



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

FILOGEOGRAFÍA DE *Lepidocolaptes affinis*
(AVES, FURNARIIDAE) EN MESOAMÉRICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

ENRIQUE ARBELÁEZ CORTÉS

DIRECTOR DE TESIS: Dr. ADOLFO GERARDO NAVARRO-SIGÜENZA

MÉXICO D.F.

JUNIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La realización de este trabajo fue posible gracias a las siguientes instituciones, personas y proyectos.

- Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la formación académica recibida y por el apoyo económico brindado para una estancia en el extranjero.
- Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología de México (CONACYT) por el apoyo económico brindado con una beca para estudios de posgrado.
- Los Proyectos SEMARNAT-CONACYT C01-0265 y PAPIIT IN-216408-2 por aportar el presupuesto usado en este proyecto.
- A los miembros de mi comité tutorial: Blanca E. Hernández-Baños, Ma. Del Coro Arizmendi y Adolfo G. Navarro-Sigüenza por su instrucción y comentarios durante el desarrollo del proyecto.
- A los curadores de las diferentes colecciones científicas que facilitaron muestras para este trabajo: Adolfo Navarro-Sigüenza (Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias UNAM, México), Mark Robbins (Natural History Museum University of Kansas, U.S.A), Jonh Klicka (Marjorie Barrick Museum University of Nevada U.S.A.), Sharon Birks (Burke Museum University of Washington), Robb Brumfield & Dona Dittmann (Museum of Natural History Louisiana State University U.S.A), David Willard (Field Museum U.S.A), Jano Núñez (CORBIDI, Lima, Perú).

AGRADECIMIENTOS

- A todos los colectores de los museos porque sin su contribución no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo. En especial a los colectores del Museo de Zoología de la UNAM: Adolfo G. Navarro-Sigüenza, Luis A. Sánchez-González, Octavio Rojas-Soto, Anuar López y Roberto Sosa; quienes colectaron muestras durante el desarrollo de este proyecto conscientes de su utilidad inmediata.
- A Blanca Hernández-Baños y a Anuar López por la colaboración en la búsqueda y recuperación de tejidos del Banco de tejidos del Museo de Zoología de la UNAM.
- A Nandadevi Cortés y Anahí Avila por su colaboración en algunos pasos del trabajo en el laboratorio.
- A A. Townsend Peterson y Arpad Nyari por el apoyo brindado y por el acceso al laboratorio en The Natural History Museum University of Kansas.
- A Adolfo Navarro-Sigüenza, Blanca Estela Hernández-Baños, Ma. del Coro Arizmendi, Luis Antonio Sánchez-González, Mark Earl Olson y Luis Eguiarte por sus comentarios y recomendaciones sobre una versión inicial de este manuscrito.
- A Cesar A. Ríos-Muñoz y Luis D. Verde-Arregoitia por la colaboración en la edición de las imágenes de este trabajo.
- A Alejandro Gordillo por el apoyo logístico durante el proyecto.
- A Yoshinori Nakazawa y Andrés Lira Noriega por el apoyo brindado durante mi estancia en The Natural History Museum University of Kansas.
- A Adolfo G. Navarro-Sigüenza, Luis A. Sánchez-González, Erick García-Trejo, Cesar Ríos-Muñoz, Anuar Lopez, Hernán Vázquez, Jerónimo Berruecos, Ian MacGregor, Andrés Lira-Noriega, Yoshinori Nakazawa, Mark E. Olson, A. Townsend Peterson, Juan José Morrone y Helga Ochoterena por la enriquecedora y amena discusión académica sobre aspectos generales de la biología y particulares de este proyecto.
- Especialmente agradezco a Adolfo G. Navarro-Sigüenza por brindarme la gran oportunidad de investigar, conocer y aprender a su lado.
- Y por último, pero no por eso lo último, a Dora Inés Cortés, Germán Arbeláez, Alvaro Arbeláez-Cortés y Natalia Díaz-Gutiérrez por acompañarme y apoyarme en la distancia.

RESUMEN

Se analizó la variación genética de *Lepidocolaptes affinis* en Mesoamérica a partir de la secuenciación de 1869pb de dos regiones del ADN mitocondrial (CytB y ND2) de 79 especímenes de 34 localidades entre el noreste de México y Costa Rica. La diversidad y estructura genética fue estudiada con métodos de genética de poblaciones y con el Análisis de Clados Anidados. La historia demográfica se examinó con distribuciones *mismatch* y métodos basados en coalescencia. Las relaciones filogenéticas entre haplotipos fueron analizadas usando ML, MP, análisis bayesianos y redes de haplotipos. *L. affinis* presentó una diversidad genética moderada (3.6% de sitios variables, 356 haplotipos únicos y diversidad nucleotídica= 0.005), una baja diferenciación entre individuos (divergencia media *P-uncorrected* = 1.8%) y una diferenciación variable entre poblaciones ($F_{ST} = 0.16 - 0.96$, $p < 0.05$). El patrón filogeográfico mostró a la depresión de Nicaragua como una barrera geográfica evidente. Las poblaciones a ambos lados del Istmo de Tehuantepec no mostraron una diferenciación marcada. En México las poblaciones de las montañas de Oaxaca y de la Sierra Madre Oriental estuvieron relacionadas y compuestas por dos linajes diferentes. Las relaciones filogenéticas entre varios haplotipos no se resolvieron completamente probablemente debido a una diferenciación reciente. En general los datos no apoyaron un escenario de expansión demográfica y la única población que mostró evidencia de un cuello de botella genético fue la de Costa Rica. Se comentan algunos aspectos de las relaciones filogenéticas entre esta especie y otras del mismo género.

ABSTRACT

The genetic variation of *Lepidocolaptes affinis* in Mesoamerica was analyzed by sequencing 1869bp of mtDNA regions (CytB and ND2) of 79 specimens of 34 localities from northeastern México to Costa Rica. The genetic diversity and structure was studied with population genetics methods and a Nested Clade Analysis. Demographic history was examined with mismatch distributions and coalescent based methods. The phylogenetic relationships between haplotypes were analyzed using ML, MP, Bayesian approaches and haplotype networks. *L. affinis* presented a moderate genetic diversity (3.6% variable sites, 36 unique haplotypes, nucleotide diversity=0.005), low differentiation among individuals (mean p-uncorrected divergence= 1.8%) and a variable differentiation among populations ($F_{ST} = 0.16 - 0.96$, $p < 0.05$). The phylogeographic pattern suggests that the Nicaragua depression acts as an important geographic barrier. Populations on the two sides of Tehuantepec isthmus did not show strong differentiation. In Mexico, the Oaxaca mountains and the Sierra Madre Oriental populations were related and composed of two different lineages. Relationships among many haplotypes were not fully resolved likely due to recent differentiation. In general, the data didn't support a scenario of demographic expansion and the only population that showed evidence of a genetic bottleneck was Costa Rica. Some aspects about phylogenetic relationships among this species and others of the same genus are commented.

INTRODUCCIÓN

La biología evolutiva busca responder dos preguntas básicas: ¿cuáles son las causas de la evolución? y ¿cuál es la historia de la vida en la Tierra? (Futuyma 1998). La gran diversidad biológica del Neotrópico representa un buen sistema para poner a prueba hipótesis relacionadas con esas preguntas. La mayoría de modelos de diversificación de varios grupos taxonómicos en esta zona invocan el aislamiento geográfico como el modo principal de diferenciación (Haffer 1969, Nores 1999) a diferentes escalas. En el grupo de las aves, las diferencias entre hábitats y el efecto de los cambios geológicos y/o climáticos se han incluido en las explicaciones de su diversificación en el Neotrópico (*e.g.*, García-Moreno & Cardoso da Silva 1996, Aleixo 2002, 2004, Brumfield & Edwards 2007, Cabanne *et al.* 2008). El conocimiento de los procesos evolutivos que dieron forma a la biota es importante tanto para propósitos académicos como de conservación (Moritz 2002). En años recientes, la posibilidad de poner a prueba hipótesis sobre la historia de especies individuales se ha enriquecido por la generalización del uso de marcadores moleculares y el desarrollo de nuevas teorías y métodos analíticos (*e.g.*, filogeografía, genética de poblaciones).

El presente estudio analiza la variación genética de una especie de ave (*Lepidocolaptes affinis*) de Bosque Montano en Mesoamérica, utilizando información de sus secuencias de ADN. Con el fin de sugerir algunas explicaciones sobre la historia evolutiva de este linaje, se implementaron diferentes métodos y análisis que describen los patrones de relaciones históricas y de distribución geográfica de los haplotipos de *L. affinis*. También se utilizan análisis para detectar evidencia de fluctuaciones demográficas de las poblaciones de *L. affinis*. La variación genética de *L. affinis* se compara con la de otras especies tanto de Bosques Montanos Mesoamericanos como con especies de la subfamilia Dendrocolaptinae para poner los resultados en un contexto biogeográfico y filogenético. Se exploran, además, las relaciones filogenéticas entre *L. affinis* y otras especies del género.

Filogeografía

La filogeografía pretende dilucidar los patrones espaciales de la variación genética de las especies y proponer los procesos implicados (Avice 2000). Este campo surge gracias a desarrollos en las técnicas de análisis de la diversidad genética a nivel molecular, el mejoramiento de los análisis filogenéticos y el establecimiento de la teoría de coalescencia (Avice 2000). El ADN mitocondrial

(ADNmt) se ha utilizado como base en la mayoría de estudios filogeográficos ya que en animales evoluciona rápidamente y usualmente es transmitido maternalmente sin recombinación (Avice 1998) lo cual permite encontrar una gran diversidad interindividual y hacer reconstrucciones filogenéticas. El que la filogeografía implique información filogenética le da una dimensión histórica de la que carece la genética de poblaciones (Avice 2000).

Los métodos filogenéticos más usados en filogeografía son los basados en los criterios de Máxima Parsimonia y de Máxima Verosimilitud, así como las reconstrucciones basadas en Inferencia Bayesiana (IB). Los análisis con MP usan un criterio de selección de hipótesis en donde la solución más simple es la mejor, minimizando así el número de hipótesis *ad hoc* (e. g., homoplasias) sobre una filogenia (Egan & Crandall 2006). Para MP existen poderosas estrategias de búsqueda (Goloboff *et al.* 2003) que han disminuido el tiempo computacional de los análisis. El análisis con MP funciona bien para secuencias de ADN con divergencia moderada, pero puede ser poco preciso cuando las secuencias presentan una gran divergencia, ya que si algunas ramas en una filogenia han evolucionado a una tasa mayor que otras es posible que acumulen varias homoplasias y MP tiende a agrupar esas ramas (atracción de ramas largas) rindiendo inferencias filogenéticas erróneas (Egan & Crandall 2006). En el caso de los datos moleculares, los métodos que tienen en cuenta características específicas de esos datos o de los procesos implicados rinden estimadores más precisos de las filogenias (Huelsenbeck 1995).

Cuando se cuenta con modelos de evolución de los caracteres, se pueden usar métodos estadísticos estándar para estimar la filogenia (Felsenstein 2004). El método más aplicado es la Máxima Verosimilitud (ML), que basándose en un árbol con longitudes de rama y un modelo evolutivo que permite calcular probabilidades de cambio de los estados de carácter a lo largo de ese árbol, busca la topología que muestre el mejor ajuste entre los datos y el modelo (Felsenstein 2004). La verosimilitud tiene varias propiedades que la hacen un buen método estadístico, entre ellas la consistencia (Felsenstein 2004). En sistemática filogenética, la consistencia significa que el método converge en la filogenia correcta conforme los datos disponibles tienden al infinito (Hillis 1995, Sober 2004). A pesar de usar criterios diferentes para elegir una hipótesis filogenética, la MP y ML usan las mismas estrategias de búsqueda (e.g., heurística) y los mismos métodos de reordenamiento de ramas (e.g., TBR) para explorar el espacio de topologías posibles.

Otro método estadístico para el análisis filogenético es la Inferencia Bayesiana, que tiene varias diferencias con los otros métodos, en cuanto a sus bases teóricas e implementación. Los métodos bayesianos están relacionados con los métodos de verosimilitud, difiriendo por el uso de una distribución *prior* del parámetro que va a ser inferido, que típicamente es el árbol (Felsenstein 2004). En la perspectiva Bayesiana no hay distinción lógica entre los parámetros del modelo usado y los datos, siendo considerados como variables aleatorias con una distribución de probabilidad conjunta que es el producto de la verosimilitud por el *prior* (Beaumont & Rannala 2004). El *prior* encapsula información, en forma de una distribución de probabilidad, acerca de los valores de un parámetro antes de examinar los datos, y por su parte la verosimilitud es una distribución condicional que especifica la probabilidad de los datos observados dado cualquier valor particular de los parámetros (Beaumont & Rannala 2004). En conjunto, esas dos funciones combinan toda la información disponible sobre los parámetros (Beaumont & Rannala 2004). Algunos cálculos difíciles de computar son aproximados utilizando una estrategia de búsqueda iterativa conocida como el método de cadenas Markov Monte Carlo (MCMC) (Egan & Crandall 2006) que despliega una muestra aleatoria de los árboles (hipótesis de la distribución *a posteriori*), permitiendo hacer propuestas probabilísticas acerca del árbol verdadero (Felsenstein 2004).

Dado que las reconstrucciones filogenéticas basadas en los métodos comentados pueden presentar ciertos problemas al establecer relaciones entre haplotipos de una especie (*e.g.*, ocurrencia de reticulación), se han desarrollado las redes de haplotipos (Posada & Crandall 2001). Este método, basado en diferentes algoritmos, es otra forma de presentar las relaciones entre un conjunto de haplotipos en donde éstos no se ubican solo en los terminales sino también en los nodos, formando una red que une los haplotipos por sus distancias mutacionales (Posada & Crandall 2001).

Ahora bien, en su forma básica los métodos filogeográficos superponen una hipótesis de relaciones entre haplotipos a la distribución geográfica (mapa) de los mismos y sobre esto se desarrollan las interpretaciones de la historia del linaje estudiado. Sin embargo, en muchos casos este método puede resultar subjetivo. Por esta razón se desarrolló un método conocido como Análisis de Clados Anidados (NCA ó NCPA, por sus siglas en inglés) (Templeton *et al.* 1995, Templeton 2004) que mediante la aleatorización de la información geográfica y filogenética pone a prueba estadísticamente la hipótesis de no-asociación geográfica de los haplotipos. Además, según

los proponentes del método (Templeton *et al.* 1995, Templeton 2004) los resultados del análisis pueden ser sometidos a una clave de inferencia (serie de preguntas verbales sobre los valores obtenidos del análisis) para proponer diferentes procesos históricos (*e.g.*, vicarianza, aislamiento por distancia) implicados en la distribución geográfica de los haplotipos. A pesar de su amplia utilización, el NCA ha sido muy criticado especialmente por el aparente exceso de falsos positivos que reporta en pruebas con simulaciones computacionales (*e.g.*, Knowles & Maddison 2002, Petit 2007, Knowles 2008), pero existen réplicas a tales críticas (Templeton 2004, 2008).

