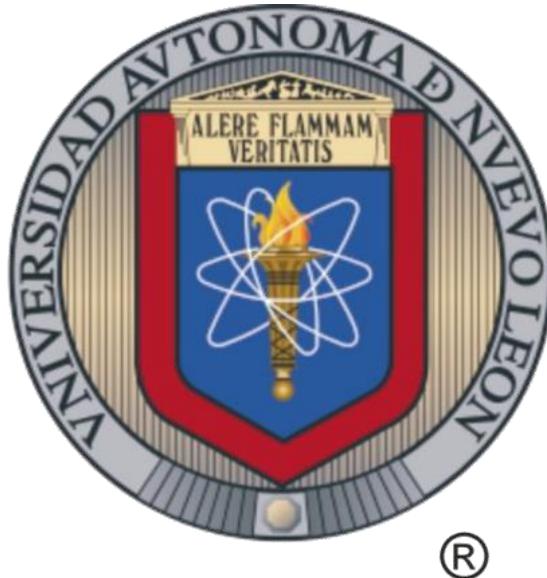


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



TESIS

**ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE OSO NEGRO
(*Ursus americanus*) EN EL PARQUE NACIONAL CUMBRES DE
MONTERREY, A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE ADN**

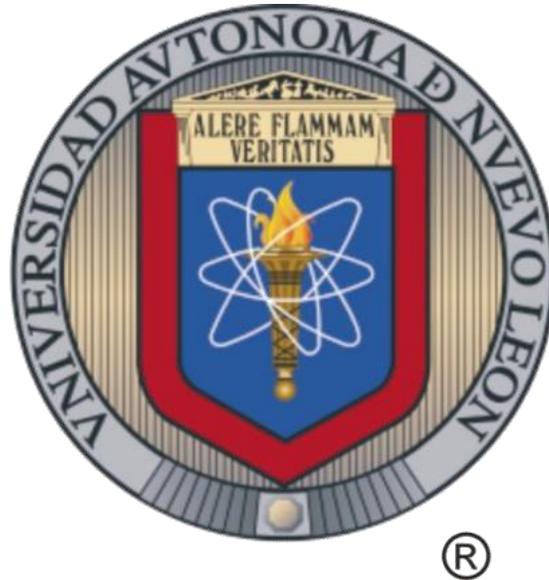
PRESENTA

MVZ. JUAN PABLO FIMBRES MACÍAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

**ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE OSO NEGRO
(*Ursus americanus*) EN EL PARQUE NACIONAL CUMBRES DE
MONTERREY, A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE ADN**

PRESENTA

MVZ. JUAN PABLO FIMBRES MACÍAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



TESIS

ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE OSO NEGRO
(*Ursus americanus*) EN EL PARQUE NACIONAL CUMBRES DE
MONTERREY, A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE ADN

PRESENTA

MVZ. JUAN PABLO FIMBRES MACÍAS

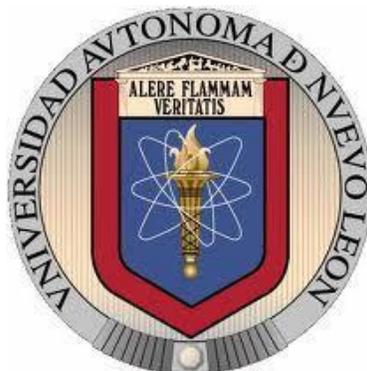
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO

NOVIEMBRE. 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA



ESTIMACIÓN DE LA DENSIDAD POBLACIONAL DE OSO NEGRO (*Ursus americanus*) EN EL PARQUE NACIONAL CUMBRES DE MONTERREY, A TRAVÉS DEL ANÁLISIS DE ADN

Aprobación de tesis por el comité particular de
MVZ Juan Pablo Fimbres Macías


Dr. Rogelio Carrera Treviño
Director de tesis



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Asesor



Dr. Víctor Manuel Riojas Valdés
Asesor

ESCOBEDO, N. L. MÉXICO

NOVIEMBRE 2017

DEDICATORIA

A Dios.

A mis padres Maricruz Macías Cantú y Héctor Fimbres Durazo sepan que los amo y que son los pilares en mi formación como persona y que siempre me alentaron y apoyaron incondicionalmente. Mi hermano Héctor Fimbres Macías que también demostraste interés en los aspectos personales, académicos y profesionales en esta etapa de mi vida. Espero los tres se sientan orgullosos, pues yo estoy muy orgulloso de tenerlos en mi vida.

A Claudia Mariel Tueme Reséndez mi hermosa novia, gracias por la paciencia, siempre estar a mi lado y motivarme para salir adelante en busca de alcanzar mis metas y recordarme que cosas mejores vendrán.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rogelio Carrera Treviño, por ser un excelente guía en mi formación académica y laboral desde hace ya varios años. Gracias por la oportunidad de desenvolverme en mi primer trabajo como MVZ y por las experiencias y conocimientos compartidos, así como la paciencia en el largo desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Diana E. Zamora Ávila, por sus comentarios y consejos siempre acertados, por siempre destinar algo de su tiempo para atender mis dudas.

Al Dr. Víctor Riojas Valdés, por sus prontas y atinadas revisiones y su tiempo para resolver dudas.

Al Ing. Jorge Guerrero Salcedo por las facilidades brindadas para llevar a cabo el muestreo.

Al Dr. Sadot Edgardo Ortiz Hernández y al Biólogo Jesús Oliver Castillo Hernández, personal de CONANP que facilitó y participó directamente en el proceso de muestreo en el ANP.

Al Dr. Iván Lira Torres (QEPD) por su apoyo en la instalación de trampas y diversas actividades.

A la Dra. Diana Doan-Crider por sus consejos y por el primer acercamiento con el personal de "Wildlife Genetics International".

A todos los involucrados en las actividades de campo de este estudio, MVZ. Eliud Jacob Durón García, Ing. Sergio Antonio Mireles Infante, MVZ. Pedro Arturo Cano Arriaga, Arq. José Eduardo Luna Arreola, Argelio Hernández Marroquín, Luis Enrique Montemayor Palacios, Homero Hernández Marroquín y MVZ. Omar Alejandro Ocañas Saldaña. Al Biol. Rubén Omar Suárez Hernández y Biol. Ángel Omar Salinas Andrade por su apoyo con los Sistemas de Información Geográfica. MC. Mercedes Alejandra Salinas Camarena y MC. Stephany Ariatne Castillo Carranza por sus consejos y tiempo compartido en el laboratorio. MC. por los conocimientos y el tiempo compartido en el laboratorio.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

1' MM	1 desajuste del inglés "1 miss match"
2' MM	2 desajustes del inglés "2 miss match"
µl	Microlitros
A	Alelo
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNmt	Acido desoxirribonucleico mitocondrial
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
CITES	Convención Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres
cm	Centímetro
CMNP	Cumbres de Monterrey National Park
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CONANP	Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas
D.E.	Desviación estándar
E.E.	Error estándar
e. g.	"Exempli gratia" latín de: por ejemplo
EUA	Estados Unidos de América
et al.	Latín de: y otros
g	Gramos
H	Hembra
H _E	Heterocigosidad esperada
H _O	Heterocigosidad observada
I. C.	Intervalo de confianza
i. e.	"Id est" latín de: esto es

kg	Kilogramo
km	Kilometro
L.I.	Límite inferior
L.S.	Límite superior
M	Macho
msnm	Metros sobre el nivel del mar
n	Tamaño de muestra
PCR	Siglas en ingles de reacción en cadena de la polimerasa
pb	Pares de bases
PROCER	Programa de Conservación de Especies en Riesgo
PNCM	Parque Nacional Cumbres de Monterrey.
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
UMA	Unidades de manejo ambiental
UNESCO	Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
UV	Ultravioleta
Var	Varianza

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	1
1.2. Hipótesis	2
1.3. Objetivo general	2
1.4. Objetivos específicos	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Clasificación taxonómica	3
2.2. Características generales	3
2.3. Distribución	4
2.4. Reproducción y ciclo de vida	6
2.5. Hábitos alimenticios	6
2.6. Ecología de invierno	7
2.7. Genética	7
2.8. Estatus de conservación	8
2.9. Densidades de población y patrones de movimiento	8
2.10. Métodos de muestreo no invasivos	11
2.10.1. Estimación de densidad con muestras no invasivas	13
2.10.2. Muestreo por métodos de captura-marcaje-recaptura	16
2.10.3. Estimador de Lincoln-Petersen	17
2.10.4. Fortalezas y debilidades de métodos de muestreo no invasivos....	18
2.11. Identificación de individuos con muestras no invasivas	20
2.11.1. Manejo y preservación de las muestras	20

2.11.2.	Extracción de ADN	20
2.11.3.	Amplificación por PCR de ADN (microsatélites)	21
2.11.4.	Genotipificación	23
2.11.5.	Errores en la genotipificación	24
3.	MÉTODOS	25
3.1.	Área de estudio	25
3.2.	Trabajo de campo	28
3.3.	Trabajo de laboratorio	32
3.3.1.	Extracción de ADN	32
3.3.2.	Preselección con locus <i>ZFX/ZFY</i>	32
3.3.3.	Genotipificación multilocus microsatélite	33
3.4.	Análisis estadístico	34
4.	RESULTADOS	35
4.1.	Resultados de muestreo	35
4.2.	Resultado de la extracción de ADN y preselección locus <i>ZFX/ZFY</i>	36
4.3.	Genotipificación multilocus microsatélite	36
4.3.1.	Variabilidad de los marcadores	38
4.4.	Tamaño de población y estimación de densidad	39
5.	DISCUSIÓN	41
6.	CONCLUSIONES	45
7.	LITERATURA CITADA.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Densidades de población de oso negro estimadas con diversas técnicas en Norteamérica.....	10
Tabla 2. Ámbitos hogareños de oso negro reportados para Norteamérica... 	12
Tabla 3. Densidades de población de oso negro estimadas mediante muestreo no invasivo y genotipificación de individuos en Norteamérica.	13
Tabla 4. Fortalezas y debilidades del muestreo no invasivo de pelo para estudios de ADN en mamíferos.	19
Tabla 5. Secuencia de cebadores de los 11 microsatélites utilizados para la genotipificación de individuos de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey durante el 2015 y 2016.....	33
Tabla 6. Número de muestras obtenidas mediante trampas de pelo en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 (etapa 1) y mayo de 2016 (etapa 2).....	35
Tabla 7. Número de individuos de oso negro identificados mediante genotipificación de ADN microsatélite, a partir de muestras colectadas con trampas de pelo en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 (etapa 1) y mayo del 2016 (etapa 2).	37
Tabla 8. Heterocigosidad esperada, observada y número de alelos encontrados para 16 individuos de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey durante el 2015 y 2016.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Distribución histórica del oso negro en Norteamérica.	5
Figura 2. Distribución potencial del oso negro en México.	5
Figura 3. Diseño de una trampa de corral de alambre de púas para obtener muestras de pelo para estudios de ADN en mamíferos (Ilustración modificada de Kendall y McKelvey, 2008).	15
Figura 4. Esquema de las tres etapas generales para la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ilustración modificada de Schwartz y Monfort, 2008).	22
Figura 5. Ejemplo de seis genotipos posibles a partir de tres alelos de un locus microsatélite.	23
Figura 6. Polígono del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, Nuevo León, México.	26
Figura 7. Sitios sugeridos para el muestreo sistemático de oso negro con trampas de pelo, para identificación de individuos mediante genotipificación de ADN microsatélite en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey.	29
Figura 8. Sitios de muestreo de oso negro con trampas de pelo instaladas en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 y mayo de 2016.	30
Figura 9. Recolección de muestras en trampa de pelo, se muestra: A) Como debe ser introducida una muestra en un sobre; B) Mechón de pelo en púa; C) Sobre debidamente identificado.	31
Figura 10. Trampas de pelo que registraron individuos de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 y mayo de 2016.	38

RESUMEN

Las poblaciones de oso negro (*Ursus americanus*) son muy variadas en Norteamérica donde se han reportado densidades entre los 0.02 hasta los 0.62 osos por kilómetro cuadrado (km²). A pesar de que en México es una especie protegida por la ley y catalogada en peligro de extinción, no se conoce el estado actual de sus poblaciones. En los años recientes se ha incrementado el número de avistamientos de esta especie en las zonas urbanas colindantes con el Parque Nacional Cumbres de Monterrey (PNCM), esto ha creado la percepción de que la población de osos negros ha aumentado. Este estudio es el primer esfuerzo para generar información básica sobre la ecología de población de oso negro en el PNCM como la densidad de población, la relación de sexos y sus patrones de movimiento, a través de un muestreo no invasivo mediante trampas de pelos para la identificación de individuos mediante genotipificación de microsatélites. Durante el 2015 y el 2016 se colocaron 35 trampas de pelo de manera sistemática en el PNCM, repitiendo 4 sesiones de muestro cada año durante la época de mayor actividad del oso negro. Se colectaron un total de 39 muestras y fueron enviadas al laboratorio Wildlife Genetics International (Nelson, BC, Canadá). A partir de las muestras, se identificaron 17 genotipos de 16 individuos diferentes (una recaptura). Con el número de individuos identificados se estimó la densidad de la población con un modelo de captura-recaptura utilizando la ecuación tradicional de Lincoln-Petersen y una ecuación modificada (Chapman). Para el 2015 mediante la ecuación tradicional la densidad estimada fue de (0.029 osos/km², 95% I. C. ± 0.05), mientras que con la ecuación modificada la densidad estimada fue de (0.019 osos/km², 95% I. C. ± 0.016). Para el 2016 no fue posible estimar la densidad con la ecuación tradicional ya que al no haber recapturas se produce un error matemático, utilizando la ecuación modificada la densidad estimada fue de (0.006 osos/km², 95% I. C. ± 0.006). Mientras que utilizando la información de ambos años la densidad estimada mediante la ecuación modificada fue de (0.052 osos/km², 95% I. C. ± 0.063). La relación de sexos encontrada en los 16 individuos fue de 13 machos (M) y 3 hembras (H). El único individuo recapturado fue un macho que se desplazó más de 30 kilómetros en línea recta en menos de 30 días.

Palabras clave: Área Natural Protegida, microsatélites, muestreo no invasivo, captura-recaptura, Lincoln-Petersen.

ABSTRACT

Black bear (*Ursus americanus*) population densities in North America have been reported to range between 0.02 and up to 0.62 bears per squared kilometer (km²). Although in Mexico they are protected and listed as an endangered species, the current status of their populations is unknown. During the last few years the number of black bear sightings has increased in the surrounding urban areas of Cumbres de Monterrey National Park (CMNP) in Nuevo Leon, Mexico. This increase in bear sightings and media coverage has created the perception that the population of black bears has increased in recent years. This study is the first effort to estimate black bear population density in CMNP, through non-invasive sampling using hair snares for the identification of individuals by microsatellite genotyping. During 2015 and 2016, 35 hair traps were systematically placed in CMNP, repeating four sampling sessions each year during months with greatest black bear activity. A total of 39 samples were collected and processed at the Wildlife Genetics International laboratory (Nelson, BC, Canada) for individual genotyping. From the samples 17 genotypes were correctly assigned to 16 individuals (one recapture). With the number of individuals identified we estimated population density using a capture-recapture model with the Lincoln-Petersen estimator and a modified version (Chapman). The density estimated for 2015 using de Lincoln-Petersen equation was (0.029 bears/km², 95% I. C. \pm 0.05), while with the modified version the density was (0.019 bears/km², 95% I. C. \pm 0.016). For 2016 it was not possible to estimate the population density with the Lincoln-Petersen estimator because there were no recaptures, with the modified version the density estimated was (0.006 bears/km², 95% I. C. \pm 0.006). Using the data from both years the density was (0.052 bears/km², 95% I. C. \pm 0.063). The sex ratio was 13 males and 3 females. The only individual recaptured was a male that moved over 30 kilometers in straight line in less than 30 days.

Key words: Natural Protected Area, microsatellites, non invasive sampling, capture-recapture, Lincoln-Petersen

1. INTRODUCCIÓN

El oso negro (*Ursus americanus*) es el carnívoro terrestre más grande y el único úrsido presente en México. De las ocho especies de la familia Ursidae, el oso negro americano es considerado la especie más común en el mundo, y la que mejor se ha adaptado a la expansión de poblaciones humanas (Pelton, 2005); sin embargo, presenta poblaciones variables a lo largo de su distribución, ya que en Canadá y noreste de los Estados Unidos de América (EUA) es considerado como una especie muy abundante (Neal, 1990; Warburton y Maddrey, 1994), mientras que en México se encuentra bajo la protección de la ley debido a su disminución durante la segunda mitad del siglo XX; como consecuencia de la cacería furtiva, comercialización de piel y grasa, envenenamiento, desarrollo y expansión de centros poblacionales, y la pérdida de su hábitat.

El oso negro ocupa una variedad de hábitats, en los que juega un papel clave en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento de los ecosistemas, ya que tiene un gran efecto en sus comunidades, al estabilizar poblaciones de sus presas y las de otros carnívoros de menor talla (Schmitz et al., 2000; Shurin et al., 2002). Ecológicamente, sirve como monitor ambiental, al reflejar cambios que tienen lugar a través de grandes regiones; por lo que se cree, que al estabilizar y recuperar sus poblaciones, se puede producir un efecto en la conservación de otras especies y su hábitat (McKinney y Delgadillo, 2004).

A pesar de ser una especie protegida por las leyes mexicanas, la información acerca de sus poblaciones es muy escasa. El Parque Nacional Cumbres de Monterrey (PNCM), no es la excepción, por lo que este estudio, tiene como objetivo el generar información básica sobre características de esta población, como densidad, relación de sexos y distancias que se desplazan los individuos.

1.1. Justificación

A pesar de que el oso negro es una especie protegida por la ley en nuestro país, no se conoce su estado de población en el PNCM. El número de reportes de avistamiento de la especie en las zonas urbanas colindantes con el parque se ha incrementado en los años recientes, sugiriendo que esto podría deberse a un crecimiento de la población, sin embargo no existen datos reales que sustenten lo anterior. La densidad de población, relación de sexos y la distancia que se desplazan los individuos será información útil para conocer la situación de la población y ayudar en las estrategias de conservación de la especie.

1.2. Hipótesis

La densidad de población de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey es media en relación a lo reportado para Norteamérica (0.3-0.4 osos/km²).

La relación de sexos de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey será de un macho por cada hembra (M1:1H).

La distancia máxima que se desplazan los osos negros en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey estará dentro del rango reportado para otras áreas de Norteamérica (10-20 km).

1.3. Objetivo general

Generar información básica de la ecología de población de oso negro en el PNCM como la densidad poblacional, así como la relación de sexos y sus patrones de movimiento.

1.4. Objetivos específicos

- Realizar un muestreo sistemático para coleccionar muestras de oso negro mediante trampas de pelo.
- Identificar individuos de oso negro mediante genotipificación de las muestras.
- Estimar el tamaño de la población y la densidad de esta, mediante la ecuación de Lincoln-Petersen.
- Estimar la relación de sexos.
- Calcular la distancia máxima que se desplazan los individuos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Clasificación taxonómica

Familia: Ursidae

Género: *Ursus*

Especie: *americanus*

Nombre científico: *Ursus americanus* (Pallas. 1780)

Nombre común: Oso negro

2.2. Características generales

Ursus americanus es un gran carnívoro, robusto de cola corta, plantígrado y con garras no retráctiles. Tiene ojos pequeños y sus orejas son redondas y erguidas (Rogers, 1980). Es el más pequeño de los osos de Norteamérica y a su vez el carnívoro más grande en México, con una longitud total de 130-200 centímetros (cm) y altura a los hombros de 61-92 cm. Dependiendo de la localidad geográfica y de la disponibilidad de alimento, el peso corporal oscila entre 90 y 216 kilogramos (kg) (Ford 1981; Herrero, 1985; Leopold, 1977). Uno de los osos negros más grandes registrados hasta la fecha pesó 365 kg y fue encontrado en el Parque Nacional Riding Mountain en Canadá. Los machos generalmente son 10% más largos que las hembras y entre 10-70% más pesados (McLean y Pelton, 1990).

Algunas medidas promedio reportadas (en cm; <desviación estándar> D.E. y *n* entre paréntesis) de oso negro del Smoky Mountains National Park, Tennessee, machos y hembras respectivamente: largo total 157 (18, 311), 143 (14, 339); circunferencia del cuello, 55 (10, 309), 46 (6, 335); circunferencia del pecho, 86 (14, 308), 75 (9, 336). Peso promedio en California (en kg, *n* en paréntesis) de machos y hembras, respectivamente, 86 (30) y 58 (11) (Piekielek y Burton, 1975).

