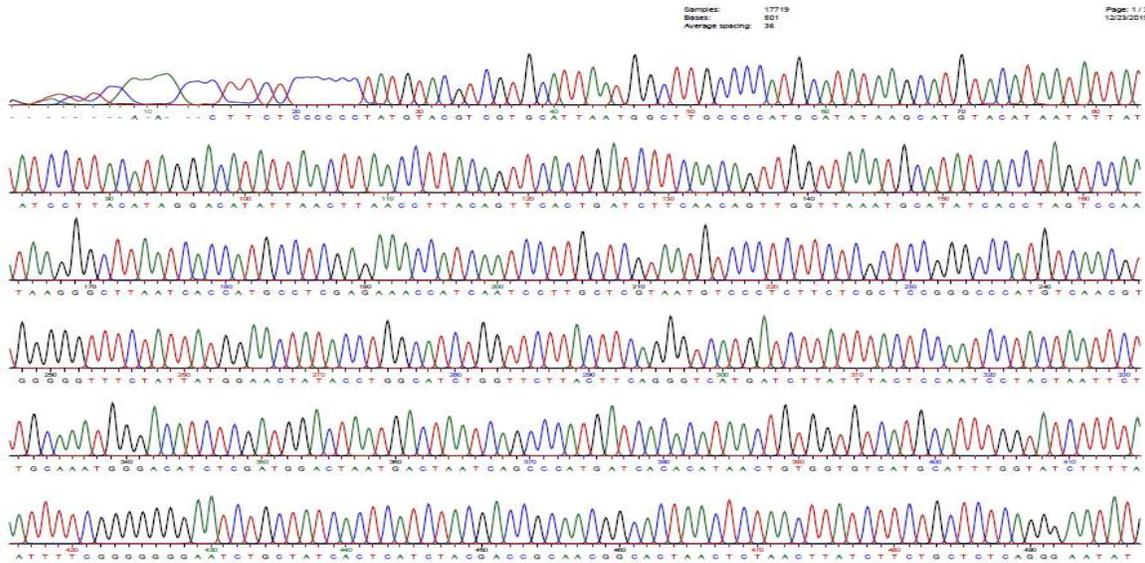


Figura 5. Electroferograma obtenido en la secuenciación de fragmentos de ADN. Se muestra un ejemplo de la muestra EO1 de la región COI de uno de los electroferogramas visualizados con el software Bioedit, en donde se compararon y editaron las secuencias de las cadenas obtenidas.

5.5. Análisis de secuencias

5.5.1. Diversidad haplotípica

Se obtuvieron un total de 16 secuencias para el gen COI, 23 secuencias para el gen D-loop del ADNmt, 18 secuencias para DRB1 y 19 secuencias para el gen ZDHHC16 del ADNn para la especie *C. latrans* presentes en los zoológicos de MX. En las muestras de los zoológicos de MX se encontraron 11 haplotipos en el gen COI, 13 haplotipos para el gen D-loop, 12 haplotipos para el gen DRB1 y 5 haplotipos para el gen ZDHHC16, mientras las secuencias y haplotipos encontrados en el NCBI fueron 6 para gen D-loop, respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Número de haplotipos de *C. latrans* de los zoológicos de MX encontrados en este trabajo para cada gen y del NCBI.

Región	Número de secuencias de los zoológicos de México	Número de haplotipos de los zoológicos de México	Número de secuencias de NCBI	Número de haplotipos de NCBI
COI	16	11	0	0
D-loop	23	13	6	5

DRB1	18	12	0	0
ZDHHC16	19	5	0	0

La frecuencia relativa que se obtuvo de cada haplotipo de los genes utilizados en el estudio para los individuos de los zoológicos de MX fue en general de 0.0625 para el gen COI, para el gen D-loop fue en un rango de 0.0435 hasta 0.1304 (Tabla 9).

Tabla 9. Número de haplotipos de los zoológicos de MX con su frecuencia absoluta (FA) y frecuencia relativa (FR).

COI_MX	FA	FR	D-loop_MX	FA	FR	DRB1_MX	FA	FR	ZDHHC16_MX	FA	FR
COI_hap 1	2	0.125	Dloop-hap1	3	0.1304	DRB1_hap1	2	0.1111	ZDHHC16_hap1	14	0.7368
COI_hap 2	4	0.25	Dloop-hap2	3	0.1304	DRB1_hap2	3	0.1667	ZDHHC16_hap2	2	0.1053
COI_hap 3	1	0.0625	Dloop-hap3	3	0.1304	DRB1_hap3	1	0.0556	ZDHHC16_hap3	1	0.0526
COI_hap 4	2	0.125	Dloop-hap4	1	0.0435	DRB1_hap4	2	0.1111	ZDHHC16_hap4	1	0.0526
COI_hap 5	1	0.0625	Dloop-hap5	1	0.0435	DRB1_hap5	2	0.1111	ZDHHC16_hap5	1	0.0526
COI_hap 6	1	0.0625	Dloop-hap6	1	0.0435	DRB1_hap6	2	0.1111	Total	19	1
COI_hap 7	1	0.0625	Dloop-hap7	2	0.087	DRB1_hap7	1	0.0556			
COI_hap 8	1	0.0625	Dloop-hap8	1	0.0435	DRB1_hap8	1	0.0556			
COI_hap 9	1	0.0625	Dloop-hap9	3	0.1304	DRB1_hap9	1	0.0556			
COI_hap 10	1	0.0625	Dloop-hap10	1	0.0435	DRB1_hap10	1	0.0556			
COI_hap 11	1	0.0625	Dloop-hap11	1	0.0435	DRB1_hap11	1	0.0556			
Total	16	1	Dloop-hap12	2	0.087	DRB1_hap12	1	0.0556			
			Dloop-hap13	1	0.0435	Total	18	1			
			Total	23	1						

La diversidad haplotípica (Hd) que presentaron los genes mitocondriales para las muestras de los zoológicos de MX, fue en el gen COI con Hd = 0.933, para el gen D-loop se obtuvo Hd = 0.945, el gen DRB1 fue de Hd = 0.954, y por último el gen ZDHHC16 se obtuvo Hd = 0.462, mientras que en las secuencias de NCBI del gen D-loop Hd = 0.933 (Tabla 10).

Tabla 10. Diversidad haplotípica (Hd) de *C. latrans* de los zoológicos de MX encontrados en este trabajo para cada gen y del NCBI.

Región	Diversidad Hd de los zoológicos de México	Diversidad Hd de NCBI
COI	0.933	0
D-loop	0.945	0.933
DRB1	0.954	0
ZDHHC16	0.462	0

5.5.2. Diversidad nucleotídica

La diversidad nucleotídica (Pi) que presentaron los genes mitocondriales para las muestras de los zoológicos de MX fueron en el gen COI con $Pi = 0.00676$, el gen D-loop se obtuvo $Pi = 0.0153$, el gen DRB1 demostró $Pi = 0.04517$, mientras que el gen ZDHHC16 presentó $Pi = 0.00109$, mientras que en las secuencias de NCBI para el gen D-loop con un valor de $Pi = 0.01897$ (Tabla 11).

Tabla 11. Valores de la diversidad nucleotípica (Pi) de *C. latrans* de los zoológicos de MX encontrados en este trabajo para cada gen y del NCBI.

Región	Diversidad Pi de los zoológicos de México	Diversidad Pi de NCBI
COI	0.00676	0
D-loop	0.0153	0.01897
DRB1	0.04517	0
ZDHHC16	0.00109	0

Los números de las posiciones polimórficas parsimoniosas (P) para las secuencias de los zoológicos de MX para el gen COI es de $P = 9$ mientras que las posiciones singletons (S) fueron $S = 11$, además de mostrar las mutaciones de transiciones (Ts's) fueron $Ts's = 16$ y transversiones (Tv's) fueron $Tv's = 4$, en el gen D-loop se presentaron un $P = 22$, presentando un $S = 5$, además de mostrar las mutaciones $Ts's = 26$ y $Tv's = 1$, el gen DRB1 se presentaron un $P = 18$, presentando un $S = 4$, además de mostrar las mutaciones $Ts's = 6$ y $Tv's = 16$ y el gen ZDHHC16 se mostró un $P = 2$, presentando un $S = 5$, además de mostrar las

mutaciones Ts's = 2 y Tv's = 5. Por otra parte, los números de las posiciones polimórficas (P) para las secuencias reportadas del gen D-loop encontradas en NCBI, presentó un P = 8, presentando un S = 14, además de mostrar las mutaciones Ts's = 21 y Tv's = 1 (Tabla 12).

Tabla 12. Número de posiciones polimórficas y mutaciones de los genes COI, D-loop, DRB1 y ZDHHC16 de los zoológicos de México.

Región	Posiciones polimórficas		Transiciones	Transversiones
	Parsimoniosas	Singletons	(Ts's)	(Tv's)
MX				
COI	9	11	16	4
D-loop	22	5	26	1
DRB1	18	4	6	16
ZDHHC16	2	5	2	5
NCBI gen				
D-loop	8	14	21	1

5.6. Análisis redes de haplotipos

Se utilizó una matriz de secuencias para cada uno de los genes y se realizaron la red de haplotipos COI (Figura 6), D-loop (Figura 7), DRB1 (Figura 8) y ZDHHC16 (Figura 9) observando que en la red de haplotipos para el gen COI se muestra una agrupación central para las muestras de México mientras que se tiene 4 separaciones de la misma con respecto a las secuencias de NCBI (Anexo 2).

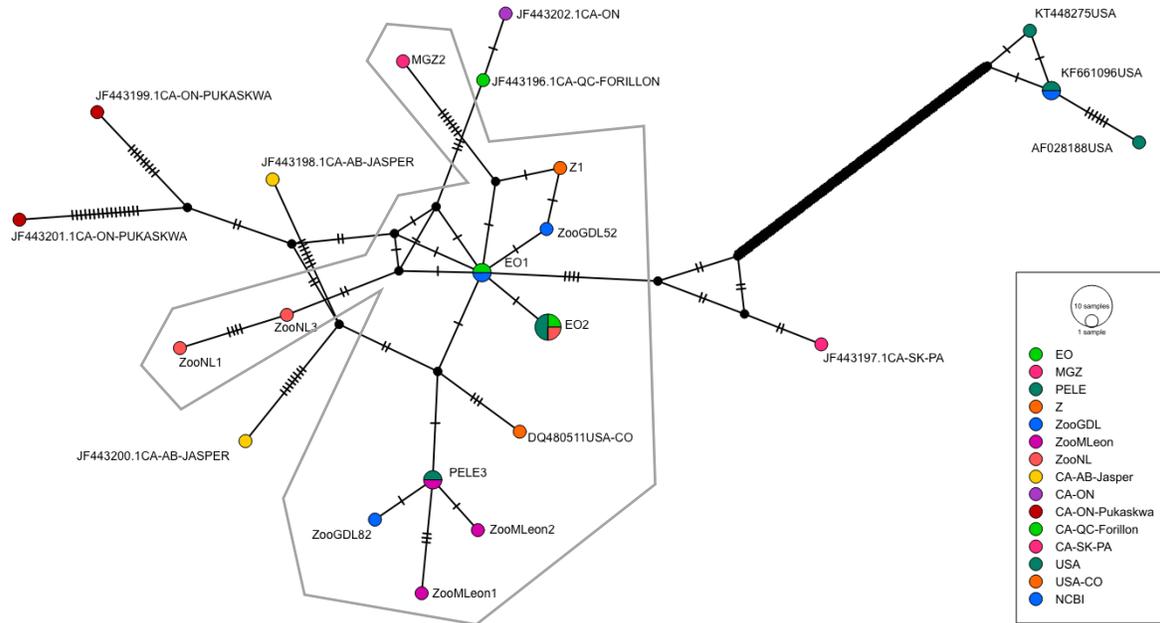


Figura 6. Red de haplotipos de MJN para el gen COI, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 653 pb de las secuencias concatenadas de gen COI. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que no fueron encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI-Bold en el anexo 2.

En la red de haplotipo para el gen D-loop (Figura 7) se utilizó una matriz de datos que comprendió 478 pb de 87 secuencias, se demuestran una red con 7 separaciones de las secuencias de México con respecto a las de NCBI, agrupándolos en toda la red.



Figura 7. Red de haplotipos de MJN para el gen D-loop, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 478 pb de las secuencias concatenadas del gen D-loop. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI en el anexo 2.

Para la red de haplotipos del gen DRB1 (Figura 8) se utilizó una matriz con 192 pb de 28 secuencias, demostrándose 2 separaciones para las muestras de México con respecto a las de NCBI observándose también una agrupación central para México.

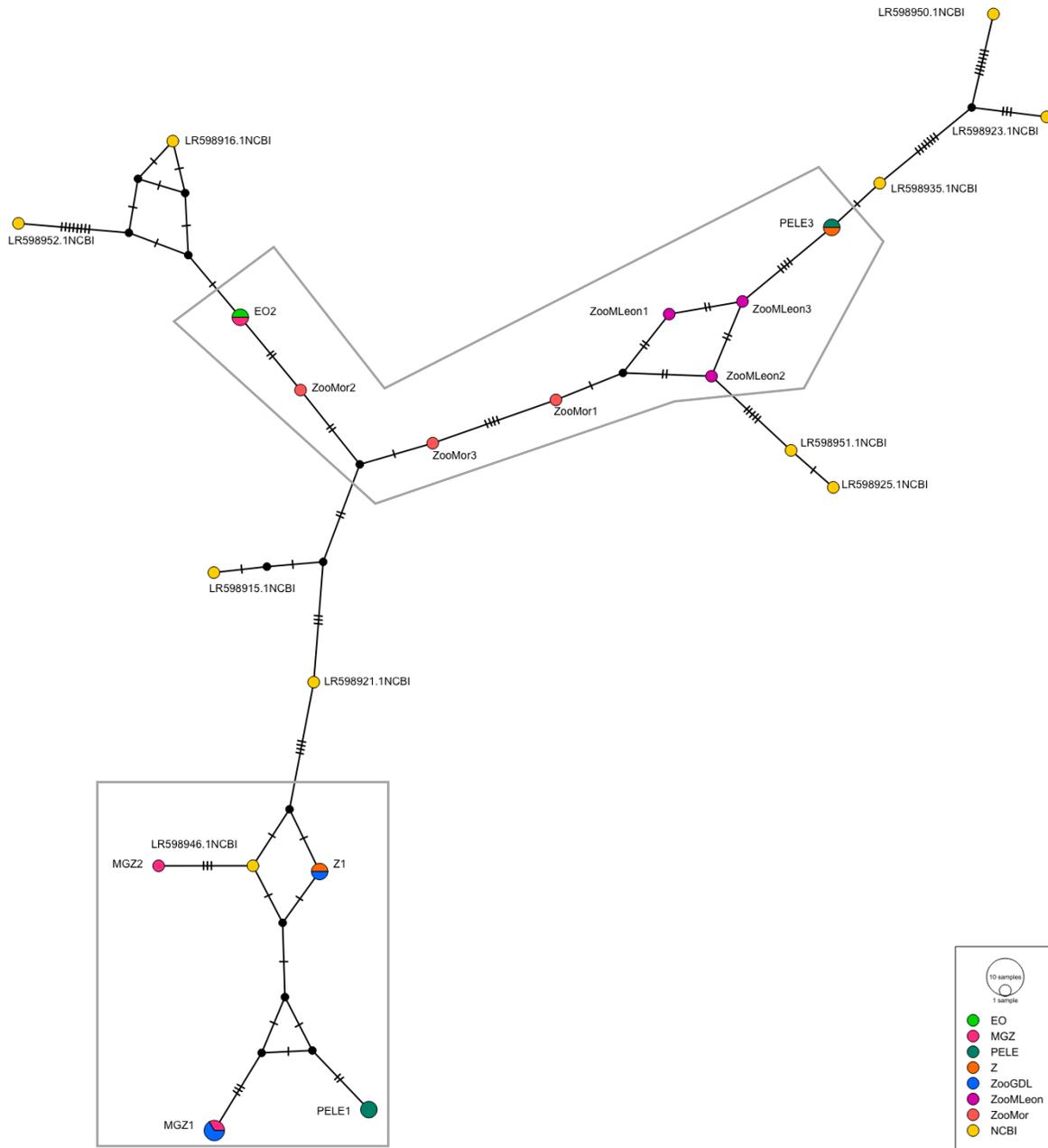


Figura 8. Red de haplotipos de MJN para el gen DRB1, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 192 pb de las secuencias concatenadas de gen DRB1. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en los 2 polígonos podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI en el anexo 2.