Para poner a prueba hipótesis sobre los procesos responsables de la distribución espacial de los haplotipos existen procedimientos basados en la teoría de coalescencia. La teoría de coalescencia considera que toda la diversidad genética actual de un linaje coalesce en un solo haplotipo en el pasado (Avice 2000). Considerando que las hembras de una población producen hijas de acuerdo con una distribución de frecuencia particular, con media y varianza definida, es posible calcular la probabilidad recursiva de extinción de una línea materna después de n generaciones (Avice 2000) y del mismo modo se puede calcular la probabilidad de que los haplotipos presentes en una población coalescan n generaciones en el pasado a uno solo.

El tiempo de coalescencia de los haplotipos de una población se relaciona directamente con el tamaño histórico de la población. Por esta razón los eventos demográficos impactan el proceso de ramificación de los linajes y la distribución actual de los haplotipos (Avice 2000). La utilización de modelos basados en coalescencia permite poner a prueba hipótesis particulares sobre la historia de los linajes al comparar estadísticamente el patrón de los datos observados con el patrón propuesto por el modelo (para una discusión al respecto véase: Knowles & Maddison 2002). Actualmente existen procedimientos automatizados que permiten estimar diferentes parámetros poblacionales (*e.g.*, LAMARC, Kuhner 2006) que unidos a cálculos tradicionales de genética de poblaciones (F_{ST} , AMOVA, *mismatch distributions*, entre otros) hacen posible completar el entendimiento de la distribución de la diversidad genética de las especies en el espacio y en el tiempo (Hey & Machado 2003, Kuhner 2009).

El Bosque Montano

El Bosque Montano Húmedo (Bosque Montano de aquí en adelante) se define como el bosque tropical de elevaciones medias y altas que recibe una gran cantidad de humedad de la lluvia, de la niebla y de las nubes (Hernández-Baños *et al.* 1995). Estos bosques se encuentran desde el este y sureste de México hacia el sur hasta el Noroeste de Argentina, en parches de diferente tamaño a lo largo de las pendientes montañosas desde los 600 a los 3000 msnm (Brown & Kapelle 2001). En el norte de Mesoamérica, este bosque se encuentra por parches de distribución reducida mientras que en Costa Rica, Panamá y Sur América constituye un cinturón casi continuo (Terborgh 1971).

Este bosque ha sido testigo de la evolución de una impresionante diversidad biológica (Hernández-Baños *et al.* 1995, Gentry 1995, Navarro *et al.* 2001, Sánchez-González *et al.* 2007). Tal diversidad se ha explicado mediante hipótesis que consideran el efecto del cambio climático pasado sobre este hábitat que propició periodos de aislamiento y periodos de relativa continuidad entre los fragmentos del Bosque Montano (Wijninga 1995). A pesar de su amplia distribución, el Bosque Montano, requiere de condiciones ecológicas específicas para su presencia, como pendientes pronunciadas y una gran cantidad de humedad (Foster 2001). Lo anterior ocasiona una distribución geográfica altamente fragmentada, análoga a un archipiélago (Luna *et al.* 1988).

Por lo tanto, los estudios de la variación geográfica y filogenética de los elementos bióticos asociados al Bosque Montano son claves para el entendimiento de sus procesos de diferenciación y especiación (García-Moreno *et al.* 2004). La divergencia de las poblaciones de aves en estos bosques ha mostrado ser considerable en términos de caracteres tanto morfológicos (Navarro *et al.* 2001, Sánchez-González *et al.* 2007) como genéticos (Peterson *et al.* 1992, García-Moreno *et al.* 2004, Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008, Puebla-Olivares *et al.* 2008), lo cual hace que la avifauna del Bosque Montano sea un caso de gran interés para estudios filogeográficos que exploran la historia de la diversidad intraespecífica.

Filogeografía de aves del Bosque Montano en Mesoamérica

Estudios desarrollados con dos especies de aves de Bosque Montano en Mesoamérica (*Aulacorhynchus prasinus* y *Chlorospingus ophthalmicus*) muestran una separación morfológica discreta y marcada entre diferentes poblaciones (Navarro *et al.* 2001, Sánchez-González *et al.* 2007). Del mismo modo, algunos trabajos usando una aproximación filogenética basada en datos

moleculares (García-Moreno *et al.* 2004, Bonaccorso *et al.* 2008, Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008, Puebla-Olivares *et al.* 2008) indican que la variación genética de las poblaciones de aves (*Lampornis amethystinus*, *C. ophthalmicus*, *Buarremon brunneinucha* y *A. prasinus*) de distintas zonas del bosque montano de Mesoamérica se estructura a diferentes niveles geográficos.

Estos estudios coinciden en señalar diferentes zonas montañosas en México (*e.g.*, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur, Sierra de los Tuxtlas), algunas en el Sur de México (*e.g.*, Sur de Chiapas) y otras del norte de Centro América (*e.g.*, El Salvador) como zonas con poblaciones genéticamente separadas. Dos de dichos estudios (Navarro-Sigüenza *et al.* 2008, Puebla-Olivares *et al.* 2008), muestran que también hay una gran diferencia entre el Sur de Centroamérica, la zona media de Centroamérica y el norte de Centroamérica y México, aunque los límites geográficos exactos varían. Vale la pena anotar que separaciones semejantes también se han encontrado mediante análisis biogeográficos tradicionales con especies de aves (Hernández-Baños *et al.* 1995, Sánchez-González *et al.* 2008). Estas diferencias y separaciones entre las poblaciones y especies del bosque montano de Mesoamérica han sido relacionadas con la presencia de barreras geográficas.

En Mesoamérica las principales barreras para las especies montanas son el Istmo de Tehuantepec y la depresión de Nicaragua, así como las tierras altas y secas del interior de México (Sánchez-González *et al.* 2007). Pero también, algunos accidentes geográficos menores (*e.g.*, la cuenca del Río Verde entre Guerrero y Oaxaca) han tenido una influencia local en la separación de algunas poblaciones (Hernández-Baños *et al.* 1995, Puebla-Olivares *et al.* 2008). A pesar de las similitudes en el patrón de distribución y de aislamiento de los taxa estudiados, los datos indican que las poblaciones de algunas especies (*C. ophthalmicus* y posiblemente *B. brunneinucha*) han tenido una larga historia de aislamiento o una rápida evolución tras la separación de su ancestro común (García-Moreno *et al.* 2004, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008), mientras que otras especies (*L. amethystinus*, *A. prasinus*) posiblemente tuvieron una diversificación relativamente reciente (Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Puebla-Olivares *et al.* 2008). Esto resalta la naturaleza singular de la historia de cada linaje.

Patrones similares a los encontrados con aves se han identificado en otros vertebrados tales como mamíferos (Eizirik *et al.* 1998, Cortés-Ortiz *et al.* 2003, León-Paniagua 2007) y reptiles (Castoe

et al. 2009). A pesar de que las escalas geográficas y el nivel taxonómico de estos trabajos no son iguales, sus resultados parecen indicar que diversos grupos han compartido parte de su historia evolutiva en la zona.

Lepidocolaptes affinis

Lepidocolaptes affinis es una especie de la familia Furnariidae (Banks *et al.* 2006), subfamilia Dendrocolaptinae (Irestedt *et al.* 2002, Banks *et al.* 2008). En el género *Lepidocolaptes* se agrupan 8 especies, 5 de las cuales se encuentran en Suramérica, 2 en México y Centroamérica y una en Centro y Suramérica (del Hoyo *et al.* 2003). La subfamilia Dendrocolaptinae es un grupo relativamente homogéneo de aves trepadoras y forrajeadoras de corteza, conocidas como trepatroncos, que habitan desde el norte de México hasta Argentina (Hilty 2003, del Hoyo *et al.* 2003). *L. affinis* es una especie insectívora relativamente pequeña (19–22cm), común y moderadamente sensible a la intervención humana (del Hoyo *et al.* 2003) que habita en el Bosque Montano de México y Centroamérica (Fig. 1). Esta especie se encuentra dividida en 3 subespecies: I) *L. a. lignicida* del noreste de México; II) *L. a. affinis* del este y sur de México hasta el norte de Nicaragua y III) *L. a. neglectus* de las montañas de Costa Rica y del oeste de Panamá (del Hoyo *et al.* 2003, Dickinson 2003) (Fig. 1).

Para el caso de *L. affinis*, resulta muy interesante la baja variación morfológica que exhibe a lo largo de toda su distribución geográfica (3 subespecies) en comparación con la variación que muestran otras especies comunes de Bosque Montano como: *A. prasinus*, *Xiphocolaptes promeropirhynchus*, *Henicorhina leucophrys*, *C. ophthalmicus* y *B. brunneinucha*; que tienen 7, 5, 7, 10 y 8 subespecies, respectivamente, a lo largo de Mesoamérica (Dickinson 2003). La baja variabilidad de *L. affinis* contrasta, también, con el gran número de subespecies reconocidas para *L. lacrymiger* en Sur América (9) (Dickinson 2003) una especie con una historia natural semejante (del Hoyo *et al.* 2003) que en el pasado fue considerada conespecífica con *L. affinis* (*e.g.*, Hilty & Brown 1986).

Dentro de las aproximaciones filogenéticas con datos moleculares para aves del Neotrópico existen al menos seis estudios que incluyen especies de la subfamilia Dendrocolaptinae. De estos trabajos, tres abordan algunas preguntas sobre la diversificación de dos géneros en Sur América (*Xiphorhynchus* y *Lepidocolaptes*) en relación con los hábitats en que se encuentran sus especies

(García-Moreno & Cardoso da Silva 1997, Aleixo 2002, 2004). Los otros tres se centran en el análisis genético y filogeográfico de *Glyphorhynchus spirurus* (Marks *et al.* 2002) y *X. fuscus* (Cabanne *et al.* 2007, 2008). Para *G. spirurus*, una especie ampliamente distribuida en tierras bajas del Neotrópico, se analizó si la distribución de sus haplotipos coincide con las áreas de endemismo señaladas para la zona. Para *X. fuscus*, una especie del Bosque Atlántico Suramericano se pusieron a prueba diferentes hipótesis sobre las causas de su divergencia genética.



Figura 1. A. Mapa con la distribución geográfica de *Lepidocolaptes affinis* en México y Centroamérica. Se indica la distribución de cada una de las tres subespecies. B. Ilustración de *L. affinis* (Del Hoyo *et al.* 2003).

De acuerdo con la distribución de los bosques montanos en que habita *L. affinis*, se espera que exista cierto grado de estructura genética y filogeográfica entre sus poblaciones que coincida con el patrón encontrado para otras especies. Sin embargo, dada su baja divergencia morfológica en comparación con la de otras aves de bosques montanos, su variación genética puede ser baja. Dado que los bosques montanos han sido afectados por cambios climáticos en el pasado es posible que *L. affinis* presente indicios de fluctuaciones demográficas históricas.

MÉTODOS

Obtención de datos

Se utilizaron 79 muestras de tejido de individuos de *L. affinis* procedentes de cinco colecciones zoológicas: Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM (47), Natural History Museum University of Kansas (15), Marjorie Barrick Museum University of Nevada (5), Museum of Natural History Louisiana State University (10) y Field Museum of Natural History (2). Adicionalmente, como grupo externo se utilizaron muestras de *L. lacrymiger* (2), *L. souleyetii* (2), *L. leucogaster* (1), *L. angustirostris* (1) y *Xiphorhynchus flavigaster* (1) provenientes algunas de estas instituciones, más una secuencia de *Sittasomus griseicapillus* publicada en el *GenBank* que fue usado para enraizar los árboles. Las muestras representan 34 localidades a lo largo de la distribución de *L. affinis* (Fig. 2, Tabla 1, Anexo 1).

La extracción de ADN genómico total se hizo utilizando el kit de extracción *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen), siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes. Se amplificaron, mediante PCR en un termociclador *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)* dos regiones mitocondriales, ND2 y CytB, utilizando los iniciadores H6313-L5212 y H16065-L14841 respectivamente. Ambas secuencias completas suman aproximadamente 2170pb. La amplificación del ND2 se realizó en 10 ciclos de: 94°C por 15 seg, 55°C por 30 seg y 72°C por 30 seg; seguidos por 35 ciclos de: 94°C por 15 seg, 50°C por 15 seg y 72°C por 30 seg finalizando con 72°C por 3 min. La amplificación del CytB se realizó en 27 ciclos de: 95°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 2 min; finalizando con 72°C por 7min. Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa para confirmar su presencia, determinar que el tamaño del amplificado correspondiera con el del fragmento esperado y determinar la presencia de una sola banda. En todas las amplificaciones se usaron controles negativos con agua para descartar la ocurrencia de contaminación por ADN.

Los productos amplificados por PCR fueron sometidos a un proceso de purificación en placas del Kit de Purificación (Millipore), diluidos a un volumen final de 20 µL y visualizados en geles de agarosa para determinar la concentración de ADN de cada muestra. Cuando fue necesario, las muestras se diluyeron a una concentración de 20 a 40 ng/µL para optimizar los resultados de la secuenciación. Las reacciones de secuencia se realizaron utilizando el protocolo BigDye *Terminator* (Applied Biosystems). Los productos de esta reacción fueron purificados mediante columnas de

Sephadex. Las secuencias fueron obtenidas en un ABI *prism 377 DNA automatic sequencer* (Perkin-Elmer), éstas fueron editadas y alineadas manualmente utilizando el programa Bioedit (Hall 1999).

Análisis de datos

Reconstrucción de relaciones filogenéticas. Para todos los análisis presentados a continuación se usaron en conjunto los datos obtenidos para las dos regiones evaluadas del ADNmt (ND2 y CytB). Se propuso una hipótesis de relación filogenética entre los haplotipos únicos de *L. affinis* mediante búsquedas heurísticas utilizando el criterio de parsimonia (MP) y de máxima verosimilitud (ML) así como una reconstrucción filogenética basada en inferencia Bayesiana (IB). Para MP se realizaron varias búsquedas heurísticas utilizando el reordenamiento de ramas TBR utilizando el programa Winclada 1.00.08 (Nixon 2002): I) 5000 réplicas, 1000 puntos de partida; 10 000 árboles en memoria, II) 8000 repeticiones, 2000 puntos de partida 25 000 árboles en memoria y III) 20 000 repeticiones, 5000 puntos de partida, 100 000 árboles en memoria. Esto se hizo con el fin de tener más certeza sobre el árbol con MP encontrado.