El pelaje del oso negro es corto, lacio, uniforme y varía de negro a azul, azul grisáceo, café oscuro, canela e inclusive beige, y este puede cambiar entre mudas de pelo (Rogers, 1980). El color negro ocurre más frecuentemente en bosques boreales y en bosques templados tropicales (Rounds, 1987). Capas diferentes al negro son comunes en bosques abiertos del oeste y en las zonas desérticas en el suroeste de Estados Unidos (Rogers, 1980; Rounds, 1987). Ocasionalmente presentan manchas blancas o beige en el pecho. Existe una tonalidad blanca de la especie, que se presenta en las Islas Kermode, en la costa pacífico de British

Columbia y es considerada rara (Hornaday, 1905). Ejemplares albinos son raros (Kolenosky y Strathearn, 1987). En México se ha observado que las variaciones con color claro son exclusivas de las poblaciones que habitan en el oeste, siendo muy raras entre los osos del este (Baker, 1956). Los osos negros de tonalidades café claro pueden ser diferenciados del oso plateado (*U. arctos*) por la ausencia de una prominente joroba de musculo, además que son más pequeños (generalmente <150 kg) (Hall, 1981).

2.3. Distribución

El oso negro habita exclusivamente Norteamérica, en zonas templadas y frías. Su área de distribución abarca desde el límite de la vegetación boreal al norte de Alaska, todo el territorio de Canadá excepto la Isla Prince Edward y casi todo Estados Unidos a excepción de las regiones más áridas del suroeste (Figura 1) (Kolenosky y Strathearn, 1987). Las poblaciones de esta especie se distribuyen en las zonas montañosas, principalmente en las cañadas y cumbres cubiertas por bosques de pino y encino, por ser éstos los lugares en los que encuentran alimento y refugio. Durante la primavera y el verano también se distribuyen en los pastizales áridos que se extienden al pie de las sierras. El rango altitudinal reportado que habita la especie va desde los 650 hasta los 3,000 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Moctezuma, 1997).

En México el área de distribución de esta especie se extendió alguna vez más al sur que en la actualidad, abarcando los bosques templados de la Sierra Madre Oriental, Occidental y las sierras adyacentes. Lo reportado para esta especie incluía las regiones montañosas del noreste de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Tamaulipas, Nuevo León y Durango, extendiéndose al sur hasta Zacatecas (Leopold, 1959) (Figura 1). Los estados de San Luis Potosí y Sinaloa también fueron reportados como zonas de distribución de oso (Hall, 1981) (Figura 1).

La cacería furtiva y la reducción y modificación de su hábitat mermaron las poblaciones de esta especie, y redujeron su área original de distribución en 80%, por lo que actualmente se considera que potencialmente sólo se encuentra en el extremo norte del país (Figura 2), sin embargo no existen datos precisos de campo acerca de la distribución actual real de muchas de las poblaciones de esta especie en México (SEMARNAP, 1999).



Figura 1. Distribución histórica del oso negro en Norteamérica.

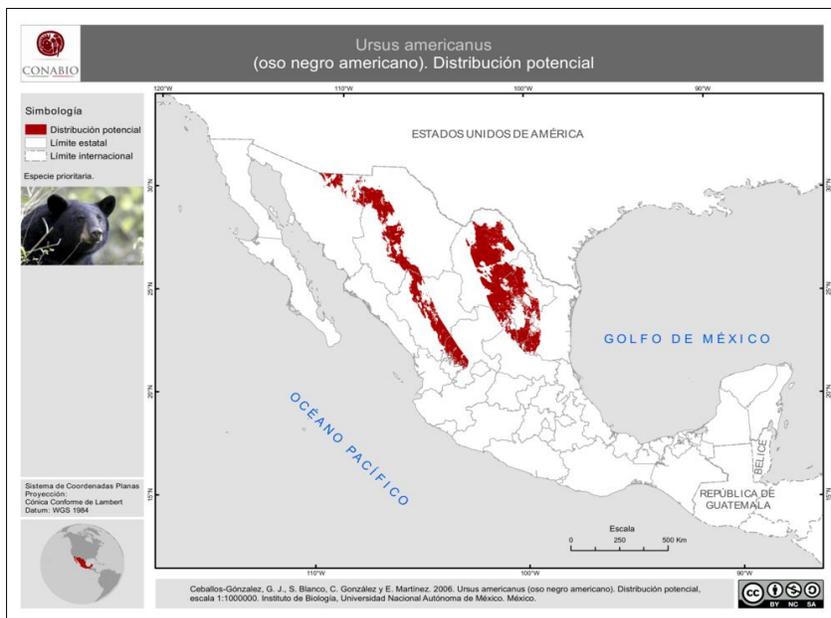


Figura 2. Distribución potencial del oso negro en México.

2.4. Reproducción y ciclo de vida

El oso negro es una especie polígama, las hembras alcanzan la madurez sexual entre los 2 y 8 años de edad (Hellgren y Vaughan, 1989^a; Poelker y Hartwell, 1973; Rogers, 1987). Los intervalos entre parto son de uno a cuatro años (Eiler et al., 1989; Kasworm y Thier 1994). En el primer parto suelen producir un oseño, pero en los siguientes el número de oseños por camada está en un rango de uno a cuatro, siendo dos lo común (Doan-Crider y Hellgren, 1996; Kasworm y Thier, 1994) y está influenciado por la condición de la madre al comienzo del invierno. La disponibilidad de comida durante otoño afecta la edad de la primera reproducción, la productividad y la tasa de supervivencia de los cachorros (Noyce y Garshelis, 1997). Las hembras entran en estro de junio a septiembre, pero la mayoría de los apareamientos se produce entre junio y julio (Eiler et al., 1989; Wimsatt, 1963). El ciclo reproductivo de las hembras está regulado por fotoperiodo (Tsubota et al., 1995). El coito puede inducir la ovulación y la implantación es retardada y ocurre de mediados de noviembre a principios de Diciembre (Wimsatt, 1963), por lo que la verdadera gestación dura de 60 a 70 días (Hellgren et al., 1990).

Los cachorros nacen entre enero y febrero, ciegos, cubiertos de pelo y sin dientes, pesando alrededor de 250 gramos (g); sin embargo, crecen rápido, amamantados con la leche materna que es rica en calorías ya que contiene hasta 45% de grasa. En primavera cuando emergen de la madriguera pesan alrededor de 2 kg, el destete se da a los 4 meses de edad, no obstante se mantienen con la madre cerca de 16 meses, periodo en el que esta no entra en celo. Para el segundo verano, la madre los aleja para volver a reproducirse y desde este momento, los jóvenes osos machos iniciarán una vida solitaria uniéndose en pareja solo en los periodos de apareamiento (Lindzey y Meslow, 1977). La edad máxima registrada para un oso negro silvestre es de 41 años, en un ejemplar cazado en los bosques del estado de Nueva York, Estados Unidos; sin embargo lo usual es que no vivan más de 20 años.

2.5. Hábitos alimenticios

El oso negro requiere de hábitats que produzcan una variedad de comida en diferentes estaciones, como también requieren áreas extensas y aisladas donde pueden resguardarse (Landers et al., 1979). El aspecto más importante del oso negro para seleccionar el hábitat es la presencia de comida, por lo que este puede variar según la estación del año (Clark et al., 1994, Hellgren y Vaughan, 1994). Las zonas de disturbio, como bosques incendiados también son áreas importantes de hábitat para el oso negro.

El oso negro tiene una dieta omnívora centrada en vegetales. En primavera, el oso negro consume brotes tiernos de vegetación y cadáveres de animales (Raine y Kansas, 1990; Stubblefield, 1993). Durante el verano, materia herbácea y frutos son los principales elementos de su dieta. En otoño, se alimentan principalmente de bayas y semillas (Irwin y Hammond, 1985). Los alimentos elegidos serán por lo general ricos en carbohidratos y proteínas (Bacon y Burghardt, 1983; Kimball et al., 1998). Dicho está que la composición de la dieta del oso negro dependerá de la localidad y de la época, para ser más específico se dice básicamente que está constituida en 75% materia vegetal y 25% materia animal (SEMARNAP, 1999).

2.6. Ecología de invierno

En la mayor parte de la distribución geográfica del oso negro, durante el invierno hay poca comida y las condiciones climáticas son adversas, a causa de esto entran en un periodo de hibernación, el cual puede durar de septiembre a mayo (Fuller y Keith, 1980). El estímulo para entrar en hibernación se relaciona con la disponibilidad de comida, el clima y la acumulación de nieve (Schooley et al., 1994; Schwartz et al., 1987). Hay diferencias en el tiempo que dura la hibernación del oso negro, hembras con crías por lo general entran antes (Schooley et al., 1994), y emergen después que lo hacen las hembras sin cachorros (Hellgren y Vaughan, 1989b). Así mismo las hembras adultas hibernan antes que los machos adultos (Lindzey y Meslow, 1976). Los individuos con más grasa comienzan a hibernar antes que los que tienen menor cantidad de grasa. En latitudes al sur de su distribución entran más tarde (enero-febrero) y emergen más temprano (marzo-abril), y no todos los osos negros del sur hibernan. En México, se sabe que las hembras preñadas generalmente hibernan, mientras que los machos permanecen activos todo el invierno; y las hembras con crías pueden o no hibernar (Doan-Crider y Hellgren, 1996).

2.7. Genética

El oso negro es diploide, y tiene $2n = 74$ cromosomas, sesenta y cuatro autosomas son acrocéntricos o telocéntricos, y 8 autosomas son metacéntricos o submetacéntricos. El cromosoma X es largo y submetacéntrico, y el cromosoma Y es pequeño y acrocéntrico (Hsu y Benirschke, 1967).

Los resultados de un estudio en genética de poblaciones de oso negro en los estados de Coahuila y Nuevo León, México, sugieren que en los sitios muestreados existen tres clados bien definidos, uno al norte de Coahuila que incluye las poblaciones de Serranías del Burro y Sierra del Carmen; un segundo clado en la región centro y sur de Nuevo León representado por las poblaciones de Picachos,

Linares y Santa Catarina; y el tercero al norte de Nuevo León incluyendo la población de Villaldama (Ortega, et al., 2014). También se han usado las herramientas genéticas de investigación para determinar ciertos movimientos migratorios, como en el caso del estado de Texas, EUA, en donde no existía oso negro en estado silvestre desde 1940, pero para 1980 se registraron algunos individuos y los estudios genéticos revelaron que estos individuos provenían de las poblaciones de Serranías del Burro (Onorato, et al., 2004). Un estudio a mayor escala en México entre las poblaciones de oso negro de la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental demuestra que dichas poblaciones no se encuentran estrechamente relacionadas, aparentemente estas poblaciones han estado históricamente separadas y no han tenido flujo genético desde la última glaciación (Varas-Nelson, 2010).

2.8. Estatus de conservación

El oso negro es la especie más abundante de los osos que habitan Norteamérica. En la Convención Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES), el oso negro se encuentra en el Apéndice II, lo que significa que aún que no se considera una especie en peligro de extinción, podría llegar a estarlo si no se regula adecuadamente su comercio y aprovechamiento. En México el oso negro está catalogado como especie protegida en peligro de extinción en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, únicamente las poblaciones de Serranías del Burro se encuentran con protección especial, debido a que estudios demuestran que estas poblaciones son grandes y estables. Las amenazas para el oso negro incluyen la destrucción y alteración de hábitat, así como alteración en el patrón de comportamiento (Mattson, 1990), el tráfico de órganos principalmente vesícula biliar (Mills y Servheen, 1994). En México se prohibió su cacería desde 1985, sin embargo la cacería ilegal como represalia por parte de agricultores que ven afectados sus cultivos de manzana o maíz (Carvajal-Villarreal y López-Villarreal, 2007); o ganaderos afectados por depredación en ganado bovino o caprino (Delgadillo-Villalobos, 2011) y en las zonas donde hay interacción entre humanos y oso negro, la cacería ilegal representa un riesgo para la conservación de la especie (Treves y Karanth, 2003).

2.9. Densidades de población y patrones de movimiento

Los individuos de oso negro pueden llegar a mostrar poca evasión temporal o espacial unos de otros, y los ámbitos hogareños y áreas núcleo en hábitats con abundancia de alimento en ocasiones se traslapan (Horner y Powell, 1990; Powell et al., 1997). Generalmente los ámbitos hogareños son más amplios en años o áreas donde la disponibilidad de comida es baja, y son reducidos en años o áreas donde la abundancia de comida es mayor; de la misma manera que los individuos tienden a ser más territoriales cuando la disponibilidad de comida es baja que

cuando es abundante (Garshelis et al., 1983; Powell et al., 1997). La densidad poblacional de oso negro ha sido estimada en distintas localidades en Norteamérica, con diferentes métodos y los valores reportados en kilómetros cuadrados (km^2) van desde 0.77 osos/ km^2 en California, EUA (Piekielek y Burton, 1975) hasta 0.06 osos/ km^2 en Arizona, EUA (LeCount, 1982) (Tabla 1). En México se conoce poco sobre el tamaño de las poblaciones de oso negro. Una de las poblaciones más estudiadas se ubica al norte, en el Estado de Coahuila, dicha población se encuentra en las Serranías del Burro. Esto gracias a las unidades de manejo para la conservación de la vida silvestre (UMA), en donde se ha monitoreado la población, y la han protegido contra la cacería y destrucción de hábitat (Tabla 1).

Entre 1991 y 1994, se hizo un estudio sobre las características poblacionales del oso negro (i.e. densidad y ámbito hogareño), en el extremo suroeste de las Serranías del Burro, en una UMA con una extensión de 100 km^2 . En dicho estudio se utilizaron técnicas invasivas (i.e. radiotelemetría) y determinaron que la densidad de oso negro en las Serranías del Burro es de las más altas reportadas hasta la fecha en Norteamérica, con un valor de 0.72 osos/ km^2 (Tabla 1). Estos resultados sugieren que las poblaciones de oso negro en esta región son abundantes, sin embargo es importante aclarar que los ranchos privados donde se realizaron estos estudios practican la suplementación alimenticia de la fauna silvestre y no son representativos de la mayoría de los ranchos donde se distribuye el oso negro.

Los ámbitos hogareños entre hembras y machos difieren considerablemente en tamaño siendo mayor el de los machos. Entre las hembras existe una marcada territorialidad cuando la disponibilidad de alimento no es alta, por lo que cada una señala los límites de su territorio mediante marcas de orina y lo defiende de la incursión de otras hembras e incluso de machos que se adentran durante época no reproductiva. Se ha reportado que los ámbitos hogareños de las hembras abarcan entre 6.5 y 25 km^2 (Fair, 1990; Rogers, 1977) (Tabla 2).

Los machos al igual que las hembras se desplazan dentro de una zona definida durante todo el año, donde cuentan con comida y refugio. Estas zonas corresponden a amplios ámbitos que se componen de un territorio individual sobre el cual poseen el dominio exclusivo y el resto puede traslaparse con el de otros individuos. Donde existe una acumulación de comida (i.e. basureros o corrientes de salmón) ambos sexos formarán una jerarquía (Rogers, 1987). Los machos suelen marcar sus territorios orinando o arañando la corteza de los árboles. Se han reportado ámbitos hogareños que abarcan desde 26 a 124 km^2 y estos varían en tamaño al paso de los años; usualmente comprenden varios territorios de hembras, pero suelen evitar la zona núcleo de éstos. Los machos subadultos de la población en las Serranías del Burro presentan ámbitos hogareños que van de 73.8 a 119.6 km^2 (Doan-Crider, 1995) (Tabla 2).

Tabla 1. Densidades de población de oso negro estimadas con diversas técnicas en Norteamérica.

Localidad	No. De osos/km ²	Referencia
California, EUA.	0.77	Piekielek y Burton, 1975.
Coahuila, Méx.	0.72	Doan-Crider, 1995.
Alberta, Can.	0.62	Young y Ruff, 1982. +
Virginia, EUA.	0.59	Hellgren y Vaughan, 1989a.
Wisconsin, EUA.	0.57•	Belant J. et al., 2005. +
Washington, EUA.	0.53	Poelker y Hartwell, 1973.
Idaho, EUA.	0.48	Beechman, 1980.
Idaho, EUA.	0.43	Beechman, 1980.
Alabama, EUA.	0.38	Kemp, 1976.
Montana, EUA.	0.38	Jonkel y Cowan, 1971.
Sonora, Méx.	0.38•	Varas-Nelson, 2010. +
Idaho, EUA.	0.34	Rohlman, 1989.
Arizona, EUA.	0.33	LeCount, 1982.
Coahuila, Méx.	0.31	Doan-Crider, 1995
Ontario, EUA.	0.30 - 0.59	Yodzis y Kolenosky, 1986.
Arizona, EUA.	0.28	Waddell y Brown, 1984.
B. C., Can.	0.27•	Mowat G. et al., 2005. +
Minnesota, EUA.	0.23	Rogers, 1987.
Alaska, EUA.	0.20	Schwartz y Franzmann, 1991.
New York, EUA.	0.20•	Gardner B. et al., 2010. +
Oregon, EUA.	0.20•	Immel y Anthony, 2008. +
Colorado, EUA.	0.18	Beck, 1991.
Maine, EUA.	0.16	Hugie, 1982.
Arizona, EUA.	0.14	LeCount, 1990
New Mexico, EUA.	0.13	Costello et al., 2001. +
Michigan, EUA.	0.12	Manville, 1983.
Maine, EUA.	0.09	Hugie, 1982.
Alaska, EUA.	0.09	Miller et al., 1987.
Arizona, EUA.	0.06	LeCount, 1987.
Sonora, Mex.	0.05	Lara-Díaz, 2010. +

Modificado de SEMARNAP, 1999.

•Densidades estimadas mediante muestreo no invasivo.

+Densidades no reportadas por SEMARNAP, 1999.

Los investigadores de fauna silvestre usan diferentes técnicas para marcar, identificar y rastrear a los individuos, como aretes, bandas de colores, collares, radiotransmisores y marcas individuales (Nietfeld et al., 1994). Cada método tiene ventajas y desventajas, el marcaje ideal debe ser no invasivo (i.e., no requerir capturar al animal), fácilmente visible, fácil de leer, de bajo costo y permanente.

Muchos de los estudios de fauna silvestre se han hecho con técnicas tradicionales que no cumplen las características del marcaje ideal y dichas técnicas cada vez son menos utilizadas.

Las “etiquetas genéticas” desarrolladas mediante genotipificación de microsatélites tienen el potencial de cumplir con muchos de los requerimientos para marcaje ideal, y los últimos avances en la tecnología están haciendo a estos métodos accesibles a niveles prácticos (Parker et al., 1998). Hace 20 o 30 años para hacer estudios genéticos de un animal se requerían grandes cantidades de tejido fresco comúnmente de diferentes órganos, para hacer estudios de electroforesis de proteínas, a consecuencia de esto los animales eran sacrificados para su estudio científico (Murphy et al., 1996). En esa época los científicos estaban bajo presión buscando técnicas no destructivas (i.e., que no requieran sacrificar al animal). El contexto realmente cambió con el descubrimiento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando una polimerasa termoestable (Mullis y Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Con esto se comenzarían a utilizar muestras no destructivas como sangre, pequeñas biopsias, e inclusive pelos desprendidos directamente del animal (Wright y Wynford-Thomas, 1990). Otro avance fue demostrar que pelos, plumas, escamas o piel desprendida, heces o inclusive saliva podían producir una valiosa fuente de ácido desoxirribonucleico (ADN) (Valsecchi et al., 1998).

2.10. Métodos de muestreo no invasivos

Hoy en día hay métodos novedosos, que permiten estudiar poblaciones sin la necesidad de observar directamente a los ejemplares o capturarlos, por lo que se consideran “no invasivos” (Taberlet y Luikart, 1999). Desde hace más de 20 años el término “muestreo no invasivo” se ha aplicado generalmente a la recolección de muestras de ADN (e.g., pelos, heces) (Morin y Woodruff, 1992). En aplicaciones recientes se incluyen trabajos basados en muestras diferentes al ADN, como fotografías obtenidas mediante cámaras fotográficas activadas remotamente (Moruzzi et al., 2002). Hay una amplia rama de objetivos que potencialmente se pueden alcanzar, con un diseño efectivo de muestreo no invasivo, algunos de ellos son: evaluación de ocurrencia y distribución (Zielinski et al., 1995); estimación de abundancia relativa (Engeman et al., 2005); y estimación de abundancia (Mills et al., 2000).