En la red de haplotipos para el gen ZDHHC16 (Figura 9) se utilizó una matriz con 848 pb de 19 secuencias de México observándose una agrupación central de donde surgen cuatro haplotipos. Con excepción de los especímenes de NL, el haplotipo principal se encontró en seis de los zoológicos analizados. Los haplotipos del zoológico NL concentraron el mayor número de polimorfismos y se encontraron haplotipos compartidos entre MGZ y MLeon.

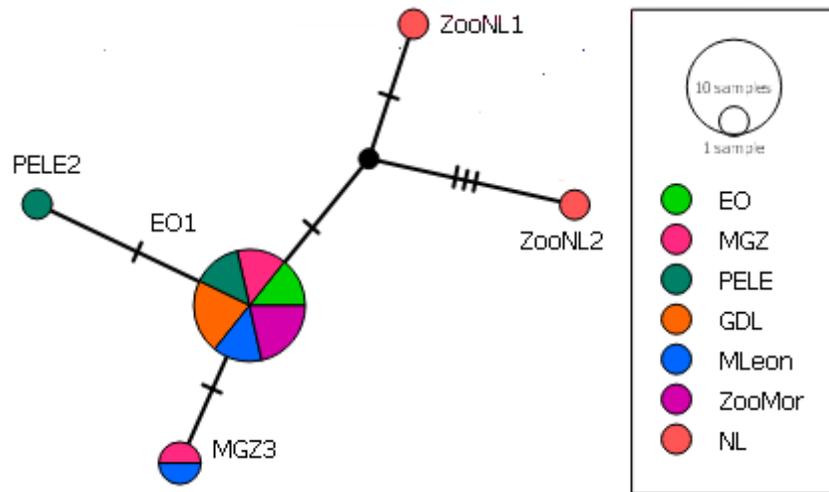


Figura 9. Red de haplotipos de MJN para el gen ZDHHC16, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 848 pb del gen ZDHHC16. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en la red podemos observar las muestras de los zoológicos de México en el anexo 2.

5.8 Análisis filogenéticos

Se utilizó una matriz de datos para cada uno de los genes (Tabla 3), se realizaron los análisis filogenéticos para el gen COI (Figura 10), D-loop (Figura 11), DRB1 (Figura 12) y ZDHHC16 (Figura 13) las topologías obtenidas bajo los diferentes tipos de análisis muestran alguna inconsistencia en las relaciones entre los clados en la base del árbol (Figura 13 y 14) con la finalidad de simplificar las observaciones, identificamos un clado (CI) donde agrupa a todos los OTUs de la matriz exceptuando el grupo externo de cada matriz (Figura 13, 14, 15 y 16), en el árbol consenso para el gen COI (Figura 13) se puede observar el clado principal

(CI) donde se agrupan 8 subclados (SCI al SCVIII) todos monofiléticos, las muestras del presente trabajo se agrupan en los subclados (SCI, SCIV, SCVI, SCVII y SCVIII), siendo politomías los subclados (SCI, SCIV y SCVIII), mientras que el subclado (SCVI y SCVII) son dicotomías, en el subclado SCVIII con los OTUs (EO1, MGZ2, ZooGDL33 y DQ480511_USA_CO) son ancestrales al resto con soporte bajo (PP=*, BP=*/*/54), el subclado SCVII con los OTUs Z1 y ZooGDL52 se agrupa con un soporte (PP=0.84, BP=*/*/54), el subclado SCVI tiene los OTUs ZooNL1 y ZooNL3 con soporte (PP=0.99, BP=85/75/54), el subclado SCV presenta los OTUs JF443202_CA_ON y JF 443196_CA_QC_FORILLON con un soporte alto (PP=1, BP=88/90/96), el subclado SCIV con los OTUs EO2 (PP=0.76, BP=65/61/62), PELE1 (PP=0.76, BP=65/58/62), PELE2y ZooNL2 presentan los soportes (PP=0.76, BP=65/60/62), el subclado SCIII presenta una dicotomía donde los OTUs JF443200_CA_AB_JASPER (PP=1, BP=67/62/54), JF443201_CA_ON_PUKASKWA (PP=1, BP=67/62/85), JF443200_CA_AB_JASPER (PP=1, BP=67/62/54) y JF443201_CA_ON_PUKASKWA (PP=1, BP=67/62/85), el subclado SCII presenta una dicotomía donde se separa el OTUs JF443197_CA_SK_PA con soporte bajo (PP=0.52, BP=*/*/54) se une con la politomía de los OTUs KF661096USA (PP=1, BP=77/59/64), KT448275USA (PP=1, BP=100/100/99), AF028188USA (PP=1, BP=82/88/100) y GBMTG783NCBI (PP=1, BP=77/88/64), el subclado SCI con los OTUs PELE3, ZooGDL82 y ZooMLeon1 (PP=0.84, BP=53/50/54), ZooMLeon2 y ZooMLeon3 (PP=0.84, BP=53/50/54).

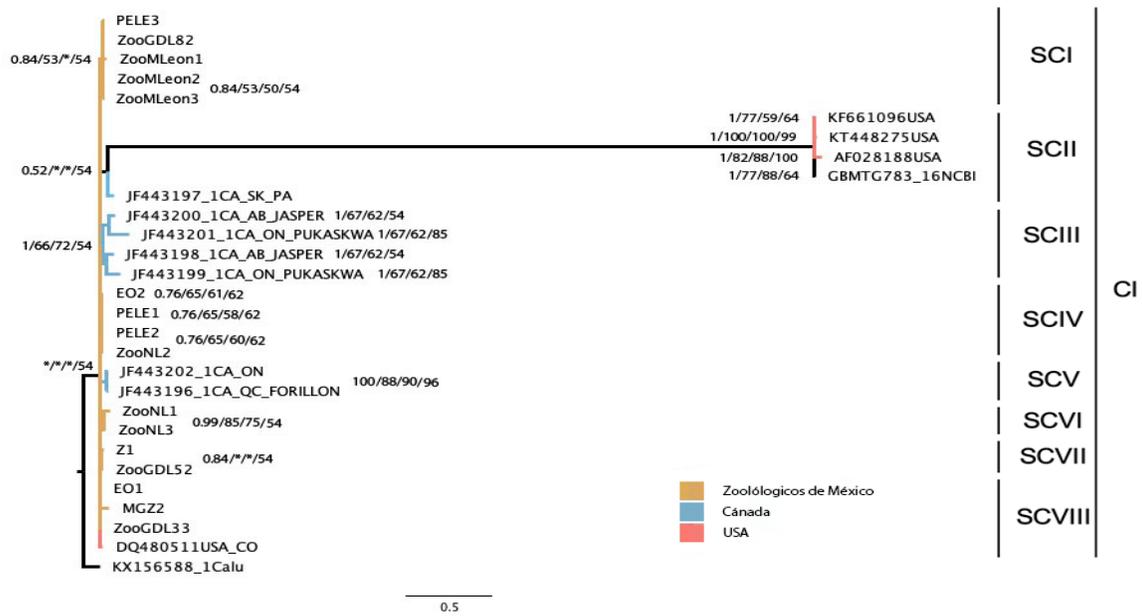


Figura 13. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 653 caracteres de 26 taxones de COI (ADNmt). La especie hermana *Canis lupus* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). *valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.

El árbol de consenso para el gen D-loop (Figura 14) se puede observar el clado principal CI donde se agrupan 12 subclados (SCI al SCXII), las muestras del presente trabajo se agrupan en los subclados (SCI, SCII, SCIII, SCV, SCVI, SCVIII, SCIX y SCXIV), siendo el subclado SCXIII el grupo ancestro de todo el árbol con los OTUs EU400577_US_CO y EU400578_US_CO con soporte (PP=0.98, BP=76/93/100) entre los dos, mientras que con los otros grupos presenta soporte (PP=1, BP=*/*/*), seguido del subclado SCXI donde presenta una dicotomía los OTUs MGZ2 y ZooMor3 con soporte alto (PP=1, BP=98/99/96), presentando una dicotomía con el OTUs JX987491_US_CA con soporte (PP=0.51, BP=99/99/99) y estos se agrupan en una politomía con los OTUs EU400570_US_OH (PP=1, BP=100/51/78), EU400561_US_OH (PP=1, BP=100/51/78), EU400559_US_OH (PP=1, BP=100/51/78) y EU400554_US_OH (PP=1, BP=100/51/78).

En el subclado SCX presenta una politomía los OTUs EO1 (PP=0.90, BP=93/91/94), Z1 y Z2 con soporte (PP=0.90, BP=94/92/95) y estos a su vez con

FJ213930_US_CA con soporte alto (PP=0.71, BP=99/99/99), el subclado SCIX presenta una dicotomía los OTUs FJ213921US_WI con FJ213921US_WI (PP=0.86, BP=75/75/71), unido a una politomía con los OTUs EU789789_US, EU400572_US_OH, EU400558_US_OH, EU400556_US_OH, EU400555_US_OH, EU400546_US_OH, EU400545_US_OH (PP=0.8, BP=99/99/99), seguido del subclado SCVIII con los OTUs ZooGDL33 y ZooGDL52 con soporte alto (PP=0.98, BP=79/93/92), seguido del OTUs MGZ4 (PP=0.8, BP=69/68/58) y por último DQ480510US_CO con soporte (PP=0.96, BP=67/66/58) y estos a su vez con los demas grupos con un soporte alto (PP=0.8, BP=99/99/99), el subclado SCVII presenta una politomía con los OTUs EO2, PELE1, PELE2 con un soporte (PP=0.86, BP=62/75/52), con el OTUs ZooNL2 (PP=0.86, BP=75/75/71), el subclado SCVI presenta una politomía los OTUs EU400567_US_OH, EU400565_US_OH, EU400564_US_OH (PP=1, BP=68/95/68), EU400562_US_OH, EU400560_US_OH con soporte (PP=1, BP=68/95/68),

Mientras que el subclado SCV se observa una dicotomía con los OTUs ZooNL1 y ZooNL3 con un soporte (PP=0.95, BP=69/62/63), unido a una politomía con los OTUs EU400574_US_OH, EU400573_US_OH, EU400569_US_OH, EU400553_US_OH, EU400550_US_OH, EU400548_US_OH, AY172675_US_OH, en el subclado SCIV hay una dicotomía con los OTUs EU400571_US_OH y EU400552_US_OH con un soporte (PP=0.89, BP=66/76/99), unido al OTUs FJ213929_US_WI con un soporte alto (PP=0.98, BP=100/100/99), el subclado SCIII presenta el OTUs ZooGDL82 con un soporte (PP=0.84, BP=100/85/99), seguido de una politomía con los OTUs MGZ1, MGZ3 y ZooMor2 (PP=0.68, BP=56/53/99), seguido de una dicotomía don el OTUs PELE3 con un soporte (PP=0.94, BP=64/59/99), seguido de una politomía con los OTUs ZooMLeon1, ZooMLeon2 y ZooMLeon3 (PP=0.94, BP=66/85/81), el subclado SCII se presenta una dicotomía con los OTUs JT448276_NA y JT448275_NA con un soporte (PP=0.91, BP=99/75/100), y con una politomía con los OTUs EU400576_US_OH, AY172674_US_TX, FJ213926_US_WI, FJ213922_US_WI, FJ213917_US_WI, AF098154_CA Y AF098153_CA con un soporte (PP=0.61, BP=99/99/99), el subclado SCI presenta una dicotomía con el OTUs ZooMor1 con un soporte alto

(PP=0.91, BP=99/99/99) con la politomía de los OTUs EU400575_US_OH, EU400568_US_OH (PP=1, BP=97/99/81), EU400566_US_OH, EU400557_US_OH, EU400549_US_OH, con un soporte (PP=1, BP=97/99/55).

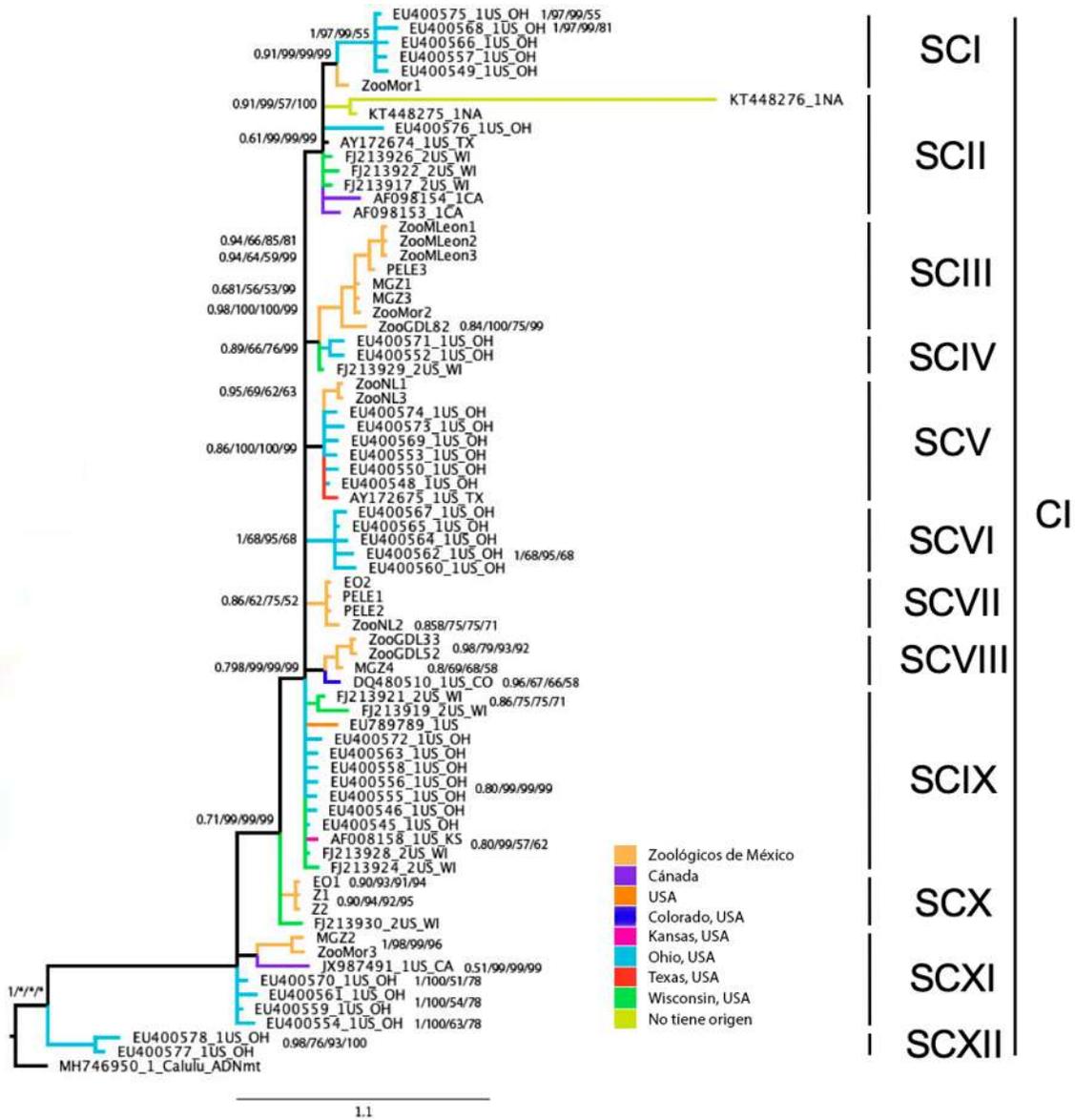


Figura 14. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 478 caracteres de 75 taxones de D-loop (ADNmt). La especie hermana *Canis lupus lupus* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). (*) valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.