Se utilizó Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998) para calcular empíricamente los parámetros del modelo evolutivo y determinar el modelo apropiado de evolución de las secuencias, a ser usado con ML, bajo el Criterio de Información de Akaike. La búsqueda de la hipótesis de relaciones según el criterio de ML se realizó en PAUP* 4.0 (Swofford 2002) (250 repeticiones con TBR). La medida de apoyo de los clados se asignó mediante un *bootstrap* con 250 repeticiones.

El programa Mr. Bayes 3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) se usó para realizar una aproximación bayesiana a la filogenia (IB). Se usaron 4 cadenas MCMC (una fría y tres calientes) que corrieron simultáneamente por 1 000 000 generaciones, muestreando árboles cada 200 generaciones, el 25% de los árboles iniciales se consideró como *burn-in*, siendo eliminados del análisis. Esta estrategia de búsqueda fue repetida dos veces. Mediante IB se calculó la probabilidad *a posteriori* de los clados que fue usada como medida de soporte. Adicionalmente, se construyó una red de haplotipos mediante el algoritmo *median joining* implementado en Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.* 1999, www.fluxus-engineering.com) utilizando sólo individuos de *L. affinis*.

Diversidad y estructura genética. De acuerdo con criterios de cercanía geográfica y continuidad ecológica (Challenger 1998) se definieron, *a priori*, 11 poblaciones de *L. affinis* (Fig. 2, Tabla 1). Para definir las poblaciones se tuvo en cuenta que en su mayoría incluyeran localidades separadas entre sí por menos de 70 km y que correspondieran con una zona orográfica definida. Las poblaciones incluyeron 3 o más individuos. Las localidades con un solo individuo como: los Tuxtlas, SMS-Oaxaca y Nicaragua no se consideraron como poblaciones en los análisis. Además, se definieron tres grupos regionales de poblaciones: I) México al norte del Istmo, II) norte de Centro América (incluye México al sur del Istmo) y III) Costa Rica; separados por barreras geográficas putativas (Istmo de Tehuantepec y Depresión de Nicaragua) reconocidas en estudios previos (e.g., Castoe *et al.* 2009, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008). Con base en la información derivada de los análisis, se definió un grupo poblacional adicional *a posteriori* (ver resultados) que juntó a algunas de las poblaciones definidas *a priori* y al cual se le hicieron sólo algunos de los análisis aplicados a las demás poblaciones.

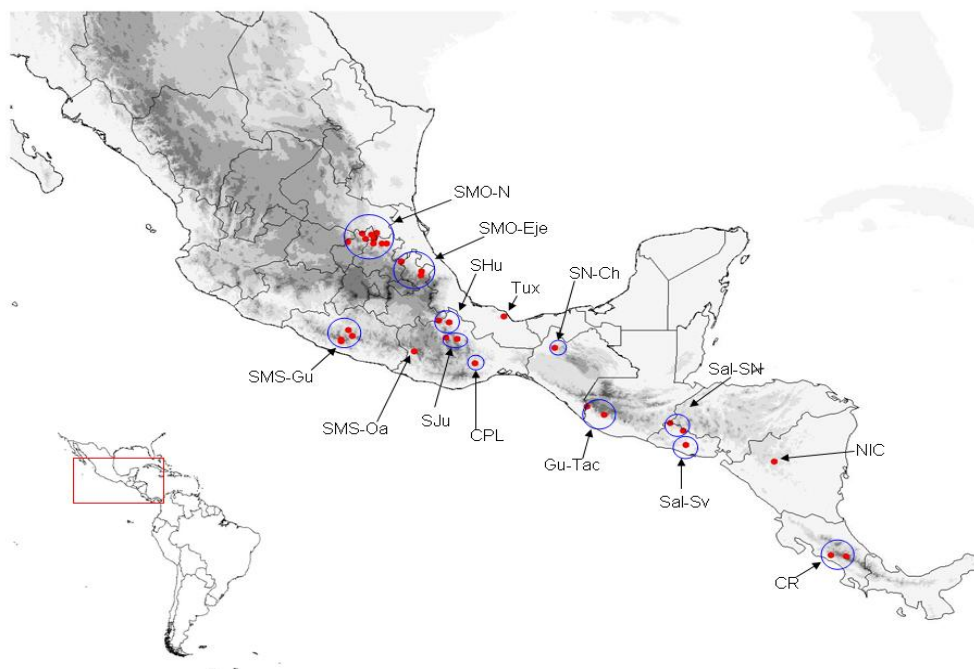


Figura 2. Mapa de la zona de estudio indicando las localidades de colecta de *L. affinis* (puntos rojos) así como las poblaciones definidas para los análisis (círculos azules). Ver tabla 1 para interpretación de las abreviaturas.

Tabla 1. Localidades de colecta de *L. affinis* y poblaciones definidas para el estudio

Población / Clave (n)	País	Estado	Localidad (N)	Clave	Coordenadas
SMO-N Norte de la Sierra Madre Oriental (14)	México	San L. Potosí	Xilitla (3)	SPXil	+21.40 -99.04
	México	Querétaro	Laguna de la Cruz (1)	QRLag	+21.36 -99.51
	México	Querétaro	Tres Lagunas (1)	QRTre	+21.33 -99.21
	México	Querétaro	El Pemoche (1)	QRPem	+21.23 -99.11
	México	Querétaro	Santa Inés (1)	QRSan	+21.18 -99.13
	México	Querétaro	Jalpan (1)	QRJal	+21.17 -99.4
	México	Hidalgo	Chilijapa (2)	HIChi	+21.01 -98.87
	México	Hidalgo	Tlanchinol (2)	HITla	+20.99 -98.7
	México	Hidalgo	Cerro Jarros (1)	HICer	+20.99 -99.14
	México	Hidalgo	El Coyol (1)	HICoy	+21.06 -99.99
SMO-Eje Sierra Madre Oriental a la Altura del Eje Neovolcánico (7)	México	Hidalgo	Tenango de Doria, El Gosco (3)	HITenA	+20.34 -99.23
	México	Hidalgo	Tenango de Doria, El Potrero (2)	HITenB	+20.33 -98.22
	México	Puebla	Xocoyolo (1)	PUXoc	+19.98 -97.55
	México	Puebla	Zacapoaxtlo (1)	PUZac	+19.83 -97.57
SHu Sierra de Huautla (3)	México	Oaxaca	Sierra de Huautla (2)	OAShu	+18.17 -97.00
	México	Oaxaca	San Martín Caballero (1)	OAMca	+18.11 -96.64
SJu Sierra de Juárez (8)	México	Oaxaca	Yaguila (6)	OAYag	+17.49 -96.37
	México	Oaxaca	San Juan Bautista (2)	OABau	+17.54 -96.74
CPL Cerro Piedra Larga (6)	México	Oaxaca	Cerro Piedra Larga (6)	OAPie	+16.61 -95.80
SMS-Oa Sierra Madre del Sur-Oaxaca (1)	México	Oaxaca	Reyes Llano Grande (1)	OAREy	+17.03 -97.8
Tux Los Tuxtlas (1)	México	Veracruz	Sierra de Santa Marta (1)	VETux	+18.32 -94.83
SMS-Gu Sierra Madre del Sur - Guerrero (4)	México	Guerrero	Atoyac (1)	GUAta	+17.48 -100.20
	México	Guerrero	Carrizal (1)	GUCar	+17.82 -99.97
	México	Guerrero	Nueva Delhi (1)	GUNud	+17.42 -100.20
	México	Guerrero	Yextla (1)	GUYex	+17.602 -99.85
SN-Ch Sierra Norte de Chiapas (6)	México	Chiapas	Coapilla (6)	CHCoa	+17.17 -93.15
Gu-Tac Vol. Tacaná- Guatemala (3)	México	Chiapas	Volcán Tacaná (1)	CHVta	+15.01 -92.10
	Guatemala	Quezaltenango	Santa María de Jesús(2)	GUATE	+14.72 -91.53
Sal-SN Sierra Norte de El Salvador (8)	El Salvador	Chalatenango	La Laguna (4)	SALCh	+14.13 -88.92
	El Salvador	Santa Ana	Metapan (4)	SALSa	+14.41 -89.36
Sal-Sv El Salvador, Volcán SV (7)	El Salvador	San Vicente	N. Tepetitán (7)	SALSv	+13.60 -88.84
NIC Nicaragua (1)	Nicaragua	Matagalpa	Matagalpa (1)	NIC	+13.00 -85.92
CR Costa Rica (10)	Costa Rica	San José	(3)	CRSj	+9.56 -84.05
	Costa Rica	Cajamarca	(7)	CRCa	+9.52 -83.55

Para explorar la variación genética entre los individuos de *L. affinis* y de éstos con individuos de las especies usadas como grupo externo, se realizó una matriz de distancias (*P uncorrected*) en PAUP* 4.0 (Swofford 2002) y se contabilizó el número de sitios variables. Además se identificó el número de haplotipos totales y únicos por población. La diversidad haplotípica fue calculada en DnaSP v5 (Librado & Rozas 2009). También, se calculó el índice de diversidad nucleotídica π , que es el número promedio de diferencias por sitio entre secuencias homólogas (Nei 1987), para cada población con más de un individuo y más de un haplotipo usando como distancia molecular las diferencias pareadas (*pairwise differences*) y un parámetro de forma de la distribución gamma de 0.262 en Arlequin v 3.1 (Excoffier 2006).

La estructura genética de *L. affinis* se evaluó de tres maneras para poblaciones con tres o más individuos, usando Arlequin v 3.1 (Excoffier 2006). Primero, se generó una matriz de F_{ST} entre pares de poblaciones usando las distancias genéticas entre haplotipos (*pairwise differences*) y un parámetro de forma de la distribución gamma de 0.262. La significancia de éstos valores se determinó mediante 25 000 permutaciones aleatorias de los haplotipos entre las poblaciones. El F_{ST} es una medida común de la estructura poblacional porque mide la proporción de variación genética entre individuos de todas las poblaciones que es debida a diferencias genéticas entre las poblaciones (Templeton 2006). En la interpretación de los F_{ST} se tuvo en cuenta que para el ADNmt se espera que éstos valores sean cuatro veces mayores que para regiones nucleares ya que el ADNmt tiene un tamaño poblacional menor (Page & Holmes 1998). Para representar gráficamente las diferencias genéticas entre poblaciones se usaron los valores de F_{ST} para construir un árbol con el método UPGMA en Mega v4.0 (Tamura *et al.* 2007).

Segundo, se puso a prueba la hipótesis de que la distribución de los haplotipos entre pares de poblaciones es aleatoria. Para esto, se usaron las frecuencias haplotípicas y una prueba exacta de diferenciación poblacional con una cadena de Markov de 100 000 pasos (20 000 de *burn-in*). Este método (Raymond & Rousset 1995) se basa en el *test* exacto de Fisher que es un procedimiento no paramétrico con tablas de contingencia, pero en vez de computar la probabilidad exacta de cada tabla estima una probabilidad usando cadenas de Markov (Raymond & Rousset 1995).

Tercero, se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA), incluyendo las poblaciones con más de tres individuos y los 3 grupos regionales de poblaciones, usando la distancia molecular entre haplotipos. Se utilizó el modelo de Tamura–Nei con una corrección de la distribución gamma de

0.262 obtenido empíricamente a partir de los datos, usando Modeltest 3.7 (Posada & Crandall 1998). Los niveles de significancia de este análisis fueron obtenidos mediante 25 000 iteraciones. El AMOVA permite analizar la partición de la variación genética dentro y entre poblaciones mediante estimados de los componentes de varianza y análogos de los estadísticos F, reflejando la correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de división jerárquica (Excoffier *et al.* 1992).

Por otro lado, se puso a prueba la hipótesis de que los haplotipos de *L. affinis* se distribuyen aleatoriamente en el espacio geográfico, mediante un análisis de clados anidados (NCA) (Templeton *et al.* 1995). La red de haplotipos, construida en Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.* 1999, www.fluxus-engineering.com), fue convertida manualmente en una serie jerárquica de clados anidados usando las reglas de Templeton *et al.* (1987) así como las indicaciones dadas en Posada & Templeton (2006). Los cálculos del NCA y las réplicas al azar fueron realizadas usando el programa GEODIS 2.5 (Posada *et al.* 2000). La significancia estadística fue determinada usando 100 000 repeticiones. La clave de inferencia (v.11 Nov.2005, Posada & Templeton 2006) fue utilizada para dilucidar los procesos histórico-demográficos compatibles con la distribución de haplotipos de *L. affinis*.

Demografía histórica. Se realizaron distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias (distribuciones *mismatch*) (Rogers & Harpending 1992) de: I) todas las poblaciones con seis o más individuos, II) la población definida a posteriori de las Montañas de Oxaca-SMO, III) los tres grupos regionales de poblaciones y IV) todos los individuos de *L. affinis*. Estas distribuciones *mismatch* fueron usadas como indicadores de cambios demográficos recientes. También se determinó la distribución de tales diferencias bajo un modelo de expansión demográfica y se calculó el índice de *raggedness* (Harpending 1994), que toma valores altos cuando las secuencias son diversas y pocos individuos comparten los mismos haplotipos lo cual se espera para poblaciones constantes con *mismatch* multimodales (Haring *et al.* 2007). En general, da valores menores a 0.04 para poblaciones en expansión y valores mayores para poblaciones estables (Harpending 1994). Los cálculos fueron realizados en Arlequin v 3.1 (Excoffier 2006) utilizando 500 réplicas de *bootstrap*. Adicionalmente, se calculó el valor estadístico D de Tajima (Tajima 1989). Asumiendo neutralidad, un exceso de mutaciones recientes con respecto al número de sitios segregantes esperados bajo equilibrio lleva a valores significativamente negativos de la D de Tajima y a rechazar la estabilidad demográfica (Alexander & Burns 2006).