Los estudios de estimación de abundancia, suelen ser más defendibles que los de abundancia relativa como índices del tamaño de población, dado que se requiere la identificación de individuos, no se hacen supuestos sobre la población y las estadísticas (datos) de detección (e.g., número de huellas, fotografías). Por lo tanto, técnicamente estos estimados reflejan densidad (i. e., individuos/área de estudio). Generalmente es más práctico si se expresa esta densidad en unidades

universales, tales como km² (Long y Zielinski, 2008). Hay que reconocer que los métodos no invasivos, pueden tener efectos intrusivos. Si bien es cierto que por definición, estos métodos no requieren contacto físico con el ejemplar, estos pueden tener repercusiones en su comportamiento. En un estudio reciente encontraron que la luz de una cámara remota, resultó en evasión del sitio por la especie en estudio (Schipper, 2007). Además ciertos métodos de muestreo como “trampas de pelo” utilizan atrayente o cebo, lo que también puede resultar en evasión o atracción hacia la trampa (Harris y Knowlton, 2001).

Tabla 2. Ámbitos hogareños de oso negro reportados para Norteamérica.

Localidad	Sexo/edad	Valor mínimo en km²	Valor máximo en km²	Valor promedio en km²	Referencia
Coahuila, Méx.	Hembras adultas	12.0	27.2	19.6	Doan-Crider, 1995.
Coahuila, Méx.	Machos subadultos	73.8	119.6	96.7	Doan-Crider, 1995.
Arizona, EUA.	Hembras adultas	*	*	17.8	LeCount, 1984.
Arizona, EUA.	Machos subadultos	*	*	42.0	LeCount, 1984.
Arizona, EUA.	Machos adultos	*	*	29.0	LeCount, 1984.
Minnesota, EUA.	Hembras adultas	6.5	25.0	15.7	Rogers, 1977.
Washington, EUA.	Hembras adultas	*	*	5.2	Poelker y Hartwell, 1973.
Washington, EUA.	Machos adultos	*	*	51.7	Poelker y Hartwell, 1973.
Idaho, EUA.	Hembras adultas	*	*	49.0	Amstrup y Beecham, 1976.
Idaho, EUA.	Machos adultos	*	*	120.0	Amstrup y Beecham, 1976.

Tomado de SEMARNAP, 1999.

*No se especificaron los datos.

2.10.1. Estimación de densidad con muestras no invasivas

Densidad de población se define como número de individuos por unidad de área (e.g., 1 oso/km²) (Long y Zielinski, 2008). Las heces y pelos son algunas de las fuentes de ADN que se pueden obtener de manera no invasiva, para hacer estimaciones de densidad de población. Algunas ventajas del pelo sobre las heces son que, estos contienen menos inhibidores químicos que afectan la PCR, menos contaminación de ADN de otras fuentes (e.g., ADN de presas contenido en heces), además comúnmente hay una tasa más elevada de identificación de individuos (Schwartz y Monfort, 2008). La raíz del pelo de mamífero contiene suficiente ADN para análisis por amplificación con PCR de marcadores microsatélite. Para oso el pelo es una buena opción porque frecuentemente lo dejan en árboles, madrigueras y alambres de púas (Taberlet y Bouvet, 1992).

La identificación de especies con muestras de pelo es tan vieja como la humanidad misma, pero no recibió atención por parte de la comunidad científica hasta que se desarrollaron métodos eficientes y de bajo costo para la amplificación de ADN (Long y Zielinski, 2008). Antiguamente se utilizaban las características morfológicas para identificar especies a través del análisis en microscopio de las muestras de pelo. Los carnívoros de Norteamérica se pueden identificar confiablemente al nivel de familia mediante esta técnica. Los pelos de los cánidos por ejemplo, pueden diferenciarse consistentemente de los pelos de félidos, pero los pelos de especies más cercanas por lo general son difíciles de distinguir (McDaniel et al., 2000). Ciertamente, para la mayoría de las especies se requiere análisis de ADN para identificar especies a través de muestras de pelo, así como para hacer identificación de individuos y estudiar características de población tales como abundancia (Woods et al., 1999), estructura (Proctor et al., 2005), patrones de movimiento (Proctor et al., 2004), parentesco (Ritland, 1996) y cuello de botella poblacional (Luikart y Cornuet, 1998). Para el caso del oso negro se han hecho estudios sobre presencia y distribución, abundancia relativa, abundancia y densidad, entre otros (Tabla 3).

Tabla 3. Densidades de población de oso negro estimadas mediante muestreo no invasivo y genotipificación de individuos en Norteamérica.

Localidad	Osos/km ²	Referencia
Wisconsin, EUA.	0.57	Belant J. et al., 2005.
Sonora, Méx.	0.38	Varas-Nelson, 2010.
Louisiana, EUA.	0.36	Boersen et al., 2003.
S. Carolina, EUA.	0.34	Drewry et al., 2013.
B. C. Can.	0.27	Mowat G. et al., 2005.
New York, EUA.	0.20	Gardner B. et al., 2010.
Oregon, EUA.	0.20	Immel y Anthony, 2008.
S. Carolina, EUA.	0.05	Drewry et al., 2013.

El uso de métodos de muestreo no invasivo a partir de muestras de pelos para estudios de fauna silvestre ha crecido rápidamente desde mediados de 1990. Las técnicas de muestreo no invasivas para análisis de ADN fueron utilizadas por primera vez para el estudio de especies raras, elusivas y carismáticas como oso grizzli (Woods et al., 1999), oso negro (Boersen et al., 2003), lince canadiense y marta americana (Mowat y Paetkau, 2002) en Norteamérica. Los muestreos de pelo ahora son más comunes y se han expandido para incluir un gran número de carnívoros. Existen diferentes métodos para coleccionar muestras de pelos, algunos incluyen la recolección oportunista en madrigueras, senderos u otras áreas frecuentadas por la especie de interés. Pero en este caso describiremos los dispositivos o mecanismos específicamente diseñados y desarrollados para la recolección de pelo, puesto que para estimaciones de abundancia los métodos requieren conocer el lugar y el momento en que se muestrearon los individuos (e.g., en que trampa y en qué sesión del muestreo) (Kendall y McKelvey, 2008). Un muestreo de pelo generalmente requiere un dispositivo de recolección o una serie de estos dispositivos, (e.g., alambre de púas, cinta adhesiva, o cepillos) estratégicamente situados dentro de un sitio de muestreo, en forma de un corral o un cubículo (Kendall y McKelvey, 2008). Para que una metodología de muestreo sea efectiva, ésta debe permitir el paso libre del animal, enganchar la muestra de pelo, y finalmente las muestras resultantes deben contener ADN en buena cantidad y calidad (Kendall y McKelvey, 2008). La metodología para muestreo de pelo puede ser subdividida en dos tipos; los cebados o activos y los no cebados o pasivos. Los métodos cebados suelen ser los más usados, sin embargo, los pasivos pueden ser más efectivos o apropiados para ciertas especies o para abordar estudios precisos (e.g., uso de hábitat), ya que el comportamiento del animal no es afectado por la atracción del cebo (Kendall y McKelvey, 2008). Los métodos pasivos se pueden agrupar en dos categorías: 1) Objetos de frotación natural (e.g., arboles con alambre de púas); 2) Trampas en las rutas de desplazamiento (e.g., alambres de púas tendidos en pasaderos, cintas adhesivas).

A su vez, los métodos cebados se pueden dividir en 4 tipos: 1) Corrales: que son estructuras que usan al menos un alambre de púas para cubrir perimetralmente un atrayente y son principalmente usados para úrsidos. 2) Estaciones de frotación: estaciones con señuelos de olor. 3) Árboles y postes: rodeados de alambre de púas y con atrayente en la parte superior. 4) Cubículos: que son cajas o tubos con atrayente y alambre de púas en el interior (Kendall y McKelvey, 2008). Para oso negro existe una amplia variedad de técnicas de muestreo de pelo que son efectivas, entre las cuales el corral de púas es la “trampa de pelo” más ampliamente utilizada para esta especie (Boulanger et al., 2008).

El corral o trampa de pelo típicamente consiste de un perímetro de alambre de púas, clavado a árboles o postes rodeando un cebo (Figura 3). La altura del cable es ajustada a la altura de la especie objetivo, con la intención de enganchar un mechón de pelo cuando el animal cruce encima o debajo del alambre, el cual se ha comprobado que no causa daño en la piel de los osos (Woods et al., 1999).

Generalmente se utiliza un solo alambre, pero algunos estudios han encontrado que usando dos alambres paralelos a 20 y 50 cm del suelo se obtienen más muestras, seguramente debido a que se da un mayor contacto entre el oso y el alambre; mientras que otros estudios también reportan que no hay beneficio con usar un segundo alambre (Tredick, 2005). Otros estudios han encontrado que agregar otro alambre únicamente incrementa el trabajo de campo así como el del laboratorio, sin mejorar la precisión de la estimación (Boulanger et al., 2006).

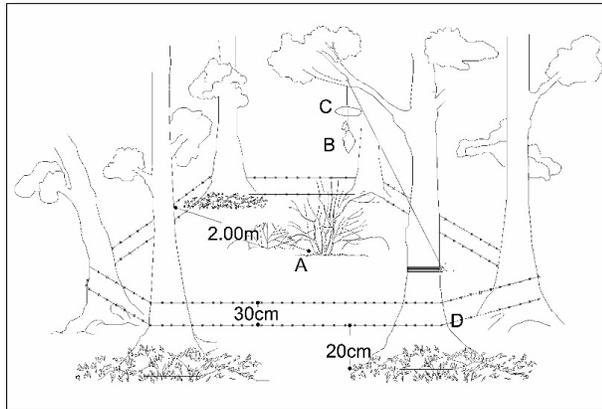


Figura 3. Diseño de una trampa de corral de alambre de púas para obtener muestras de pelo para estudios de ADN en mamíferos (Ilustración modificada de Kendall y McKelvey, 2008).

Una trampa de pelo está compuesta por: (A) Ramas y hojas impregnadas con atrayente; (B) cebo o atrayente; (C) protector de lluvia para cebo; (D) alambre de púas clavado. El atrayente debe ser posicionado de tal manera que el animal se vea obligado a cruzar el alambre, y no únicamente olfatear desde el exterior. Para esto el cebo debe estar a 2 metros del perímetro de alambre (Figura 3). Para prevenir que el animal cruce el perímetro sin dejar muestra, idealmente se debe rellenar las superficies irregulares para mantener la altura apropiada del piso al alambre y utilizar ramas para obstruir los terrenos donde queda muy bajo el alambre (Kendall y McKelvey, 2008). El sitio específico donde se ubicará la trampa usualmente se basa en la calidad del hábitat y el patrón de actividad de la especie. Para oso negro algunos estudios sugieren que estén montadas a ≥ 250 metros de caminos y senderos y a ≥ 500 metros de asentamientos humanos por seguridad de los humanos y de la especie (Drewry et al., 2013). En las zonas donde se desarrollan actividades ganaderas es recomendable hacer una cerca de exclusión al ganado rodeando el perímetro de la trampa. En sitios con altas densidades de ganado en Montana, muchas de las trampas sin cerca de exclusión no presentaron muestras de pelo de oso, porque el ganado pisoteó los alambres o tumbó el pelo de oso, además puede enmascarar los pelos de oso con su propio pelo (K. Kendall, datos sin publicar; R. Mace, Montana Fish, Wildlife, and Parks). A pesar de que la trampa de alambre de púas no concentra a los animales para pasar por una misma zona, hay que considerar que es posible que dos individuos crucen por la misma, esto puede resultar en una muestra mezclada (i.e., dos individuos dejan pelo en la misma

púa). Generalmente es posible identificar la especie a partir de una muestra mezclada, pero si se quiere identificar individuo, será difícil hacerlo (Roon et al., 2005). Para identificar individuos es recomendable minimizar coleccionar muestras mezcladas de múltiples individuos, esto puede lograrse revisitando las trampas en periodos de tiempo breves, utilizar métodos que permitan coleccionar muestras una sola vez y utilizar cámaras de foto-trampeo (Bremner-Harrison et al., 2006).

2.10.2. Muestreo por métodos de captura-marcaje-recaptura

El método tradicional de captura-marcaje-recaptura (captura-recaptura de aquí en adelante) utiliza el número total de individuos capturados durante dos o más sesiones de muestreo, junto con la probabilidad de captura de cada individuo para estimar el tamaño de la población. La probabilidad de captura se estima analizando el patrón de capturas y recapturas de diferentes sesiones durante el estudio. Existen métodos novedosos que adaptan el modelo de captura-recaptura a partir de datos generados con muestreos no invasivos. Estos métodos utilizan el número de individuos detectados, junto con la probabilidad de detectar a los animales (calculada con el número de re-detecciones) —el equivalente no invasivo de recaptura— para estimar el tamaño de población (Boulanger et al., 2008; Gardner et al., 2010).

Los modelos de captura-recaptura se clasifican en “*cerrados*” y “*abiertos*”, de acuerdo a los supuestos respecto a los movimientos, natalidad y mortalidad de la población. Los modelos *cerrados* asumen que no hay cambios en el tamaño de la población (i.e., nacimientos, muertes, inmigración o emigración) entre las sesiones de muestreo y se usan para estimar abundancia (Imell y Anthony, 2008). Los modelos *abiertos* en contraste, acogen este tipo de cambios y proporcionan estimaciones de supervivencia y migración además de abundancia (Boulanger y McLellan, 2001). Para que un estudio de captura-recaptura sea exitoso se debe maximizar la probabilidad de detección y minimizar la heterogeneidad de detección. La probabilidad de detección debe ser suficientemente alta para que todos los animales tengan oportunidad de ser detectados (Lukacs y Burnham, 2005). Además muchos individuos deben estar marcados para lograr un adecuado nivel de precisión y de hecho se dice que incrementar la probabilidad de detección tanto como sea posible es “la ley” en los métodos de captura-recaptura (Lukacs y Burnham, 2005).

En muchos casos, especialmente con carnívoros que tienen poblaciones con baja densidad y ámbitos hogareños amplios, el esfuerzo de muestreo requerido para una alta probabilidad de detección y re-detección, implica un gasto económico y de tiempo que lo hacen prohibitivo (Boulanger et al., 2008). Por lo tanto hay que evaluar el potencial realista para llevar a cabo un estudio de estas características. La otra importante regla para estudios de captura-recaptura es minimizar la heterogeneidad de detección. Manteniendo las probabilidades de detección iguales entre individuos

o entre subgrupos, para reducir sesgos. La violación al supuesto de la igualdad de probabilidad de detección puede ocurrir cuando individuos o grupos tienen diferentes probabilidades de detección. (e.g., los osos machos tienden a usar más los senderos, por lo que un estudio de excretas en senderos resultaría en un sesgo) (Lukacs y Burnham, 2005). Una forma de minimizar la heterogeneidad de detección es utilizar diferentes métodos de muestreo, puesto que no es necesario que la probabilidad de detección obligatoriamente sea la misma (solo durante cada sesión de muestreo los animales deben tener la misma). En un estudio llevado a cabo en Michigan, EUA se utilizaron muestras de pelo de 5 sesiones de muestreo con trampas de pelo cebadas, y después una sesión final utilizando muestras de tejido de osos cazados para estimar la abundancia de oso negro (Dreher et al., 2007).

2.10.3. Estimador de Lincoln-Petersen

Este modelo es el más simple de los métodos de captura-recaptura. Las bases de éste método fueron utilizadas por primera vez en EUA en donde marcaron aves acuáticas migratorias con bandas, para en el año posterior calcular cuántas de las aves cazadas habían sido marcadas (Lincoln, 1930). Inicialmente durante un muestreo un número n_1 de animales es capturado, marcado y liberado. Posteriormente, en un segundo muestreo un número n_2 de animales es capturado, de los cuales, algunos m ya se encuentran marcados (Lancia et al., 1996). Intuitivamente la proporción de animales marcados en el segundo muestreo, debe ser equivalente a la proporción de animales marcados en toda la población (asumiendo que la probabilidad de captura es la misma para individuos marcados y no marcados) por lo tanto:

$$\frac{m}{n_2} = \frac{n_1}{N}$$

Donde N es el tamaño de la población (Lancia et al., 1996).

La población N por lo tanto puede calcularse despejando la ecuación anterior, con lo cual obtenemos la ecuación de Lincoln-Petersen, que dice que el tamaño de la población es igual al número de individuos marcados en la primera etapa multiplicado por el número de individuos capturados en la segunda etapa, entre el número de recapturas (Lancia et al., 1996).

Y se representa:

$$N = \frac{(n_1 \cdot n_2)}{m}$$

Dónde: N =Tamaño de población.

n_1 = Número de individuos capturados y marcados en la primera etapa.

n_2 = Número de individuos capturados posteriormente.

m = Número de individuos recapturados.

El error estándar (E.E.) se puede calcular con la ecuación:

$$E.E. = \sqrt{\frac{n_1^2 n_2 (n_2 - m)}{m^3}}$$

Para determinar los límites superior (L.S.) e inferior (L.I.) dentro de los cuales se encuentra la población (95% de confianza) se suma y se resta dos veces el valor del E.E. a la estimación del tamaño de la población N . Estas fórmulas son satisfactorias para situaciones en donde el valor de m sea suficientemente grande, cuando esto no se cumple el sesgo puede ser grande (Bailey, 1952). Sin embargo, Chapman (1951) reporta una versión modificada de la ecuación de Lincoln-Petersen para reducir dicho sesgo que dice:

$$\hat{N} = \left[\frac{(n_1 + 1)(n_2 + 1)}{(m + 1)} \right] - 1$$

(Chapman, 1951).

Asimismo, Chapman (1951) reporta que la varianza de \hat{N} se calcula:

$$var \hat{N} = \frac{(n_1 + 1)(n_2 + 1)(n_1 - m)(n_2 - m)}{(m + 1)^2 (m + 2)}$$

Con lo anterior entonces se puede calcular un intervalo de confianza (I.C.) $\hat{N}c$ con un 95% de precisión de acuerdo con Seber (1982) donde se tiene que:

$$\hat{N}c \pm 1.965 \sqrt{var(\hat{N})}$$

(Seber, 1982).

2.10.4. Fortalezas y debilidades de métodos de muestreo no invasivos

El muestreo de pelo no invasivo proporciona un medio para obtener información genética de animales con una ubicación conocida y ha sido de gran ayuda en la conservación y el manejo de especies que son solitarias, potencialmente peligrosas o que habitan en zonas con densa vegetación. Para estudios de captura-recaptura, las etiquetas genéticas tienen la ventaja que no se pueden perder (Tabla 4) (Kendall y McKelvey, 2008). A pesar de que como ya se mencionó esta metodología puede generar una heterogeneidad en el muestreo por atracción o evasión de las trampas, ésta siempre será menor que los animales que han sido capturados físicamente mediante trampas convencionales (Kendall y McKelvey, 2008). La colecta de pelos con técnicas no invasivas y posterior análisis genético de las muestras puede ser una metodología cara comparada con otros métodos de investigación, pero si el estudio requiere la identificación de individuos los costos son comparables o más bajos que algunos otros métodos como los tradicionales con captura física (Kendall

y McKelvey, 2008). Los análisis genéticos asociados a muestras de pelo son caros no únicamente por los precios de mano de obra, materiales (e.g., ADN polimerasa), y equipo, también lo son porque las muestras de pelo colectadas de forma no invasiva son inherentemente costosas (Kendall y McKelvey, 2008). Una muestra de pelo puede no producir información debido a que el ADN se encuentra degradado, contiene muy poco, o la muestra contiene pelos de más de un individuo. Por el otro lado, el pelo como fuente de ADN, generalmente está menos degradado que el extraído de excretas y proporciona información y resultados más consistentes (Tabla 4) (Kendall y McKelvey, 2008). Mientras que los métodos para coleccionar muestras de pelo y su análisis genético pueden proporcionar información acerca de un gran número de individuos, representando así una significativa proporción de una población, también es cierto que el análisis genético de pelo no puede brindar información sobre la edad del animal, estado reproductivo, condición corporal o patrón de movimiento diario (Tabla 4).

Tabla 4. Fortalezas y debilidades del muestreo no invasivo de pelo para estudios de ADN en mamíferos.