El árbol de consenso para el gen DRB1 (Figura 15) se puede observar el clado principal CI donde se agrupan 8 subclados (SCI y SCVIII), las muestras del presente trabajo se agrupan en los subclados (SCII, SCIII, SCIV, SCVI y SCVIII), siendo el subclado el grupo ancestro de todos los OTUs con una politomía con los OTUs EO2, MGZ3, ZooMor1, ZooMor2, ZooMor3, LR598921_NCBI, LR598916_NCBI, LR598915_NCBI, LR 598960 de la especie *Canis aureus* y AM182467_ de la especie *Canis simensis* con un soporte (PP=1, BP=**/*), seguido del clado SCVII con una dicotomía en los OTUs PELE1 y PELE2 con un soporte alto (PP=0.80, BP=97/97/98), el subclado SCVI tiene una dicotomía con los LR598951_NCBI y LR598925_NCBI con soporte (PP=0.99, BP=85/89/94), el subclado SCV tiene una dicotomía con los OTUs LR598952_NCBI y NM_001014768 con la especie *Canis lupus familiaris* con un soporte alto (PP=1, BP=97/99/100), el subclado SCIV posee una politomía con los OTUs MGZ1 (PP=0.72, BP=97/98/100), ZooGDLL33 y ZooGDL52 con soporte (PP=0.72, BP=97/98/100), el subclado SCIII donde hay dos dicotomías la primera con los OTUs MGZ2 y LR598946_NCBI con soporte (PP=0.67, BP=77/98/*), y la segunda con los OTUs Z1 y ZooGDL82 con soporte (PP=0.74, BP=88/84/85), el subclado SCII tenemos primero una dicotomía con el OTUs ZooMLeon2 con soporte (PP=0.85, BP=**/*), seguido de los OTUs ZooMLeon 1 y ZooMLeon3 con soporte (PP=0.78, BP=**/*) y los OTUs PELE3 y Z2 con soporte (PP=0.94, BP=97/92/95), el subclado SCI con los OTUs LR598935_NCBI (PP=0.59, BP=**/*), LR598965 de la especie *Canis mesomelas*, (PP=0.59, BP=**/*), seguido de LR598950_NCBI y FM246839 de la especie *Canis lupus*, y los OTUs LR598923_NCBI y LR598970 de la especie *Canis adustus* con soporte (PP=0.52, BP=81/79/94).

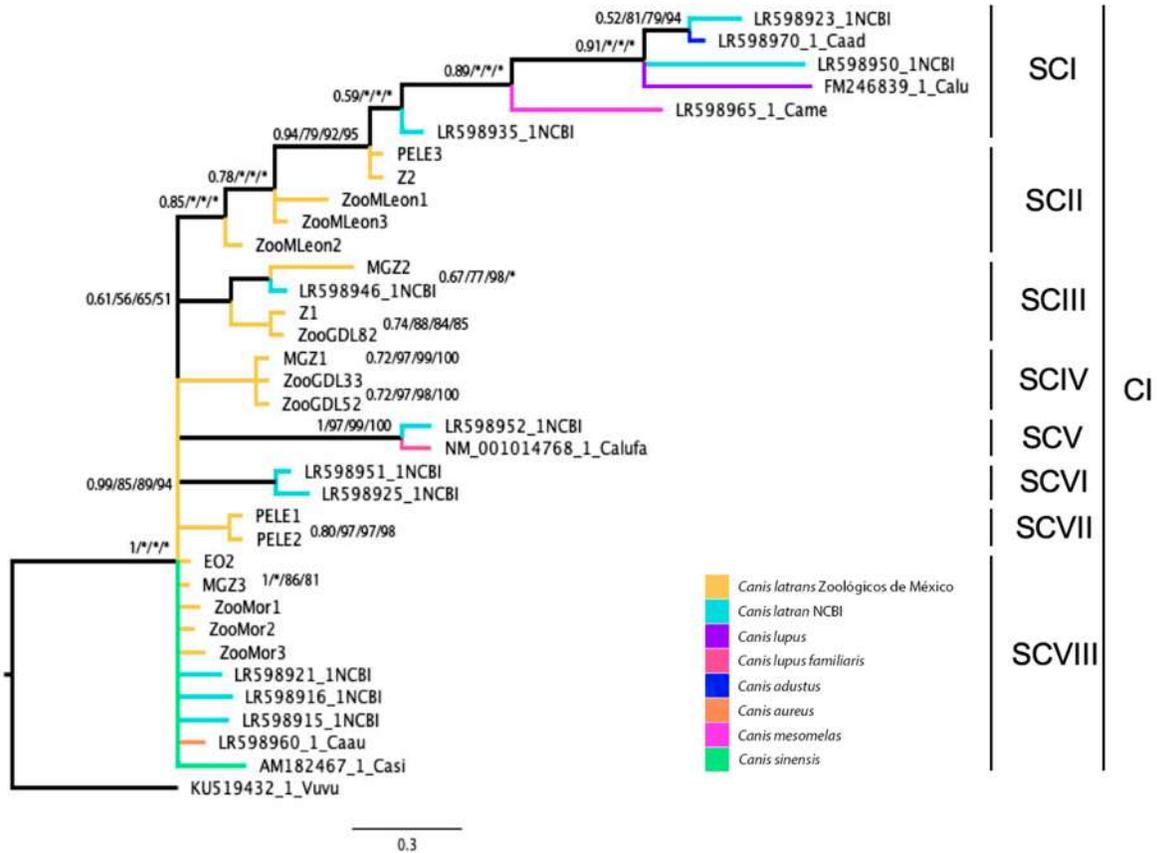


Figura 15. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 192 caracteres de 35 taxones de DRB1 (ADNn). La especie hermana *Vulpes vulpes* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). (*) valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.

El árbol de consenso para el gen ZDHHC16 (Figura 16) se puede observar el clado principal CI donde se agrupan 5 subclados (SCI y SCV), las muestras del presente trabajo se agrupan en el subclado (SCI), siendo el subclado SCV el grupo ancestro de todo el árbol con los OTUs XM025991393 con la especie *Vulpes vulpes* con soporte (PP=1, BP=87*/100), seguido de una dicotomía con los OTUs XM844975 con la especie *Canis lupus familiaris* y XM_025466792 con la especie *Canis lupus dingo* con soporte (PP=1, BP=92*/100), el subclado SCIV presenta una dicotomía con soporte (PP=1, BP=64*/*) donde primero se separa a los OTUs XM_0044094691 de la especie *Odobenus rosmarus divergens* con soporte (PP=1, BP=99/86/100), XM_02588042 de la especie *Callorhinus ursinus* (PP=0.97,

BP=95/88/70), XM_028098573 de la especie *Eumetopia jubatus* y XM_027596718 *Zalophus californianus* con soporte (PP=1, BP=76/62/64), y el segundo se presenta una dicotomía con soporte (PP=1, BP=92/*/97), con los OTUs XR_004923322 *Halichoerus grypis* y XM_032432398 *Phoca vitulina* con soporte (PP=1, BP=95/76/91), seguido con una politomía con soporte (PP=1, BP=67/*/66), con los OTUs XM_035026389 *Mirounga leonina* (PP=1, BP=94/*/83), XM_006750890 *Leptonychotes weddellii*, y XM_021699518 *Neomonachus schauinslandi* con soporte (PP=1, BP=76/62/64), el subclado SCIII presenta al OTUs XM_019797235 *Ailuropoda melanoleuca* con soporte alto (PP=1, BP=100/96/100), con una dicotomía con los OTUs XM_008702224 *Ursus maritimus* y XM_026493788 *Ursus arctos horribilis* con soporte alto (PP=1, BP=100/99/100), el subclado SCII tiene una dicotomía con los OTUs XM_013054666 *Mustela putorius furo* y XM_032312481 *Mustela erminea* con soporte (PP=1, BP=100/92/99), seguido del OTUs XM_022499589 *Enhydra lutris kenyoni*, el subclado SCI tiene una dicotomía con el OTUs XM_032883119 *Lontra canadensis* con soporte (PP=1, BP=100/100/97), con una politomía EO1, EO2, MGZ2, MGZ4, PELE1, PELE2, PELE3, (PP=1, BP=100/92/52), ZooGDL33, ZooGDL52, ZooGDL82, ZooMLeon1, (PP=1, BP=100/92/55), ZooMLeon3, ZooMor1, ZooMor2 y ZooMor3 con soporte (PP=1, BP=100/92/86), seguido de dos dicotomías con los OTUs MGZ3 y ZooMLoen2 con soporte (PP=0.97, BP=62/62/63) y ZooNL1 y ZooNL2 con soporte (PP=0.94, BP=58/70/100).

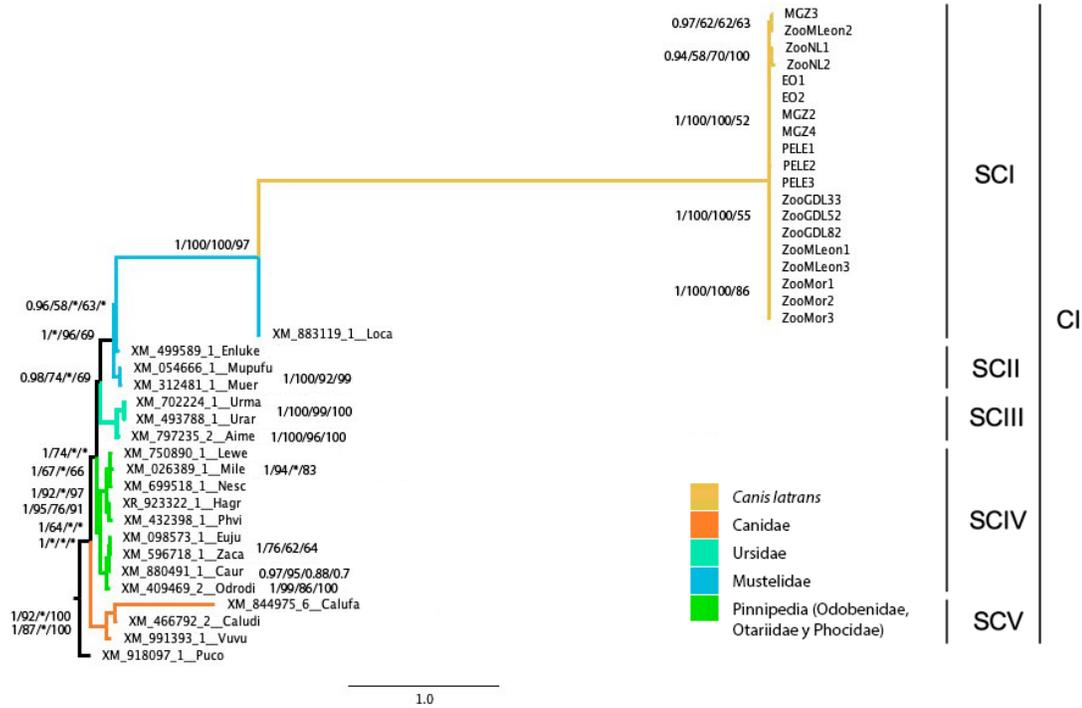


Figura 16. Árbol de consenso que muestra las relaciones genealógicas entre los haplotipos de *Canis latrans* obtenidos con los análisis con inferencia bayesiana (IB), máxima verosimilitud (ML), neighbor-joining (NJ) y (UPGMA). Se realizaron estimaciones con 848 caracteres de 39 taxones de ZDHHC16 (ADNn). La especie hermana *Puma concolor* fue el grupo externo. Los valores sobre las ramas representan probabilidades posteriores y valores de soporte bootstrap (PP/BP/BP/BP). (*) valor inferior a PP=0.5 o PB=50. Las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.

5.7 Distancias genéticas

Para obtener los datos de distancias genéticas entre secuencias, se consideró la matriz de datos para cada uno de los genes obtenidos en el presente trabajo y el resto de las secuencias que fueron tomadas de NCBI (Anexo 2), se realizaron los análisis de distancias genéticas para el gen COI (Tabla 13), D-loop (Tabla 14), DRB1 (Tabla 15) y ZDHHC16 (Tabla 16). Los valores de la mayoría de las distancias genéticas dentro del gen COI están por debajo de 0.020 (2.0%). Sin embargo, los valores más altos son de 0.858 (85.8%) a 0.915 (91.5%) entre algunos de los OTUs (Tabla 13).

Tabla 13. Valores de distancias genéticas para el gen COI obtenidas con el modelo K2P. Valores mayores destacados en amarillo, menores en azul. Para las abreviaturas de los OTUs se desglosan en el anexo 2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	
1 EO1																												
2 EO2	0.0																											
3 MGZ2	0.0	0.0																										
4 PELE1	0.0	0.0	0.0																									
5 PELE2	0.0	0.0	0.0	0.0																								
6 PELE3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																							
7 Z1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																						
8 ZooGDL33	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																					
9 ZooGDL52	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																				
1 ZooGDL82	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																			
1 ZooMLeon1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																		
2 ZooMLeon2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																	
3 ZooMLeon3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0																
1 ZooNL1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0															
4 ZooNL1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0														
1 ZooNL2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0													
5 ZooNL2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0												
1 ZooNL3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0											
6 ZooNL3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0										
1 JF443200.1CA-AB-JASPER	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0									
7 JF443200.1CA-AB-JASPER	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0							
1 JF443198.1CA-AB-JASPER	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0						
8 JF443198.1CA-AB-JASPER	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					
1 JF443202.1CA-ON	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0				
9 JF443202.1CA-ON	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			
2 JF443201.1CA-ON-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
0 PUKASKWA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
2 JF443199.1CA-ON-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
1 PUKASKWA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2 JF443196.1CA-QC-FORILLON	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
2 JF443196.1CA-QC-FORILLON	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3 JF443197.1CA-SK-PA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2 JF443197.1CA-SK-PA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3 JF443197.1CA-SK-PA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4 KF661096USA	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
4 KF661096USA	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
2 KT448275USA	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
5 KT448275USA	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
2 AF028188USA	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
6 AF028188USA	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
2 DQ480511USA-CO	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
7 DQ480511USA-CO	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
2 GBMTG783.16NCBI	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
8 GBMTG783.16NCBI	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

Los valores de la mayoría de las distancias genéticas dentro del gen D-loop están por debajo de 0.030 (3.0%); sin embargo, los valores más altos son de 0.055 (5.5%) a 0.132 (1.32%) entre algunos de los OTUs (Tabla 14).

6. DISCUSIÓN

6.1. Diversidad genética en *Canis latrans* de México

En este estudio se presenta información de diversidad genética de *Canis latrans* a partir de especímenes confinados en zoológicos de México. Aunque no se conoce con exactitud el censo poblacional de la especie *Canis latrans* en vida silvestre, se considera de menor preocupación en la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2020). *Canis latrans* tampoco se encuentra listada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). Uno de los intereses principales en el estudio de coyote se relaciona con la migración y colonización de nuevos territorios y el servicio que brinda a los ecosistemas como un depredador de pequeños roedores (Ceballos, 2010). En los Estados Unidos de América y Canadá, esta especie es de particular interés por su hibridación con perro doméstico y lobo. Esto sugiere que la hibridación es un posible mecanismo que facilita la expansión del coyote a nuevos ambientes (Wilson *et al.* 2009; Kays *et al.* 2010; Thornton y Murray, 2014).

Algunos estudios demuestran que la extirpación de grandes depredadores como lobo (*C. lupus*, *C. lycaon* y *C. rufus*), puma (*Puma concolor*) y jaguar (*Panthera onca*), además de la modificación del hábitat a causa de la actividad humana, ha propiciado la expansión del coyote a nuevos hábitats (Méndez-Carvajal y Moreno, 2014; Hody y Kays, 2018). De acuerdo con registros históricos, el coyote se distribuye en todo México y continúa extendiéndose hacia Centroamérica (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004; Hody y Kays, 2018).

El uso de marcadores moleculares representa una herramienta de suma importancia para el entendimiento de patrones evolutivos y de conocimiento de la especie. El uso y manejo de las técnicas aplicadas para su obtención son variables. Con la finalidad de aportar datos genéticos de coyote, en este estudio se realizó un análisis molecular de cuatro genes; COI, D-loop, DRB1 y ZDHHC16, de la especie *C. latrans* presentes en los zoológicos de México, para aportar datos genéticos de una especie poco conocida a nivel molecular, se decidió iniciar con especímenes en cautiverio esto para obtener la mayor cantidad de muestras posibles. Además de que los zoológicos son pilares para la conservación de especies, teniendo como

objetivo principal la reproducción y reintroducción de especies. Así mismo, se encargan de llevar a cabo investigación científica y educación ambiental.