Los parámetros poblacionales θ (tasa de mutación poblacional) y G (relacionado con el crecimiento poblacional) fueron estimados para todas las poblaciones con 7 o más individuos, los tres grupos regionales de poblaciones y para todo *L. affinis*, usando el método de Máxima Verosimilitud basado en coalescencia implementado en LAMARC v.2.1.3 (Kuhner 2006). Se usó el modelo de evolución F84 con tasas de transición/transversión y frecuencias de nucleótidos calculadas empíricamente. La estrategia de muestreo fue de una réplica con 10 cadenas iniciales cortas (500 genealogías muestreadas cada 20 iteraciones con un *burn-in* de 1000) seguidas por dos cadenas largas (10 000 genealogías muestreadas cada 20 iteraciones con un *burn-in* de 1000).

El parámetro θ describe la cantidad de variación esperada para cada nucleótido de una secuencia bajo un modelo de evolución enteramente neutral ($\theta = 2N_e\mu$ para haploides) (Page & Holmes 1998). El parámetro θ refleja dos aspectos importantes de la historia de las poblaciones: I) el tamaño poblacional histórico (N_e), en la forma de su media armónica, que es afectada drásticamente por los valores más bajos (disminuciones poblacionales) por lo que un valor bajo de θ podría indicar la ocurrencia de un cuello de botella; II) el tiempo de coalescencia en el pasado de los linajes actuales, ya que bajo la teoría de coalescencia, éste es proporcional al tamaño histórico de las poblaciones (Avice 2000, Hein *et al.* 2005). Estos dos aspectos no son independientes, pero al adicionar información derivada de otros análisis es posible diferenciar ciertos procesos.

El valor calculado para el parámetro θ fué utilizado para datar algunos eventos en la historia de *L. affinis* en Mesoamérica, mediante la estimación del tiempo de coalescencia de sus haplotipos. Para ello se utilizó un valor de $\mu = 8.72 \times 10^{-8}$ cambios por nucleótido por generación, utilizado por Milot *et al.* (2000) para el análisis del primer dominio de la región control del ADNmt en *Dendroica petechia* y que ha sido usado también en otra especie de Dendrocolaptinae (Cabanne *et al.* 2007). Este valor fue reemplazado en la formula del parámetro θ bajo el supuesto teórico de que el tiempo de coalescencia de todas las copias de un gen en una población es de N_e generaciones para secuencias de ADNmt (Freeland 2005) y se asumió un tiempo generacional para *L. affinis* de 1.5 años que está en el intervalo de entre 1 y 2.5 años utilizado en trabajos con aves paseriformes que usan una aproximación similar (García-Moreno *et al.* 2004, Bowie *et al.* 2006, Milá *et al.* 2006, Cabanne *et al.* 2007) y es un valor promedio plausible dada la alta mortalidad que presentan las aves en su primer año (Milá *et al.* 2006). Esta datación no pretende ser un estimado exacto de tiempo, dado que no se conoce la tasa real de cambio evolutivo en el ADNmt de *L. affinis*. Sin

embargo permite tener una idea de tiempos mínimos de ocurrencia de eventos ya que la región control del ADNmt evoluciona más rápidamente que otras regiones del ADNmt (en cóvidos, la región control tiene 2.5 veces más diversidad que el CytB; Omland *et al.* 2006).

El parámetro G es el exponente de una fórmula de crecimiento exponencial que compara los valores de θ en el presente y en el pasado ($\theta_t = \theta_{now} e^{-Gt}$, donde θ_{now} es θ en el presente y θ_t es el valor de ese parámetro t unidades de tiempo atrás) (Kuhner 2008). Un valor negativo de G indica que la población ha decrecido y un valor positivo de G indica crecimiento, los valores de cero indican estabilidad (Kuhner 2008). Como el parámetro G puede estar sesgado hacia valores altos, especialmente cuando se usan pocos genes (Kuhner 2008) se tuvo en cuenta que en los intervalos de confianza del 95% no estuvieran presentes valores negativos que significarían estabilidad, a pesar de que G tuviera un valor elevado.

RESULTADOS

Se obtuvieron secuencias de entre 900 y 1020pb para el ND2 y de entre 969 y 990pb para el CytB. En total, se alinearon 1869pb, de ambas regiones, de 79 individuos de *Lepidocolaptes affinis*, mas 8 individuos de las especies usadas como grupo externo. Entre las secuencias de *L. affinis*, se encontraron 36 haplotipos, 67 sitios variables (3.6%) y 42 sitios informativos para Parsimonia. Entre las evidencias del origen mitocondrial de estas secuencias se cuentan: I) la baja tasa de Guanina (A: 0.305335, C: 0.319029, G: 0.112396, T: 0.263240); II) una tasa de transiciones mucho mayor que de transversiones (57 ts / 10 tv); III) las regiones de ADNmt fueron secuenciadas en ambas direcciones y IV) las secuencias obtenidas fueron congruentes y pudieron ser alineadas fácilmente con otras muestras de ADN mitocondrial de aves previamente publicadas.

La matriz de distancias genéticas (*p-uncorrected*) mostró que el promedio de diferenciación entre individuos de *L. affinis* es de 0.0175, mientras que entre las especies de *Lepidocolaptes* incluidas en este estudio es de 0.0508. La mayor distancia entre individuos de *L. affinis* (0.0177; entre un individuo de Costa Rica y uno de la Sierra Madre Oriental-Norte), es menor que la menor distancia entre individuos de *L. affinis* e individuos de otras especies de *Lepidocolaptes* (0.0487; entre un individuo de *L. leucogaster* e individuos del Cerro Piedra Larga y de la Sierra de Juárez en Oaxaca). La diversidad nucleotídica de *L. affinis* fué de 0.005, presentando valores entre 0 y 0.0027 en las diferentes poblaciones (Tabla 2).

La búsqueda heurística bajo el criterio de MP encontró un árbol de 684 pasos (Ci=74; Ri=75) (Anexo 2). De acuerdo con el Criterio de Infomación de Akaike, los datos se ajustan al modelo mutacional GTR+G con un parámetro de forma de distribución gamma de 0.26195. La búsqueda heurística bajo ML encontró solo un árbol (-ln L= 5780.12126) (Anexo 3). La topología de los árboles de MP y ML fue la misma que la del consenso de mayoría del análisis de IB (Figura 3). En todos los análisis, *L. affinis* resultó monofilético con respecto a las demás especies de *Lepidocolaptes* incluidas, siendo *L. leucogaster* su grupo hermano. Las relaciones entre haplotipos de *L. affinis* es compleja y no se encuentra una correspondencia completa entre éstos y su procedencia geográfica, aunque hay cierto grado de estructuración. El clado con los haplotipos de Costa Rica aparece claramente diferenciado de todos los demás haplotipos de *L. affinis*. Los haplotipos de las poblaciones del norte de Centro América y México forman clados con cierta coherencia geográfica pero sin relación definida entre sí.

Tabla 2. Valores estadísticos y parámetros de diversidad genética y crecimiento poblacional, calculados para las diferentes poblaciones de *L. affinis*.

Estimador de parámetro ó valor estadístico poblacional	Poblaciones definidas <i>a priori</i>									Agrupamientos de poblaciones			
	SMO-N	SMO-E	SJu	CPL	SMS-Gu	SN-Ch	Sal-N	SalVsa	CR	Montañas de Oaxaca-SMO	México norte del Istmo	Norte de Centro América	<i>L. affinis</i> Total
Tamaño poblacional n	14	7	8	6	4	6	8	7	10	34	44	25	79
Número de Haplotipos	10	5	3	3	2	5	3	5	3	16	21	12	36
Diversidad Haplotípica Hd	0.923	0.905	0.733	0.667	0.5	0.933	0.679	0.905	0.378	0.912	0.94	0.893	0.962
Diversidad Nucleotídica π	0.0026	0.0019	0.0015	0.0012	0.0003	0.0011	0.0012	0.0016	0.0008	0.0016	0.0022	0.0014	0.0049
Parámetro poblacional θ	0.0132	0.0032	0.0035	----	----	----	0.0011	0.0036	0.0009	0.0117	0.0132	0.0072	0.0123
D de Tajima (valor de P)	-0.079 (0.52)	0.569 (0.74)	0.025 (0.53)	1.387 (0.92)	-0.61 (0.37)	-1.367 (0.05)	0.588 (0.76)	0.345 (0.66)	-1.839 (0.02)	-1.289 (0.1)	-1.199 (0.19)	-1.14 (0.12)	-1.082 (0.13)
Parámetro de crecimiento G	1594.42 *	1004.63*	1795.82*	----	----	----	327.1	367	-361.82	2445	2049.28	2693.55*	257.15*

* Estimados de G con valores negativos en el intervalo de confianza del 95%

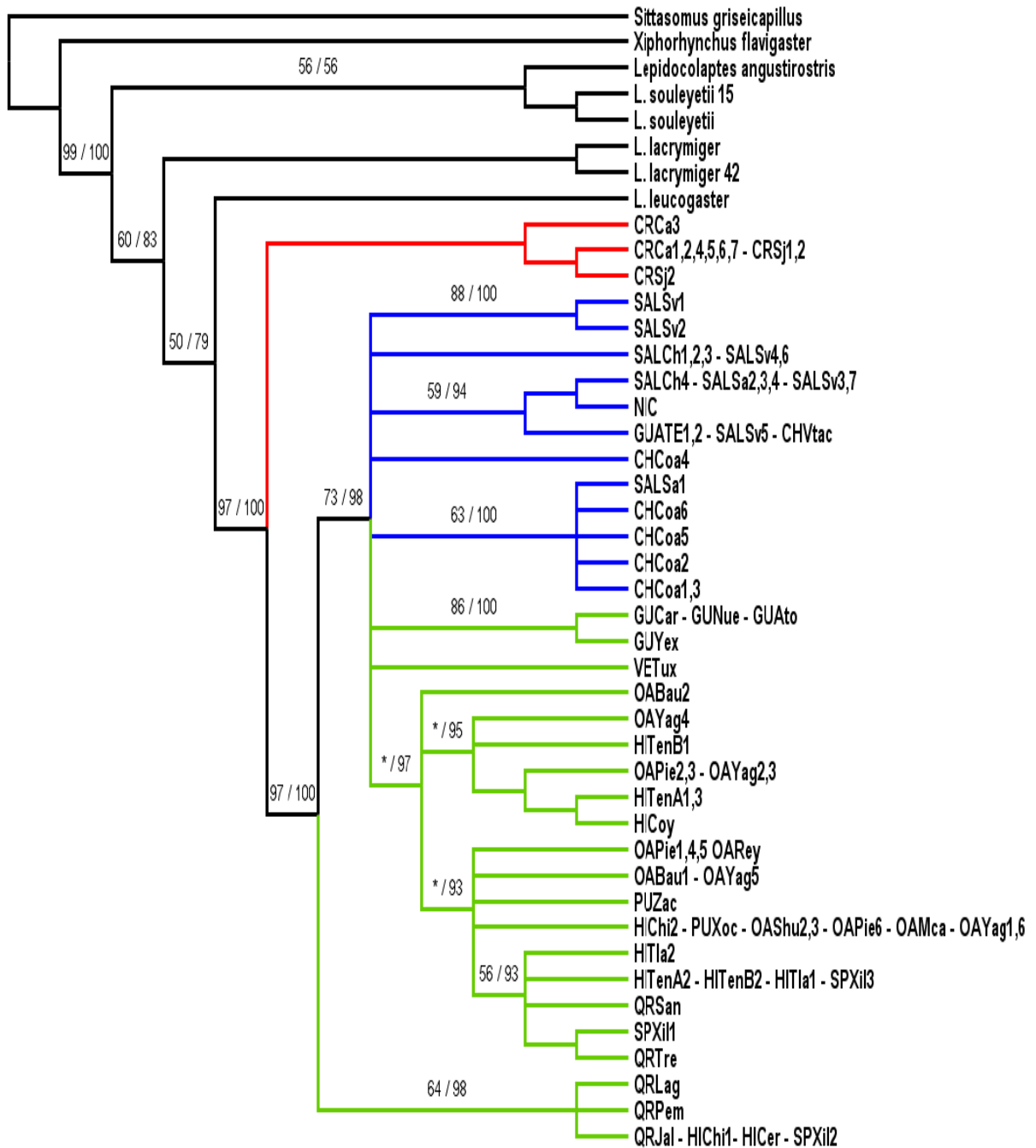


Figura 3. Hipótesis de relaciones filogenéticas entre haplotipos de *L. affinis* y de otras especies del género. Topología del árbol de consenso de mayoría de IB. La topología es igual a la de las reconstrucciones con ML y MP. Se indican los soportes de los clados (*Bootstrap* ML / IB *a posteriori*). El asterisco (*) señala clados sin soporte de *bootstrap* ML. En colores se presentan los linajes de las tres zonas geográficas: sur de Centro América (Rojo), norte de Centroamérica al sur del Istmo de Tehuantepec (Azul) y Centroamérica al norte del Istmo-México (Verde).

Varios haplotipos de poblaciones Mexicanas se agrupan en un clado “mayor”. Este clado tiene casi todos los haplotipos de las poblaciones de las montañas de Oaxaca y de la SMO (SMO-Eje, SHu, SJu, CPL, SMS-Oa y una parte de los haplotipos de la SMO-N). Este clado fue definido *a posteriori* como una población más, Montañas de Oaxaca-SMO (Mts Oax). Los demás haplotipos de la SMO-N, curiosamente, son un linaje hermano del clado con los haplotipos de *L. affinis* del norte de Centro América y México. Los clados con haplotipos de la SMS-Gu, el haplotipo de Tux y un haplotipo de la SN-Ch junto con los clados que agrupan haplotipos de poblaciones del norte de Centro América aparecen en una politomía en donde sus relaciones no están definidas. La mayoría de los clados recuperados para *L. affinis* presentan un soporte *a posteriori* alto ($\geq 94\%$) aunque los valores de *bootstrap* fueron bajos en algunos casos (Figura 3). La relación entre *L. affinis* y *L. leucogaster* como taxa hermanos tuvo un soporte *a posteriori* (79%) y valor de *bootstrap* bajos (50).

Las comparaciones pareadas de F_{ST} y del *test* exacto de diferenciación (Tabla 3, Fig. 4) no coinciden, en la mayoría de los casos, en señalar las mismas diferencias entre poblaciones. El *test* exacto de diferenciación detectó menos diferencias que el F_{ST} . Dado que el F_{ST} usa información de la similitud entre secuencias y no solo frecuencia de haplotipos (como hace el *test* exacto), se considera un mejor índice y por esto solo se discuten solo sus resultados. Las poblaciones que presentaron diferenciación con respecto a todas las demás fueron: CR ($F_{ST} > 0.87$), SMS-Gu ($F_{ST} > 0.43$) y SN-Ch ($F_{ST} > 0.32$). Ninguna población presentó F_{ST} no significativos o significativos pero bajos (< 0.2) con respecto a otra de un grupo regional de poblaciones diferente. Todos los F_{ST} calculados entre grupos regionales de poblaciones (datos no presentados) fueron significativos, siendo el más bajo el encontrado entre México al norte del istmo y norte de Centro América ($F_{ST} = 0.27$). El AMOVA (Tabla 4) indicó que la mayor variación genética (alrededor del 73%) se explica por diferencias entre los 3 grupos regionales de poblaciones.