Fortalezas	Debilidades
<ul style="list-style-type: none"> •Comúnmente se logra un muestreo representativo. •Se pueden estudiar áreas grandes, remotas o especies crípticas. •Permite diferenciar entre especies cercanas, individuos y sexo. •Aplicable en una amplia gama de hábitats. •Se pueden conocer muchos datos sobre la genética de una población. •Se pueden coleccionar muestras de múltiples especies. •Se pueden mezclar métodos pasivos y cebados para mejorar la calidad del muestreo y reducir sesgos. 	<ul style="list-style-type: none"> •La cantidad de ADN varía considerablemente entre especies. •Se requiere análisis de ADN para identificación de especie, individuos y sexo. •Los métodos cebados requieren una respuesta por parte de la especie objetivo. •No existen dispositivos de muestreo efectivos para todas las especies. •La degradación de ADN puede darse rápido en ambientes húmedos y calientes. •Las trampas se cubren de nieve en invierno. •La mayoría de los diseños son efectivos únicamente para la especie objetivo, o bien para especies similares en talla y comportamiento.

(Kendall y McKelvey, 2008).

2.11. Identificación de individuos con muestras no invasivas

La estimación de abundancia y densidad a partir de información obtenida de muestras de pelo requiere la identificación individual basada en ADN nuclear. El ADN mitocondrial (ADNmt) es por lo general menos variable entre individuos de una especie que el ADN nuclear, por lo que este último se prefiere para identificación individual y dentro del ADN nuclear, los microsatélites son uno de los marcadores genéticos más comúnmente utilizados para identificación de individuos (Kendall y McKelvey, 2008). Identificar individuos a partir de muestras no invasivas requiere un meticuloso procesamiento de la muestra, desde que es colectada, su preservación, extracción de ADN, amplificación de ADN (microsatélites) por PCR, genotipificación y errores en el genotipificado (Taberlet y Luikart, 1999).

2.11.1. Manejo y preservación de las muestras

El primer problema al que se enfrentan los investigadores de campo es elegir un método de preservación que no comprometa la integridad de las muestras de pelo por varias semanas o meses después de colectadas (Taberlet y Luikart, 1999). Con las condiciones de almacenamiento apropiadas el ADN es una molécula que puede permanecer viable para su estudio por miles de años (e.g., Hofreiter et al., 2001; Leonard et al., 2005). La forma de almacenamiento y el tiempo entre la colecta y la extracción de ADN pueden influenciar en el éxito y la tasa de error. El ADN se degrada con el tiempo, sobre todo cuando es expuesto a la humedad y la luz ultravioleta (UV) (Lindahl, 1993). Hoy en día se sabe que una de las formas más factibles, en cuanto a costo y practicidad es colocarlas en sobres de papel con desecante, de tal manera que así las requieren algunos laboratorios comerciales especialistas (Wildlife Genetics International). La contaminación es un aspecto al que se le debe prestar importancia, ya que esta puede ocurrir desde la recolección de la muestra y puede ser causada por el cebo, animales o muestras previamente manejadas o mascotas (Schwartz y Monfort, 2008). Se recomienda el uso de guantes de látex y pinzas esterilizadas con calor para recolectar las muestras de pelo. Si la especie de estudio no pertenece al género de los primates la contaminación con el ADN del personal de campo no es de gran relevancia (Schwartz y Monfort, 2008).

2.11.2. Extracción de ADN

En teoría un pelo con raíz contiene suficiente ADN para ser analizado y hacer identificación de individuos, sin embargo se recomienda utilizar ≥ 4 pelos (Woods et al., 1999). Con los métodos convencionales de extracción de ADN que utilizan fenol/cloroformo usualmente se obtienen malos resultados, debido al pobre contenido de ADN comúnmente encontrado en los pelos (Roon et al., 2003). Estas

dificultades fueron superadas con la aparición de nuevas formas de extracción como el método “Chelex” (Walsh et al., 1991) y recientemente se han desarrollado kits comerciales para la extracción de ADN (e.g., QIAamp Kit, Qiagen). En estudios comparativos estos kits han probado funcionar tan bien o mejor que los métodos utilizados en el pasado los cuales son más complejos (Wasser et al., 1997; Peacock et al., 2011). Evaluar la viabilidad del ADN extraído de muestras de pelo cuantificándolo con métodos convencionales (e.g., fluorometría) puede ser de poca utilidad, porque este puede ser muy poco. Aún si grandes cantidades fueron extraídas el ADN puede estar degradado, por lo que una opción para comprobar su viabilidad es hacer una PCR y verificar si amplifica exitosamente (Taberlet y Luikart, 1999). Para evitar contaminación durante la extracción, algunos laboratorios tienen instalaciones separadas para la recepción y extracción de ADN de las muestras, además algunos utilizan irradiación de rayos UV sobre las superficies, cloro u otros químicos (Schwartz y Monfort, 2008).

2.11.3. Amplificación por PCR de ADN (microsatélites)

La técnica de PCR fue desarrollada por Kary Mullis en el año 1983 y el proceso consiste en amplificar un fragmento de ADN mediante cebadores específicos, que flanquean la región a amplificar y la enzima polimerasa (Taq) proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*, ya que ésta es estable a temperaturas de 90°C (Watson et al., 1992). La técnica puede ser descrita como una maquina fotocopidora que producirá muchas copias de los fragmentos deseados, permitiendo así la visualización del producto amplificado (Schwartz y Monfort, 2008). La PCR consta de tres etapas que forman un ciclo, estas etapas son desnaturalización, alineación y extensión (Figura 4). En la desnaturalización la muestra de ADN se mezcla con los 4 nucleótidos, la enzima Taq polimerasa, agua, buffer y los cebadores. Estos cebadores tienen la función de reconocer su contraparte de ADN para dar comienzo a la amplificación. Esta mezcla se calienta a 92°-94°C, para que se desnaturalice y se separe en las dos hebras (Watson et al., 1992).

Durante la alineación la temperatura de la mezcla se enfría para que descienda (entre 50°-70°C, dependiendo del segmento a amplificar) para que los cebadores se unan a los segmentos 3' de la secuencia que se quiere amplificar (Watson et al., 1992). En la extensión la temperatura es elevada nuevamente a 72°C y es en este momento cuando la enzima polimerasa agrega los nucleótidos en dirección 5' para sintetizar una nueva cadena complementaria de ADN, dando fin un ciclo (Watson et al., 1992). Estos ciclos se repiten hasta obtener el número de copias deseado, teóricamente, si la plantilla de ADN contiene únicamente una copia del ADN diana, y si la eficiencia del PCR es 0.7 (proporción de moléculas amplificadas cada ciclo), entonces se requerirán 44 ciclos de amplificación para obtener 10 ng del ADN diana al final del PCR (Ramekers et al., 1997).

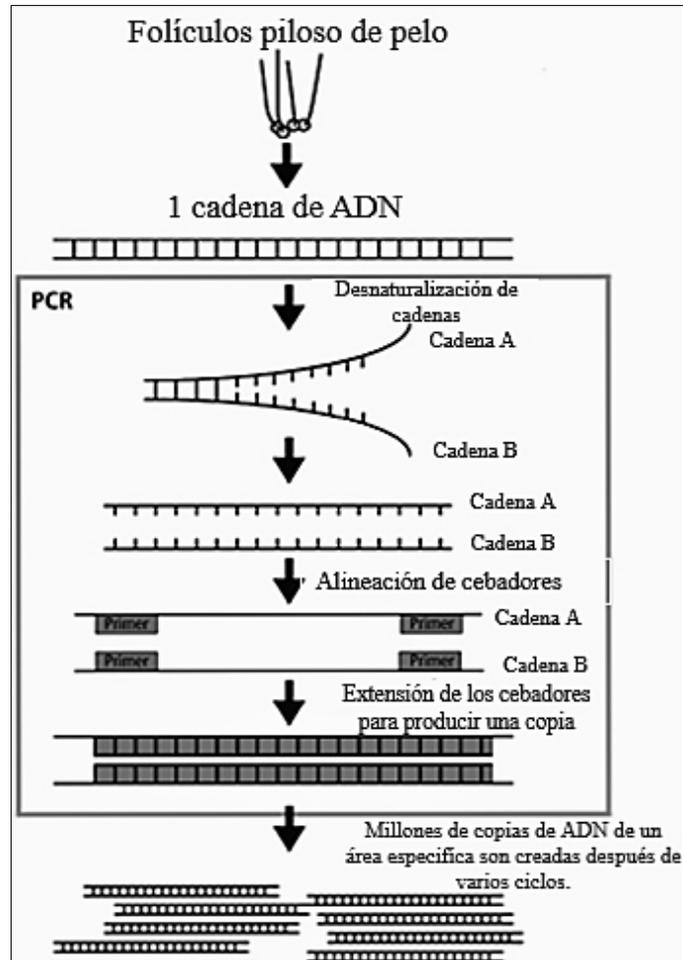


Figura 4. Esquema de las tres etapas generales para la amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ilustración modificada de Schwartz y Monfort, 2008).

Las secuencias de tipo microsatélite (STR por sus siglas Short Tandem Repeats), están constituidas por unidades cortas (motivos básicos) de 2 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem, un diverso número de veces (González, 2003). Son secuencias no codificantes altamente variables o polimórficas, entre y dentro de individuos. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo *locus*. Estas diferencias surgen debido a la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico (Ellegren, 2004).

Los microsatélites han sido durante muchos años los marcadores preferidos para múltiples objetivos como genética forense, pruebas de paternidad, análisis poblacionales, estudios de diversidad e identificación, construcción de mapas genéticos, entre otros (Pico y Belén, 2012). Los microsatélites tienen ciertas características que los hacen ser preferibles, como cebadores específicos para cada

2.11.5. Errores en la genotipificación

Los errores de genotipificación pueden afectar dramáticamente los resultados de un estudio, sobre todo cuando se trata de estimación de abundancia (McKelvey y Schwartz, 2004). Los errores en la genotipificación pueden ocurrir debido a la baja concentración de ADN (Wandeler et al., 2003), lo que puede resultar en la falla de un alelo para amplificar, problema llamado alelo ausente (allelic dropout), produciendo un falso homocigoto (Miller y Waits, 2003). Los errores en la genotipificación también pueden ocurrir debido a la amplificación preferencial de un alelo pequeño (i.e., el alelo grande está ausente o hay dominancia del alelo corto) (Wattier et al., 1998). Además durante la extensión se pueden amplificar productos con “tartamudeo” que diferirán de la plantilla de ADN que se está amplificando, este tartamudeo puede dar diferentes alelos por lo tanto diferenciar entre homocigotos y heterocigotos. Finalmente, si hay mutación de los sitios en que se alinearán los cebadores, algunos alelos pueden no ser amplificados a este problema se le denomina alelo nulo, la diferencia con el alelo ausente es que esto no ocurre al azar, sino que no amplificará consistentemente (Shaw et al., 1999).

Existen diversos métodos conocidos para identificar y eliminar dichos errores. Uno es llamado multitubos, en el cual es necesario (en casos específicos) realizar hasta 7 reacciones de PCR por locus para obtener un genotipo correcto con un 99% de confianza. Aunque este método puede detectar y eliminar errores, tiene la desventaja de incrementar los costos económicos y el uso del material de muestra que suele ser poco (Taberlet et al., 1996).

Otro método es cuantificar la cantidad de ADN nuclear que puede ser utilizado para amplificación. Éste método provee de información de la concentración de ADN antes del análisis y permite descartar muestras inutilizables (Morin et al., 2001). Una alternativa es el uso de algoritmos por computadora a través de programas diseñados para esto. GIMLET (Valière et al., 2002) es uno de estos y puede identificar falsos homocigotos y falsos alelos, una desventaja es que requiere de repeticiones del genotipado para cada muestra. Otro algoritmo comúnmente utilizado es el basado en la máxima verosimilitud (maximum likelihood-based) que utiliza el programa RELIOTYPE (Miller et al., 2002).

3. MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El PNCM es un Área Natural Protegida (ANP) de competencia de la Federación localizada en el estado de Nuevo León, entre las coordenadas geográficas 26°31'00" de Latitud Norte y 100° 17'20". Se ubica en el sistema montañoso de la Sierra Madre Oriental, dentro de la Subprovincia de la Gran Sierra Plegada, constando de una serie de sierras menores de estratos plegados, formando cañones, amplios valles y zonas de topografía accidentada. El rango de elevación de esta ANP va desde los 600 msnm hasta los 3,400 msnm (Lugo-Hubp, 1990). Forma parte territorial de ocho municipios; Allende, García, Montemorelos, Monterrey, Rayones, Santa Catarina, Santiago y San Pedro Garza García, con una superficie total de más de 1,773 km² (Figura 6) (González-Saldivar et al., 2013).

Este Parque Nacional es de gran importancia para la Ciudad de Monterrey y su área metropolitana, como lo es para toda la República Mexicana, ya que aparte de representar el mayor captador de agua que existe en Nuevo León, es considerada por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), como "Región Terrestre Prioritaria" por su alto valor para la conservación (González-Saldivar et al, 2013). Esto, ya que el PNCM funge como corredor biológico, uniendo áreas de bosques templados con áreas más secas al norte. Dentro del área que comprende esta Área Natural Protegida, se presentan zonas alternadas de bosques de pino y chaparral en buen estado de conservación, lo que lo hace acreedor a una categoría alta dentro de las Regiones Terrestres Prioritarias. (González-Saldivar et al., 2013). Destacando además, que el PNCM también representa relevancia internacional, pues es reconocido por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) como Reserva MAB (Programa MAB/Man and Biosphere) (Chape et al., 2008).

La combinación de variadas condiciones de elevación, pendiente, orientación de las laderas y el patrón general de vientos en la región da origen a una gran diversidad de flora en el PNCM, con al menos 1,368 especies de flora y fauna, de las cuales 73 son consideradas en alguna categoría de riesgo (SEMARNAT, 2010). La humedad, condicionada por los patrones generales de clima, juega un papel importante en la distribución de la vegetación. Este fenómeno crea un efecto de aridez en las vertientes de sotavento, lo cual refleja un cambio dramático en la fisonomía de la vegetación y en su riqueza florística (González-Saldivar, 2013).

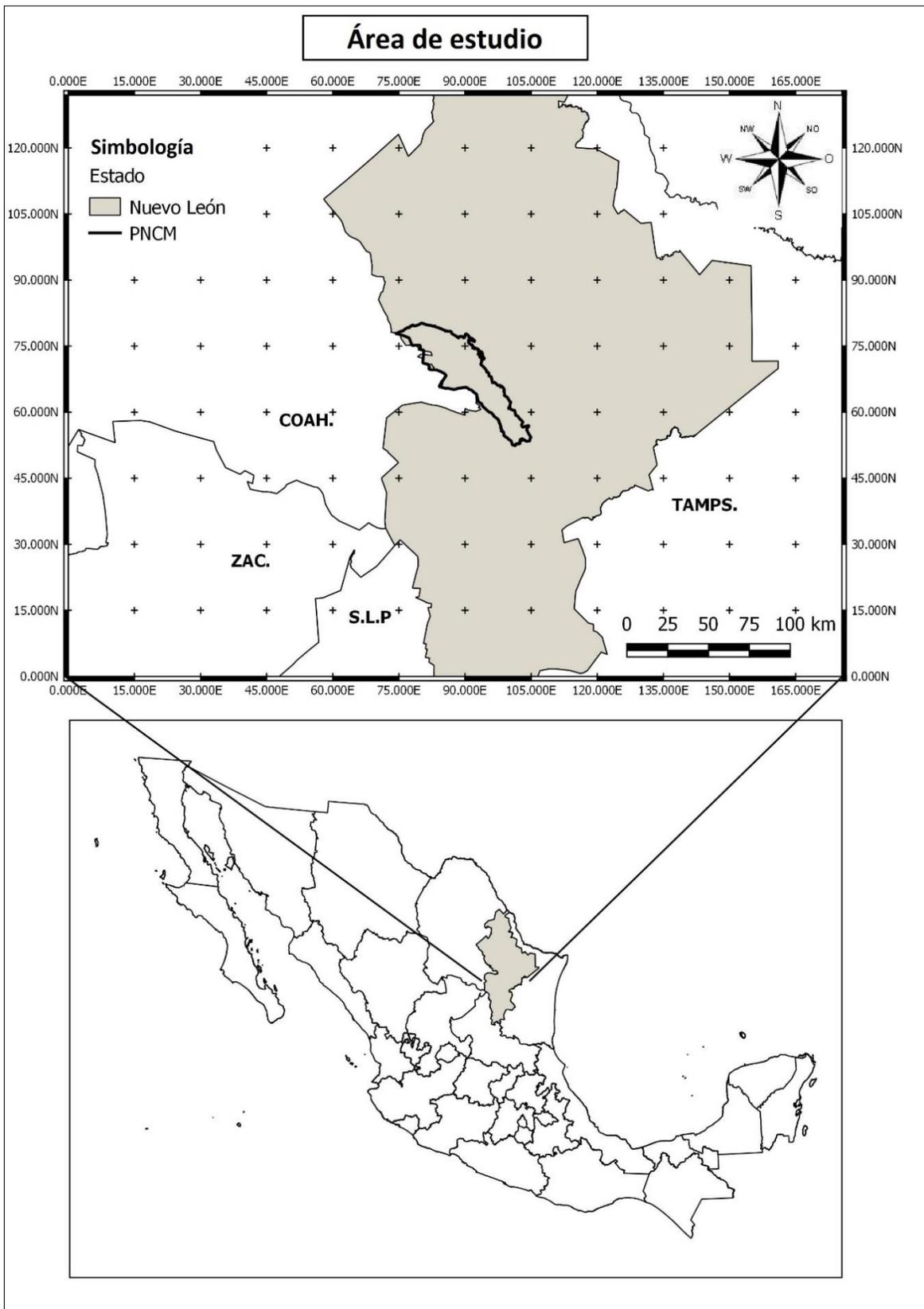


Figura 6. Polígono del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, Nuevo León, México.

A medida que decrecen la humedad y la temperatura, se promueve el establecimiento de comunidades mesotérmicas como los bosques de latifoliadas y de coníferas que coronan las elevaciones de la sierra. La talla y vigor de la vegetación primaria está determinada por la cantidad de agua disponible, reflejada en una variedad de formas de baja altura de los árboles (conocido como chaparral) hasta las asociaciones de matorrales xerófilos (xerófitas) de las zonas más secas (González-Saldivar et al., 2013).

Las comunidades dentro del PNCM son variadas y heterogéneas, constituyendo mosaicos con diversa fisonomía y estructura. Para la región árida y semiárida, los tipos de vegetación presentes se clasifican como matorral desértico-micrófilo, matorral desértico-rosetófilo, matorral submontano y chaparrales. Mientras que en las zonas subhúmedas, se encuentran los bosques de encino, pino, y bosques mixtos. En las zonas más altas y frías, se encuentran relictos de bosque de ayarín-pino-oyamel y bosque mesófilo de montaña en condiciones de mayor humedad y temperaturas templadas (Alanís-Flores y Velazco-Macías, 2013).

El Parque está considerado dentro de la denominada Sierra de Arteaga por la CONABIO, y representa un área de importancia para la conservación de las aves (AICA) (García-Salas et al., 2013). Dentro del Parque se distribuyen varias especies de fauna enlistadas en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Destaca la presencia de la cotorra serrana (*Rhynchopsitta terrisi*) cuya población se distribuye principalmente en los bosques de esta área natural protegida. Además en el PNCM, en “Los Condominios” se puede observar el sitio de anidación más importante de la cotorra serrana oriental. En materia de herpetofauna se tienen registrados en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey 44 especies, representadas en 8 anuros, una salamandra, 20 saurios, 14 serpientes y una tortuga. Esta diversidad representa el 30.76 % de la herpetofauna registrada para el estado de Nuevo León con 143 especies repartidas en 28 de anfibios y 115 de reptiles (Narváez-Torres y Lazcano-Villarreal, 2013).

Para el caso de mamíferos se tiene un registro de 79 especies en el PNCM, las cuales pertenecen a ocho órdenes, pero el 90% de estas se agrupa únicamente dentro de tres órdenes que son: Chiropteros (28 especies), Roedores (27 especies) y el orden Carnívora (16 especies). Los cinco órdenes restantes están representados solo por una o dos especies de mamíferos. Por otra parte estas 79 especies representan un total de 21 familias de las cuales cinco albergan al 62% de todos los mamíferos y las restantes 16 familias solo representan el 38% restante de las especies registradas. Las 5 familias con mayor número de especies son: Muridae (17 especies), Vespertilionidae (15 especies), Felidae y Phyllostomidae (6 especies cada una) y Heteromyidae (5 especies) (González-Saldivar et al., 2013).