Aunque en este trabajo no se incluyeron poblaciones silvestres de México, se logró la representación de la diversidad genética de coyote a partir de especímenes en cautiverio de 6 estados de la República Mexicana, incluyendo Tamaulipas, Zacatecas, Estado de México, Jalisco, Michoacán y Guanajuato. A partir de los genes mitocondriales, se observó una diversidad genética (COI $H=0.933$, $p=0.006$; D-loop $H=0.945$, $p=0.0153$) comparable con poblaciones silvestres de Estados Unidos de América. Dichas poblaciones se consideran abundantes (Rashleich *et al.* 2008; Hailer y Leonard, 2008; Koblmüller *et al.* 2009) (Tabla 17).

Estudios previos para como los realizados por Kays *et al.* (2010) en Ohio en 30 individuos de *Canis latrans* (n), encontraron 11 haplotipos (h) con el gen CR, en el Oeste de Pensilvania y Nueva York (207 n, 16 h), en el Este de Pensilvania, Este de Nueva York, Nueva Jersey, Connecticut, Rhode Island, Massachusetts, Nuevo Hampshire, Vermont, Mainey Quebec (450 n, 6 h), Rutledge *et al.* (2010) en USA y Canadá nuevo mundo I + nuevo mundo II (47 n, 18 h), nuevo mundo I (16 n, 7 h) y nuevo mundo II (31 n, 11 h) (Tabla 17). En un estudio realizado por Kobbi y Saadi (2017) en Canadá y USA (9 n, 9 h), encontraron menor número de haplotipos para *C. latrans* que lo observado en este estudio. Podemos ver que los coyotes presentan menor haplotipos en comparación con este trabajo esto da como resultado que los individuos de Canadá y Estados Unidos de América en estos estados tienen más consanguinidad que los individuos de los zoológicos de México.

Por lo contrario, Rashleich *et al.* (2008) en Cleveland (63 n, 33 h), Hailer y Leonard (2008) en Texas (53 n, 26 h) y Nebraska (71 n, 36 h) y Koblmüller *et al.* (2009) en Colorado, Illinois, Nevada y Nebraska (48 n, 46 h), reportaron mayor número de haplotipos para la especie *C. latrans* (Tabla 17) podemos ver que en estos estados de Estados Unidos de América con respecto a este trabajo donde podemos observar que los coyotes del Oeste no están emparentados pudiendo ser que tienen mayor movilidad de área a comparación del Este.

La diversidad observada puede ser un indicio de la estabilidad o el incremento de las poblaciones de coyote en México. DRB1 fue el gen más diverso en este estudio. En otros cánidos, se han obtenido resultados similares (Hedrick *et al.* 2000; Amaike *et al.* 2018). Alta diversidad genética y un mayor número de cambios no sinónimos caracterizan a este gen. En *Canis latrans* de México, aún con un número de muestra reducido ($n = 23$) se identificaron 12 haplotipos. La mayoría de los cambios corresponden a transversiones. Esto significa mayor probabilidad de un cambio no sinónimos (dN) en el aminoácido que codifican. Por ejemplo, en lobo, la relación $dN/dS = 1.9$ y en perro $dN/dS = 1.8$ (Kennedy *et al.* 2007). Aunque en este trabajo no se buscaron señales de selección, es importante establecer en futuros estudios, los valores de referencia de DBR1 de coyote en México. En otras regiones del mundo se ha utilizado para establecer la historia evolutiva de la especie, incluyendo ancestría, eventos de hibridación e introgresión de alelos (Kennedy *et al.* 2007; Galaverni *et al.* 2013).

En otros estudios, se ha reportado una menor cantidad de haplotipos para otras especies de *Canis*, Hailer y Leonard (2008) en *C. lupus baileyi* capturado (6 n, 1 h), histórico (6 n, 3 h) y *C. rufus* capturado (1 n, 1 h). Koblmüller *et al.*, (2009) *C. lupus* Territorios del Norte y Alberta (58 n, 8 h), lobo de los grandes lagos híbrido Ontario, Quebec, Minnesota, Wisconsin, Michigan y Nueva York (202 n, 19 h). Gauber *et al.* (2012) en el parque forestal y zoológico de Hann en Dakar África en vida silvestre *C. l. pallipes* (5 n, 2 h), *C. l. chanco* (22 n, 2 h) en el zoológico y vida silvestre *C. l. lupaster* (10 n, 9 h). Rutledge *et al.* (2010) *C. lycaon* en USA y Canadá (9 n, 2 h), *C. lupus* en Canadá (20 n, 3 h), Eurasia (España, Suecia, Rusia y Arabia Saudita) (4 n, 4 h). Kobbi y Saadi (2017) Turquía, Bulgaria, Palestina, India, Serbia, Ucrania, Italia, Kenia *C. aureus* (11 n, 9 h) Mongolia (*C. lupus lupus*, *C. l. pallipes*, *C. l. campestris*), Nepal, China, Himalaya y Mongolia (*C. l. chanco*), Marruecos (*C. l. lupaster*), China (*C. l. desertorum*, *C. l. laniger*), Japón (*C. l. hodophilax*, *C. l. hattai*) (14 n, 14 h), encontraron pocos haplotipos en comparación de *C. latrans* de este trabajo se ve que las demás especies de *Canis* tienen mayor consanguinidad que *C. latrans* además que esta especie es la que presenta mayor distribución con respecto a sus especies hermanas; mientras que Gaubert *et al.* (2012) en el parque

forestal y zoológico de Hann en Dakar África en vida silvestre la especie *C. lupus/familiaris* (1382 n, 150 h) encontraron un mayor número de haplotipos que *C. latrans* del presente trabajo, esto nos indica que los perros domésticos de la región de Hann tienen menos consanguinidad que los lobos tibetanos (*C. l. chanco*), el lobo indio (*C. l. pallipes*) y el lobo dorado africano (*C. l. lupaster*).

Tabla 17. Estudios de diversidad genética de la familia Canidae.

Autor	Especie	Gen	Origen	Lugar	Número de individuos (n)	Haplotipos (h)	Diversidad		Sitios polimórficos (S)	
							Haplótipica (Hd)	Nucleotídica (Pi)		
Rashleigh et al., 2008	<i>C. latrans</i>	D-loop	Vida silvestre	Cleveland, USA	Oeste	63	33	0.963	0.0178	
					Centro			0.945	0.0177	
					Este			0.673	0.0147	
					Overall N &			0.932	0.0179	
Amaike et al., 2018	<i>V. vulpes</i>	DRB1	Vida silvestre	Hokkaido, Japón	Sur	26	x		0.02	
					Centro	83		0.053		
					Norte	60		0.06		
					Este	34		0.055		
					Lejano Este	29		0.057		
					overall	232		0.054		
Hailer y Leonard 2008	<i>C. latrans</i>	CR y Y-Chromosome	Vida silvestre	USA	Texas	53	26	0.949	0.02	x
					Nebraska	71	36	0.969	0.02	
	<i>C. l. baileyi</i>				Capturado	6	1	0		
	Historico				6	3	n.d.	x		
	<i>C. rufus</i>				Cautiverio	1	1	0		
Koblmüller et al., 2009	<i>C. latrans</i>	CR	Museo Nacional de Historia Natural del Instituto Smithsonian	Canada	USA	48	46	0.982	0.018	
					Colorado, Illinois, Nevada y Nebraska	78	7	0.78	0.016	
					Massachusetts y Nueva York	58	8	0.575	0.006	
					Territorios del Noreste y Alberta	202	19		x	
Gaubert et al., 2012	<i>C. lupus/familiaris</i> <i>C. l. pallipes</i> <i>C. l. chanco</i>	CR, Cyt-b	Vida silvestre	África Parque forestal y Zoológico de Hann en Dakar,	<i>C. lupus/familiaris</i>	1382	150	0.923	0.01769	72
					<i>C. l. pallipes</i>	5	2	0.4	0.00291	2
					<i>C. l. chanco</i>	22	2	0.312	0.00345	3

	<i>C. l. lupaster</i>		Zoológico y vida silvestre		<i>C. l. lupaster</i>	10	9	0.978	0.02795	22
					Ohio	30	11	0.844	0.0133	
					Oeste de Pensilvania y Nueva York	207	16	0.721	0.0152	
Kays <i>et al.</i> , 2010	<i>C. latrans</i>	CR	Museo de Nueva York	USA y Canadá	Este de Pensilvania, Este de Nueva York, Nueva Jersey, Connecticut, Rhode Island, Massachusetts, New Hampshire, Vermont, Mainey Quebec	450	6	0.664	0.0158	x
					Total	687	22	0.708	0.0158	
	<i>C. lycaon</i>				Nuevo mundo	9	2			49
					Nuevo Mundo I + Nuevo Mundo II	47	18			30
	<i>C. latrans</i>			USA y Canadá	Nuevo mundo I	16	7			4
					Nuevo Mundo II	31	11			25
Rutledge, <i>et al.</i> , 2010		CR, ATPase, ATPase6, ATPase8	Vida silvestre		Total Nuevo Mundo	56	20			15
	<i>C. lupus</i>			Canadá	Viejo Mundo I CA	20	3	x		14
				Eurasia (España, Suecia, Rusia Y Arabia Saudita)	Viejo Mundo II Eurasia	4	4			11
					Total Viejo Mundo	24	7			2
					Total	83	29			7
Kobbi y Saadi 2017	<i>C. latrans</i>	D-loop, Cyt-b	Pang, Bjornerfeldt <i>et al.</i> , 2006, Rashleich <i>et al.</i> , 2008, Kays <i>et al.</i> , 2010, Koop <i>et al.</i> , 1998, Pilgrim <i>et al.</i> , 1998, Hailer y Leonard 2008, Vila <i>et al.</i> , 1997, Mech <i>et al.</i> , 2010, Kim <i>et al.</i> , 2011	Canadá y EUA	x	9	9	1		x

<i>C. aureus</i>		Turquía, Bulgaria, Palestina, India, Serbia, Ucrania, Italia, Kenia	11	9	0.9455
<i>C. lupus lupus</i>					
<i>C. l. pallipes</i>		Mongolia			
<i>C. l. campestris</i>					
<i>C. l. chanco</i>	Vida silvestre	Nepal, China, Rusia, Himalaya, Mongolia			
<i>C. l. lupaster</i>		Marruecos	14	14	1
<i>C. l. desertorum</i>					
<i>C. l. laniger</i>		China			
<i>C. l. hodophila</i>					
<i>C. l. hattai</i>		Japón			

El gen ZDHHC16, fue el menos diverso ($H= 0.462$; $Pi= 0.00109$). Se ha discutido su variación a causa de la introgresión de alelos entre especies del género *Canis*. Las variaciones mejor representadas se encuentran en poblaciones en expansión en el Este de los Estados Unidos de América (Heppenheimer *et al.* 2018). De los 5 haplotipos observados en coyote, los haplotipos de Tamaulipas acumulan el mayor número de cambios, aunque solo 2 fueron parsimoniosos. Se observó también que algunos haplotipos pueden estar ausentes (no identificados en este estudio), que serían la conexión entre los haplotipos de Tamaulipas respecto a los estados del Centro y Sur del país. Para ahondar en la distribución del coyote de México, hacen falta estudios sobre la estructura genética poblacional y sobre la validez de al menos 10 subespecies. Este es un tema pendiente en coyote, a la fecha no existen estudios moleculares que apoyan esta clasificación (Hernández y Laundre, 2014).

En poblaciones históricas de coyote de Estados Unidos de América este gen es monomórfico (Heppenheimer *et al.* 2018). Por presentar polimorfismos, el gen ZDHHC16 es candidato para estudios de expansión poblacional del coyote en México. Hace falta probar su utilidad en poblaciones silvestres.

Todos los haplotipos reportados en este estudio para los genes COI, D-loop y DBR1 son nuevos registros para la especie *Canis latrans*. Ninguno de los haplotipos encontrados ha sido reportado previamente.

Haciendo la comparativa de la diversidad haplotípica de las secuencias de los zoológicos se observó una mayor diversidad haplotípica en el gen DRB1, seguido de los genes mitocondriales D-loop y el gen COI, por último, el gen ZDHHC16 presentó una diversidad haplotípica baja esto para las secuencias de los zoológicos de MX.

En cuanto a la diversidad nucleotídica (Pi), en la región D-loop ($Pi= 0.0153$) se encontraron valores de diversidad dentro del rango reportado ($Pi=0.0133 - 0.0179$) (Rashleich *et al.* 2008; Kays *et al.* 2010)

Para DRB1 ($Pi=0.0451$), los valores de Pi están dentro del rango de diversidad reportado para la especie *Vulpes vulpes* ($Pi=0.020 - 0.0570$) (Amaike *et al.*, 2018). Mientras que el gen ZDHHC16 ($Pi= 0.00109$) mostró un valor inferior con

respecto a los otros genes ya que no hay información poblacional reportada para la especie.

Los resultados de las posiciones polimórficas parsimoniosas (P) para los genes de las secuencias de los zoológicos de MX mostraron que el gen que presentó más posiciones P fue el D-loop P = 22, seguido de DRB1 P = 18, posteriormente el gen COI P = 9, y por último el gen ZDHHC16 con P = 2. Lo reportado para coyotes en la base de datos del NCBI para el gen D-loop fue menor P = 8. Las muestras de México presentan mayores posiciones a lo reportado en NCBI pudiendo ser que los coyotes tienen más consanguinidad que las de México.

En las posiciones polimórficas singleton (S) para los genes de las secuencias de los zoológicos de MX el gen que presentó más posiciones S para el gen COI presentó S = 11, seguido de D-loop y ZDHHC16 con S = 5 por último el gen DRB1 con S = 4, mientras que las secuencias NCBI con el gen D-loop fue mayor S = 14.

En las transiciones (Ts's) el gen con mayor mutación fue el D-loop Ts's = 26, seguido del gen COI Ts's = 16, seguido del gen DRB1 Ts's = 6 y por último el gen ZDHHC16 Ts's = 2. Se encontró que las secuencias del NCBI con el gen D-loop fue mayor Ts's = 21 a las muestras de los zoológicos de MX.

En las transversiones (Tv's) fue posible observar que el gen DRB1 presentó Ts's = 16, seguido de ZDHHC16 Tv's = 5, posteriormente el gen COI Tv's = 4 y el gen ZDHHC16 Tv's = 1, para las secuencias de los zoológicos de MX, mientras que las secuencias del NCBI con el gen D-loop fue Tv's = 1. Principalmente los genes nucleares fueron los que presentaron mayor número de Tv's comparado con los genes mitocondriales.

6.2. Relación de haplotipos en coyotes de los zoológicos de México

Las redes de haplotipos se realizaron para identificar la relación entre los individuos, debido a que no se sabía el panorama general de los individuos, En la red de haplotipos del gen COI se observó una agrupación central de las muestras de los zoológicos de México con respecto a las reportadas en otros estudios (Wayne *et al.* (1997); Björnerfeldt *et al.* (2006); Eger *et al.* (2011); Thalmann *et al.* (2013); Koepfli *et al.* (2015)). El gen D-loop, presenta 7 agrupaciones de las muestras de

los zoológicos de México relacionadas en toda la red de haplotipos de manera aleatoria con las secuencias previamente reportadas (Vila *et al.* (1997); Björnerfeldt *et al.* (2006); Rashleich *et al.* 2008; Pang *et al.* 2009; Fain *et al.* (2010); Kim *et al.* (2011); Koop *et al.* (1998); Wengert *et al.* (2013); Thalmann *et al.* (2013); Koepfli *et al.* (2015)). Los genes mitocondriales de los coyotes incluidos en este estudio comparten haplotipos en los Estados de México, Michoacán, Zacatecas, Guanajuato, y Jalisco. Particularmente, en Tamaulipas se encontró un haplotipo compartido con los zoológicos del Estado de México (EO). Debido a que los genes mitocondriales describen historias evolutivas profundas por su herencia matrilineal, se requiere estudiar a las poblaciones silvestres de coyote para determinar haplotipos ancestrales. En zonas de hibridación esto ha ayudado a plantear estrategias de conservación en especies en peligro de extinción (Wilson *et al.* 2009). En México ayudaría a identificar haplotipos compartidos con perro doméstico y lobo.

Para el gen DRB1, las muestras de los zoológicos de México se dispersaron en la red de haplotipos, aunque los zoológicos de Michoacán (ZooMGZ), Estado de México (Z) y Zacatecas (PELE). Para este gen no se incluyeron muestras de Tamaulipas por la baja calidad de las secuencias.