De los 36 haplotipos, 28 fueron únicos y se diferenciaron de otros haplotipos por entre 1 y 4 mutaciones. La red de haplotipos, recuperó un patrón similar al encontrado con los métodos filogenéticos (Fig. 5). Los haplotipos más comunes fueron dos que se encontraron en 8 individuos cada uno. Uno de éstos se presentó en Costa Rica y el otro se encontró entre individuos de varias poblaciones de México (SHu, CPL, SJu, SMO-Eje y SMO-N). Para las poblaciones del norte de Centro América los dos haplotipos más comunes aparecieron 6 veces cada uno, ambos en individuos de las dos poblaciones de El Salvador. Como se indicó para los haplotipos comunes, en

algunos casos el mismo haplotipo apareció en dos poblaciones diferentes pero geográficamente cercanas (e.g., entre CPL y SJu y SMS-Oa y entre Gu-Tac y SAL-Sv). No se observó que el mismo haplotipo se presentara entre poblaciones de diferentes grupos regionales de poblaciones.

De acuerdo con el anidamiento de clados sobre la red de haplotipos (Fig. 5) los 36 haplotipos de *L. affinis* se agrupan en 13 clados de nivel n+1, 5 clados n+2, 3 n+3 y 2 n+4. El NCA indicó que los haplotipos no se distribuyen aleatoriamente con respecto a su ubicación geográfica a nivel de 5 clados internos y del cladograma total (Tabla 5). La clave de inferencia sugiere que esta estructuración geográfica es compatible con procesos de alopatría a nivel de los grupos regionales de poblaciones y posiblemente, entre algunas poblaciones al interior de esos grupos, se haya presentado fragmentación poblacional en el pasado seguida por expansión de la distribución o colonización a larga distancia.

Las distribuciones *mismatch* (Fig. 6), el índice de *raggedness*, la D de Tajima y el parámetro G (Tabla 2) no muestran indicios claros de crecimiento demográfico para la mayoría de poblaciones. Aunque SMO-N presentó un índice de *raggedness* bajo, la probabilidad de que ese valor sea mayor es muy alta (98%), además la distribución bimodal de esta población no es la típica de una población en crecimiento, y puede estar indicando un evento de mezcla de linajes (ver mas adelante). Únicamente cuando se agruparon varias poblaciones en: I) Montañas de Oaxaca-SMO y II) México al norte del Istmo, se presentaron distribuciones *mismatch* y valores de G que claramente indican crecimiento. Por otro lado, el valor negativo de G obtenido para Costa Rica, así como la forma atípica de su distribución *mismatch*, indican que la población ha sufrido un decrecimiento demográfico pronunciado (cuello de botella genético).

Asumiendo una tasa mutacional de $\mu = 8.72 \times 10^{-8}$ cambios por nucleótido por generación y un tiempo generacional de 1.5 años en *L. affinis*, el tiempo mínimo de coalescencia de los haplotipos está alrededor de 110 000 años (intervalo de confianza de acuerdo con los valores de $\theta = 70\ 000 - 180\ 000$ años). Las poblaciones de SMO-N y de las Montañas de Oaxaca fueron las únicas que presentaron valores de θ muy cercanos al estimado para *L. affinis* (Tabla 2), lo cual indica que los haplotipos de estas poblaciones coalescen en un tiempo cercano al de todos los haplotipos de *L. affinis* y por lo tanto se trata de poblaciones antiguas. Otra población, posiblemente antigua, es SMS-Gu que presentó el valor mas elevado de π , pero la muestra fue muy baja para estimar θ (Tabla 2).

Tabla 3. Matriz de F_{ST} pareados (bajo la diagonal) y de significancia (+) del Test exacto de diferenciación entre poblaciones (sobre la diagonal). Para interpretación de las abreviaturas ver Tabla 1

	SMO-N	SMO-Eje	SHu	SJu	CPL	SMS-Gu	SN-Ch	Gu-Tac	SALSN	SALSV	CR
SMO-N	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
SMO-Eje	0.155*	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
SHu	0.074	0.032	-	-	-	-	-	-	+	-	+
SJu	0.195*	-0.005	0.036	-	-	+	+	+	+	+	+
CPL	0.202*	0.031	0.108	-0.039	-	+	+	+	+	+	+
SMS-Gu	0.426*	0.571*	0.930*	0.613*	0.700*	-	-	-	+	-	+
SN-Ch	0.325*	0.412*	0.634*	0.432*	0.503*	0.644*	-	-	+	-	+
Gu-Tac	0.293*	0.451*	1	0.496*	0.616*	0.908*	0.508*	-	+	-	+
SAL-SN	0.326*	0.428*	0.574*	0.437*	0.505*	0.591*	0.320*	0.143	-	-	+
SAL-SV	0.284*	0.369*	0.468*	0.376*	0.436*	0.498*	0.277*	0.061	-0.020	-	+
CR	0.870*	0.915*	0.957*	0.925*	0.936*	0.956*	0.936*	0.955*	0.932*	0.921*	-

*Indica valores significativos de $F_{ST} \alpha = 0$.

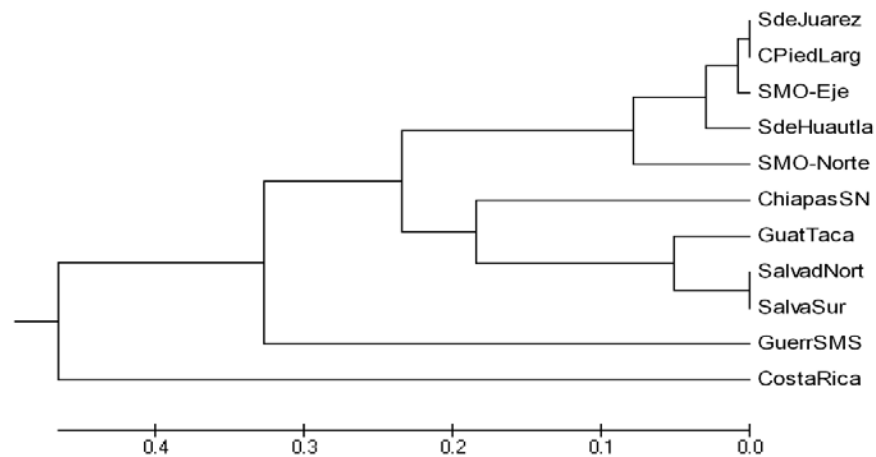


Figura 4. Árbol UPGMA que indica gráficamente las diferencias genéticas (F_{ST}) entre poblaciones de *L. affinis*

Tabla 4. Resultados del AMOVA.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Valor de P *
Entre grupos	227.451	4.891	72.857	< 0.000
Entre Poblaciones dentro de grupos	36.341	0.5	7.451	<0.000
Dentro de las poblaciones	87.246	1.322	19.691	<0.000
Total	351.039	6.713		

* α =0.05

Tabla 5. Resultados del NCA. Se indican los clados para los cuales se rechazó la hipótesis nula de asociación aleatoria entre las distribuciones de los haplotipos y su ubicación geográfica, así como las respuestas a las preguntas de la clave de inferencia (S=Si, N=No) y el proceso compatible con los resultados.

Clado	Respuestas a la clave	Proceso posible
1 - 3	1-N, 2-S, 3-S, 5-N, 6-N, 8-N	Muestreo inadecuado
1 - 7	1-S, 19-S, 20-S, 2-N, 11-S, 12-S, 13-S	Fragmentación pasada seguida por expansión de distribución
2 - 3	1-N, 2-S, 3-S, 5-N, 6-S, 13-S	Fragmentación pasada seguida por expansión de distribución
4 - 2	1-S, 19-N	Fragmentación alopátrica
Cladograma Total	1-N, 2-S, 3-S, 5-S, 15-S, 16-N	Fragmentación alopátrica

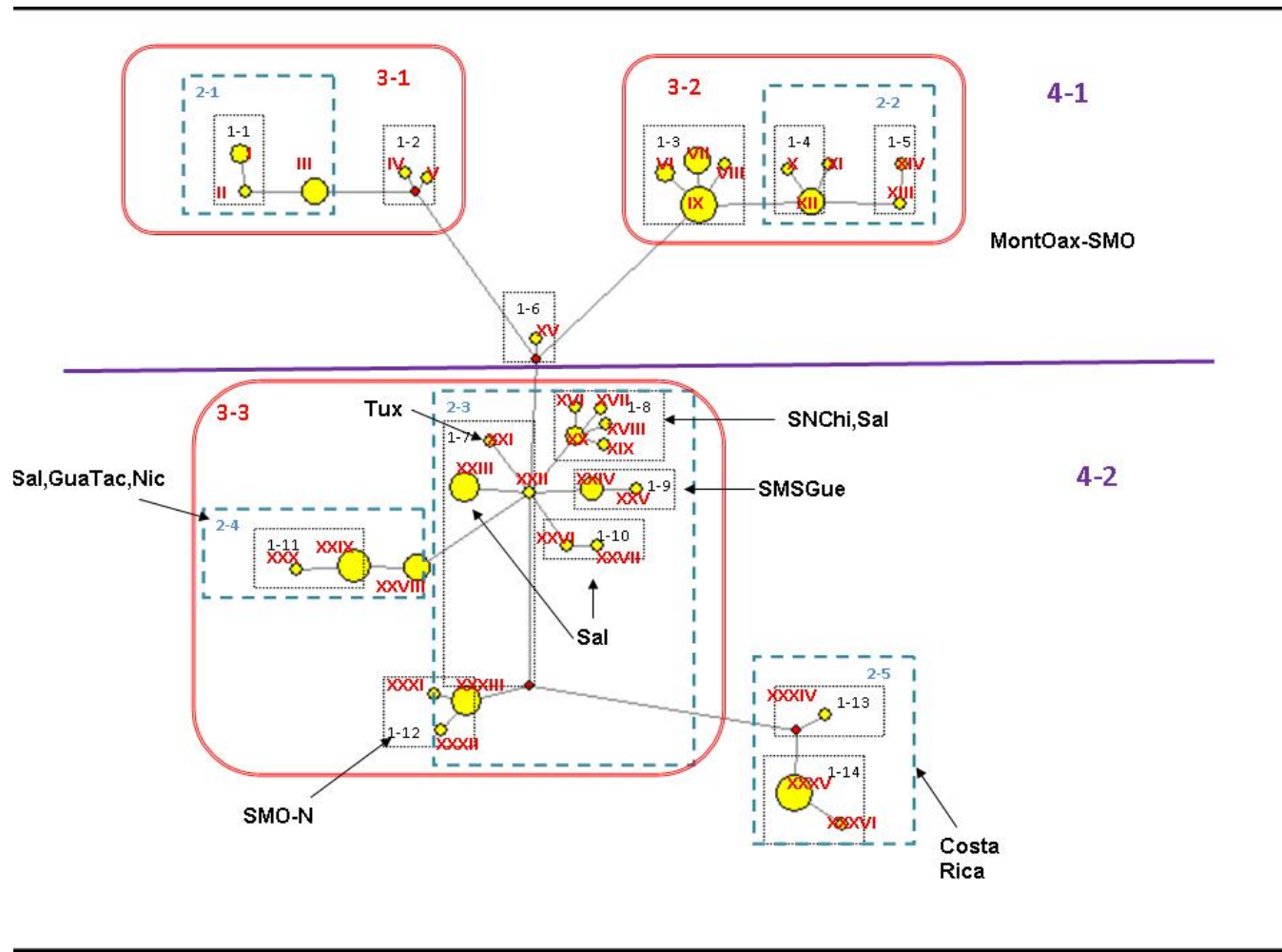


Figura 5. Red de haplotipos (círculos amarillos, números romanos) construida con el algoritmo *median joining* y clados anidados (Cuadros). Se indica el origen geográfico de algunos grupos de haplotipos. Para interpretación de las abreviaturas ver Tabla 1.

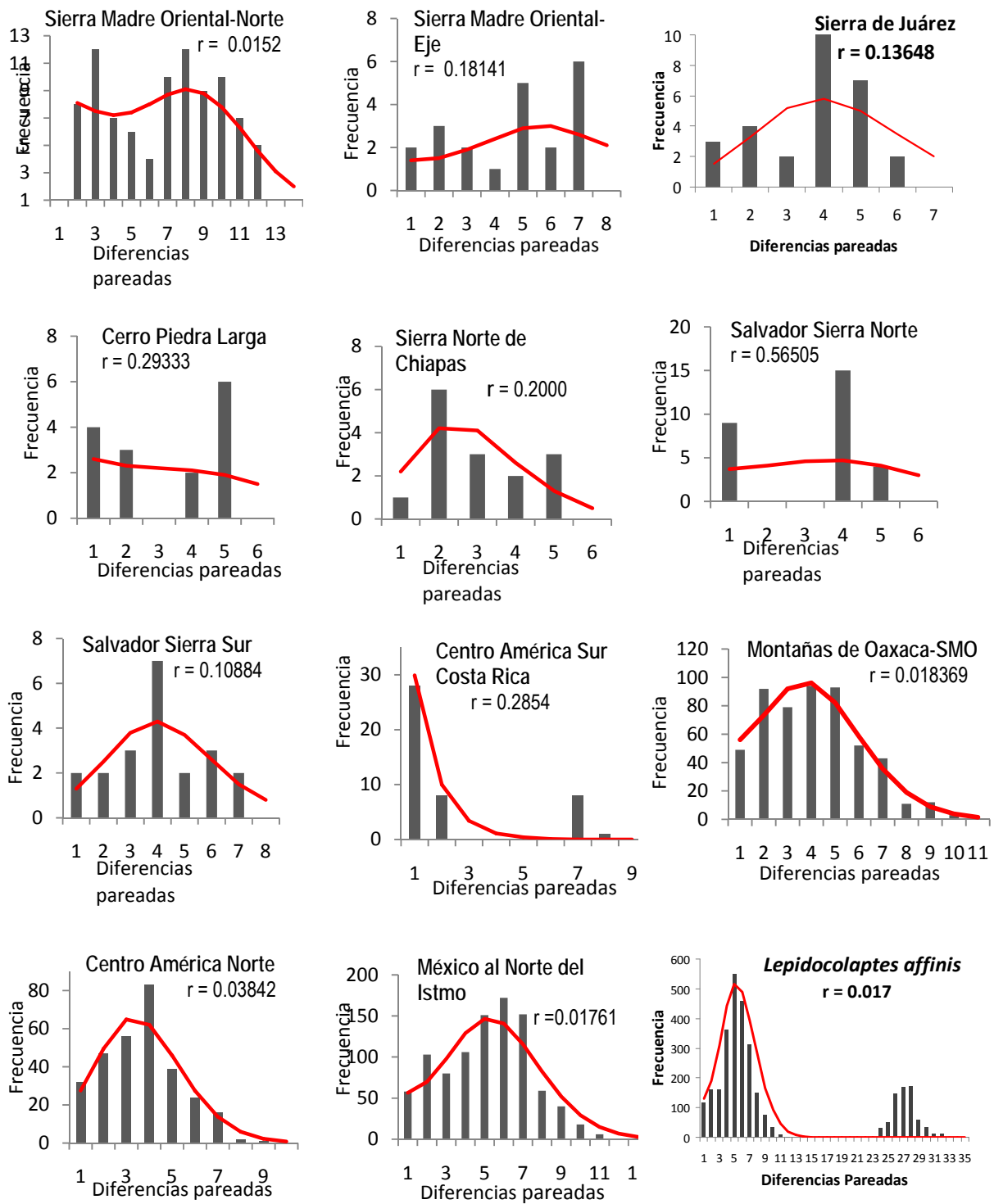


Figura 6. Distribuciones *mismatch* de las diferentes poblaciones y grupos de *L. affinis*. Las barras muestran las diferencias observadas, la línea roja indica lo esperado bajo un modelo de crecimiento demográfico, r es el

índice de *raggedness* de Harpending (1994). Valor P (r simulado > r simulado) > 0.05 en todos los casos.