Algunas de las especies del orden carnívoro que destacan son: *Canis latrans* (Coyote), *Vulpes macrotis* (Zorra del desierto), *Lynx rufus* (Gato montés), *Canepatus*

leuconotus (Zorrillo espalda blanca), *Mephitis macroura* (Zorrillo listado), *Mustela frenata* (Comadreja), *Taxidea taxus* (Tlalcoyote), *Urocyon cinereoargenteus* (Zorra gris), *Leopardus pardalis* (Ocelote), *Herpailurus yagouarondi* (Jaguarundi), *Leopardus wiedii* (Tigrillo), *Puma concolor* (Puma) y *Ursus americanus* (Oso negro).

En cuanto a las características endodemográficas del PNCM el número de localidades reportadas para el año 2000 eran 49 distribuidas en 4 municipios, siendo Santiago el que presentó el mayor número de localidades con un 53%. Para el año 2010 el número de localidades disminuyó a 43 siendo esto casi un 12%. Los 4 municipios que albergan estas 43 comunidades en orden de mayor a menos son: Santiago (24), Santa Catarina (11), Rayones (5) y Montemorelos (3). El número total de habitantes dentro del PNCM también se ha disminuido, pasando de ser 2960 pobladores en el año 2000 a 2690 en el año 2010 (Aragón-Palacios, 2013).

3.2. Trabajo de campo

Se hizo una colecta científica de pelos de oso negro mediante un muestreo sistemático no invasivo, con trampas de pelo tipo corral. Para dicho muestreo se solicitó una “Autorización de Colecta Científica por proyecto sobre especies en riesgo o sobre hábitat crítico” ante la Dirección General de Vida Silvestre (DGVS) de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la cual se autorizó mediante el oficio “SGPA/DGVS/ 04158 /15”.

Para maximizar la probabilidad de detección y minimizar la heterogeneidad de captura (i.e., todos los animales tienen la misma probabilidad de ser detectados) Otis et al. (1978) sugieren que cada animal debe tener ≥ 4 trampas en su ámbito hogareño más reducido (e.g., el ámbito de las hembras). Como para los osos del área no se cuenta con una estimación de ámbito hogareño, se utilizaron datos sobre el patrón de movimiento de una hembra, generados por un estudio parte del Programa de Conservación de Especies en Riesgo (PROCER). Dichos datos fueron emitidos por un collar satelital, y se encontró que se pueden llegar a desplazar más de 250 km² (Carrera-Treviño y Monroy-Vilchis, datos sin publicar). Para hacer el cálculo de la cantidad de trampas a colocar, se tomó en cuenta únicamente la superficie del parque con el tipo de vegetación que es hábitat para el oso negro, esto es 1,220.75 km², después se dividió esta superficie entre la distancia que se pueden llegar a desplazar. Basados en esto se generó un mapa (QGIS 2.14.0-Essen) del perímetro del PNCM, con cuadrícula y con 33 puntos distribuidos uniformemente en el área, cada uno de los cuales indicaban las coordenadas para la instalación de las trampas de pelo, cada una aproximadamente cada 37 km² (Figura 7).

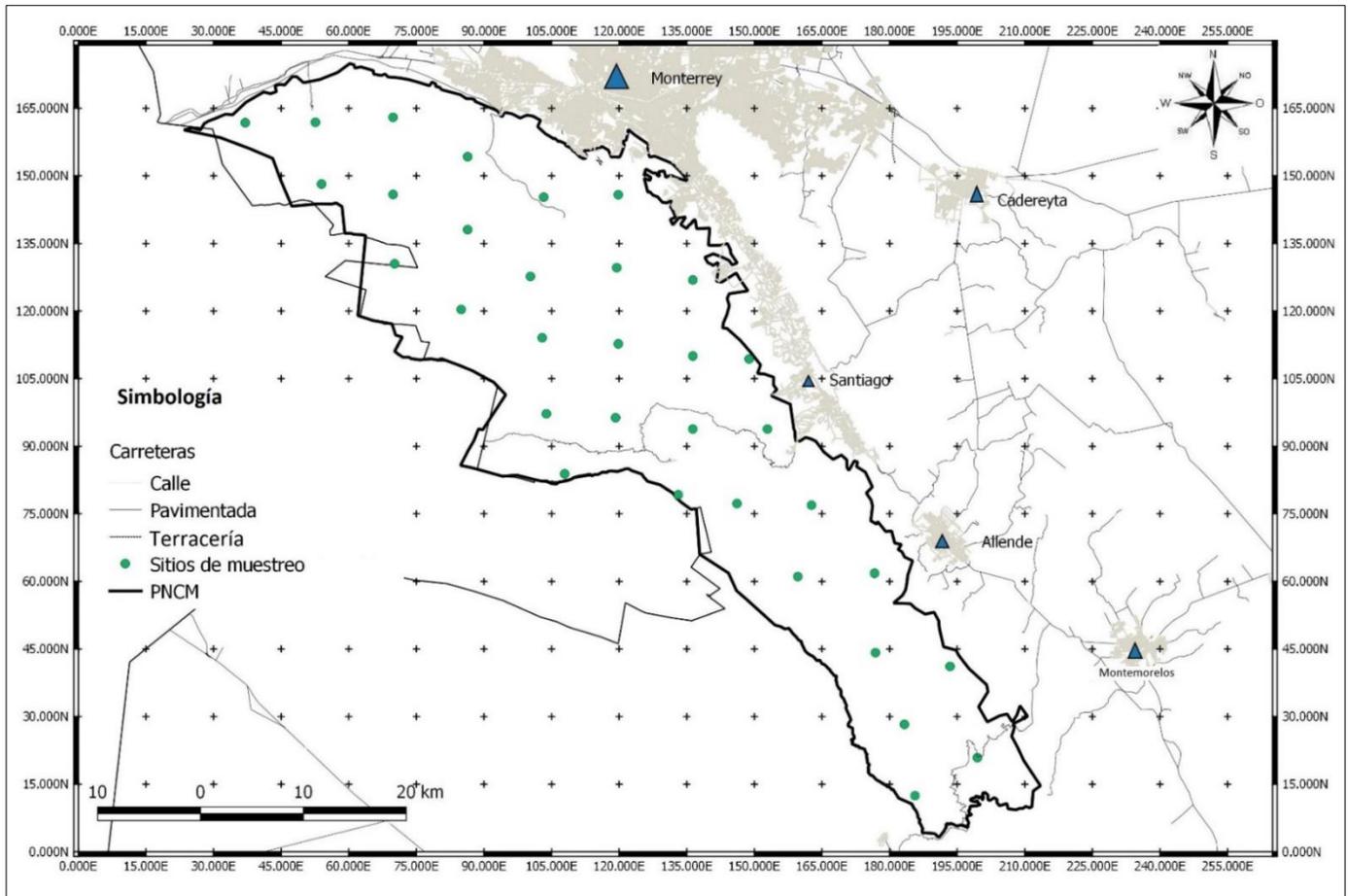


Figura 7. Sitios sugeridos para el muestreo sistemático de oso negro con trampas de pelo, para identificación de individuos mediante genotipificación de ADN microsatélite en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey.

Los puntos del mapa en la Figura 7 fueron los sitios sugeridos siguiendo un muestreo sistemático de toda el área de estudio. Las coordenadas de estos sitios sugeridos se cargaron en un equipo con Sistema de Posicionamiento Global (GPS por sus siglas en inglés) (eTrex® 20, Garmin) y una vez en campo se colocaron en base al tipo de vegetación real del sitio, a la accesibilidad (buscando que estuvieran a ≤ 200 m de los caminos y ≤ 500 de los centros de población para evitar riesgos) y a los permisos de acceso de los propietarios de los terrenos.

Fueron 35 en total las trampas que se colocaron, las dos trampas extras de las 33 sugeridas se colocaron al sur, fuera de los límites del polígono, sin embargo la distancia fuera del polígono es poca conociendo las grandes distancias que esta especie es capaz de desplazarse en la región. A pesar del esfuerzo hubo sitios al noreste del parque donde no se pudo obtener permiso de acceder y al sur hay zonas muy remotas donde no existen caminos de acceso (Figura 8). Además se tienen registros fotográficos y datos obtenidos con collares satelitales de osos que frecuentan esa zona entre los límites del ANP.

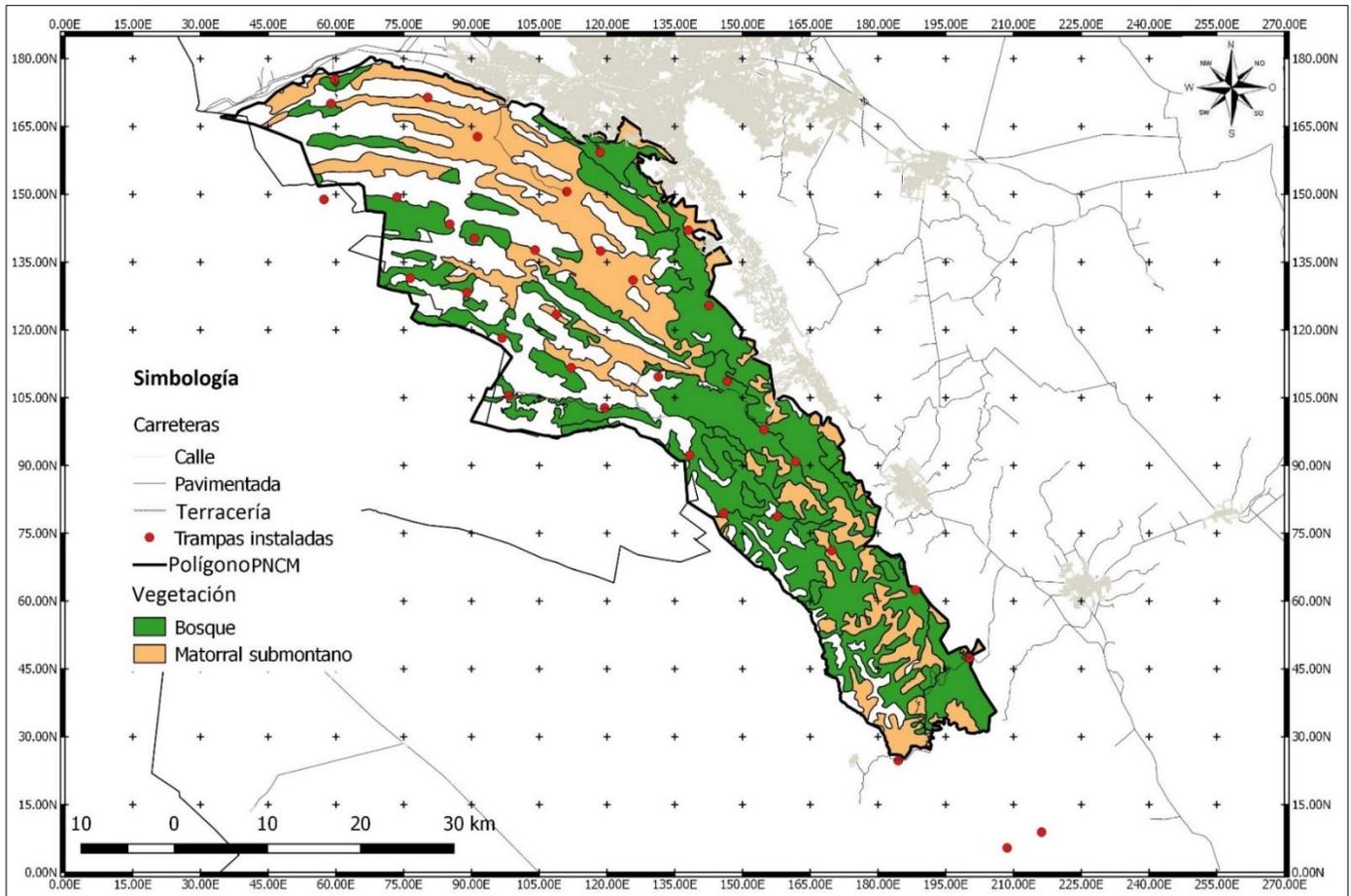


Figura 8. Sitios de muestreo de oso negro con trampas de pelo instaladas en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 y mayo de 2016.

Cada trampa consistió en un perímetro formado por dos alambres de púas calibre 15.5, con púas cada 5 pulgadas, modelo Corcel III (De Acero, San Pedro Garza García, Nuevo León, México) grapados a 20 y 50 cm del suelo cada uno, a un mínimo de tres árboles para cubrir una superficie aproximada de 25 m². En el centro del perímetro se colocó un cebo suspendido a ≥ 4 m sobre el nivel del piso para que los osos no tuvieran realmente acceso al consumo del cebo y así evitar sesgos en el muestreo. El muestreo estuvo compuesto de dos etapas una en septiembre de 2015 y otra en mayo de 2016. En cada etapa se hicieron 4 sesiones de muestreo que consistieron en un periodo de 7-10 días cada una, y en la cual se visitaron todas las trampas, se colectaron las muestras existentes y se colocó un cebo nuevo. En la etapa uno se hizo una sesión "0", pues cuando se finalizó de instalar las trampas, algunas ya habían estado "cebadas" por dos meses. En esta sesión "0" se colectaron las muestras, se cebaron las trampas y se calculó el tiempo que sería necesario para realizar las actividades correspondientes para completar el recorrido para cada una de las sesiones posteriores. Posteriormente, en la siguiente ocasión que se visitaron las trampas (sesión 1), todas habían tenido el cebo el mismo tiempo.

En la sesión “0” de la primera etapa se utilizó como cebo sardinas enlatadas en salsa de tomate. En la sesión 1 se utilizaron discos aromatizados de ácidos grasos volátiles para atraer depredadores (Scented Predator Disks, USDA Pocatello Supplye Depot. 238 East Dillon St., Pocaetllo, ID 83201). En las sesiones “2, 3 y 4” se utilizó desperdicio de carne de caballo que fue dejada al sol intencionalmente 24-36 horas para comenzar el proceso de descomposición y con esto potenciar el olor. Posteriormente se empaquetaron 500 g de la carne en bolsas resellables, para ser congeladas y facilitar su transporte hacia las trampas en cada sesión. En la sesión “1” de la segunda etapa se utilizaron sardinas enlatadas y en las siguientes sesiones se utilizó desperdicio de carne de caballo procesada de la misma manera que en la primera etapa.

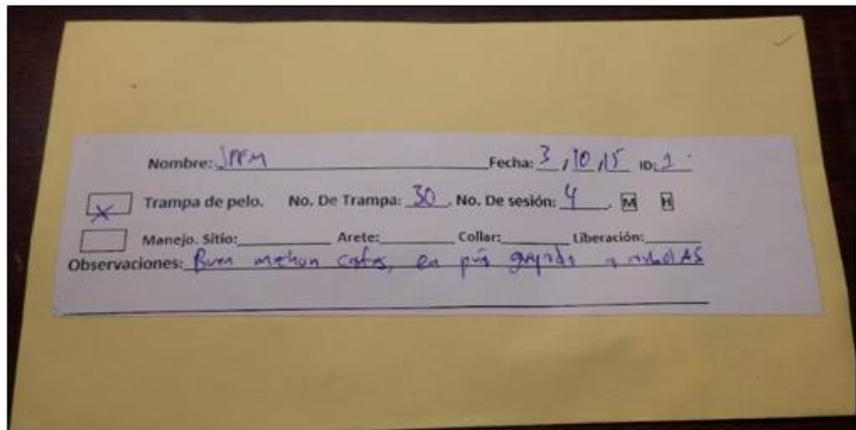
Para prevenir que el animal cruce el perímetro sin dejar muestra, se rellenaron las superficies irregulares para mantener la altura apropiada del piso al alambre y se utilizaron ramas para obstruir los terrenos donde quedo muy bajo el alambre. Cada mechón contenido en una púa se consideró una muestra (Figura 9. B), la cual fue colectada con pinzas esterilizadas (mediante un soplete de mano), y colocada en un sobre de papel con desecante debidamente identificado (Figura 9. A, C). Además se anotaron características físicas de las muestras (e.g., cantidad de pelos, longitud, color etc.), esto con la finalidad de facilitar la selección de las muestras que se procesaran y las que se descartarían porque a simple vista no aparentaban ser de oso (Figura 9. C).



A)



B)



C)

Figura 9. Recolección de muestras en trampa de pelo, se muestra: A) Como debe ser introducida una muestra en un sobre; B) Mechón de pelo en púa; C) Sobre debidamente identificado.

Para evitar tomar muestras que fueran del mismo oso o mezclas de ≥ 2 individuos, cuando dos muestras estaban a tres púas o menos de distancia únicamente se colectó la que a simple vista contenía más folículos. Además se colocaron cámaras trampa con sensor de movimiento para ayudarnos a saber que especie y cuantas ocasiones habían ingresado a la trampa.

3.3. Trabajo de laboratorio

En base a las anotaciones hechas en cada sobre y a la revisión fotográfica, se seleccionaron las muestras que serían analizadas y se descartaron las demás. Cuando hubo duda se abrió el sobre para revisar las características físicas de la muestra, teniendo cuidado de no hacer una contaminación cruzada entre muestras, y con la precaución de no contaminar las muestras con ADN humano. Las muestras se enviaron al laboratorio canadiense “Wildlife Genetics International” (Suite 200 (alley entrance) 182. Baker St. Nelson, BC V1L 4H2). Para poder enviarlas se tramitó una “Autorización de exportación de partes y derivados de la vida silvestre”. La autorización fue expedida con el certificado CITES MX 83133.

3.3.1. Extracción de ADN

El primer paso en el laboratorio fue descartar las muestras que a simple vista no contenían el material suficiente para su análisis. El objetivo fue utilizar 10 raíces de pelo de guarda, cuando fue posible, o hasta 30 pelos de la capa inferior (los cuales son más delgados) como complemento. La extracción se hizo con el kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valencia, CA), siguiendo el protocolo para tejido.

3.3.2. Preselección con locus *ZFX/ZFY*

Se hizo una preselección mediante la amplificación de un locus (*ZFX/ZFY*) a las extracciones de ADN, para así descartar las que no contenían la suficiente cantidad o calidad. Las muestras que produjeron genotipos de baja confianza, fueron confirmadas con una segunda ronda de análisis, y después clasificadas como (*Xbomb*) si volvían a fallar. Los cebadores utilizados para *ZFX/ZFY* amplifican para un amplio rango de especies de mamíferos, y es típico ver variaciones entre especies en la longitud de ambos alelos, pero especialmente el Y. Para confirmar la especie de los alelos inusuales, se hizo un análisis de la secuencia parcial del gen mitocondrial *16s rRNA*.

3.3.3. Genotipificación multilocus microsatélite

Con base en información generada por estudios con microsatélites en Nuevo México se seleccionaron los 11 más variables (Tabla 5), además del *ZFX/ZFY* (Paetkau, D., Datos sin publicar).

Tabla 5. Secuencia de cebadores de los 11 microsatélites utilizados para la genotipificación de individuos de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey durante el 2015 y 2016.

Locus	Secuencia delantera	Secuencia reversa
CXX20	AGCAACCCCTCCCATTACT	TTGTCTGAATAGTCCTCTGCG
G1D	ACAGATCTGTGGGTTTATAGGTTACA	CTACTCTTCCTACTCTTTAAGAG
G10B	GCCTTTTAATGTTCTGTTGAATTTG	GACAAATCACAGAAACCTCCATCC
G10H	CAACAAGAAGACCACTGTAA	AGAGACCACCAAGTAGGATA
G10J	GATCAGATATTTTCAGCTTT	AACCCCTCACACTCCACTTC
G10L	GTA CTGATTTAATTCACATTTCCC	GAAGATACAGAAACCTACCCATGC
G10M	TTCCCCTCATCGTAGGTTGTA	AATAATTTAAGTGCATCCCAGG
G10P	ATCATAGTTTTACATAGGAGGAAGAAA	TCATGTGGGGAAATACTCTGAA
G10U	TGCAGTGTCAGTTGTTACCAA	TATTTCCAATGCCCTAAGTGAT
G10X	CCACCTTCTTCCAATTCTC	TCAGTTATCTGTGAAATCAAAA
MU59	GCTGCTTTGGGACATTGTAA	CAATCAGGCATGGGGGAAGAA

A las muestras que pasaron la preselección del locus *ZFX/ZFY* se analizaron con los 11 microsatélites seleccionados más el primer marcador como control. Algunas muestras tuvieron poca confiabilidad en uno o dos marcadores, pero se volvieron a analizar con 5 microlitros (μ l) de ADN plantilla en lugar de 3 μ l, produciendo de esta manera resultados confiables.

Según un protocolo para revisión de errores se requiere de un reanálisis cuando hay genotipos que son similares y difieren solamente en uno o dos marcadores, puesto que pudiera ser el mismo individuo pero un genotipo surge de un error en la genotipificación (Paetkau, 2003). Los errores en la genotipificación crean genotipos que coinciden en todos excepto en uno o dos marcadores ('1MM' y '2MM'), así que este protocolo proporciona un fuerte método para detectar errores en la genotipificación. También se hizo un análisis de componente principal (PCA por sus siglas en inglés) en (Genetix), para comprobar valores atípicos, lo que provee una prueba indirecta de errores de genotipificación.