Para el gen ZDHHC16 no se pudo identificar el polimorfismo diferencial observado por Heppeneimer *et al.* (2018) en poblaciones de coyote de USA; sin embargo, el gen ZDHHC16 presentó un haplotipo de mayor frecuencia en los zoológicos de Michoacán, Jalisco, Zacatecas, Guanajuato y Estado de México. En el zoológico de Nuevo Laredo, Tamaulipas, los 2 haplotipos observados tienen un mayor número de cambios que no fueron encontrados en otros zoológicos. El gen ZDHHC16 puede ayudar como marcador molecular para describir la historia de expansión de coyote en México, así como en Estados Unidos de América y Canadá (Heppeneimer *et al.* 2018). Sin embargo, hace falta probar su utilidad en poblaciones silvestres.

Los especímenes de coyote confinados en diferentes zoológicos de México estudiados en este trabajo, retienen diversidad suficiente para vislumbrar poblacionales genéticamente saludables. Cuando una población se caracteriza

principalmente con haplotipos únicos o pocos alelos podría ser indicativo de tamaño poblacional pequeño (Frankham, 1986).

6.3. Análisis filogenéticos

La historia evolutiva de cánidos se caracteriza por eventos de hibridación, introgresión de alelos y flujo génico entre especies de *Canis* (Wilson *et al.* 2009; Gopalakrishnan *et al.* 2018).

Considerando que los eventos de hibridación son comunes en el género *Canis* y que además se desconoce el origen de los especímenes de coyote incluidos en este estudio, se estableció la relación filogenética entre los OTUs de *Canis latrans* dentro de las muestras de este trabajo (Anexo 8, 9 y 10) con lo disponible en NCBI (Figura 13, 14, 15, 16), así como las disponibilidad secuencias del Dr. Sack (Anexo 11), considerándose el primer trabajo donde se incluyen muestras de México en una filogenia con genes mitocondriales (COI y D-loop) y genes nucleares (DRB1 y ZDHHC16), Estados Unidos de América y Canadá. mediante los métodos IB, ML, NJ y UPGMA.

Para el gen COI, los coyotes de México se agruparon en los clados SCI, SCIV, SCVI, SCVII y SCVIII, sin un origen monofilético. Únicamente en el clado SCVIII, un coyote de USA (DQ480511USA_CO) comparte clado con coyote de México. En otras muestras de USA, no se pudo identificar el origen, por lo que es incierta la agrupación del clado SCII, presentando una divergencia reciente respecto al coyote México y de Canadá (Wayne *et al.* (1997); Björnerfeldt *et al.* (2006); Eger *et al.* (2011); Thalmann *et al.* (2013); Koepfli *et al.* (2015)). En el árbol filogenético los coyotes de Canadá y México se agrupan de manera basal en el árbol, probablemente por efecto de la rama en el subclado SCII. Sin embargo, es importante reconstruir la evolución del género *Canis* en América para entender mejor el papel clave del coyote en la ocupación de ambientes donde habitaban especies como *Canis lupus* y *Canis rufus* (Sacks *et al.* 2021).

Con una mejor representación de muestras de Estados Unidos de América, en el análisis filogenético del gen D-loop, los coyotes de México se agruparon en los subclados SCI (especimen ZooMor1 de Michoacán) y SCV (especimen ZooNL1

y ZooNL3 de Tamaulipas), que incluye muestras de Ohio en el Este y Texas en el Sur de los Estados Unidos de América Rashleigh *et al.* (2008).

Los coyotes de Guanajuato (ZooMLeon1, ZooMLeon2 y ZooMLeon3), Zacatecas (PELE3), Michoacán (MGZ1, MGZ3, y ZooMor2), y Jalisco (ZooGDL82) se agruparon en el subclado SCIII y en el subclado SCVI se agruparon los coyotes del Estado de México (EO), de Zacatecas (PELE1, PELE2) y de Tamaulipas (ZooNL2). Estos subclados fueron los únicos exclusivos con especímenes de México. En el árbol filogenético se observan politomías del coyote de México.

Para el gen nuclear DRB1, el análisis filogenético incluyó al menos 6 especies del género *Canis*. En DRB1 se observaron politomías, en los subclados SCII (PELE3 de Zacatecas, Z2 del Estado de México, ZooMLeón1, ZooMLeón2 y ZooMLeón3 de Guanajuato). Este subclado agrupa a *Canis latrans*, *Canis lupus*, *Canis mesomelas* (chacal de lomo negro) y *Canis adustus* (chacal rayado) (subclado SCI). El árbol filogenético no recupera un grupo monofilético pero si agrupa a *C. latrans* con menor divergencia respecto a las especies *C. mesomelas* y *C. adustus* del continente Africano, las cuales divergieron del clado lobo-coyote hace más de 3.5 millones de años (Koepfli *et al.* 2014). Por ser parte del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés), uno de los principales mecanismos de defensa ante patógenos y parásitos en vertebrados (Hedrick y Kim, 2000), el gen DRB1 presenta señales de selección en perro doméstico, lobo y coyote (Hedrick *et al.* 2000). Se ha reportado que algunos haplotipos ancestrales pueden ser retenidos por selección entre especies y donde los tiempos de divergencia no son suficientes para una clara resolución de la filogenia (Hedrick *et al.* 2000). Aspectos como la selección de DRB1 en coyote de México y la presencia de haplotipos ancestrales es desconocido en las poblaciones de México.

Para el gen ZDHHC16 el análisis filogenético incluyó especies del suborden Caniformia, esto debido al limitado número de datos disponibles en NCBI. Únicamente este gen agrupó a todos los coyotes de México en un solo subclado (SCI). Sin embargo, en este grupo monofilético también se ubicó la especie *Lontra canadensis*, la nutria de río de América del Norte. En el subclado SCV se agruparon las especies *Canis lupus familiaris*, *Canis lupus dingo* y *Vulpes vulpes*. Por ser un

gen que participa en diversas funciones celulares también es candidato para estar bajo selección. Este gen también puede considerarse candidato para ensayos de introgresión interespecífica que explique la presencia de las mutaciones diferenciales en poblaciones históricas y en expansión (Heppenheimer *et al.* 2018).

7. CONCLUSIONES

- Los coyotes de México tienen una diversidad nucleotídica (Pi) y haplotípica (H) para los genes COI, D-loop y DRB1 comparable a la información reportada para el género *Canis* en poblaciones estables o en expansión.
- El gen D-loop y DRB1 fueron los genes más diversos en *C. latrans*.
- Se encontraron nuevos haplotipos para *C. latrans* de México en los cuatro genes estudiados. En los genes mitocondriales se encontraron haplotipos compartidos entre los zoológicos del Estado de México, Michoacán, Zacatecas, Guanajuato, Jalisco y Tamaulipas. En el gen COI, Tamaulipas (NL) comparte un haplotipo con los zoológicos del Estado de México (EO).
- En DRB1 todos fueron nuevos registros para *C. latrans*, en total doce haplotipos.
- Para el gen ZDHHC16 únicamente se identificaron cinco haplotipos compartidos entre zoológicos. El mayor número de cambios se observó en el zoológico NL (Tamaulipas), cinco cambios en total.
- En los análisis filogenéticos del género *Canis* se observan politomías en *Canis latrans* de México en COI, D-loop y DRB1. Únicamente en el análisis del suborden Caniformia, el gen ZDHHC16 fue monofilético para el coyote de México.

8. LITERATURA CITADA

- Alfaro M. E. and J. P. Huelsenbeck. 2006. Comparative performance of bayesian and AIC-Based measures of phylogenetic model uncertainty. *Systematic biology*. 55(1): 89-96. <https://doi.org/10.1080/10635150500433565>
- Allard W. M. and R. L. Honeycutt. 1992. Nucleotide sequence variation in the mitochondrial 12S rRNA gene and the phylogeny of African Mole-Rats (Rodentia: Bathyergidae). *Molecular biology and evolution*. 9(1): 27-40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040706>
- Allendorf, F. W. and G. Luikart. 2007. *Conserving global biodiversity. Conservation and the genetics of populations*. Blackwell, Oxford. ISBN: 10:1405121459
- Amaike Y., Y. Nishita, K. Uruguchi, and R. Masuda. 2018. Genetic diversity of MHC Class II DRB1 Exon 2 in the red fox (*Vulpes vulpes*) on Hokkaido, Japan. *Zoological science*. 35: 402–410. [10.2108/zs170211](https://doi.org/10.2108/zs170211)
- Avise C. J. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge. ISBN: 0674666380
- Avise C. J. 2009. Phylogeography: Retrospect and Prospect. *Journal of biogeography*. 36: 3-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x>
- Ballou, J. D. 1997. Ancestral inbreeding only minimally affects inbreeding depression in mammalian populations. *Journal of heredity*. 88(3): 169-178. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023085>
- Bekoff, M. 1977. *Canis latrans*. *Mammalian species*. 79: 1-9. <https://doi.org/10.2307/3503817>
- Bekoff, M. y M. C. Wells. 1980. The social ecology of coyotes. *Scientific american*. 242(4): 130-151. <http://www.jstor.org/stable/24966307>
- Bidlack, A. L., S. E. Reed and P. J. Palsboll. 2007. Characterization of a western North American carnivore community using PCR-RFLP of cytochrome b obtained from fecal samples. *Conservation genetics*. 8: 1511–1513. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9285-3>
- Björnerferkdt, S., M. t. Webster and C. Vila. 2006. Relaxation of constraint on dog mitochondrial DNA following domestication. *Genome research*. 16: 990–994. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.5117706>
- Bradley, R. D., R. J. Baker. 2001. A test of the Genetic species concept: Cytochrome b sequences and mammals. *Journal of mammalogy*. 82(4): 960-973. [https://doi.org/10.1644/1545-1542\(2001\)082<0960:ATOTGS>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1644/1545-1542(2001)082<0960:ATOTGS>2.0.CO;2)
- Brown W. M., E. M. Prager, A. Wang and A. C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of molecular evolution*. 18: 225-239. <https://doi.org/10.1007/BF01734101>
- Ceballos, G., y G. Oliva. 2005. *Los mamíferos silvestres de México. Primera impresión*. CONABIO Fondo de cultura económica. México 161-315. ISBN: 978-970-9000-30-6
- Ceballos, G. 2014. *Mammals of Mexico. Second edition*. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland. 510-511. ISBN: 9781421408439
- Clare, E. L., B. K. Lim, M. B. Fenton, P. D. N. Hebert. 2011. Neotropical bats: Estimating species diversity with DNA barcodes. *PLoS ONE*. 6(7): e22648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022648>
- Darriba D., G. L. Taboada, R. Doallo and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*. 9(8): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dragoo J. W. and R. L. Honeycutt. 1997. Systematics of mustelid-like carnivores. *Journal of mammalogy*. 78(2): 426-443. <https://doi.org/10.2307/1382896>
- Eger J. L., B. K. Lim, M. D. Engstrom, J. G. Woods, C. Strobeck, D. W. Coltman, J. S. Millar, N. V. Ivanova, A. V. Borisenko and P.D. N. Hebert. 2011. *Mammals of Canada*. Unpublished, Direct Submission. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF443201.1>
- Eguiarte, L. E., V. Souza, X. Aguirre. 2007. *Ecología molecular. Primera edición*. Secretaría de medio ambiente y recursos naturales, Instituto nacional de ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 608. ISBN: 978-968-817-839-3
- Eizirik, E., J. H. Kim, M. Menotti-Raymond, P. G. Crawshaw JR., S. J. O'Brien and W. E. Johnson. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera*

- onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular ecology*. 10: 65-79. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01144.x>
- Fain, S. R., D. J. Straughan and B. F. Taylor. 2010. Genetic outcomes of wolf recovery in the western great lakes states. *Conservation genetics*. 11(5):1747-1765. [10.1007/s10592-010-0068-x](https://doi.org/10.1007/s10592-010-0068-x)
- Flesness, N. R. 1977. Gene pool conservation and computer analysis. *International zoo yearbook*. 17(1): 77-80. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1977.tb00870.x>
- Foose, T. J. 1977. Demographic models for management of captive populations. *International zoo yearbook*. 17(1): 70-76. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1977.tb00869.x>
- Gaubert P., C. Bloch, S. Benyacoub, A. Abdelhamid, P. Pagani, C. Adéyèmi, M. S. Djagoun, A. Couloux, S. Dufour. 2012. Reviving the African wolf *Canis lupus lupaster* in north and west Africa: a mitochondrial lineage ranging more than 6,000 km wide. *PLoS ONE*. 7(8): e42740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042740>
- Galaverni, M., R. Caniglia, E. Fabbri, S. Lapalombella and E. Randi. 2013. MHC variability in an isolated wolf population in Italy. *Journal of heredity*. 104(5): 601-612. <https://doi.org/10.1093/jhered/est045>
- Gopalakrishnan, S., Mikkel-Holger S. Sinding, J. Ramos-Madrugal, J. Niemann, J. A. Samaniego Castruita, F. G. Vieira, C. Carøe, M. M. Montero, L. Kuderna, A. Serres, V. M. González-Basallote, Y. H. Liu, G. D. Wang, T. Marques-Bonet, S. Mirarab, C. Fernandes, P. Gaubert, K. P. Koepfli, J. Budd, E. K. Rueness, C. Sillero, M. P. Heide-Jørgensen, B. Petersen, T. Sicheritz-Ponten, L. Bachmann, Ø. Wiig, A. J. Hansen and M. T. P. Gilbert. 2018. Interspecific gene flow shaped the evolution of the genus *Canis*. *Current biology* 28(21): 3441-3449. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.08.041>
- Guevara-chumacero L. M., R. López-Wilchis y V. Sánchez-Cordero. 2001. 105 Años de investigación mastozoológica en México (1890-1995): una revisión de sus enfoques y tendencias. *Acta zoológica mexicana (nueva serie)*. 83:35-72. ISSN: 0065-1737. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57508303>
- Hailer F. and J. A. Leonard. 2008. Hybridization among three native north American *Canis* species in a region of natural sympatry. *PLoS ONE* 3(10): e3333. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003333>
- Hall 1981. *The mammals of north America*. 2 vols. John wiley and sons. New York. ISBN: 10,0471054445
- Hall T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*. 41: 95-98. [10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14998u1.29)
- Hasegawa, M., H. Kishino and T. Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal molecular evolution*. 22: 160-174. <https://doi.org/10.1007/BF02101694>
- Hebert P. D. N., S. Ratnasingham and J. de Waard. 2003. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the royal society of London series B*. 270; S96-S99. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025>
- Hedrick P. W., R. N. Lee and D. Garrigan 2000. Major histocompatibility complex variation in red wolves: evidence for common ancestry with coyotes and balancing selection. *Molecular ecology*. 11: 1905-1913. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01579.x>
- Hedrick, P. W. and T. J. Kim. 2000. Genetics of complex polymorphisms: Parasites and maintenance of the major histocompatibility complex variation. In: Singh, R. S. and Krimbas, C. B. (eds) *Evolutionary Genetics: from Molecules to Morphology*, pp. 204-234. Cambridge University Press, Cambridge. ISBN: 0521571235
- Heppenheimer E., K. E. Brzeski, J. W. Hinton, B. R. Patterson, L. Y. Rutledge, A. L. DeCandia, T. Wheeldon, S. R. Fain, P. A. Hohenlohe, R. Kays, B. N. White, M. J. Chamberlain, B. M. vonHoldt. 2018. High genomic diversity and candidate genes under selection associated with range expansion in eastern coyote (*Canis latrans*) populations. *Ecology and evolution*. 8: 12641-12655. <https://doi.org/10.1002/ece3.4688>
- Hernández y Laundre 2014. Valdez, R., and S. J. A. Ortega (Eds.). (2014). *Ecología y manejo de fauna silvestre en México*. Editorial del Colegio de Postgraduados. ISBN: 978-607-715-232-3