DISCUSIÓN

Las secuencias de ADNmt de *L. affinis* revelan niveles moderados de variación genética (e.g., sitios variables, diversidad nucleotídica, distancias entre individuos) en comparación con otras especies de aves del Neotrópico (ver Tabla 6). Este resultado contrasta con los de estudios previos de aves de Bosques Montanos de Mesoamérica (Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008, García-Moreno *et al.* 2004) y de otros sitios del Trópico (Bowie *et al.* 2006, Cadena *et al.* 2007) en donde se ha encontrado una mayor diversidad. Sin embargo, las especies de los trabajos citados, a diferencia de *L. affinis*, exhiben amplia variación morfológica. Por otra parte, la variación genética de *L. affinis* es, en cierto grado, semejante a la encontrada en otras especies de Dendrocolaptinae de Suramérica (Marks *et al.* 2002, Aleixo 2004, Cabanne *et al.* 2008) y mayor a la de algunas especies de zona templada (Alexander & Burns 2006, Hourlay *et al.* 2008) y de especies de islas oceánicas (Bollmer *et al.* 2005). Sin embargo, una comparación más detallada no es posible dadas las diferencias metodológicas entre los diferentes trabajos (e.g., tipo y tamaño de las secuencias, tamaño de la muestra y área geográfica).

Por otra parte, la identificación de barreras potenciales al flujo génico entre poblaciones tiene implicaciones importantes para las investigaciones sobre la ecología, evolución y conservación de las especies (Storfer *et al.* 2007). En *L. affinis* el patrón filogeográfico no es igual al de otras especies de bosques montanos en Mesoamérica pero tiene algunos puntos en común. Para *L. affinis*, los análisis de estructura genética coinciden en señalar una ruptura marcada entre las poblaciones de Costa Rica y el resto de Centro América y México, que coincide con la depresión de Nicaragua. El impacto evolutivo de esta zona en aves de bosques montanos se ve reflejado por la evolución de subespecies y de especies hermanas en distintos taxones a ambos lados de la división (e.g., *Aulacorhynchus*; *Lampornis* y *Chlorospingus*; Navarro *et al.* 2001, García-Moreno *et al.* 2004, 2006, Sánchez-González *et al.* 2007, Puebla-Olivares *et al.* 2008 y en el quetzal *Pharomachrus mocinno*; Solórzano *et al.* 2004) y es un arreglo que se repite también en mamíferos como el ocelote *Leopardus pardalis* y el tigrillo *L. wiedii* (Eizirik *et al.* 1998) y los monos aulladores del género *Alouatta* (Cortés-Ortiz *et al.* 2003). La depresión de Nicaragua, también, se ha identificado como un punto que marca cambios importantes en la composición de la avifauna de los Bosques Montanos de Mesoamérica (Patten & Smith-Patten 2008, Sánchez-González *et al.* 2008, Sánchez-González & Navarro-Sigüenza 2009).

Tabla 6. Valores de estadísticos de diversidad genética basados en secuencias de ADNmt publicados para diferentes especies de aves. (N.R = No Reportado)

Taxón	Región Geográfica	Regiones de ADN	Pares de bases	N	Haplotipos	Sitios Variables	Diversidad Nucleotídica π	Distancias P-Unc	D de Tajima	Diversidad haplotípica	Autores
<i>Oceanodroma castro</i>	Global, Marina	CR, ND6	1000 Aprox.	386	170	139 (14%)	0.004 - 0.06	N.R.	Negativo, pero no significativo	0.82 - 1.0	Smith <i>et al.</i> 2007
<i>Anas fulvigula</i>	América de Norte	CR	665	219	57	55 (8.2%)	0.0035 - 0.0074	N.R.	-1.07 a 0.07 P>0.1	0.76 - 0.95	McCracken <i>et al.</i> 2001
<i>Buteo galapagoensis</i>	Islas Galápagos	COI, CR	911	122	7	9 (1%)	0.0018	0 - 0.007	N.R.	0.671	Bollmer <i>et al.</i> 2005
<i>Lampornis amenthystinus</i>	México y Centro América. Montañas	CytB, ND2	844	69	32	75 (8.9%)	0.0082	0.001 - 0.2	N.R.	0.91	Cortés-R. <i>et al.</i> 2008
<i>Aulacorhynchus</i>	Neotrópico	CytB, ND2,3	1159	56	22	211 (18%)	N.R.	0.001 - 0.086	N.R.	N.R.	Puebla-Olivares <i>et al.</i> 2008
<i>Picoides albolarvatus</i>	Estados Unidos, montañas del Oeste	CytB, ATPasa	1777	78	25	18 (1%)	0.002	0 - 0.0068	- 2.0 (P=0.01)	N.R.	Alexander & Burns 2006
<i>Lepidocolaptes affinis</i>	México y Centro Am. Montañas	CytB, ND2	1869	79	36	67 (3.6%)	0.005	0 - 0.0177	-1.082 (P=0.13)	0.962	Este Trabajo
<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	Brasil, Bosque Atlántico	CytB, ND2,3	2400	34	23	445 (18.5%)	0.015	0.002 - 0.026	1.02 (P>0.05)	N.R.	Cabanne <i>et al.</i> 2008
<i>Xiphorhynchus spixi / elegans</i>	Amazonas	CytB	928	21 / 17	7 / 41	161 (19%)	0.0052 / 0.0089	N.R.	0.48 / 0.14 (P>0.05)	0.79 / 0.93	Aleixo 2004
<i>Glyphorhynchus spirurus</i>	Neotrópico, Tierras Bajas	CytB ND2,3	170	72	N.R.	344 (29.4%)	N.R.	0 - 0.076	N.R.	N.R.	Marks <i>et al.</i> 2002
<i>Schiffornis turdina</i>	Neotrópico Tierras Bajas	CytB, ND2 COI	2475	41	N.R.	839 (33.9%)	N.R.	0.008 - 0.096	N.R.	N.R.	Nyári 2007

Tabla 6: (continuación)

<i>Thryothorus nigrocapillus</i>	Panamá	ATPasa 6,8 tRNA	842	17	17	74 (8,8%)	N.R.	0.009 - 0.081	N.R.	N.R.	González <i>et al.</i> 2003
<i>Lepidothrix coronata</i>	Sur y Centro América, tierras bajas	CytB, ND2,3	1067	61	52	228 (21%)	N.R.	0 - 0.055	N.R.	N.R.	Cheviron <i>et al.</i> 2005
<i>Corvus</i>	Europa y parte de Asia	CR	690	167	77	N.R.	0.0015 - 0.01	0.1- 0.9 en dif. sps.	-2.18 (P<0.01) en un grupo	0.8 - 1	Haring <i>et al.</i> 2007
<i>Aphelocoma</i>	Norte América, varios hábitats	CR	389	143	44	N.R.	0.0007 - 0.0065	N.R.	N.R.	0.28 - 0.92	Delaney <i>et al.</i> 2008
<i>Pseudopodoces humilis</i>	China - Montañas Meseta Tibetana	CR	561	67	17	27 (4.8)	0.0 - 0.005	N.R.	0.81 P>0.1	0 - 0.7	Yang <i>et al.</i> 2006
<i>Pogonochla stellata</i>	África, montañas	NADH 3	383	283	58	41 (10.7%)	2.2 - 19.1	N.R.	N.R.	0.33 - 1	Bowie <i>et al.</i> 2006
<i>Cinclus cinclus</i>	Europa	CytB ND2 CR	3096	106	51	205 (6.6%)	0.0027	N.R.	N.R.	0.9	Hourlay <i>et al.</i> 2008
<i>Nectarina olivacea / obscura</i>	África, montañas y tierras bajas	ND 3 tRNA	395	282	55	33 (8.6%)	N.R.	N.R.	-1.9 (P= 0.003)	N.R.	Bowie <i>et al.</i> 2004
<i>Dendroica petechia</i>	Alaska y Canadá	CR	344	155	59	32 (9.3%)	0.0013 - 0.014	N.R.	N.R.	0.44 - 0.96	Milot <i>et al.</i> 2000
<i>Buarremon brunneinucha</i>	Neotrópico, Montañas	ND2	1026	135	98	N.R.	0.013- 0.046	N.R.	N.R.	N.R.	Cadena <i>et al.</i> 2007
<i>Buarremon brunneinucha</i>	México-Centro Am. Montañas	COII, tRNA ATPasa6,8	801	73	50	237 (29.6%)	0.054	N.R.	-0.26 (P=0.53)	0.99	Navarro-Sigüenza <i>et al.</i> 2008
<i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	México yCentro Am. Montañas	ATPasa6,8 tRNA	676	21	N.A.	100 (15%)	N.R.	0.003 - 0.08	N.R.	N.R.	García-M <i>et al.</i> 2004
<i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	México yCentro Am. Montañas	COII ATPasa6,8	800	83	61	174 (21%)	N.R.	N.R.	N.R.	N.R.	Bonaccorso <i>et al.</i> 2008

Para *L. affinis* no se encontró la clara separación entre haplotipos al norte y sur del Istmo de Tehuantepec que se ha observado en otras especies de Bosque Montano estudiadas (García-Moreno *et al.* 2004, Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008). Al contrario, en *L. affinis* hay relación entre haplotipos de ambos lados del Istmo, un caso semejante al encontrado en *Aulacorhynchus* (Puebla-Olivares *et al.* 2008). Los patrones como éste, en donde no existe monofilia recíproca de los linajes, pueden indicar una separación reciente (*e.g.*, Baker *et al.* 2003). La monofilia recíproca se desarrolla en el ADNmt como resultado de procesos estocásticos cuyo curso temporal es comúnmente impredecible (Hudson & Turelli 2003). Por esta razón, existe un continuo de estados de divergencia entre poblaciones que van desde diferencias en las frecuencias alélicas hasta especies bien diferenciadas y cada estado en este continuo es informativo (Omland *et al.* 2006) acerca del proceso de especiación.

Algunas evidencias (ver Omland *et al.* 2006) indican, no obstante, que hay cierto grado de divergencia en las poblaciones de *L. affinis* al norte y al sur del Istmo. Estas son: I) ningún haplotipo se comparte entre sus poblaciones y II) casi todos los haplotipos tienen su haplotipo más relacionado en la misma zona (excepto el de los Tuxtlas). De acuerdo con esto, el Istmo de Tehuantepec ha tenido cierto efecto como barrera entre las poblaciones de *L. affinis* (polifilia intermedia de grado 3, *sensu* Omland *et al.* 2006) pero no lo suficiente como para ser evidenciado en un análisis filogenético tradicional. En coincidencia con lo reportado aquí, en un estudio biogeográfico, a gran escala, utilizando aves de Bosque Montano (Sánchez-González *et al.* 2008) tampoco resulta claro el papel del Istmo de Tehuantepec como barrera biogeográfica.

Algunos accidentes geográficos menores también han influido en la diversificación de poblaciones de los Bosques Montanos en Mesoamérica (Sánchez-González *et al.* 2007). En este trabajo, el único individuo de la SMS-Oa presenta un haplotipo diferente (pero idéntico a uno de CPL) de los encontrados en la misma cadena montañosa más al norte (SMS-Gu). La separación geográfica entre estas zonas de la SMS es la cuenca del Río Verde (Ferrusquía 1998), que se ha sugerido como barrera para poblaciones de otras especies de aves de Bosque Montano (Puebla-Olivares *et al.* 2008, García-Moreno *et al.* 2004, Hernández-Baños *et al.* 1995). Sin embargo, es necesario un mayor muestreo en esta zona para definir las relaciones entre estas poblaciones, algo importante dada la marcada diferenciación de SMS-Gu.

Para otras especies de aves de Bosque Montano (García-Moreno *et al.* 2004, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008, Puebla-Olivares *et al.* 2008), la serranía de los Tuxtlas ha demostrado tener poblaciones aisladas con un grado marcado de diferenciación. Para *L. affinis*, la única muestra de los Tuxtlas con que se contó no muestra asociación con ninguna población y su haplotipo, aunque único, sólo tiene un cambio mutacional con respecto a otro haplotipo encontrado en la Sierra Norte de Chiapas.

La baja estructura genética encontrada en *L. affinis* podría deberse en parte a la existencia de flujo génico actual entre algunas poblaciones, como es sugerido por la ocurrencia del mismo haplotipo en diferentes localidades. Aunque *L. affinis* es una especie común del Bosque Montano no está totalmente restringida a él, pudiendo ser encontrado en otros hábitat de montaña (Sánchez-González & Navarro-Sigüenza 2009). Además, se sabe que esta especie presenta ligeros movimientos altitudinales durante ciertas épocas del año y se ha documentado su presencia ocasional en elevaciones muy bajas (400m) (Skutch 1969, Del Hoyo 2003).