3.4. Análisis estadístico

Como el estimador de Lincoln-Petersen utiliza información sólo de dos periodos de muestreo, es necesario agrupar la información obtenida de las diferentes sesiones, idealmente sin que haya transcurrido mucho tiempo entre un muestreo y el subsecuente (Lancia et al., 1996). Para la primer etapa, se decidió agrupar en n_1 los datos generados en las sesiones 0, 1, y 2, para n_2 las sesiones 3 y 4 (Tabla 7). Haciendo este condensado fue posible calcular el tamaño de población acorde a la ecuación tradicional de Lincoln-Petersen su E. E. y el I.C. También se hizo el cálculo con la versión modificada, la ecuación de Chapman con su respectiva varianza, que genera menos sesgos y un I.C. más estrecho (Lancia et al., 1996).

Para la segunda etapa se agrupó en n_1 las sesiones 1 y 2, para n_2 se agruparon las sesiones 3 y 4. (Tabla 7). Con esto sólo nos fue posible calcular el tamaño de población mediante la ecuación modificada de Chapman, así como su varianza y el I.C. (Lancia et al., 1996), ya que al no existir recapturas se produce un error matemático con la ecuación tradicional de Lincoln-Petersen. También se hizo una estimación del tamaño de la población utilizando los datos generados durante ambas etapas, todas las sesiones de la primer etapa se agruparon en n_1 y todas las sesiones de la segunda etapa se agruparon en n_2 (Tabla 7). Bajo esta circunstancia tampoco fue posible calcular el tamaño de población con la ecuación tradicional, por el mismo motivo que para el cálculo de la segunda etapa (i.e. no hay recapturas). Por lo anterior, únicamente se hizo el cálculo mediante la ecuación modificada de Chapman, junto con su varianza e I.C. (Lancia et al., 1996).

Para conocer los patrones de movimiento de oso negro se calculó la distancia máxima recorrida, basándose en el historial de recapturas de los individuos (i.e. cuando el mismo individuo fue capturado en diferentes trampas).

4. RESULTADOS

4.1. Resultados de muestreo

Durante la primera etapa del muestreo se obtuvieron 118 muestras en total, de las cuales se decidió analizar 26 y descartar 92. De las muestras descartadas en su mayoría fueron porque a simple vista se determinó que eran pelo de ganado doméstico por la longitud y el color de las mismas, dichas características fueron anotadas en el sobre que contenía cada muestra. Asimismo, se descartaron muestras de pelo negro cuando en la cámara se encontraron registros fotográficos únicamente de pecarí de collar (*Pecari tajacu*). La sesión 1 fue en la que más muestras a procesar se obtuvieron, y en la que menos muestras a procesar fue en la sesión 2, la sesión 4 fue la que más muestras en total tuvo con 31, que a su vez fue en la que más muestras se descartaron (Tabla 6). En la segunda etapa del muestreo se obtuvieron 68 muestras totales, de las cuales se decidió analizar 13 y se descartaron las 55 restantes, en su mayoría por las mismas razones que en la primera etapa (i.e. los pelos tenían las características físicas de ganado doméstico y no se documentó la presencia de osos en las cámaras). La sesión que produjo más muestras para analizar fue la sesión 2 con seis muestras y las sesiones 3 y 4 fueron las que menos con 2. La sesión 4 fue la que más muestras totales produjo con 24 muestras, siendo esta misma en la que más se descartaron (Tabla 6). Para seleccionar que muestras se iban a procesar nos basamos en las observaciones anotadas en cada sobre con la muestra y la revisión de las fotos de las cámaras de foto trampeo.

Tabla 6. Número de muestras obtenidas mediante trampas de pelo en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 (etapa 1) y mayo de 2016 (etapa 2).

	Sesión	Si	No	Total
Etapa 1	0	7	13	20
	1	8	20	28
	2	3	18	21
	3	2	16	18
	4	6	25	31
	Total	26	92	118
Etapa 2	1	3	3	6
	2	6	13	19
	3	2	17	19
	4	2	22	24
		Total	13	55
	TOTAL	39	147	186

Si. Si se procesan.

No. No se procesan.

4.2. Resultado de la extracción de ADN y preselección locus ZFX/ZFY

De las 39 muestras totales a tres no se les hizo extracción de ADN, pues a simple vista no contenían el material suficiente y se clasificaron como “xinadequate”. Otras 10 amplificaron alelos no vistos en oso negro y 9 produjeron resultados de baja confianza (probablemente muestras de oso negro pero con baja cantidad o calidad de ADN), estas 19 de 36 (53%) fueron clasificadas como “xbomb”. Estas fueron descartadas porque no tenían suficiente calidad o cantidad de ADN, o simplemente no eran de oso negro y no valía la pena analizar para los 11 loci restantes.

Con el análisis parcial del gen *16S ARNr* hecho para conocer la especie que originaba los alelos no vistos en oso negro, se confirmó, que 6 de las 10 muestras corresponden a *C. lupus* (lobos, incluidos perros domésticos). Otras tres muestras amplificaron un alelo resultado de ADNmt mezclado de humano y oso. De una muestra no fue posible identificar a la especie, pues su alelo no se encuentra en los registros previos. Todas las muestras estaban contaminadas con ADN humano y como la PCR es competitiva, la contaminación únicamente es detectada cuando hay poco ADN del animal objetivo del estudio en la muestra.

4.3. Genotipificación multilocus microsatélite

Durante el primer análisis de las 17 muestras que pasaron el filtro de preselección, todas produjeron datos prometedores para los 12 marcadores (11 microsatélites más el marcador sexual). Aunque algunas muestras, tuvieron datos de baja confianza para uno o dos marcadores, pero después de ser reanalizados todos produjeron datos de alta confianza para los 12 marcadores. Las 17 muestras que pasaron la preselección *ZFX/ZFY*, replicaron el resultado durante este paso, sirviendo como control de error y proporcionando un registro de reproductibilidad de los datos. La replicación del genotipo para este marcador, además reduce el riesgo de abandono alélico del cromosoma-Y, lo que causaría que una muestra fuera incorrectamente clasificada como hembra.

Se definió como a un individuo a cada genotipo único de 12-loci, las 17 muestras genotipificadas, fueron correctamente asignadas a 16 individuos (una recaptura), siendo la proporción de machos (M) y hembras (H) 13:3 respectivamente (Tabla 7). A la etapa 1 corresponden 12 individuos, (M) 10:2 (H) y a la segunda corresponden 4 individuos de los cuales tres son machos y una hembra (Tabla 7). No se encontraron pares de genotipos 1MM- o 2MM- en el presente estudio, lo que era de esperarse, dado el pequeño tamaño de muestra. También se buscó por pares de genotipos 3MM- pero tampoco se encontraron este tipo de casos, por lo que no se reanalizaron muestras, en el contexto de verificación de errores.

Tabla 7. Número de individuos de oso negro identificados mediante genotipificación de ADN microsatélite, a partir de muestras colectadas con trampas de pelo en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 (etapa 1) y mayo del 2016 (etapa 2).

	Individuo	Sexo	Trampa	Sesión	Etapa
	1	M	16	0	1
	4	M	17	0	1
	5	M	18	0	1
	6	M	28	0	1
	7	M	28	0	1
	9	M	13	1	1
	10	M	13	1	1
	12	H	13	1	1
	13	M	16	1	1
	19	H	36	3	1
	20	M	36	3	1
	7	M	11	4	1
	22	M	13	4	1
	28	M	22	1	2
	31	M	15	2	2
	47	H	22	4	2
	39	M	22	4	2
Recuento	16	M 13:3 H	9	7	2

M. Macho

H. Hembra

El individuo recapturado fue un macho identificado con el número 7, su primera captura fue en la trampa 28, durante la sesión "0" de la etapa 1 y su recaptura fue en la sesión 4, esta vez en la trampa 11 de la misma etapa. La distancia en línea recta entre ambas trampas es de aproximadamente 30 km (figura 10). Las muestras de los 16 individuos identificados procedieron de 9 de las 35 trampas (Figura 10), la trampa en la que más individuos fueron capturados fue la 13 con 4 individuos M 3:1 H, todos en la primera etapa, la siguiente trampa más concurrida fue la 22 con 3 individuos, todos en la segunda etapa siendo la relación de machos y hembras 2:1 respectivamente (Tabla 7).

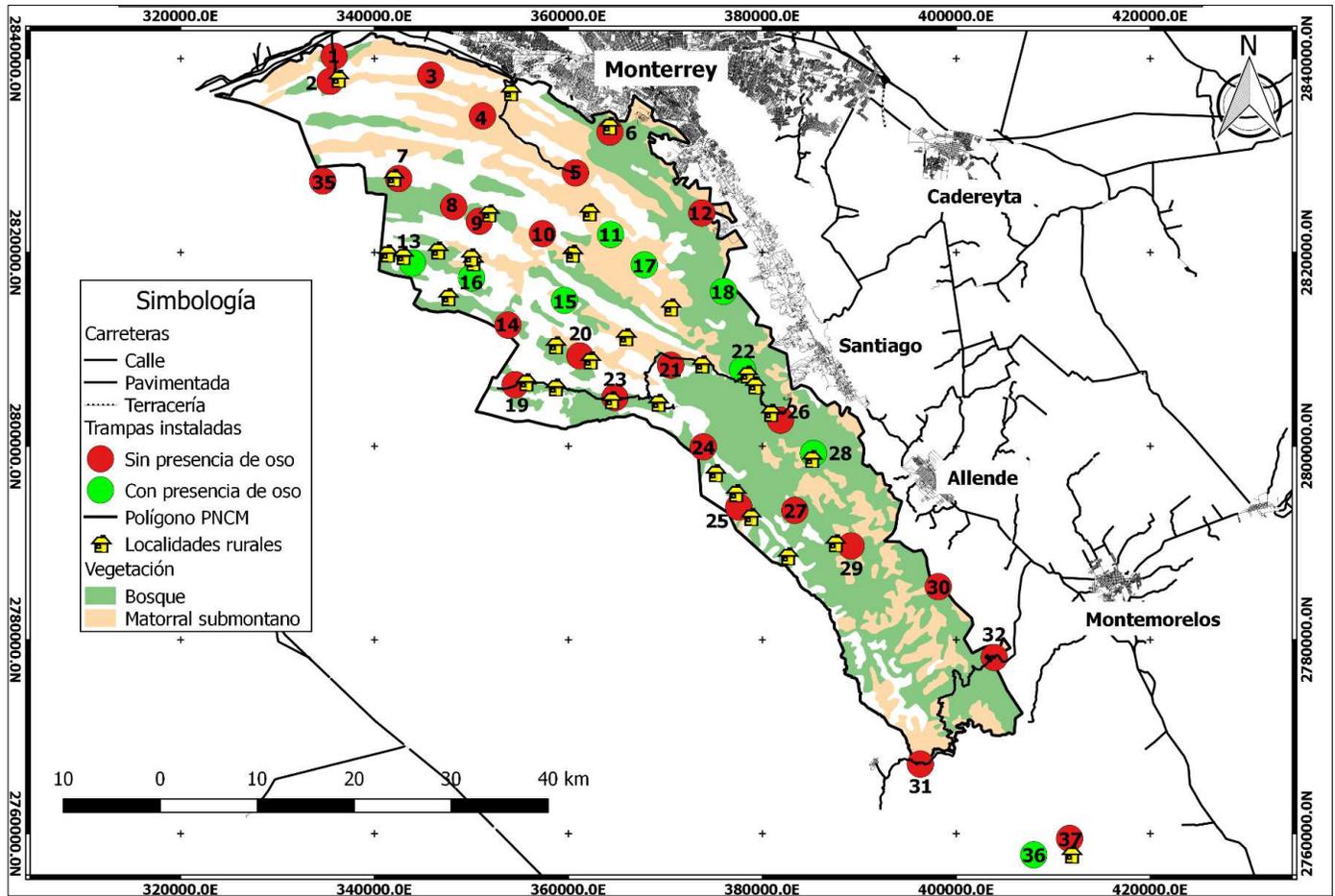


Figura 10. Trampas de pelo que registraron individuos de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey, durante septiembre de 2015 y mayo de 2016.

4.3.1. Variabilidad de los marcadores

El hecho de que cada uno de los 16 genotipos difirió entre sí en ≥ 3 marcadores proporciona un indicio de que el panel de los microsatélites utilizados tiene la capacidad de identificar cada individuo muestreado eficazmente. También se puede observar la variabilidad de los marcadores para un índice de la probabilidad de correctamente asignar un genotipo a cada muestra. La heterocigosidad promedio de los 11 marcadores microsatélite fue de 0.58, pero los seis mejores marcadores tuvieron un promedio de $H_o = 0.71$ (Tabla 8).

Tabla 8. Heterocigosidad esperada, observada y número de alelos encontrados para 16 individuos de oso negro en el Parque Nacional Cumbres de Monterrey durante el 2015 y 2016.

Locus	H_E	H_O	A
G10L	0.82	0.71	7
G10H	0.78	0.93	5
G10P	0.68	0.71	5
G1D	0.66	0.68	4
G10M	0.63	0.57	4
CXX20	0.59	0.68	4
G10J	0.58	0.50	3
G10X	0.53	0.50	6
G10U	0.51	0.54	3
G10B	0.46	0.46	4
MU59	0.14	0.14	3
Promedio	0.58	0.58	4.4
11-locus			

H_E. Heterocigosidad esperada.

H_O. Heterocigosidad observada.

A. Número de alelos encontrado.

4.4. Tamaño de población y estimación de densidad

Para el cálculo hecho únicamente con los datos de la primer etapa (2015) mediante la ecuación tradicional de Lincoln-Petersen estimamos un tamaño poblacional de 36 (95% I. C. \pm 62) osos, a partir de los 12 individuos genotipificados, esto nos da una densidad estimada de (0.029 osos/km², 95% I. C. \pm 0.05). Con la ecuación modificada de Chapman estimamos que la población es de 24 (95% I. C. \pm 20) osos, que resulta en una densidad estimada de (0.019 osos/km², 95% I. C. \pm 0.016).

Para la segunda etapa, no fue posible obtener la estimación con la ecuación tradicional de Lincoln-Petersen debido a que al no contar con recapturas, se genera un error matemático. Con sólo 4 individuos genotipificados y utilizando la ecuación de Chapman, encontramos que la estimación del tamaño de la población es de 8 (95% I.C. \pm 8) osos. La densidad estimada para éste cálculo es de (0.006 osos/km², 95% I. C. \pm 0.006).

Agrupando ambas etapas, nuevamente no fue posible calcular el tamaño de población mediante la ecuación tradicional de Lincoln-Petersen, por el hecho de no contar con recapturas. Con la ecuación modificada de Chapman estimamos que la población es de 64 (95% I. C. \pm 78) osos a partir de los 16 individuos genotipificados

y la densidad estimada es de (0.052 osos/km², 95% I. C. ± 0.063). La relación de sexos fue de 13M:3H en los 16 individuos genotipificados durante los dos años de muestreo, lo que también puede expresarse como 4.3M:1H. Si extrapolamos esta relación a la mayor estimación del tamaño de población encontraríamos 115M:27H.

Para analizar que tanto pudo haberse afectado el resultado por las muestras que produjeron resultados de baja confianza se puede hacer el cálculo incluyéndolas. Son 12 de 19 las clasificadas como “xbomb” que pudieron ser de oso negro (probablemente muestras de oso negro pero con baja cantidad o calidad de ADN o contaminadas con ADN humano). Si estas 12 hubieran sido correctamente asignadas a un individuo tendríamos 5 individuos más para la primera etapa y 7 para la segunda etapa. Con la ecuación modificada de Chapman el tamaño de población sería de 215 (95% I. C. ± 279) individuos. La densidad estimada a partir de esta población sería de (0.176 osos/km², 95% I. C. ± 0.228).

5. DISCUSIÓN

Un objetivo fundamental en el estudio de las poblaciones de fauna silvestre es estimar el tamaño de población y/o densidad, tal y como lo es en el presente estudio (Efford, 2004). La metodología de captura-recaptura, basada en el análisis de ADN, para la identificación de individuos mediante genotipificación de muestras colectadas con trampas de pelo, es una de las más usadas actualmente para abordar estos objetivos (Gardner et al., 2010).

En este estudio se logró estimar la densidad de población de oso negro en el PNCM en los años 2015 y 2016 (etapa 1 y etapa 2). A pesar de un gran esfuerzo de muestreo se obtuvieron pocas muestras, lo que repercutió en un número reducido de individuos identificados y solamente un individuo fue recapturado. El hecho de tener pocas recapturas puede generar sesgos e I. C. grandes, cuando esto sucede se recomienda aumentar el tamaño de muestra para incrementar las recapturas, pero esto no fue posible debido a la naturaleza del estudio. Es debido a lo anterior por lo que se decidió hacer las estimaciones mediante la ecuación tradicional de Lincoln-Petersen y una versión modificada que tiende a producir menos sesgos.

Encontrando así que la estimación más robusta (con el 95% I. C. más estrecho) fue la realizada para la primer etapa mediante la ecuación modificada de Chapman siendo de 0.019 osos/km² (95% I. C. \pm 0.016). La estimación que produce la mayor densidad fue la hecha para la agrupación de las dos etapas, mediante la ecuación de Chapman 0.052 osos/km², que fue a su vez la que produjo el I. C. más amplio (95% I. C. \pm 0.063), por el hecho de no haber recaptura bajo ésta forma de agrupar los datos. Con la ecuación de Lincoln-Petersen únicamente se pudo estimar la densidad para la primer etapa (por requerir forzosamente al menos una recaptura) siendo de 0.029 osos/km² que es un valor mayor a lo obtenido mediante la ecuación de Chapman para esta misma etapa y también con un I. C. más amplio (95% I. C. 0.05 osos/km²).

Las estimaciones de densidad de población de oso negro hechas en México son pocas, se han llevado a cabo en pocos estados y en su mayoría han sido realizadas mediante técnicas tradicionales como en estudios en Coahuila donde mediante telemetría reportan valores de hasta 0.72 osos/km² (Doan-Crider, 1995). Sonora es otro estado donde han estimado la densidad poblacional, pero mediante cámaras trampa, técnica, que genera incertidumbre en cuanto a la precisión, debido a la inherente necesidad de identificar individuos para estimar densidad. En una investigación estimaron una densidad que va de 0.026 a 0.089 osos/km² (Sierra-Corona, 2005). En otro estudio en el mismo estado obtuvieron una estimación de 0.05 osos/km² (Lara-Díaz, 2010). Ésta última, aunque fue hecha con metodología

diferente, es similar a la obtenida para ambas etapas mediante la ecuación de Chapman (0.052 osos/km^2) en el presente estudio

Existe un reporte de densidad de oso negro en el estado de Sonora, el cual fue hecho con muestreo no invasivo y genotipificación de ADN microsatélite, en donde la densidad estimada fue de 0.38 osos/km^2 (Varas-Nelson, 2010). Que resulta ser muy superior a nuestra estimación más alta, la hecha para ambas etapas (0.052 osos/km^2 , aún con el límite superior 95% I. C. 0.12 osos/km^2).

La estimación hecha con la ecuación de Chapman para la primer etapa (única etapa con recaptura) fue de 0.019 osos/km^2 . Esta estimación es la más baja de las reportadas para Norteamérica (utilizando metodología similar), donde existen valores que van desde los 0.57 osos/km^2 (Belant et al., 2005) a 0.05 osos/km^2 (Drewry et al., 2013).

El reducido número de recapturas entre etapas y dentro de estas puede tener pocas explicaciones, una es que, con la gran capacidad de desplazamiento encontrada, los animales salgan del ANP adentrándose a los estados de Coahuila o Tamaulipas. Otra es que haya sido necesario un mayor esfuerzo de muestreo, pero si este es el caso, estaríamos hablando de condiciones de estudio poco razonables ya que en este se hizo un gran esfuerzo. El esfuerzo de muestreo realizado en este estudio es comparable con un estudio llevado a cabo en el Parque Nacional Glacier, Montana, EUA en el cual instalaron una trampa de pelo cada 49 km^2 aproximadamente (Stetz et al., 2014). Otra causa que podría explicar esto es un decremento en la población debida a una alta tasa de mortalidad.