- Hidalgo-Mihart, M. G., L. Cantú-Salazar, A. González-Romero, C. A. López-González. 2004. Historical and present distribution of coyote (*Canis latrans*) in Mexico and Central America. *Journal of biogeography*. 31(12): 2025-2038. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2004.01163.x>
- Hody, J. W. and R. Kays. 2018. Mapping the expansion of coyotes (*Canis latrans*) across north and central America. *ZooKeys* 759: 81-97. <https://doi.org/10.3897/zookeys.759.15149>
- Hopken M., E. K. Orning, J. K. Young and A. J. Piaggio. 2016. Molecular forensics in avian conservation: a DNA-based approach for identifying mammalian predators of ground-nesting birds and eggs. *Biomedcentral research notes*. 9: 14. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1797-1>
- Hooper S. R., S. Solari, P. A. Larsen, R. D. Bradley and R. J. Baker. 2008. Phylogenetics of the fruit-eating bats (Phyllostomidae: Artibeina) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Occasional papers, Museum of Texas Tech University* 277. <https://www.depts.ttu.edu/nsrl/publications/occasional-papers.php>
- Kays R., A. Curtis and J. J. Kirchman. 2010. Rapid adaptive evolution of northeastern coyotes via hybridization with wolves. *Biology letters*. 6: 89–93. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0575>
- Kennedy, L. J., J. M. Angles, A. Barnes, L. E. Carmichael, A. D. Radford, W. E. Ollier, G. M. Happ. 2007. DLA-DRB1, DQA1, and DQB1 alleles and haplotypes in north American Gray Wolves. *Journal of heredity*. 98(5): 491-9. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm051>
- Kennedy L. J. 2019 Direct Submission. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/LR598915>
- Kim, M. G., N. Y. Kim, S. S. Lee, K. I. Kim and Y. H. Yang. 2011. Phylogenetic relationships of Jeju dogs to other domestic and foreign dog breeds determined by using mtDNA D-loop sequences. *Journal of animal science and technology*. 53(4): 303-310. <http://dx.doi.org/10.5187/JAST.2011.53.4.303>
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America (PNAS)*. 78(1): 454-458. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.1.454>
- Kobbi N. E. H., and L. Saadi. 2017. Les méthodes de reconstruction phylogénétique: exploitation des logiciels et application au genre *Canis*. [Mémoires de Master, Université Saad Dahlab Blida 1]. *Repositorio Dspace de la université Saad Dahlab Blida* <http://di.univ-blida.dz:8080/jspui/handle/123456789/2610>
- Kobl Müller S., M. Nord, R. K. Wayne and J. A. Leonard. 2009. Origin and status of the great lakes wolf. *Molecular ecology*. 18(11): 2313–2326. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04176.x>
- Koepfli, K. P., J. Pollinger, R. Godinho, J. Robinson, A. Lea, S. Hendricks, R. M. Schweizer, O. Thalmann, P. Silva, Z. Fan, A. A. Yurchenko, P. Dobrynin, A. Makunin, J. A. Cahill, B. Shapiro, F. Alvares, J. C. Brito, E. Geffen, J. A. Leonard, K. M. Helgen, W. E. Johnson, S. J. O'Brien, B. V. Valkenburgh and R. K. Wayne. 2015. Genome-wide evidence reveals that African and Eurasian golden jackals are distinct species. *Current biology*. 25(16): 2158–2165. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.06.060>
- Koop, B. F., S. Crockford, M. Burbidge, A. Byun, and U. Rink. 1998. Polyphyletic origin of dogs. Unpublished. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF098154>
- Kumar, S., K. Tamura and M. Nei. 1993. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis. *Pennsylvania state university*. University Park.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 35(6): 1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lacy, R. C., A. Petric, M. Warneke. 1993. Inbreeding and outbreeding in captive populations of wild animal species. In: Thornhill NW, editor. *The natural history of inbreeding and outbreeding*. Chicago: University of Chicago Press. p 352–74. ISBN: 0226798542
- Lavergne, A., E. Douzery, T. Stichler, F. M. Catzeflis, and M. S. Springer. 1996. Interordinal mammalian relationships: Evidence for paenungulate monophyly is provided by complete mitochondrial 12S rRNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*. 6(2): 245-258. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0074>

- Leigh, J. W. and D. Bryant. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in ecology and evolution*. 6(9): 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
- Leus, K., K. Traylor-Holzer and R. C. Lacy. 2011. Genetic and demographic population management in zoos and aquariums: recent developments, future challenges and opportunities for scientific research. *International zoo yearbook*. 45: 213–225. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2011.00138.x>
- Lorenzo, C., E. Espinoza y J. Ortega (eds.). 2008. Avances en el estudio de los mamíferos de México. Publicaciones especiales. Vol. II. Asociación mexicana de mastozoología A. C. México, D.F. 147-164 pp. ISBN: 9786077637035
- Mech, L. D., and R. M. Nowak. 2010. Systematic status of wild *Canis* in north-central Texas. *Southeastern naturalist*. 9(3):587–594. <https://doi.org/10.1656/058.009.0315>
- Méndez-Carbajal, P., and R. Moreno. 2014. Mammalia, Carnivora, Canidae, *Canis latrans* (Say, 1823): Actual distribution in Panama. *Check List*. 10(2): 376-379. <https://doi.org/10.15560/10.2.376>
- Minin, V., Z. Abdo, P. Joyce and J. Sullivan. 2003. Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. *Systematic biology*. 52(5): 674–683. <https://doi.org/10.1080/10635150390235494>
- Monterrubio-Rico, T. C., J. F. Charre-Medellín, M. G. Zavala-Paramo, H. Cano-Camacho, M. Q. Pureco-Rivera y L. Leon-Paniagua. 2012. Evidencias fotográfica, biológica y genética de la presencia actual de jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) en Michoacán, México. *Revista mexicana de biodiversidad* 83(3): 825-833. <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.28663>
- Murzina, N. V., D. P. Vorozheykina and N. I. Matvienko. 1988. Nucleotide sequence of *Thermus thermophiles* HB8 gene coding 16S rRNA. *Nucleic acids research*. 16(16): 8172. <https://doi.org/10.1093/nar/16.16.8172>
- Naidu, A., R. R. Fitak, A. Munguia-Vela and M. Culver. 2012. Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals. *Molecular ecology resources*. 12: 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03078.x>
- Norton, J. E. and M. V. Ashley. 2004. Genetic variability and population differentiation in captive baird's tapirs (*Tapirus bairdii*). *Zoo biology*. 23(6): 521–531. <https://doi.org/10.1002/zoo.20031>
- Pang, J. F., C. Kluetsch, X. J. Zou, A. B. Zhang, L. Y. Luo, H. Angleby, A. Ardalan, C. Ekström, A. Skölleremo, J. Lundeberg, S. Matsumura, T. Leitner, Y. P. Zhang and P. Savolainen. 2009. mtDNA data indicate a single origin for dogs south of Yangtze river, less than 16,300 years ago, from numerous wolves. *Molecular biology and evolution*. 26(12): 2849–2864. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp195>
- Pilgrim, K., D. Boyd, and S. Forbes. (1998). Testing for wolf-coyote hybridization in the Rocky Mountains using mitochondrial DNA. *The journal of wildlife management*. 62(2): 683-689. <https://doi.org/10.2307/3802344>
- Piñero, D., et al. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 415-493
- Pumo, D. E., P. S. Finamore, W. R. Franek, C. J. Phillips, S. Tazami, D. Balzarano. 1998. Complete mitochondrial genome of a neotropical fruit bat, *Artibeus jamaicensis*, and a new hypothesis of the relationships of bats to other Eutherian mammals. *Journal of molecular evolution*. 47: 709–717. [10.1007/pl00006430](https://doi.org/10.1007/pl00006430)
- Ralls, K. and J. D. Ballou. 1983. Extinction: Lessons from zoos, pp. 164-184 in *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. Schonewald-Cox C. M., S. M. Chambers, B. MacBryde, L. Thomas, eds. Menlo Park, California, Benjamin/Cummings, 1983. ISBN: 0-8053-7764-6
- Ralls, K. and J. D. Ballou. 1986. Preface to the proceedings of the workshop on genetic management of captive populations. *Zoo biology*. 5(1): 81-86. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430050202>
- Rambaut, A. and A. J. Drummond. 2012. FigTree. Version 1.4. 0. Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>

- Rashleigh, R. M., R. A. Krebs and H. Van Keulen. 2008. Population structure of coyote (*Canis latrans*) in the urban landscape of the Cleveland, Ohio area. *The Ohio journal of science*. 108(4): 54-59. <http://hdl.handle.net/1811/48448>
- Redondo, R. A. F., L. P. S. Brina, R. F. Silva, A. D. Ditchfield, F. R. Santos. 2008. Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular phylogenetics and evolution* 49:44–58. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.001>
- Reed, D. H., D. A. Briscoe and R. Frankham 2002. Inbreeding and extinction: The effect of environmental stress and lineage. *Conservation genetics* 3: 301–307. <https://doi.org/10.1023/A:1019948130263>
- Riddle, B. R., D. J. Hafner and L. F. Alexander. 2000. Phylogeography and systematics of the *Peromyscus eremicus* species group and the historical biogeography of north American warm regional deserts. *Molecular phylogenetics and evolution* 17(2): 145–160. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0841>
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19(12): 1572–1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. E. Ramos-Onsins, A. Sánchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large datasets. *Molecular biology and evolution*. 34: 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Rutledge, L. Y., B. R. Patterson, and B. N. White. 2010. Analysis of *Canis* mitochondrial DNA demonstrates high concordance between the control region and ATPase genes. *Biomedcentral evolutionary biology*. 10: 215 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-215>
- Sanger, F., S. Nicklen, A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceeding of the national academy of sciences*. 74(12): 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sacks, B. N., K. L. Mitchell, C. B. Quinn, L. M. Hennelly, M. H. S. Sinding, M. J. Stathm, S. Preckler-Quisquater, S. R. Fain, L. Kistler, S. L. Vanderzwan, J. A. Meachen, E. A. Ostrander and L. A. Frantz. 2021. Pleistocene origins, western ghost lineages, and the emerging phylogeographic history of the red wolf and coyote. *Molecular ecology*. 30(17): 4292-4304. <https://doi.org/10.1111/mec.16048>
- Scotto, E. C. 2006. Análisis filogenético comparativo entre secuencias codificadoras (Cyt b y ATPase 8) y secuencias no codificadoras (D-Loop) del ADN mitocondrial de primates y sus implicancias evolutivas en los homínidos. *Horizonte médico*. 6(2): 111-129. <https://www.horizontemedico.usmp.edu.pe/index.php/horizontemed/article/view/237>
- Seal, U. S., D. G. Makey, D. Bridgwater, L. Simmons and L. Murtfeldt. 1977. ISIS: a computerised record system for the management of wild animals in captivity. *International zoo yearbook*. 17(1): 68-70. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.1977.tb00868.x>
- Seal, U. S. and N. R. Flesness. 1978. Noah's Ark: Sex and survival, in American association of zoological parks and aquariums conference proceedings, Wheeling, West Virginia. pp. 214-228.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de 44 especies en riesgo. Diario oficial de la federación. 30 de Diciembre de 2010. https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091
- Sillero-Zubiri, C., M. Hoffmann and D. W. Macdonald. 2004. Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC canid specialist group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 81-92 pp. ISBN: 2831707862
- Soulé, M., M. Gilpin, W. Conway, T. Foose. 1986. The millenium ark: How long a voyage, how many staterooms, how many passengers?. *Zoo biology*. 5(1): 101-113. <https://doi.org/10.1002/zoo.1430050205>
- Thalmann, O., B. Shapiro, P. Cui, V. J. Schuenemann, S. K. Sawyer, D. L. Greenfield, M. B. Germonpré, M. V. Sablin, F. López-Giráldez, X. Domingo-Roura, H. Napierala, H-P. Uerpmann, D. M. Loponte, A. A. Acosta, L. Giemsch, R. W. Schmitz, B. Worthington, J. E. Buikstra, A. Druzhkova, A. S. Graphodatsky, N. D. Ovodov, N. Wahlberg, A. H. Freedman, R. M. Schweizer, K.-P. Koepfli, J. A. Leonard, M. Meyer, J. Krause, S. Pääbo, R. E. Green,

- R. K. Wayne. 2013. Complete mitochondrial genomes of ancient canids suggest a European origin of domestic dogs. *Science*. 342(6160): 871-874. [10.1126/science.1243650](https://doi.org/10.1126/science.1243650)
- Thornton D. H. and D. L. Murray. 2014. Influence of hybridization on niche shifts in expanding coyote populations. *Diversity and distributions*. 20(11): 1355–1364. <https://doi.org/10.1111/ddi.12253>
- Tiemann-Boege, I., C. W. Kilpatrick, D. J. Schmidly and R. D. Bradley. 2000. Molecular phylogenetics of the *Peromyscus Boylii* species group (Rodentia: Muridae) based on mitochondrial cytochrome b sequences. *Molecular phylogenetics and evolution* 16(3) :366–378. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0806>
- Vila C., P. Savolainen, J. E. Maldonado, I. R. Amorim, J. E. Rice, R. L. Honeycutt, K. A. Crandall, J. Lundeberg, R. K. Wayne. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*. 276(5319): 1687-1689. DOI: [10.1126/science.276.5319.1687](https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1687)
- Ward R. D., T. S. Zemplak, B. H. Innes, P. R. Last and P. D. N. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of the royal society series B*. 360(1462): 1847–1857. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1716>
- Wayne R. K., E. Geffen, D. J. Girman, K. P. Koepli, L. M. Lau and C. R. Marshall. 1997. Molecular systematic of the Canidae. *Systematic biology*. 46(4): 622-653. <https://doi.org/10.1093/sysbio/46.4.622>
- Wengert G. M., M. W. Gabriel, J. E. Foley, T. Kun, B. N. Sacks. 2013. Molecular techniques for identifying intraguild predators of fishers and other north American small carnivores. *Wildlife society bulletin* 37(3): 659–663. <https://doi.org/10.1002/wsb.287>
- Wilson, P. J., S. K. Grewal, F. F. Mallory and B. N. White. 2009. Genetic characterization of hybrid wolves across Ontario. *Journal of heredity*. 100(1): S80-S89. <https://doi.org/10.1093/jhered/esp034>

9. ANEXOS

Anexo 1. Haplotipos y origen de secuencias reportadas en NCBI

Gen	No. Access	Haplotipo	Autor	Lugar	haplotipo NCBI	origen NCBI
COI	JF443201.1	COI_hap1	Eger <i>et al.</i> , 2011	Canadá, Ontario, Pukaskwa	voucher HBL008243	parcial cds
	JF443199.1	COI_hap2			voucher HBL008242	parcial cds
	JF443200.1	COI_hap3		Canadá, Alberta, Jasper	voucher HBL008235	parcial cds
	JF443198.1	COI_hap4			voucher HBL008234	parcial cds
	JF443197.1	COI_hap5		Canadá, Saskatchewan, Prince Albert	voucher HBL008245	parcial cds
	JF443196.1	COI_hap6		Canadá, Quebec, Forillon	voucher HBL008244	parcial cds
	JF443202.1	COI_hap7		Canadá, Ontario	voucher ROM 111438	parcial cds
	DQ480511	COI_hap8		Björnerfeldt <i>et al.</i> , 2006	Colorado EUA	isolate 2
D-loop	AY172675.1	D-loop_hap1	Kim <i>et al.</i> , 2011	Corea	haplotipe 2	completo
	AY172674.1	D-loop_hap1			haplotipe 1	completa
	FJ213927.2	D-loop_hap2	Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA	isolate J20266	parcial
	DQ480509.1		Björnerfeldt <i>et al.</i> , 2006	Colorado EUA	isolate 1	completo
	NC008093.1	D-loop_hap2			mitocondrion	complete genome
	EU400578.1	D-loop_hap3			haplotipe 35	parcial
	EU400577.1	D-loop_hap4	Rashleich <i>et al.</i> , 2008	Cleveland, Ohio, EUA	haplotipe 34	parcial
	EU400576.1	D-loop_hap5			haplotipe 33	parcial
	FJ213920.2		Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA	isolate J20250	Parcial
	EU400575.1	D-loop_hap6	Rashleich <i>et al.</i> , 2008	Cleveland, Ohio, EUA	haplotipe 32	parcial
	EU400544.1				haplotipe 1	parcial
	FJ213918.2				Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA
	EU400574.1	D-loop_hap7			haplotipe 31	parcial
	EU400573.1	D-loop_hap8			haplotipo 30	parcial
	EU400572.1	D-loop_hap9			haplotipo 29	parcial
	EU400571.1	D-loop_hap10			haplotipo 28	parcial
	EU400570.1	D-loop_hap11			haplotipo 27	parcial
	EU400569.1	D-loop_hap12			haplotipo 26	parcial
	EU400568.1	D-loop_hap13	Rashleich <i>et al.</i> , 2008	Cleveland, Ohio, EUA	haplotipo 25	parcial
EU400567.1	D-loop_hap14	haplotipo 24			parcial	
EU400566.1	D-loop_hap15	haplotipo 23			parcial	
EU400565.1	D-loop_hap16			haplotipo 22	parcial	
EU400547.1				haplotipe 4	parcial	
EU400564.1	D-loop_hap17			haplotipo 21	parcial	
EU400563.1	D-loop_hap18			haplotipo 20	parcial	
EU400562.1	D-loop_hap19			haplotipo 19	parcial	