Un hecho que llama la atención del patrón filogeográfico de *L. affinis* es la asociación filogenética entre haplotipos que permitió definir a la población de las Montañas de Oaxaca-SMO. El hecho es notorio porque estos 15 haplotipos (42% del total de haplotipos encontrados) no aparecen en otras poblaciones. Este hecho está de acuerdo con que una parte importante de la variación encontrada en *L. affinis* se ha originado en los Bosques Montanos de esta parte de México. Dado que un gran número de haplotipos en un área sugiere la persistencia de poblaciones en ella (Bowie *et al.* 2004) y como el parámetro θ de esta población fue similar al del total de *L. affinis*, Las Montañas de Oaxaca-SMO podría ser una población antigua, algo semejante a lo encontrado para otros taxa de distribución similar como *Buarremon brunneinucha* (Navarro-Sigüenza *et al.* 2008).

Otro patrón interesante fue la existencia de dos linajes en el Norte de la Sierra Madre Oriental. Esta población, SMO-N, apareció compuesta por haplotipos relacionados con los de poblaciones vecinas (Montañas de Oaxaca-SMO) así como por haplotipos de un linaje que resultó ser hermano del clado México/Norte de Centro América. Por su parte, la distribución *mismatch* de esta población mostró un patrón claramente bimodal. Los perfiles multimodales de las *mismatch*, además de por otros factores (*e.g.*, una población grande con un tamaño relativamente constante en el tiempo), también pueden resultar por contacto secundario entre frentes que se expanden (Liebers

et al. 2001). De acuerdo con lo anterior, la población SMO-N tiene características que son compatibles con un proceso de retención de un linaje antiguo y contacto secundario con otro linaje. Este fenómeno no es raro en aves, y se ha reportado en estudios filogeográficos para diferentes especies de distintos hábitats (McCracken *et al.* 2001, Bowie *et al.* 2004, Smith *et al.* 2007). Adicionalmente, la evidencia de que la población de las Montañas de Oaxaca-SMO ha experimentado expansión demográfica reciente puede relacionarse con una ampliación en su distribución que permitió el contacto secundario mencionado.

Para otras especies de aves de Bosque Montano, el Norte de la Sierra Madre Oriental (alrededor de los 21° de Latitud Norte), ha resultado diferente de las demás poblaciones de esa cadena montañosa (García-Moreno *et al.* 2004, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008). Además, a nivel biogeográfico existe evidencia que indica que esta zona es un área de endemismo (Navarro *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2008). Por otro lado, una subespecie de *L. affinis* (no incluida en este estudio, ver más adelante) habita en los Bosques Montanos de más al norte de la SMO (Dickinson 2003) y podría representar un evento antiguo de división de linajes en *L. affinis*. Estos datos sugieren que el Norte de la Sierra Madre Oriental ha sido otro lugar importante en la historia de *L. affinis* en México.

Los procesos demográficos recientes parecen haber influido poco en la configuración filogeográfica de *L. affinis*, ya que en su mayoría las poblaciones y grupos definidos en el estudio no mostraron evidencia de crecimiento poblacional reciente. Sin embargo, resalta el caso de disminución poblacional de Costa Rica que se discute más adelante. Adicionalmente, la ocurrencia de haplotipos idénticos entre poblaciones cercanas pero no entre poblaciones de grupos regionales diferentes sugiere un flujo génico limitado. Este flujo génico podría estar dándose principalmente entre poblaciones de Oaxaca y entre poblaciones del Norte de Centroamérica.

Al igual que para *Buarremon brunneinucha* (Navarro-Sigüenza *et al.* 2008) en *L. affinis* el crecimiento poblacional parece no ser un evento importante en la configuración de sus poblaciones. De ser éste un patrón general entre especies de Bosques Montanos de Mesoamérica, sería posible pensar en la estabilidad de dicho hábitat en tiempos recientes. En un estudio con *Cinclus cinclus* en Europa (Hourlay *et al.* 2008) un patrón de estabilidad poblacional similar es interpretado como el reflejo de zonas de refugio mantenidas desde la última era glacial.

Algo que es importante comentar ahora, es la utilidad del NCA. A pesar de varias críticas, éste método ha sido aplicado en varios estudios con aves (Bowie *et al.* 2004, Cheviron *et al.* 2005, Alexander & Burns 2006, Bowie *et al.* 2006, Yang *et al.* 2006, Smith *et al.* 2007). Para *L. affinis* el NCA rechazó la hipótesis de distribución aleatoria de los haplotipos en algunos clados. Esta parte del NCA es la menos criticada (Knowles & Maddison 2002) ya que pone a prueba explícitamente una hipótesis de asociación entre los terminales de los clados y su ubicación geográfica. La otra parte del NCA, el uso de una clave de inferencia que mediante las respuestas del investigador a diferentes preguntas relacionadas con los resultados del análisis permite detectar procesos compatibles con la distribución geográfica de los haplotipos, indicó dos procesos: fragmentación alopátrica y fragmentación seguida de expansión. La fragmentación alopátrica coincide con lo encontrado con los F_{ST} , pero la expansión de distribución no es apoyada por los análisis de crecimiento demográfico. La clave de interpretación ha sido la parte más criticada del método por ser subjetiva (Knowles & Maddison 2002) y tender a proponer el flujo génico con aislamiento por distancia y expansión contigua de distribución como el proceso predominante (Panchal & Beaumont 2007). En este caso, ese proceso no fue compatible con los datos de *L. affinis*.

Ahora bien, existen estudios basados en información del ADNmt que exploran diferentes hipótesis sobre las causas de la diversificación de linajes en la sub-familia Dendrocolaptinae (García-Moreno & Cardoso da Silva 1997, Aleixo 2002, 2004; Cabanne *et al.* 2007, 2008). Estos trabajos presentan tres procesos implicados en esas diversificaciones: I) divergencia por especialización en diferentes hábitats (*e.g.*, zonas boscosas vs zonas abiertas, *várzea* vs tierra firme) en los géneros *Lepidocolaptes* y *Xiphorhynchus* (García-Moreno & Cardoso da Silva 1997, Aleixo 2002); II) alopatria causada por fragmentación de hábitat debido a eventos paleoecológicos en especies de *Xiphorhynchus* (Aleixo 2004, Cabanne *et al.* 2007, 2008); III) barreras geográficas (*e.g.*, ríos) en especies de *Xiphorhynchus* (Aleixo 2004). En general todas las especies analizadas en estos estudios son de tierras bajas. En *L. affinis*, la diversificación de linajes aparece asociada a la ocurrencia de barreras geográficas entre las montañas Mesoamericanas.

De acuerdo con la datación basada en el parámetro θ , los haplotipos actuales de *L. affinis* coalescen en el pasado hace alrededor de 130 000 años. Como se dijo anteriormente, este es un estimado del tiempo mínimo por lo que el linaje probablemente ha estado en Mesoamérica desde antes. Este tiempo es suficiente para que sus poblaciones se hayan visto afectadas por los cambios

climáticos de los últimos 90 000 años que tan ampliamente han sido discutidos como modeladores de la diversidad actual (para ejemplos de aves ver Newton 2003, Avise 2000). No obstante, dada la ocurrencia ocasional de *L. affinis* en otros hábitats diferentes al Bosque Montano (Skutch 1969, Del Hoyo *et al.* 2003, Sánchez-González & Navarro-Sigüenza 2009), su respuesta a los cambios en la distribución de este hábitat pudo haber sido variada.

Por otra parte, la monofilia de *L. affinis* con respecto a las otras especies de *Lepidocolaptes* analizadas es interesante ya que en tratamientos taxonómicos anteriores (*e.g.*, Hilty & Brown 1986) se le había considerado conespecífico con *L. lacrymiger* de Sur América. Sin embargo, con base en diferencias en tamaño y ciertos aspectos del canto, Ridgely & Tudor (1996) consideran a *L. affinis* como la especie hermana de *L. lacrymiger*. No obstante, no existe un trabajo taxonómico formal sobre las relaciones de estos taxones. De acuerdo con las reconstrucciones filogenéticas presentadas aquí, *L. affinis* y la especie endémica de México, *L. leucogaster*, son hermanas. En un trabajo filogenético basado en datos morfológicos (Raikow 1994) *L. leucogaster* había sido propuesto como la especie hermana de *L. angustirostris*, una especie Sur Americana, a pesar de ser una hipótesis poco parsimoniosa desde una perspectiva biogeográfica (García-Moreno & Cardoso da Silva 1997).

El resultado presentado aquí, *L. affinis* y *L. leucogaster* como especies hermanas, es de suma importancia ya que insinúa que la diversificación de este grupo ha tenido lugar, posiblemente, en las montañas de México. Esto resulta llamativo dada las diferencias en tamaño y coloración entre las dos especies. No obstante, debido al bajo soporte (ML Bootstrap = 50, IB *a posteriori* = 74) obtenido para la relación entre estos dos taxa es necesario contar con mayor evidencia (más muestras de *L. leucogaster* y de *L. lacrymiger*) para hacer pronunciamientos categóricos sobre este particular. Por su parte, la clara separación filogenética entre las subespecies: *L. affinis affinis* (del Norte de Centro América y México) y *L. a. neglectus* (de Costa Rica), sumada con la diferenciación morfológica que permite su designación como subespecies (Ridgway 1909) parece ser evidencia para considerar al taxón *L. a. neglectus* como una especie. Sin embargo, las diferencias genéticas entre estas dos subespecies es solo la mitad de la encontrada entre especies reconocidas de *Lepidocolaptes*. La adición de información de regiones del genoma nuclear podría dar soporte a esta propuesta.

Sobre *L. a. neglectus* de Costa Rica, llama la atención su baja diversidad genética. Aunque solo se contó con 10 muestras de dos localidades, la baja diversidad no debe ser un sesgo del muestreo, ya que localidades mexicanas (e. g., Coapilla, Chiapas) con menos muestras presentaron mayor diversidad. Por lo tanto, la evidencia demográfica (valor negativo del parámetro G , forma de la distribución *mismatch*) y filogenética (es un linaje cuya divergencia antecede la separación de las poblaciones de México) señala un evento de cuello de botella reciente como el responsable de tal patrón. Considerando que la datación basada en el parámetro θ permite una estimación aproximada de la ocurrencia del cuello de botella en esta población, éste debió haber ocurrido hace un poco más de 8000 años, lo cual es un periodo muy corto de tiempo, en el que ya se podrían considerar efectos debidos a actividad antropogénica. Adicionalmente, vale la pena mencionar que la otra subespecie de *L. affinis*, *L. a. lignicida* (Bangs & Penard 1919), que habita en las montañas del NE de México al extremo norte de la Sierra Madre Oriental, presenta una variación morfológica mas pronunciada con respecto a las otras dos subespecies, que la observada entre *L. a. affinis* y *L. a. neglectus*. Por lo tanto es posible que este taxón sea un linaje independiente con diferente historia . No obstante esto solo puede ser resuelto una vez se incluyan muestras de dicho taxón en un análisis filogenético formal.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto la singularidad histórica reflejada en los linajes biológicos. En este caso, *L. affinis* comparte solo parcialmente aspectos de su historia con otras especies de los Bosques Montanos de Mesoamérica. La evidencia presentada parece indicar que al igual que otros taxa, *L. affinis* se ha visto afectado por procesos que han desembocado en su diversificación *in situ*. Un estudio comparativo que incluya la información disponible para diferentes taxa de Bosques Montanos Mesoamericanos y que ponga a prueba hipótesis explícitas sobre el modo de su diversificación (e.g., dispersión vs. vicarianza) permitirá complementar el cuadro de la evolución de la biota Neotropical. En el caso de *L. affinis*, la inclusión de muestras de la población de *L. a. lignicida* del noreste Mexicano y de algunas poblaciones intermedias (Honduras, Sierra Madre de Sur-Oaxaca, Chimalapas-Chiapas) así como la evaluación de zonas del genoma nuclear y de otras regiones del ADNmt con tasas mas altas de mutación (e.g., ND3, COI), probablemente mejorará la resolución de los análisis filogeográficos y disminuirá el margen de error asociado con las estimaciones basadas en coalescencia.

CONCLUSIÓN

Lepidocolaptes affinis es monofilético con respecto a las demás especies de *Lepidocolaptes*. Su diversidad genética es baja y su patrón filogeográfico es complejo. Este patrón coincide solo en ciertos puntos con el encontrado para otras especies de aves de Bosques Montanos en Mesoamérica. Aunque, en general, la estructura genética de *L. affinis* no es marcada, hay indicios claros de que la diversidad genética no se distribuye aleatoriamente en el espacio geográfico. La depresión de Nicaragua se identificó como una barrera más importante que el Istmo de Tehuantepec en el rompimiento de linajes. Aparentemente, gran parte de la variación genética de *L. affinis* se ha originado en los Bosque Montanos de México. Existe evidencia de que la historia de *L. affinis* ha sido modelada por diferentes procesos, tales como: I) alopatría por vicarianza a distintos niveles geográficos, II) mantenimiento de linajes ancestrales y contacto secundario, III) estabilidad demográfica con algunos casos puntuales de fluctuaciones marcadas y IV) flujo génico entre poblaciones cercanas. Además, es posible que el taxón *L. affinis* incluya más de una especie.

BIBLIOGRAFÍA

Aleixo, A. 2002. Molecular systematics and the role of the "varzea" - "terra-firme" ecotone in the diversification of *Xiphorhynchus* woodcreepers (Aves: Dendrocolaptidae). *Auk* 119: 621-640.

Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution* 58: 1303-1317.

Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.

Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press. U.S.A.

Baker, J. M., E. López-Medrano, A.G. Navarro, O. Rojas-Soto & K.E. Omland. 2003. Recent speciation in Orchard Orioles group: divergence of *Icterus spurius spurius* and *Icterus spurius fuertesi*. *Auk* 120 (3): 848-859.

Bandelt, H., P. Forster & A. Rohl. 1999. Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Bangs, O. & Penard T. E. 1919. Some critical notes on birds. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* 63: 19-40.

Banks, R. C., C. Cicero, J. L. Dunn, A. W. Kratter, P. C. Rasmussen, J. V. Remsen Jr, J. D. Rising, & D. F. Stotz. 2006. Forty-seventh supplement to the American Ornithologist' Union check-list of North American birds. *Auk* 125: 926-936.