En los años previos al presente estudio y durante el mismo, las autoridades federales (Procuraduría Federal de Protección Ambiental, PROFEPA) y estatales (Parques y Vida Silvestre de Nuevo León, PVSNL) han capturado ejemplares de oso negro que entran en conflicto con humanos en el PNCM y los han reubicado a más de 80 km de distancia. Se desconoce cuál ha sido el efecto de este tipo de manejo en la población de oso negro del PNCM, sin embargo hay estudios que reportan una alta mortalidad en los osos que son trasladados a otras áreas a consecuencia de conflictos humano-osos (Linnell et al., 1997; Comly-Gericke y Vaughan, 1997). Lo anterior se debe entre otras razones a falta de comida y refugio en el nuevo sitio, pero la principal causa de este decremento en la supervivencia son atropellamientos en carreteras (Linnell et al., 1997; Comly-Gericke y Vaughan, 1997).

Durante el periodo en que este estudio se llevó a cabo se registraron varios casos de osos pertenecientes al PNCM reubicados y que fueron encontrados muertos.

Como el caso de una osa que fue capturada en la zona urbana colindante con el PNCM, la cual fue reubicada al sur del PNCM el 21 de noviembre de 2014 por personal de PROFEPA y PVSNL. A dicho ejemplar le fue colocado un collar satelital (Lotek, ON, Canadá) como parte de un estudio; a través del cual se documentó que el ejemplar murió cerca del ejido La Cebolla, municipio de Santiago en el interior del PNCM el 27 de junio de 2015. Después de dar aviso a las autoridades, personal de campo acudió al sitio para recuperar el collar, por lo que se supo a través de los habitantes del ejido La Cebolla, que el ejemplar había sido eliminado en represalia a conflictos con actividades humanas. Asimismo, existen otros tres casos (dos machos y una hembra) en los que los individuos reubicados por las autoridades no sobrevivieron más de 4 meses entre el 2014 y 2015 (Carrera-Treviño y Monroy-Vilchis, datos sin publicar).

Otro caso más reciente es el de un oso macho juvenil que fue capturado e identificado con arete y tatuaje en el Parque Ecológico Chipinque (PECh) el 19 de marzo del 2017 y que fue liberado afuera del PNCM por personal de PROFEPA Y PVSNL. La liberación se hizo en una zona montañosa al norte del área metropolitana de Monterrey conocida como Sierra Milpillas, municipio de Salinas Victoria. Este individuo fue encontrado atropellado y muerto en el km 38 de la carretera Monterrey-Saltillo el 7 de julio del 2017. Este ejemplar evidentemente estaba intentando regresar a su ámbito hogareño para lo cual atravesó más de 78 km en línea recta (Carrera-Treviño, Datos sin publicar).

Además de los collares satelitales durante los años 2014 y 2015 se le colocaron collares VHF a 12 ejemplares de oso negro en el PNCM, como parte del manejo que hizo el PNCM y el Laboratorio de Fauna Silvestre a osos que entraron en conflicto con actividades humanas. En el seguimiento de estos ejemplares solamente dos fueron localizados posteriormente durante recorridos de campo, mientras que dos emitieron señal de mortalidad sin que se hayan recuperado los collares. Para los restantes 8 individuos nunca se volvió a escuchar sus señales VHF o bien nunca se supo cuál fue su paradero ni su estado (Carrera-Treviño, datos sin publicar).

La relación de sexos encontrada en este estudio indica que hay al menos 4 veces más machos que hembras en la población. Esto puede deberse a varias situaciones, como una heterogeneidad en el muestreo debido a que los machos se desplazan mayores distancias que las hembras, o que estas no fueron atraídas por el cebo o temieron acercarse a las trampas por la presencia de machos (Long y Zielinski, 2008). La relación de sexos distó mucho de lo que sería una relación normal (i. e. 1M:1H), sin embargo, no es el único caso donde los valores muestran esta disparidad. En un estudio sobre ecología de población de oso negro, llevado a cabo mediante radiotelemetría en Coahuila, encontraron una relación de 1.7M:1H en osos adultos (Doan-Crider y Hellgren, 1996). Mientras que en Sonora mediante

genotipificación de excretas encontraron una relación de 1.6M:1H (Varas-Nelson, 2010); en otro estudio en un Parque Nacional en Montana, EUA en el que genotipificaron muestras de pelo colectadas mediante trampas encontraron una relación de 1M:1.1H (Stetz et al., 2014).

La única recaptura corresponde a un oso negro macho, que en 30 días se desplazó entre dos trampas que se encuentran aproximadamente a 30 kilómetros en línea recta. Aún que no se puede hacer un promedio, esta distancia es notablemente superior para lo reportado en otros estudios. En un Parque Nacional en Montana, EUA se calculó un promedio para machos de apenas 7.6 km recorridos (Stetz et al., 2014); otro promedio de la distancia máxima recorrida por machos y hembras es de 4.7 km en Oregon, EUA (Imell y Anthony, 2008).

En el mapa de trampas con presencia de oso (Figura 10) se detecta un patrón, y es que la mayor cantidad de trampas con presencia de oso se encuentran cerca de zonas con asentamientos rurales. Un ejemplo de esto es que las trampas 27, 29, 30 y 32 no fueron visitadas por ningún individuo, estas se localizan al sur del PNCM en donde la vegetación es continua, de buena cobertura y alejada de centros poblacionales.

En un estudio de 6 años y que aún continúa sobre oso negro en Colorado, EUA han encontrado algunos patrones similares en la población a los que encontramos en el PNCM actualmente. En Colorado encontraron que los avistamientos y conflictos oso-humano pueden incrementarse aún si la población de osos decrece. En el año 2012 hubo una marcada escasez de comida con lo que la población se redujo de 200 hembras a solo 82. En ese mismo año observaron un incremento en la cantidad de osos que acudían a alimentarse de la basura disponible en los contenedores, y no eran solo osos de la cercanía, registrando individuos que se desplazaron más de 24 km en busca de este alimento (Frey, 2017).

En el presente estudio la diversidad genética del oso negro fue superior a la obtenida por otro estudio, en el cual la evaluaron para diferentes poblaciones mexicanas. Entre ellas una en Santa Catarina que pertenece al PNCM, donde encontraron una H_o promedio de 0.38 para 10 microsatélites (Ortega et al., 2014). Este promedio es inferior a lo obtenido por nuestros microsatélites que mostraron una H_o : 0.58 para 11 microsatélites, pero los mejores 6 promediaron una H_o de 0.71.

6. CONCLUSIONES

A pesar de haber realizado un esfuerzo de muestreo considerable se obtuvieron muy pocas muestras durante el presente estudio, por lo que aun con las estimaciones más conservadoras, los resultados sugieren que la población de oso negro en el PNCM actualmente es muy baja comparada con otras regiones de Norteamérica. La baja densidad y la relación de sexos tan inclinada hacia los machos puede ser el resultado de elevadas tasas de mortalidad por causas como eliminación de individuos que entran en conflicto con las actividades humanas, así como por la reubicación de ejemplares que son liberados al exterior del PNCM, por lo que esto debe ser estudiado.

Solo hubo una recaptura y no se puede obtener un promedio, sin embargo, la distancia que se desplazó el ejemplar macho es superior hasta en un 200% a la distancia recorrida por los individuos de otros reportes en Norteamérica. Esta capacidad de desplazarse grandes distancias puede deberse a una baja disponibilidad de alimento y que este está muy disperso en el ambiente.

Lo encontrado en este estudio en cuanto a densidad de población, la información sin publicar de la mortalidad y la capacidad de los osos de desplazarse grandes distancias nos sugiere que existen muy pocos osos negros en el PNCM. Pero que una gran proporción de estos tienen habituación al humano y entran en conflicto, lo que ha generado la idea de que hay muchos osos en la región.

Con la diversidad genética encontrada en base a la Ho se considera que 7 microsatélites proporcionarían la suficiente información para identificar individuos en esta población en investigaciones futuras (8 con el marcador sexual). Desafortunadamente con el pequeño tamaño de muestra no es posible decidir cuál sería el séptimo mejor marcador (G10J, G10X o G10U) para agregarse a los 6 con mayor heterocigosidad.

Para investigaciones futuras deben fijarse objetivos para determinar efectivamente la estructura poblacional (i.e., clases de edades y relación de sexo entre dichas clases), así como determinar la tasa de natalidad y supervivencia para conocer más a fondo la dinámica poblacional de la especie en el área de estudio. Por otro lado, es importante estudiar el ámbito hogareño de machos y hembras, así como los patrones de movimiento de la especie en relación a los conflictos con las actividades humanas.

En cuanto al manejo de ejemplares que entran en conflictos con las actividades humanas, las autoridades deberían considerar la evaluación de técnicas alternativas a la reubicación de individuos, tales como, condicionamiento aversivo con el uso de perros y pirotecnia, cercos eléctricos y condicionamiento aversivo al sabor entre otros. De acuerdo con los resultados del presente estudio y lo reportado en la literatura, es importante considerar la reubicación de ejemplares únicamente como última opción de manejo, para así disminuir afectaciones al nivel poblacional de la especie en la región. En el caso de la población de oso negro en el PNCM es importante poner especial interés en los ejemplares hembra, ya que su proporción es muy baja y sus tasas de reproducción son bajas de manera natural. Además de adoptar un manejo integral de los individuos de oso negro por parte de las autoridades, es necesario implementar acciones de manejo basados en la prevención y educación de los residentes y población del área metropolitana de Monterrey.

7. LITERATURA CITADA

Alanís-Flores, G. y C. Velazco-Macías. 2013. Tipos de vegetación. En: Cantú-Ayala, C., M. Rovalo-Merino, J. Marmolejo-Moncivais, S. Ortiz-Hernandez y F. Serriñá García. 2013. Historia natural del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, México. UANL-CONANP, pp: 117-126.

Amstrup, S. C. y J. J. Beecham. 1976. Activity patterns of radiocollared black bears in Idaho. *Journal of Wildlife Management* 40, pp: 340-348.

Aragón-Palacios, J. 2013. Amenazas Demográficas Potenciales. En: Cantú-Ayala, C., M. Rovalo-Merino, J. Marmolejo-Moncivais, S. Ortiz-Hernandez y F. Serriñá García. 2013. Historia Natural del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, México. UANL-CONANP, pp: 253-260.

Bacon, E. S. y G. M. Burghardt. 1983. Food preference testing of captive black bears. *International Conference on Bear Research and Management* 5, pp: 102-105.

Bailey, T. J. 1952. Improvements in the interpretation of recapture data. *Journal of Animal Ecology* 21(1), pp: 120-127.

Baker, R. H. 1956. Mammals of Coahuila, Mexico. University of Kansas Publication, Museum of Natural History 9, pp: 125-135.

Beck, T. D. I. 1991. Black bears of west-central Colorado. Colorado Division of Wildlife, Tech. Publication 39, pp: 86.

Beechman, J. 1980. Some populations characteristics of two black bear populations in Idaho. *Interior Conference on Bear Research and Management* 4, pp: 201-204.

Belant, J. L., J. F. Van Stappen, D. Paetkau. 2005. American black bear population size and genetic diversity at Apostle Islands National Lakeshore. *Ursus*, 16(1), pp: 85-92.

Boersen, M. R., J. T. Clark y T. L. King. 2003. Estimating black bear population density and genetic diversity at Tensas River, Louisiana, using microsatellite DNA markers. *Wildlife Society Bulletin* 31, pp: 197-207.

Boulanger, J., B. Mc Lellan. 2001. Closure violation in DNA-based mark-recapture estimation of grizzly bear populations. *Canadian Journal of Zoology* 79(4), pp: 642-651.

Boulanger, J., K. C. Kendall, J. B. Stetz, D. A. Roon, L. P. Waits y D. Paetkau. 2008. Multiple data sources improve DNA-Based Mark-Recapture populations of grizzly bears. *Ecological Applications* 18, in press.

Boulanger, J., M. Proctor, S. Himmer, G. Stenhouse, D. Paetkau y J. Cranston. 2006. An empirical test of DNA Mark-Recapture sampling strategies for grizzly bears. *Ursus* 17, pp: 149-158.

Bremner-Harrison, S., S. W. R. Harrison, B. L. Cypher, J. D. Murdock y J. Maldonado. 2006. Development of a single-sampling noninvasive hair snare. *Wildlife Society Bulletin* 34, pp: 456-461.

Carvajal-Villarreal, S. y A. López-Villarreal. 2007. Black bear (*Ursus americanus*) preliminar survey in the National Park Cumbres de Monterrey (Ejido San Antonio de la Osamenta, Santa Catarina, Nuevo León, México). 18th International Conference on Bear Research & Management. Monterrey, México.

Chape, S., Spalding, M. y Jenkins, S. 2008. *The World's Protected Areas. Status, Values and Prospects in the 21st Century.* UNEP-WCMC, Cambridge, England.

Chapman, D. G. 1951. Some properties of the hypergeometric distribution with applications to zoological sample censuses. *Univ. Calif. Publ. Stat.* 1, pp: 131-160.

Clark, J. D., D. L. Clapp, K. G. Smith, y B. Ederington. 1994. Black bear habitat use in relation to food availability in the interior highlands of Arkansas. *International Conference on Bear Research and Management* 9, pp: 309-318.

Comly-Gericke, L. M. y M. R. Vaughan. 1997. Survival and reproduction of translocated virginia black bears. *Int. Conf. Bear Res. And Manage.* 9(2), pp: 113-117.

Costello, C. M., Jones, D. E., Green-Hammond, K. A., Inman, R. M., Inman, K. H., Thompson, B. C y Quigley, H. B. 2001. A study of black bear ecology in New Mexico with models for population dynamics and habitat suitability. Final Report, Federal Aid in Wildlife Restoration Project W-131-R, New Mexico Department of Game and Fish, Santa Fe, USA.

Delgadillo-Villalobos, J. 2011. Técnicas de conservación y manejo de oso negro en México. En: Sánchez, O., P. Zamorano, F. P. Recagno y H. Moya eds. *Temas sobre conservación de vertebrados silvestres en México*, pp: 311-331.

Doan-Crider, D. L. 1995. Population characteristics and home range dynamics of the black bear in northern Coahuila, Mexico. M. S. Thesis. Texas A&M University-Kingsville, Kingsville. EUA. Pp 117.

Doan-Crider, D. L. y E. C. Hellgren. 1996. Population characteristics and winter ecology of black bears in Coahuila, Mexico. *The Journal of Wildlife Management* 60, pp: 398-407.

Dreher, B. P., S. R. Winterstein, K. T. Scribner, P. M. Lukacs, D. R. Etter, G. J. M. Rosa, V. A. López, S. Libants y K. B. Filcek. 2007. Non-invasive estimation of black bear abundance in Michigan incorporating genotyping errors and harvested bears. *Journal of Wildlife Management* 71, pp: 2684-2693.

Drewry, J. M., F. T. Van Manen y D. M. Ruth. 2013. Density and genetic structure of black bears in coastal South Carolina. *The Journal of Wildlife Management* 77(1), pp: 153-164.

Efford M. 2004. Density estimation in live-trapping studies. *Oikos* 106(3), pp: 586-610.

Eiler, J. H., W. G. Wathen, y M. R. Pelton. 1989. Reproduction in black bears in the southern Appalachian Mountains. *The Journal of Wildlife Management* 53, pp: 353-360.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6), pp: 435-445.

Engeman, R. M., R. E. Martin, H. T. Smith, J. Woolard, C. K. Crady, S. A. Shwiff, B. Constantin, M. Stahl y J. Griner. 2005. Dramatic reduction in predation on marine turtle nestes through improved predator monitoring and management. *Oryx* 39, pp: 318-326.

Fair, J. 1990. *The great american bear.* North Word Press. Inc. WI. Pp: 191.

Ford, B. 1981. *Black bear, The spirit of the wilderness.* Houghton Mifflin Company. Boston, Massachusetts. Pp: 182.

Frey, D. 2017. Colorado study may change bear management practices. <http://wildlife.org/colorado-study-may-change-bear-management-practices/www>. Consultado el 10 de Agosto del 2017.

Fuller, T. K., y L. B. Keith. 1980. Summer ranges, covertype use, and denning of black bears near Fort McMurray, Alberta. *The Canadian Field-Naturalist* 94, pp: 80-83.

García-Salas, J., A. Contreras-Balderas, J. Ortega-Pimienta, J. Castillo-Hernández, A. López-Villarreal, O. Ballesteros-Medrano, H. González.Páez, I. Banda-Villanueva, J. García-Hernández, J. Torres-Ayala, J. Contreras-Lozano, J. Correa-Nieto, J. Chávez-Cisneros, S. Narváez-Torres, M. Salinas-Camarena y D. Borré-González. 2013. Aves. En: Cantú-Ayala, C., M. Rovalo-Merino, J. Marmolejo-Moncivais, S. Ortiz-Hernandez y F. Serriñá García. 2013. *Historia natural del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, México.* UANL-CONANP, pp: 221-235.

- Gardner, B., J. A. Royle., M. T. Wegan., R. E. Raibolt., P. D., Curtis.** 2010. Estimating black bear density from hair snares. *Journal of Wildlife Management* 74(2), pp: 318-325.
- Garshelis, D. L., H. B. Quigley, C. R. Villarubia y M. R. Pelton.** 1983. Diel movements of black bears in the southern Appalachians. *International Conference on Bear Research and Management* 5, pp: 11-19.
- González E. G.** 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59(2-3), pp: 377-388.
- González-Saldivar, F., J. Uvalle-Sauceda, J. Avendaño y A. Niño-Ramírez.** 2013. Mamíferos. En: Cantú-Ayala, C., M. Rovalo-Merino, J. Marmolejo-Moncivais, S. Ortiz-Hernandez y F. Serriñá García. 2013. *Historia natural del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, México.* UANL-CONANP, pp: 237-251.
- Hall, E. R.** 1981. *The mammals of North America.* John Wiley and Sons, New York, N.Y. Pp: 1181.
- Harris, C. E., y F. F. Knowlton.** 2001. Differential responses of coyotes to novel stimuli in familiar and unfamiliar settings. *Canadian Journal of Zoology* 79, pp: 2005-2013.
- Hellgren, E. C. y M. R. Vaughan.** 1989a. Demographic analysis of a black bear population in the Great Dismal Swamp. *The Journal of Wildlife Management* 53, pp: 969-977.
- Hellgren, E. C. y M. R. Vaughan.** 1989b. Denning ecology of black bears in a southeastern wetland. *The Journal of Wildlife Management* 53, pp: 347-353.
- Hellgren, E. C. y M. R. Vaughan.** 1994. External morphometrics of black bears, *Ursus americanus* (Carnivora: Ursidae), in the Great Dismal Swamp of Virginia and North Carolina. *Brimleyana* 21, pp: 141-149.
- Hellgren, E. C., M. R. Vaughan, F. C. Gwazdauskas, B. Williams, P. F. Scanlon y R. L. Kirkpatrick.** 1990. Endocrine and electrophoretic profiles during pregnancy and nonpregnancy in captive female black bears. *Canadian Journal of Zoology* 69, pp: 892-898.
- Herrero, S.** 1985. *Bear attacks: Their causes and avoidance.* Lyons & Burford. New York. Pp: 287.
- Hofreiter, M., D. Serre, H. N. Poinar, M. Kuch y S. Paabo.** 2001. Ancient DNA. *Nature Reviews Genetics* 2, pp: 353-359.
- Hornaday, W. T.** 1905. A new white bear, from British Columbia. *Annual Report of the New York Zoological Society* 9, pp: 81-86.