EU400561.1	D-loop_hap20			haplotipo 18	parcial
EU400560.1	D-loop_hap21			haplotipo 17	parcial
EU400559.1	D-loop_hap22			haplotipo 16	parcial
FJ213925.2		Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA	isolate J10167	parcial
EU400558.1	D-loop_hap23			haplotipo 15	parcial
EU400551.1				haplotipo 8	parcial
EU400557.1	D-loop_hap24			haplotipo 14	parcial
EU400556.1	D-loop_hap25			haplotipo 13	parcial
EU400555.1	D-loop_hap26	Rashleigh <i>et al.</i> , 2008	Cleveland, Ohio, EUA	haplotipo 12	parcial
EU400554.1	D-loop_hap27			haplotipo 11	parcial
EU400553.1	D-loop_hap28			haplotipo 10	parcial
EU400552.1	D-loop_hap29			haplotipo 9	parcial
EU400550.1	D-loop_hap30			haplotipo 7	parcial
FJ213923.2		Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA	isolate J10226	parcial
EU400549.1	D-loop_hap31			haplotipo 5	parcial
EU400548.1	D-loop_hap32	Rashleigh <i>et al.</i> , 2008	Cleveland, Ohio, EUA	haplotipo 4	parcial
EU400546.1	D-loop_hap33			haplotipo 3	parcial
EU400545.1	D-loop_hap34			haplotipo 2	parcial
JX987491.1	D-loop_hap35	Wengert <i>et al.</i> , 2013	California y Nebraska EUA	mitochondrial	parcial
FJ213930.2	D-loop_hap36			isolate J20275	parcial
FJ213929.2	D-loop_hap37			isolate J10172	parcial
FJ213928.2	D-loop_hap38	Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA	isolate J20278	parcial
FJ213926.2	D-loop_hap39			isolate J20274	parcial
FJ213924.2	D-loop_hap40			isolate J20246	parcial
KT448277.1		Koepfli <i>et al.</i> , 2015	Norte América	isolate CLA_RKW3591	parcial mitocondrion
FJ213922.2	D-loop_hap41	Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA	isolate J10162	parcial
DQ480511.1		Björnerfeldt <i>et al.</i> , 2006	Colorado EUA	isolate 2	completo mitocondrion
FJ213921.2	D-loop_hap42			isolate J20236	parcial
FJ213919.2	D-loop_hap43	Fain <i>et al.</i> , 2010	Wisconsin EUA	isolate J10147	parcial
FJ213917.2	D-loop_hap44			isolate J10211	parcial
AF098154.1	D-loop_hap45	Koop <i>et al.</i> , 1998		clone Coyote16	parcial
KF661096.1		Thalmann <i>et al.</i> , 2013	EUA	isolate coyote1	parcial mitocondrion
AF098153.1	D-loop_hap46	Koop <i>et al.</i> , 1998		clone COYOTE14	parcial
AF008158.1	D-loop_hap47	Vila <i>et al.</i> , 1997	Museo de historia natural Kansas	isolate coyote mitochondrial control region I	
KT448276.1	D-loop_hap48	Koepfli <i>et al.</i> , 2015	Norte América	isolate CLA_RKW3591	parcial mitocondrion
KT448275.1	D-loop_hap49			isolate CLA_RKW13478	parcial mitocondrion
EU789789.1	D-loop_hap50	Pang <i>et al.</i> , 2009	China	Coy6a	completo mitocondrion

	DQ480510.1	D-loop_hap51	Björnerfeldt et al., 2006	EUA	isolate 1	completo mitocondrion
	LR598952.1	DRB1_hap1			allelo DLA-DRB1*116:01, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598951.1	DRB1_hap2			allelo DLA-DRB1*115:01, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598950.1	DRB1_hap3			allelo DLA-DRB1*114:01, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598946.1	DRB1_hap4			allelo DLA-DRB1*110:01, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
DRB1	LR598935.1	DRB1_hap5	Kennedy (2019)	X	allelo DLA-DRB1*097:01, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598925.1	DRB1_hap6			allelo DLA-DRB1*067:02, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598923.1	DRB1_hap7			allelo DLA-DRB1*064:02, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598921.1	DRB1_hap8			allelo DLA-DRB1*056:02, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598916.1	DRB1_hap9			allelo DLA-DRB1*042:03, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno
	LR598915.1	DRB1_hap10			allelo DLA-DRB1*042:02, exon 2	gen DLA-DRB1de MHC clase II antígeno

Anexo 2. Matriz considerada en los análisis filogenéticos con secuencias obtenidas en el presente trabajo con negritas y de NCBI.

COI	D-loop	DRB1	ZDHHC16
EO1	EO1	EO2	EO1
EO2	EO2	MGZ1	EO2
MGZ2	MGZ1	MGZ2	MGZ2
PELE1	MGZ2	MGZ3	MGZ3
PELE2	MGZ3	PELE1	MGZ4
PELE3	MGZ4	PELE2	PELE1
Z1	PELE1	PELE3	PELE2
ZooGDL33	PELE2	Z1	PELE3
ZooGDL52	PELE3	Z2	ZooGDL33
ZooGDL82	Z1	ZooGDL33	ZooGDL52
ZooMLeon1	Z2	ZooGDL52	ZooGDL82
ZooMLeon2	ZooGDL33	ZooGDL82	ZooMLeon1
ZooMLeon3	ZooGDL52	ZooMLeon1	ZooMLeon2
ZooNL1	ZooGDL82	ZooMLeon2	ZooMLeon3
ZooNL2	ZooMLeon1	ZooMLeon3	ZooMor1
ZooNL3	ZooMLeon2	ZooMor1	ZooMor2
JF443200.1CA-AB-JASPER	ZooMLeon3	ZooMor2	ZooMor3
JF443198.1CA-AB-JASPER	ZooMor1	ZooMor3	ZooNL1
JF443202.1CA-ON	ZooMor2	LR598952.1NCBI	ZooNL2
JF443201.1CA-ON-PUKASKWA	ZooMor3	LR598951.1NCBI	XM_844975.6_PREDICTED : <i>Canis lupus familiaris</i> (perro domestico)
JF443199.1CA-ON-PUKASKWA	ZooNL1	LR598950.1NCBI	XM_025466792.2_PREDICTED: <i>Canis lupus dingo</i> (Dingo)
JF443196.1CA-QC-FORILLON	ZooNL2	LR598946.1NCBI	XM_025991393.1_PREDICTED: <i>Vulpes vulpes</i> (Zorro rojo)

JF443197.1CA-SK-PA	ZooNL3	LR598935.1NCBI	XM_022499589.1_PREDIC TED: <i>_Enhydra lutris kenyoni</i> (Nutria marina)
KF661096USA	EU789789.1US	LR598925.1NCBI	XR_004923322.1_PREDICT ED: <i>_Halichoerus grypis</i> (Foca gris)
KT448275USA	JX987491.1US-CA	LR598923.1NCBI	XM_013054666.1_PREDIC TED: <i>_Mustela putorius furo</i> (Hurón)
AF028188USA	DQ480510.1US-CO	LR598921.1NCBI	XM_006750890.1_PREDIC TED: <i>_Leptonychotes weddellii</i> (Foca de Weddell)
DQ480511USA-CO	EU400578.1US-OH	LR598916.1NCBI	XM_028098573.1_PREDIC TED: <i>_Eumetopia jubatus</i> (León marino de Steller)
GBMTG783.16NCBI	EU400577.1US-OH	LR598915.1NCBI	XM_025880491.1_PREDIC TED: <i>_Callorhinus ursinus</i> (Oso marino ártico)
KX156588.1 <i>Canis lupus</i> (Lobo)	EU400576.1US-OH	FM246839.1_ <i>Canis lupus</i> (Lobo)	XM_032312481.1_PREDIC TED: <i>_Mustela erminea</i> (Armiño)
	EU400575.1US-OH	NM_001014768.1_ <i>Canis lupus familiaris</i> (perro domestico)	XM_032883119.1_PREDIC TED: <i>_Lontra canadensis</i> (Nutria de río de América del Norte)
	EU400574.1US-OH	LR598970.1_ <i>Canis adustus</i> (Chacal rayado)	XM_032432398.1_PREDIC TED: <i>_Phoca vitulina</i> (Foca común)
	EU400573.1US-OH	LR598960.1_ <i>Canis aureus</i> (Chacal dorado)	XM_035026389.1_PREDIC TED: <i>_Mirounga leonina</i> (Elefante marino del Sur)
	EU400572.1US-OH	LR598965.1_ <i>Canis mesomelas</i> (Chacal de lomo negro)	XM_027596718.1_PREDIC TED: <i>_Zalophus californianus</i> (Lobo marino de California)
	EU400571.1US-OH	AM182467.1_ <i>Canis sinensis</i> (Lobo etíope)	XM_004409469.2_PREDIC TED: <i>_Odobenus rosmarus divergens</i> (Morsa del Pacífico)
	EU400570.1US-OH	KU519432.1_ <i>Vulpes vulpes</i> (Zorro rojo)	XM_021699518.1_PREDIC TED: <i>_Neomonachus schauinslandi</i> (Foca monje de Hawái)
	EU400569.1US-OH		XM_019797235.2_PREDIC TED: <i>_Ailuropoda melanoleuca</i> (Panda gigante)
	EU400568.1US-OH		XM_008702224.1_PREDIC TED: <i>_Ursus maritimus</i> (Oso polar)
	EU400567.1US-OH		XM_026493788.1_PREDIC TED: <i>_Ursus arctos horribilis</i> (Oso grizzly)
	EU400566.1US-OH		XM_025918097.1_PREDIC TED: <i>_Puma concolor</i> (Puma)
	EU400565.1US-OH		
	EU400564.1US-OH		
	EU400563.1US-OH		
EU400562.1US-OH			
EU400561.1US-OH			
EU400560.1US-OH			
EU400559.1US-OH			
EU400558.1US-OH			
EU400557.1US-OH			
EU400556.1US-OH			
EU400555.1US-OH			
EU400554.1US-OH			
EU400553.1US-OH			

EU400552.1US-OH
EU400550.1US-OH
EU400549.1US-OH
EU400548.1US-OH
EU400546.1US-OH
EU400545.1US-OH
AF008158.1US-KS
AY172675.1US-TX
AY172674.1US-TX
FJ213930.2US-WI
FJ213929.2US-WI
FJ213928.2US-WI
FJ213926.2US-WI
FJ213924.2US-WI
FJ213922.2US-WI
FJ213921.2US-WI
FJ213919.2US-WI
FJ213917.2US-WI
AF098154.1CA
AF098153.1CA
KT448276.1NA
KT448275.1NA
MH746950.1_*Canis*
lupus lupus (Lobo
gris)_ADNmt

Análisis de secuencias

Anexo 3. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen COI de secuencias de los zoológicos de México.

Haplotipo	Posición en la secuencia y tipo de cambio																			
COI_MX	2	3	7	42	48	72	75	96	159	168	171	396	408	561	582	597	644	645	646	648
COI-hap1	G	C	G	G	T	C	C	A	A	G	G	T	C	G	C	A	C	C	C	G
COI-hap2	A
COI-hap3	A	T	.	.	.	T	T	G	.	.	A	.	T	A
COI-hap4	.	.	.	A	G
COI-hap5	A	.	A
COI-hap6	.	.	A
COI-hap7	.	.	A	A	G
COI-hap8	.	.	.	A	A	.	.	.	G	T	A
COI-hap9	.	.	.	A	G	A	.	.	.
COI-hap10	C	.	.	T	G	T	A	A	A
COI-hap11	C	.	.	T	G
Sitios	P	S	P	P	S	S	S	S	P	P	S	P	S	S	P	P	S	S	P	S
Mutación	TS	TS	TS	TS	TV	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TV	TV	TV	TS

Anexo 4. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen D-loop de secuencias de los zoológicos de México.

Haplotipo	Posición en la secuencia y tipo de cambio																										
D-loop_MX	63	64	65	80	81	82	93	96	104	108	113	114	218	221	238	239	250	269	276	282	283	289	291	307	310	427	470
D-loop-hap1	T	C	C	T	T	A	A	G	A	T	A	G	G	A	T	A	C	T	T	C	T	C	T	T	C	G	
D-loop-hap2	C	.	T	A	C	C	.	T	.	.	.	C	.	.
D-loop-hap3	C	T	T	C	.	.	.	A	A	.	.	G	.	C
D-loop-hap4	.	T	.	.	C	.	G	.	G	C	G	A	A	.	C	.	C	C
D-loop-hap5	.	.	T	C	A	.	.	.	T
D-loop-hap6	C	T	T	C	.	.	.	A	A	.	.	G	.	C	A
D-loop-hap7	.	.	T	C	G	.	.	.	A	.	.	.	T	T	A
D-loop-hap8	C	T	T	C	.	.	.	A	G	.	.	.	A	.	.	G	.	C	.	C
D-loop-hap9	C	T	T	C	.	.	.	A	A	.	.	G	.	C	C	A
D-loop-hap10	.	.	.	C	.	G	A	T	.	.	C	C
D-loop-hap11	.	T	G	.	.	C	G	A	A	.	C	.	.	C	T
D-loop-hap12	C	.	T	C	C	A	C	C	C	.	T	.
D-loop-hap13	C	.	T	A	C	C	.	T	.	.	.	C	.	A
Sitios	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P	P	P	S	P	P	P	P	P	S	P	S	S	P	P	P	P
Mutación	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TV	TS												

Anexo 5. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen D-loop de secuencias NCBI los números en amarillo son iguales a los de México.

Haplotipo	Posición en la secuencia y tipo de cambio																						
D-loop_NCBI	22	63	64	65	80	81	82	92	93	98	101	111	114	116	238	250	269	276	280	310	423	427	
D-loop_hap1	A	C	T	T	C	T	A	T	A	T	C	A	G	T	T	C	C	C	G	T	T	T	C
D-loop_hap2	.	T	C	.	.	.	G
D-loop_hap3	.	T	.	C	T	C	.	C	G	.	T	G	A	A	C	T	T	T	.	C	C	C	C
D-loop_hap4	G	T	C	.	.	.	G	.	A	C	.	.	.	A
D-loop_hap5	.	T	C	.	T	.	G	.	A	C	T	C
Sitios	P	S	P	S	P	S	P	S	S	S	P	S	S	S	P	S	S	S	P	S	S	S	P
Mutación	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TS	TV	TS	TS	TS	TS	TS	TV	TS	TS							

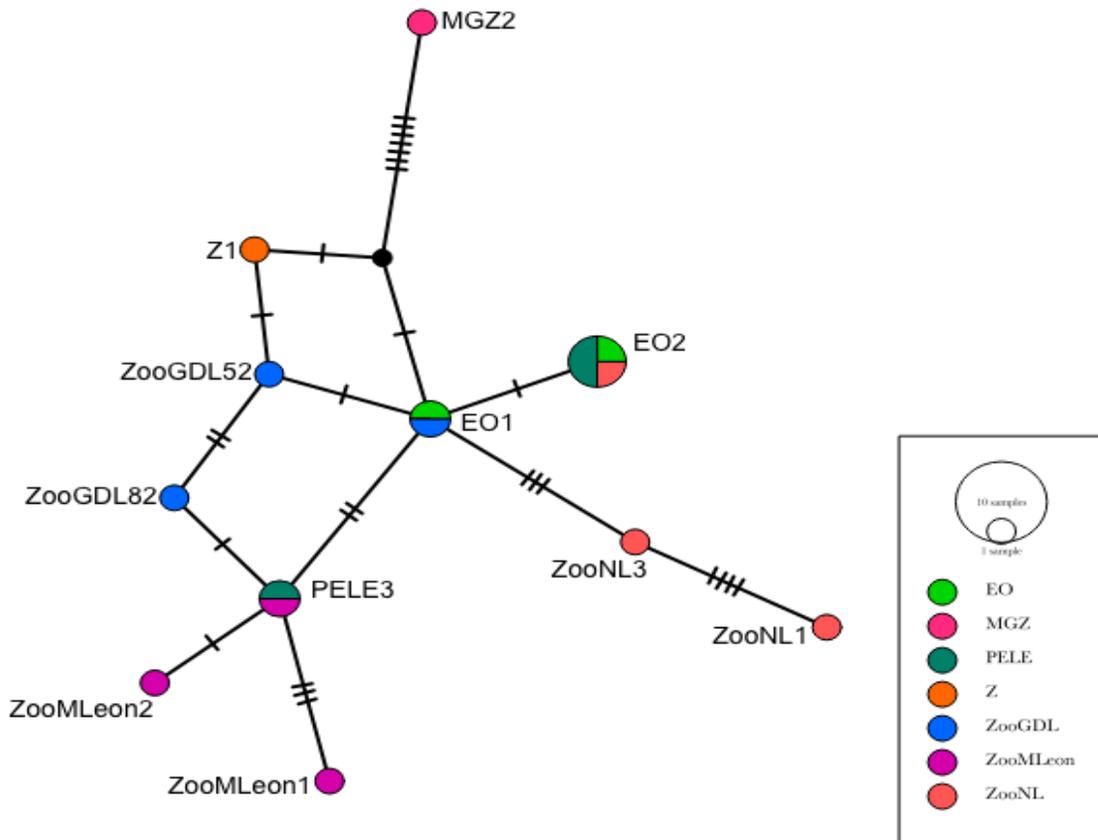
Anexo 6. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen DRB1 de secuencias de los zoológicos de México.