- Horner, M. A. y R. A. Powell.** 1990. Internal structure of home ranges of black bears and analyses of home-range overlap. *Journal of Mammalogy* 71, pp: 402-410.
- Hsu, T. C. y K. Benirschke.** 1967. *Ursus americanus* (American black bear) $2n = 74$. An atlas of mammalian chromosomes. Vol. 1(23). Springer-Verlag, New York.
- Hugie, R. D.** 1982. Black bear ecology and management in the northern conifer-deciduous forest of Maine. PhD. Thesis, Univ. Mont., Missoula. Pp: 203.
- Immel, D. y R. G. Anthony.** 2008. Estimation of black bear abundance using a discrete DNA sampling device. *Journal of Wildlife Management*. 72(1), pp: 324-330.
- Irwin, L. L. y F. M. Hammond.** 1985. Managing black bear habitats for food items in Wyoming. *Wildlife Society Bulletin* 13, pp: 477-483.
- Jonkel, C. J. y I. McT. Cowan.** 1971. The black bear in the spruce-fir forest. *Wildlife Monographs* 27, pp 57.
- Kasworm, W. F. y T. J. Thier.** 1994. Adult black bear reproduction, survival, and mortality sources in northwest Montana. *International Conference on Bear Research and Management* 9, pp: 223-230.
- Kemp, G. A.** 1976. The dynamics and regulation of black bear *Ursus americanus* populations in Northern Alberta. *Bears: Their Biology and Management*, Vol. 3, A Selection of Papers from the Third International Conference on Bear Research and Management, Binghamton, New York, USA, and Moscow, U.S.S.R., June 1974. IUCN Publications New Series no. 40 (1976), pp: 191-197.
- Kendall, K. C. y K. S. McKelvey.** 2008. Hair collection. En: Long, R. A., P. MacKay, W. J. Zielinski, J. C. Ray. *Noninvasive survey methods for carnivores*. Island Press. pp. 141-182.
- Kimball, B. A., D. L. Nolte, R. M. Engeman, J. J. Johnston, y F. R. Stermitz.** 1998. Chemically mediated foraging preferences of black bears (*Ursus americanus*). *Journal of Mammalogy* 79, pp: 448-456.
- Kolenosky, G. B. y S. M. Strathearn.** 1987. Black bear. En: M. Nowak, J. A. Baker, M. E. Obbard, y Malloch, B. Wild furbearer management and conservation in North America. Ontario Ministry of Natural Resources, Toronto, Canada, pp. 443-454.
- Lancia, R. A., Nichols J. D. y Pollock K. H.** 1996. Estimating the number of individuals in wildlife populations. En: Bookhout T. A. *Research and management techniques for wildlife and habitats* The Wildlife Society, pp: 215-250.

Landers, J. L., R. J. Hamilton, A. S. Johnson, y R. L. Marchinton. 1979. Foods and habitat of black bears in southeastern North Carolina. *The Journal of Wildlife Management* 43, pp: 143-153.

Lara-Díaz, N. 2010. La comunidad de mamíferos previa a la liberación de *Canis lupus baileyi* en Sonora, México. Tesis Maestría, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, México.

LeCount, A. L. 1982. Characteristics of a northern Arizona black bear population. *Game and Fish Dept. Fed. Aid Proj. W-78-R.*, 2(22), pp: 26.

LeCount, A. L. 1984. Black bear cub production and survival in central Arizona. *Arizona Game and Fish Dept. Fed. Aid in Wildl. Restor., Final Report, Proj. W-78-R*, pp:10.

LeCount, A. L. 1987. Characteristics of a northern Arizona black bear population. *Game and Fish Dept. Fed. Aid Proj. W-78-R., Work Plan 2, Job 22.* 26 pp., citado en: Doan-Crider, D. L. 1995.

LeCount, A. L. 1990. Characteristics of an east-central Arizona black bear population. *Arizona Game and Fish Department. Tech. Report, 2*, pp: 32.

Leonard, J. A., C. Vila y R. Wayne. 2005. Legacy lost: genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). *Molecular Ecology* 14, pp: 9-17.

Leopold, A. S. 1959. *Wildlife of Mexico.* University of California Press. Davis, pp: 568.

Leopold, A. S. 1977. *Fauna silvestre de México.* Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, pp: 467-473.

Lincoln, F. C. 1930. Calculating waterfowl abundance on the basis of banding returns. Circular 118. U.S. Department of Agriculture.

Lindahl, T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, pp: 709-715.

Lindzey, F. G. y E. C. Meslow. 1976. Winter dormancy in black bears in southwestern Washington. *The Journal of Wildlife Management* 40, pp: 408-415.

Lindzey, F. G. y E. C. Meslow. 1977. Home range and habitat use by black bears in southwestern Washington. *The Journal of Wildlife Management* 41, pp: 413-425.

Linnell, J. D. C., R. Aanes y J. E. Swenson. 1997. Translocation of carnivores as a method for managing problem animals: a review. *Biodiversity and Conservation* 6, pp: 1245-1257.

Long, R. A. y W. J. Zielinski. 2008. Designing effective noninvasive carnivore surveys. En: Long, R. A., P. MacKay., W. J. Zielinski y J. C. Ray. *Noninvasive survey methods for carnivores*, pp: 8-44.

López, M., P. Mallorquín, M. Vega. 2005. Genotipado en salud humana. Informe de vigilancia tecnológica, pp: 97.

Lugo-Hubp, J. 1990. El relieve de la República Mexicana. Univ. Nal. Autón. México. *Inst. Geología. Revista* 9(1), pp: 82-111.

Luikart, G. y J. –M. Cornuet. 1998. Empirical evaluation of a tests for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology* 12, pp: 228-237.

Lukacs, P. M. y K. P. Burnham. 2005. Review of capture-recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling. *Molecular Ecology* 14, pp: 3909-3919.

Manville, A. M. 1983. Human impact on the black bear in Michigan's lower peninsula. *Bears: Their Biology and Management*, pp: 20-33.

Mattson, D. J. 1990. Human impacts on bear habitat use. *International Conference on Bear Research and Management* 8, pp: 33-56.

McDaniel, G. W., K. S. McKelvey, J. R. Squires y L. F. Ruggiero. 2000. Efficacy of lures and hair snares to detect lynx. *Wildlife Society Bulletin* 28, pp: 119-123.

McKelvey, K. S. y M. K. Schwartz. 2004. Providing reliable and accurate genetic capture-mark-recapture estimates in a cost-effective way. *Journal of Wildlife Management* 68, pp: 453-456.

McKinney, B. R. y J. A. Delgadillo. 2004. Manual para el manejo de oso negro mexicano, Guía para manejadores. Cemex, Monterrey, N.L. México. Pp: 71.

McLean, P. K. y M. R. Pelton. 1990. Some demographic comparisons of wild and panhandler bears in the Smoky Mountains. *International Conference on Bear Research and Management* 8, pp: 105-112.

Miller C. R. y L. P. Waits. 2003. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): Implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 100, pp: 4334–4339.

Miller, C. R., P. Joyce y L. P. Waits. 2002. Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* 160, pp: 357-366.

Miller, S. D., Becker, E. F., y Ballard, W. B. 1987. Black and brown bear density estimates using modified capture-recapture techniques in Alaska. Interior Conference on Bear Research and Management 7, pp: 23-35.

Mills, J. y C. Servheen. 1994. The Asian trade in bears and bear parts: impacts and conservation recommendations. International Conference on Bear Research and Management 9, pp: 161-167.

Mills, L. S., K. Pilgrim, M. K. Schwartz y K. McKelvey. 2000. Identifying lynx and other North American felids based on MtDNA analysis. Conservation Genetics 1, pp: 285-288.

Moctezuma, O. O. 1997. Oso negro americano (*Ursus americanus* Pallas, 1780). En: Ceballos, G. y H. Arita, eds. Atlas mastozoológico. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) e Instituto de Ecología, U.N.A.M.

Morin, P. A., K. E. Chambers, C. Boesch y L. Vigilant. 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from samples for accurate microsatellite genotyping in wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). Molecular Ecology 10, pp: 1835-1844.

Morin, P. A., y D. S. Woodruff. 1992. Paternity exclusion using multiple hypervariable microsatellite loci amplified from nuclear DNA or hair cells. En: Martin, R. D., A. F. Dixson y E. J. Wickings (eds) Paternity in primates: genetic tests and theories. Basel, Karger, pp: 63-81.

Moruzzi T. L., T. K. Fuller, R. M. DeGraaf, R. T. Brooks, y W. Li. 2002. Assessing remotely triggered cameras for surveying carnivore distribution. Wildlife Society Bulletin 30, pp: 380-386.

Mowat, G. y D. Paetkau. 2002. Estimating marten *Martes americana* population size using hair capture and genetic tagging. Wildlife Biology 8, pp: 201-209.

Mowat, G., Heard, D. C., Seip, D. R., Poole, K. G., Stenhouse, G., y Paetkau, D. W. 2005. Grizzly *Ursus arctos* and black bear *U. americanus* densities in the interior mountains of North America. Wildlife Biology, 11(1), pp: 31-48.

Mullis K. B, F. A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Methods in Enzymology 155, pp: 335-350.

Murphy R., J. W. J. Sites, D. Buth, C. Haufler. 1996. Proteins: isozyme electrophoresis. En: Hillis D, Moritz C, Mable B, eds. Molecular Systematics Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc, pp: 51-120.

Narvaez-Torres, S. y D. Lazcano-Villarreal. 2013. Anfibios y reptiles. En: Cantú-Ayala, C., M. Rovalo-Merino, J. Marmolejo-Moncivais, S. Ortiz-Hernandez y F.

Seriñá García. 2013. Historia natural del Parque Nacional Cumbres de Monterrey, México. UANL-CONANP, pp: 207-220.

Neal, W. A. 1990. Black bear. En: Demarais, S. y P. R. Krausman, eds. 2000. Ecology and management of large mammals of North America, Prentice Hall, pp: 389-408.

Nietfield, M. T., M. W. Barrett, y N. Silvy. 1994. Wildlife Marking Techniques. 140-168 in T.A. Bookhout (ed). Research and Management Techniques for Wildlife and Habitats. Fifth ed. The Wildlife Society, Bethesda, pp: 740.

Noyce, K. V. y D. L. Garshelis. 1997. Influence of natural food abundance on black bear harvests in Minnesota. The Journal of Wildlife Management 61, pp: 1067-1074.

Onorato, D. P., E. C. Hellgren, R. A. Van Den Bussche, y D.L. Doan-Crider. 2004. Phylogeographic patterns within a metapopulation of black bears (*Ursus americanus*) in the American Southwest. Journal of Mammalogy 85, pp: 140-147.

Ortega, J., Montiel-Reyes, F., Maldonado, J. E., Del Real-Monroy, M., Martínez-Méndez, N. 2014. Non-invasive sampling reveals fine-scale genetic structure in black bear *Ursus americanus* populations from northeastern Mexico. Endangered Species Research. 26, pp: 179-188.

Otis, D. L., K. P. Burnham, G. C. White y David R. A. 1978. Statistical inference from capture recapture data on closed animal populations. Wildlife Monographs 62, pp: 3-135.

Paetkau, D. 2003. An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories. Molecular Ecology 12, pp: 1375-1387.

Paetkau, D., L. Waits, P. Clarkson, L. Craighead, E. Vyse, R. Warth y C. Strobeck. 1998. Variation and genetic diversity across the range of North American brown bears. Conservation Biology 12, pp: 418-429.

Pallas, P. S. 1780. Spicilegia Zoologica, quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus. Berolini, G. A. Lange, 1774-1780. Fascicle 14, p. 5 (not seen, cited in Catalogue of the Library of the Museum of Comparative Zoology 6, pp: 506).

Parker, P. G., A. A. Snow, M. D. Schug, G. C. Booton y P. A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. Ecology 79(2), pp: 361-382.

Peacock, E., K. Titus, D. L. Garshelis, M. M. Peacock y M. Kuc. 2011. Mark-recapture using tetracycline and genetics reveal record-high bear density. Journal of Wildlife Management. 75(6), pp: 1513-1520.

Pelton, M. R. 2005. Black bear. En: Demarais, S. y P. R. Krausman eds. Ecology and management of large mammals of North America. Prentice Hall, pp: 389-408.

Pico, S. M. Belén. 2012. Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR o STR (Simple sequence repeats or short tandem repeats). Microsatélites, pp: 1-11.

Piekielek, W. y T. S. Burton. 1975. A black bear population study in northern California. California Fish and Game, 61, pp: 4-25.

Poelker, R. J. y H. D. Hartwell. 1973. Black bear in Washington. Washington State Game Department, Biological Bulletin 14, pp: 1-180.

Powell, R. A., J. W. Zimmerman y D. E. Seaman. 1997. Ecology and behaviour of North American black bears: home ranges, habitat and social organization. Chapman and Hall, New York. Pp: 204.

Proctor, M. F., B. N. McLellan, C. Strobeck. y R. M. R. Barclay. 2004. Gender-specific dispersal distances of grizzly bears estimated by genetic analysis. Canadian Journal of Zoology 82, pp: 1108-1118.

Proctor, M. F., B. N. McLellan, C. Strobeck. y R. M. R. Barclay. 2005. Genetic analysis reveals demographic fragmentation of grizzly bears yielding vulnerably small populations. Proceedings of the Royal Society Biology 272(1579), pp: 2409-2416.

Raine, R. M. y J. L. Kansas. 1990. Black bear seasonal food habits and distribution by elevation in Banff National Park, Alberta. International Conference on Bear Research and Management 8, pp: 297-304.

Ramekers J., S. Hummel, B. Herrmann. 1997. How many cycles does a PCR need? Determination of cycle numbers depending of the number of targets and the reaction efficiency factor. Naturwissenschaften 84, pp: 259-262.

Ritland, K. 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. Genetical Research 67, pp: 175-185.

Rogers, L. L. 1977. Social relationships, movements, and population dynamics of black bears in north-eastern Minnesota. PhD. Thesis. University of Minnesota. Minneapolis, pp: 194 pp.

Rogers, L. L. 1980. Inheritance of coat color and changes in pelage coloration in black bears in northeastern Minnesota. Journal of Mammalogy. 61, pp: 324-327.

Rogers, L. L. 1987. Effects of food supply and kinship on social behavior, movements, and population growth of black bears in northeastern Minnesota. Wildlife Monographs 97, pp: 1-72.

Rohlman, J. A. 1989. Black bear ecology near Priest Lake, Idaho. Thesis, University of Idaho, Moscow, Idaho, USA.

Roon, D. A., L. P. Waits y K. C. Kendall. 2003. A quantitative evaluation of two methods for preserving hair samples. *Molecular Ecology Notes* 3, pp: 163-166.

Roon, D. A., M. E. Thomas, K. C. Kendall y L. P. Waits. 2005. Evaluating mixed samples as a source of error in non-invasive genetic studies using microsatellites. *Molecular Ecology* 14, pp: 195-201.

Rounds, R. C. 1987. Distribution and analysis of colourmorphs of the black bear (*Ursus americanus*). *Journal of Biogeography* 14, pp: 521-538.

Saiki R. K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi., G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, pp: 487-491.

Schipper, J. 2007. Camera-trap avoidance by kinkajous *Potos flavus*; rethinking the "non-invasive" paradigm. *Small Carnivore Conservation* 36, pp: 38-41.

Schmitz, O. J., P. A. Hambäck y A. P. Beckerman. 2000. Trophic cascades in terrestrial systems: a review of the effects of carnivore removals on plants, *The American Naturalist*, Vol. 155(2) , pp: 141-153.

Schooley, R. L., C. R. Macloughlin, G. J. Matula, JR. y W. B. K Rohn. 1994. Denning chronology of female black bears: effects of food, weather, and reproduction. *Journal of Mammalogy* 75, pp: 466-477.

Schwartz, C. C. y A. W. Franzmann. 1991. Interrelationship of black bears to moose and forest succession in the northern coniferous forest. *Wildlife Monographs* 113, pp: 58 pp.

Schwartz, C. C., S. D. Miller, y A. W. Franzmann. 1987. Denning ecology of three black bear populations in Alaska. *International Conference on Bear Research and Management* 7, pp: 281-291.

Schwartz, M. K. y S. L. Monfort. 2008. Genetic and endocrine tools for carnivore surveys. En: Long, R. A., P. MacKay, W. J. Zielinski, J. C. Ray. *Noninvasive survey methods for carnivores*. Island Press. Pp. 238-262.

Seber, G. A. F. 1982. The estimation of animal abundance and related parameters. Second ed. Macmillian Publ. Co., Inc., New York, N.Y. Pp: 653.

Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. (SEMARNAP) 1999. PROYECTO PARA LA CONSERVACIÓN Y MANEJO DEL Oso Negro (*Ursus americanus*) en México. Instituto Nacional de Ecología.

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 Especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación 2ª Sección, 30 de diciembre del 2010.

Shaw P. W., G. J. Pierce y P. R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 8, pp: 407– 417.

Shurin, J. B., E. T. Borer, E. W. Seabloom, K. Anderson, C. A. Blanchette, B. Broitman, S. D. Cooper y B. S. Halpern. 2002. A cross-ecosystem comparison of the strength of trophic cascades, *Ecology letters* 5, pp: 785-791.

Sierra-Corona, R., I. A. Sáyo-Vázquez, M. C. Silva Hurtado y C. A. López-González. 2005. Black bear abundance, hábitat use, and food habits in the Sierra San Luis, Sonora, México. *USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-36*, pp: 444-448-

Stetz, J. B., K. C. Kendall y A. C. Macleod. 2014. Black bear density in glacier National Park, Montana. *Wildlife Society Bulletin* 38(1), pp: 60-70.

Stubblefield, C. H. 1993. Food habits of black bears in the San Gabriel Mountains of southern California. *The Southwestern Naturalist* 38, pp: 290-293.

Taberlet, P. y G. Luikart. 1999. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biological Journal of the Linnean Society* 68, pp: 41-55.

Taberlet, P. y J. Bouvet. 1992. Bear conservation genetics. *Nature* 358, pp: 197.

Taberlet, P., S. Griffen, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits y J. Bouvet. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 26, pp: 3189-3194.

Tredick, C. A. 2005. Population abundance and genetic structure of black bears in coastal North Carolina and Virginia using noninvasive genetic techniques. MS thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.

Treves, A. y K., U. Karanth. 2003. Human-carnivore conflict and perspectives on carnivore management worldwide. *Conservation Biology* 17(6), pp: 1491-1499.

- Tsubota, T., R. A. Nelson, J. D. Thulin, L. Howell, y J. M. Bahr.** 1995. Annual changes in serum concentrations of prolactin in captive male black bears (*Ursus americanus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 104, pp: 187-191.
- Valière, N., P. Berthier, D. Mouchiroud y D. Pontier.** 2002. GEMINI: software for testing the effects of genotyping errors in multitubes approach for individual identification. *Molecular Ecology Notes* 2, pp: 83-86.
- Valsecchi E, D. Glockner-Ferrari, M. Ferrari, W. Amos.** 1998. Molecular analysis of the efficiency of sloughed skin sampling in whale population genetics. *Molecular Ecology* 7, pp: 1419-1422.
- Varas-Nelson, A. C.** 2010. Conservation genetics of black bears in Arizona and Northern Mexico. The University of Arizona, PhD Dissertation. School of Natural Resources and the Environment, University of Arizona. Tucson. USA.
- Waddell, T. E. y D. E. Brown.** 1984. Weights and color of black bears in the Pinaleno Mountains, Arizona. *Journal of Mammalogy*, 65(2), pp: 350-351.
- Walsh P. S., D. A. Metzger, R. Higuchi.** 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10, pp: 506-513.
- Wandeler P., S. Smith, P. A. Morin, R. A. Pettifor, S. M. Funk.** 2003. Patterns of nuclear DNA degeneration over time — a case study in historic teeth samples. *Molecular Ecology* 12, pp: 1087–1093.
- Warburton, G. S. y R. C. Maddrey,** 1994. Black bear. En: Demarais, S. y P. R. Krausman eds. 2000. *Ecology and management of large mammals of North America*, Prentice Hall, pp: 389-408.
- Wasser S, C. Houston, G. Koehler, G. Cadd, S. Fain.** 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies in Ursids. *Molecular Ecology* 6, pp: 1091-1097.
- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller.** 1992. *Recombinant DNA*. 2nd Edition, W. H. Freeman and Company, New York, N.Y., USA.
- Wattier R., C. R. Engel, P. Saumitou-Laprade., M. Valero.** 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* 7, pp: 1569–1573.

Wimsatt, W. A. 1963. Delayed implantation in the Ursidae, with particular reference to the black bear (*Ursus americanus*). Pp. 49-76 En: Enders, A. C. Delayed implantation University of Chicago Press, Illinois. Pp: 49-76.

Woods, J. G., D. Paetkau, D. Lewis, B. N. McLellan, M. Proctor y C. Strobeck. 1999. Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. Wildlife Society Bulletin 27(3), pp: 616-627.

Wright P.A. y D. Wynford-Thomas. 1990. The polymerase chain reaction: miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. Journal of Pathology 162, pp: 99-117.

Yodzis, P. y G. B. Kolenosky. 1986. A population dynamics model of black bears in east central Ontario. Journal of Wildlife Management 50, pp: 602-612.

Young, B. F. y R. L. Ruff. 1982. Population dynamics and movements of black bears in East Central Alberta. The Journal of Wildlife Management 46(4), pp: 845-860.

Zielinski, W. J. y T. E. Kucera. 1999. Introduction to detection and survey methods. En: Zielinski W. J. y T. E. Kucera, editors. American marten, fisher, lynx, and wolverine: survey methods for their detection. USDA Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Albany CA. General Technical Report PSW-GTR-157, pp: 1-16.