Haplotipo	Posición en la secuencia y tipo de cambio																						
DRB1_MX	3	18	19	47	49	88	96	118	120	121	130	140	141	142	143	159	165	166	167	189	190	192	
DRB1_hap1	T	A	A	G	T	A	G	A	A	A	C	C	T	A	C	G	A	T	T	C	A	A	
DRB1_hap2	C	T	T	.	A	C	.	.	G	C	G	G	C	.	.	.	
DRB1_hap3	C	.	.	T	A	C	C	G	G	C	C	G	G	C	A	C	G	
DRB1_hap4	C	C	C	.	.	G	C	G	G	C	.	.	.	
DRB1_hap5	.	C	G	.	G	A	G	G	T	G	
DRB1_hap6	C	.	.	.	A	C	C	G	G	C	.	G	G	T	G	.	G	G	C	.	.	.	
DRB1_hap7	.	C	G	.	G	A	.	G	.	G	C	G	G	C	.	.	.	
DRB1_hap8	.	C	.	.	A	.	.	G	.	G	A	.	.	.	G	C	G	
DRB1_hap9	.	C	G	.	G	A	.	G	.	G	C	G	
DRB1_hap10	.	C	.	.	A	.	.	G	.	G	A	C	G	G	C	.	.	.	
DRB1_hap11	G	C	
DRB1_hap12	G	.	.	A	C	.	G	C	.	.	.	
Sitios	P	P	P	S	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	S	S	S
Mutación	TS	TV	TV	TV	TV	TV	TV	TS	TS	TV	TS	TV	TS	TV	TV	TS							

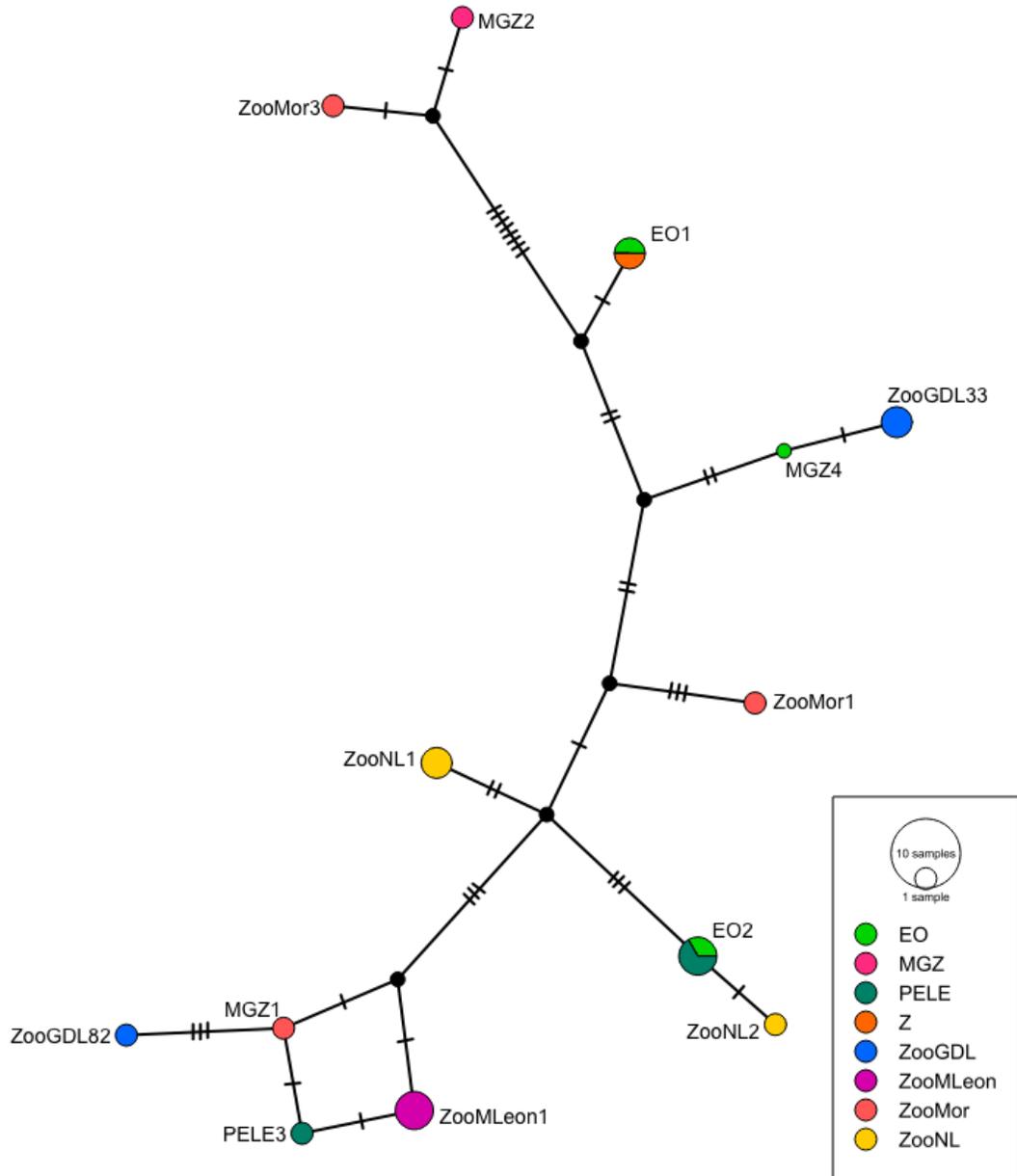
Anexo 7. Posiciones en la secuencia y tipo de cambio de los haplotipos del gen ZDHHC16 de secuencias de los zoológicos de México.

Haplotipo	Posición en la secuencia y tipo de cambio						
ZDHHC16_MX	475	714	733	785	827	838	839
ZDHHC16_hap1	T	A	G	A	G	A	A
ZDHHC16_hap2	T	.
ZDHHC16_hap3	.	.	.	G	.	.	.
ZDHHC16_hap4	C	C
ZDHHC16_hap5	.	T	T	.	T	.	C
Sitios Mutación	S	S	S	S	S	P	P
	TS	TV	TV	TS	TV	TV	TV

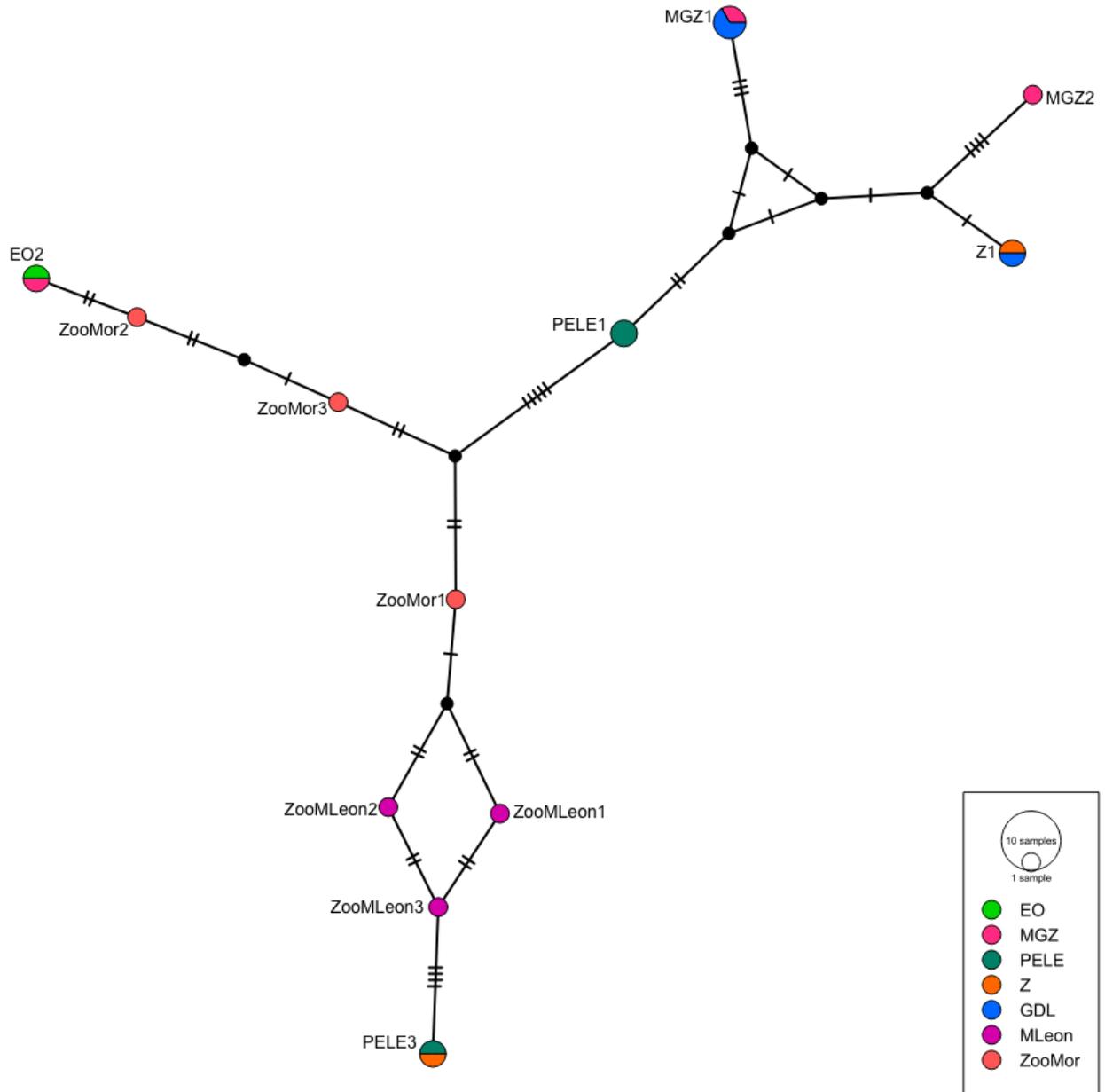
Análisis de genealogía



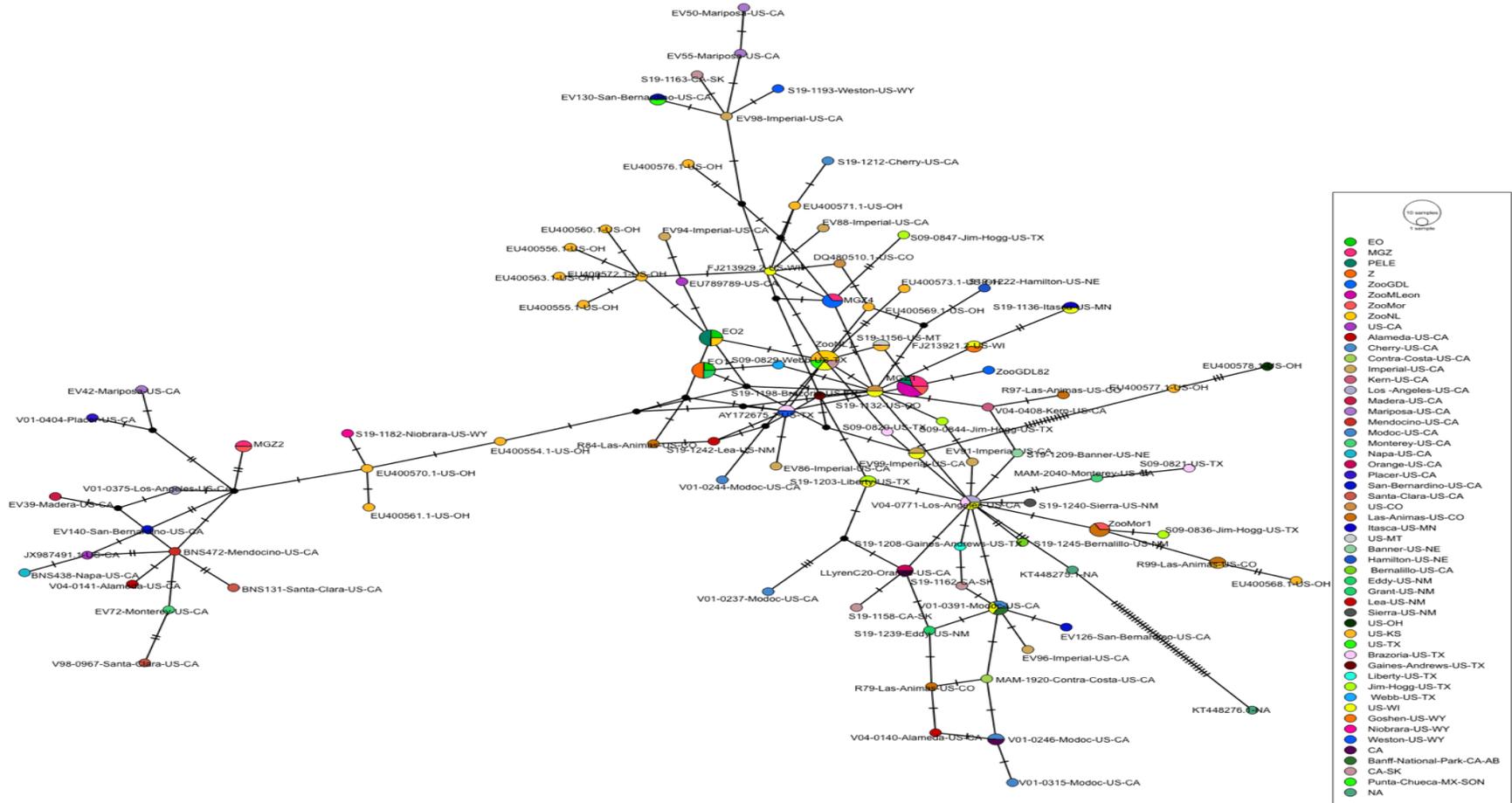
Anexo 8. Red de haplotipos de MJN para el gen COI, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 653 pb de las secuencias concatenadas de gen COI. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México.



Anexo 9. Red de haplotipos de MJN para el gen D-loop, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 478 pb de las secuencias concatenadas del gen D-loop. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México.



Anexo 10. Red de haplotipos de MJN para el gen DRB1, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 192 pb de las secuencias concatenadas de gen DRB1. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en los 2 polígonos podemos observar las muestras de los zoológicos de México.



Anexo 11. Red de haplotipos de NJ para el gen D-loop, que muestra las relaciones de los individuos de *C. latrans*, basado en 478 pb de las secuencias concatenadas del gen D-loop. El círculo es el tamaño proporcional de números de individuos que comparten el haplotipo, pero la longitud de las ramas es proporcional al número de mutaciones. Las líneas transversales de las ramas presentan el número de mutaciones entre haplotipos mientras que los puntos negros representan haplotipos hipotéticos que fueron no encontrados o haplotipos ancestrales, en el polígono podemos observar las muestras de los zoológicos de México con respecto a las de NCBI y del Dr. Benjamín N. Sack.