Banks, R. C., R. T. Chesser, C. Cicero, J. L. Dunn, A. W. Kratter, I. J. Lovette, P. C. Rasmussen, J. V. Remsen, Jr., J. D. Rising, D. F. Stotz, & K. Winker. 2008. Forty-ninth supplement to the American Ornithologists' Union check-list of North American birds. *Auk* 125: 758-768.

Beaumont, M. A. & B. Rannala. 2004. The Bayesian revolution in genetics. *Nature Reviews Genetics* 5: 251-261.

Bonaccorso, E., A. G. Navarro-Sigüenza, L. A. Sánchez-González, A. T. Peterson & J. García-Moreno. 2008. Genetic differentiation of the *Chlorospingus ophthalmicus* complex in Mexico and Central America. *Journal of Avian Biology* 39: 311-321.

Bowie, R. C.K., J. Fjeldsa, S. J. Hackett., & T. M. Crowe. 2004. Molecular evolution in space and through time: mtDNA phylogeography of the Olive Sunbird (*Nectarinia olivacea/obscura*) throughout continental Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 56 -74.

Bowie, R. C. K., J. Fjeldsa, S. J. Hackett, J. M. Bates & T. M. Crowe. 2006. Coalescent models reveal the relative roles of ancestral polymorphism, vicariance, and dispersal in shaping phylogeographical structure of an African montane forest robin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 171-188.

Brown, A. D. & M. Kapelle. 2001. Introducción a los bosques nublados del Neotrópico: Una síntesis regional. EN: Kapelle, M. & A.D. Brown. (Eds). Bosques nublados del Neotrópico. INBio. Santo Domingo de Heredia.

Brumfield, R. T. & S. V. Edwards. 2007. Evolution into and out of the Andes: A Bayesian analysis of historical diversification in *Thamnophilus* antshrikes. *Evolution* 61: 346-367.

Cabanne, G. S., F. R. Santos, & C. Y. Miyaki. 2007. Phylogeography of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes, Dendrocolpatidae): vicariance and recent demographic expansion in southern Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 73-84.

Cabanne, G. S., F. M. De Horta, E. H. R. Sari, F. R. Santos, & C. Y. Miyaki. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 760-773.

Cadena, C. D., J. Klicka & R. E. Ricklefs. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: Molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush-finches (Aves, Emberizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 993-1016.

Castoe, T. A., J. M. Daza, E. N. Smith, M. M. Sasa, U. Kuch, J. A. Campbell, P. T. Chippindale & C. L. Parkinson. 2009. Comparative phylogeography of pitvipers suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. *Journal of Biogeography* 36: 88-103.

Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Cheviron, Z. A, S. J Hackett & A. P. Capparella. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 338-357.

Cortés-Rodríguez, N., B. E. Hernández-Baños, A. G. Navarro-Sigüenza, A. T. Peterson, & J. García-Moreno. 2008. Phylogeography and population genetics of the Amenthyst-throated Hummingbird (*Lampornis amethystinus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 48: 1-11.

Cortés-Ortiz, L., E. Bermingham, C. Rico, E. Rodríguez-Luna, I. Sampaio & M. Ruiz-García. 2003. Molecular systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 64-81.

Del Hoyo, J., A. Elliot, & D. A. Christic. Eds. 2003. Handbook of the birds of the world. Vol 8. Broadbills to Tapaculos. Lynx Edicions, Barcelona.

Dickinson, E. C. Ed. 2003. The Howard & Moore complete checklist of the birds of the world. 3rd Edition. Princeton University Press. New Jersey.

Egan, A. N. & K. A. Crandall. 2006. Theory of phylogenetic estimation. En: Fox, C.W. & J.B. Wolf (Eds). 2006. Evolutionary genetics: Concepts and case studies. Oxford University Press. USA. 592 pp.

Eizirik, E., S. L. Bonatto, W. E. Johnson, P. G. Crawshaw Jr., J. C. Vie, D. M. Brousset, S. J. O'Brien & F. M. Salzano. 1998. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two Neotropical cats (Mammalia, Felidae). *Journal of Molecular Evolution* 47: 613-624.

Excoffier, L. 2006. Arlequin ver. 3.1. An integrated software package for populations genetics data analysis. Computational and molecular population genetics lab. Zoological Institute. University of Berne. URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

Excoffier, L., P. E. Smouse, & J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates inc. U.S.A.

Ferrusquía, V. I. 1998. Geología de México: Una sinopsis. En Ramamoorthy T.P., R. Bye, A. Lot, & J. Fa, Eds. *Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Foster, P. 2001. The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth Science Review* 55: 73-106.

Freeland, J. R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. England.

Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates Ink. Publishers. U.S.A.

García-Moreno, J., A. G. Navarro-Sigüenza, A. Peterson, & L. A. Sánchez-González. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 186-196.

García-Moreno, J., & J. M. Cardoso da Silva. 1997. An interplay between forest and non-forest South American avifaunas suggested by a phylogeny of *Lepidocolaptes* woodcreepers (Dendrocolaptinae). *Studies in Neotropical Fauna & Environment* 32: 164-173.

García-Moreno, J., N. Cortés, G. M. García-Deras & B. E. Hernández-Baños. 2006. Local origin and diversification among *Lampornis* hummingbirds: A Mesoamerican taxon. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 488-498.

Gentry, A. H. 1995. Patterns of diversity and floristic composition in Neotropical montane forest. En: Churchill S. P., H. Balslev, E. Forero & J.L Lutein. Eds. *Biodiversity and conservation of Neotropical montane forest*. The New York Botanical Garden, New York. Pp. 103-126.

Goloboff, P., J. Farris, & K. Nixon. 2003. T.N.T: Tree analysis using new technology. Program and documentation available from the authors and at: www.zmuc.dk/public/phylogeny.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* 165:131-137.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

- Haring, E., A. Gamauf, & A. Kryukov. 2007. Phylogeographic patterns in widespread corvid birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 840-862.
- Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66: 591-600.
- Hein, J, M. H. Schierup., & C. Wiuf. 2005. *Gene genealogies, variation and evolution: a primer in coalescent theory*. Oxford University Press. United States.
- Hey, J. & C. A. Machado. 2003. The study of structured populations – New hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics* 4: 535-543.
- Hernández-Baños, B. E., A. T. Peterson, A. G. Navarro- Sigüenza, & P. Escalante-Pliego. 1995. Bird faunas of the humid montane of Mesoamerica: biogeographic patterns and priorities for conservation. *Bird Conservation International* 5: 251-277.
- Hillis, D. M. 1995. Approaches for assessing phylogenetic accuracy. *Systematic Biology* 44: 3-16.
- Hilty, S. 2003. *Birds of Venezuela*. Second Edition. Princeton University Press.
- Hilty, S. & W.L. Brown. 1986. *A guide to the birds of Colombia*. Princeton University Press. USA.
- Hourlay, F., R. Libois, F. D'Amico, M. Sara, J. O'Halloran & J. R. Michaux. 2008. Evidence of highly complex phylogeographic structure on a specialist river bird species, the dipper (*Cinclus cinclus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 435-444.
- Hudson, R. R & M. Turelli. 2003. Stochasticity overrules the 'threetimes rule': genetic drift, genetic draft, and coalescence times for nuclear loci versus mitochondrial DNA. *Evolution* 57: 182–190.
- Huelsenbeck, J. P. 1995. The robustness of two phylogenetic methods: four-taxon simulations reveal a slight superiority of maximum likelihood over neighbor-joining. *Molecular Biology and Evolution* 12: 843–849.
- Irestedt, M., J. Fjeldsa, U. S. Johansson. & P. G. P. Ericson. 2002. Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). *Molecular Phylogenetics. and Evolution* 23: 499- 512.
- Kuhner, M. K. 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22: 768-770.
- Kuhner, M. K. 2008. Documentation. LAMARC - Likelihood Analysis with Metropolis Algorithm using Random Coalescence. URL:http://evolution.genetics.washington.edu/lamarc/lamarc_prog.html.
- Kuhner, M. K. 2009. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 86-93.
- Knowles, L. L. 2008. Why does a method that fails continue to be used. *Evolution* 62: 2713-2717.

Knowles, L. L., & W.P. Maddison., 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623-2635.

León-Paniagua, L., A. G. Navarro-Sigüenza, B. E. Hernández -Baños & J. C. Morales. 2007. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 42: 653–664.

Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Liebers, D., A. J. Helbig & P. de Knijff. 2001. Genetic differentiation and phylogeography of gulls in the *Larus cachinnans-fuscus* group (Aves: Charadriiformes). *Molecular Ecology* 10: 2447–2462.

Luna, I., L. Almeida, L. Villiers, L. Lorenzo. 1988. Reconocimiento florístico y consideraciones fitogeográficas del bosque mesófilo de montaña de Teocelo, Veracruz. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 48: 35–63.

Marks, B. D., S. J. Hackett, & A. P. Capparella. 2002. Historical relationships among Neotropical lowland forest areas of endemism as determined by mitochondrial DNA sequence variation within the Wedge-billed Woodcreeper (Aves: Dendrocolaptidae: *Glyphorynchus spirurus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 24: 153-167

McCracken, K. G., W. P. Johnson & F. H. Sheldon. 2001. Molecular population genetics, phylogeography, and conservation biology of the mottled duck (*Anas fulvigula*) *Conservation Genetics* 2: 87-121.

Milá, B., T. B. Smith & R. K. Wayne. 2006. Postglacial population expansion drives the evolution of long-distance migration in a songbird. *Evolution* 60: 2403-2409.

Milot, E., H. L. Gibbs., & K. A. Hobson. 2000. Phylogeography and genetic structure of northern populations of the yellow warbler (*Dendroica petechia*). *Molecular Ecology* 9: 667-681.

Moritz, C., 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary process that sustain it. *Systematic Biology* 51: 238-254.

Navarro, A. G., A. T. Peterson, E. Lopez-Medrano, & D. G Benitez. 2001. Species limits in Mesoamerican *Aulacorhynchus* toucanets. *Wilson Bulletin* 113: 363-372.

Navarro-Sigüenza, A. G., A. T. Peterson, A. Nyari, G. García-Deras, & J. García-Moreno. 2008. Phylogeography of the *Buarremon brunneinucha* Brush-finch complex (Aves,Emberizidae) in Mesoamerica. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 21-35.

Navarro, A. G., H. A. Garza-Torres, S. López de Aquino, O. R. Rojas-Soto & L. A. Sánchez-González. 2004. Patrones biogeográficos de la avifauna. En: Luna I., J.J. Morrone & D. Espinosa. (Eds). Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. Las Prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México.

Nei, M. 1987 *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.

- Newton, I. 2003. Speciation and biogeography of birds. Academic Press. UK. 668pp.
- Nixon, K. 2002. Winclada. URL: www.cladistics.com.
- Nores, M. 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *Journal of Biogeography*. 26: 475–485.
- Omland, K. E., J. M. Baker & J. F. Peters. 2006. Genetic signatures of intermediate divergence: population history of Old and New World Holarctic ravens (*Corvus corax*). *Molecular Ecology* 15: 795-808.
- Page, R. D. M. & E. C. Holmes. 1998. Molecular evolution: a phylogenetic approach. Blackwell Science Ltd. Great Britain. 346pp.
- Panchal, M. & M. A. Beaumont. 2007. The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. *Evolution* 61: 1466-1480.
- Patten, M. A. & B. D. Smith-Patten. 2008. Biogeographical boundaries and Monmonier's algorithm: a case study in the northern Neotropics. *Journal of Biogeography* 35: 407-416.
- Peterson, A. T., P. Escalante, & A. Navarro. 1992. Genetic variation and differentiation in mexican populations of common bushtanagers and Chestnut-capped Brush-Finches. *Condor* 94: 244-253.
- Petit, R. J. 2007. The coup de grace for the nested clade phylogeographic analysis. *Molecular Ecology* 17: 516 – 518.
- Posada, D. & A. R. Templeton. 2006. GEODIS 2.5 Documentation. Facultad de Biología. Universidad de Vigo. URL:<http://darwin.uvigo.es>
- Posada, D. & K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Posada, D. & K. A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends In Ecology and Evolution* 16: 37-45.
- Posada, D., K. A. Crandall & A. R. Templeton. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology* 9: 487–488.
- Puebla-Olivares, F., E. Bonaccorso, A. Espinosa, K. E. Omland, J. E. Llorente-Bousquets, A. T. Peterson, & A. G. Navarro-Sigüenza. 2008. Speciation in the Emerald toucanet (*Aulacorhynchus prasinus*) complex. *Auk* 125: 39-50.
- Raikow, R. J., 1994. A phylogeny of the woodcreepers (Dendrocolaptinae). *Auk* 111: 104-114.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Ridgely, R. S., & G. Tudor., 1996. The birds of South America: The Suboscine Passerines. University of Texas Press, Austin.

Ridgway, R. 1909. New genera, species and subspecies of Formicariidae, Furnariidae, and Dendrocolaptidae. *Proceedings of the biological society of Washington* 22: 69-74.

Rogers, A. R. & H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.

Ronquist, F. & J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Sánchez-González, L. A., A. G. Navarro-Sigüenza, A. T. Peterson, & J. García-Moreno. 2007. Taxonomy of *Chlorospingus ophthalmicus* in México and northern Central America. *British Ornithologist's Club* 127: 34-49.

Sánchez-González, L. A., J. J. Morrone & A. G. Navarro-Sigüenza. 2008. Distributional patterns of the Neotropical humid montane forest avifaunas. *Biological Journal of the Linnean Society* 94: 175-194.

Sánchez-González, L. A. & A. G. Navarro-Sigüenza. 2009. History meets ecology: a geographical analysis of ecological restriction in the Neotropical humid montane forests avifaunas. *Diversity and Distributions* 15: 1-11.

Skutch, A. 1969. Spotted-crowned Woodcreeper. Pp. 385-391 En: *Life Histories of Central American Birds III. Pacific Coast Avifauna* 35.

Smith, A. L., L. Monteiro., O. Hasegawa & V. L. Friesen. 2007. Global phylogeography of the band-rumped storm-petrel (*Oceanodroma castro*; Procellariiformes: Hydrobatidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 755-773.

Sober, E. 2004. The contest between parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 53: 644-653.

Solórzano, S., A. J. Baker & K. Oyama. 2004. Conservation priorities for Resplendent Quetzals based on analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *Condor* 106: 449-456.

Storfer, A., M. A. Murphy, J. S. Evans, C. S. Goldberg, S. Robinson, S. F. Spear, R. Dezzani, E. Delmelle, L. Vierling & L. P. Waits. 2007. Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* 98: 128-142.

Swofford, D. L. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and others methods). Ver. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-596.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

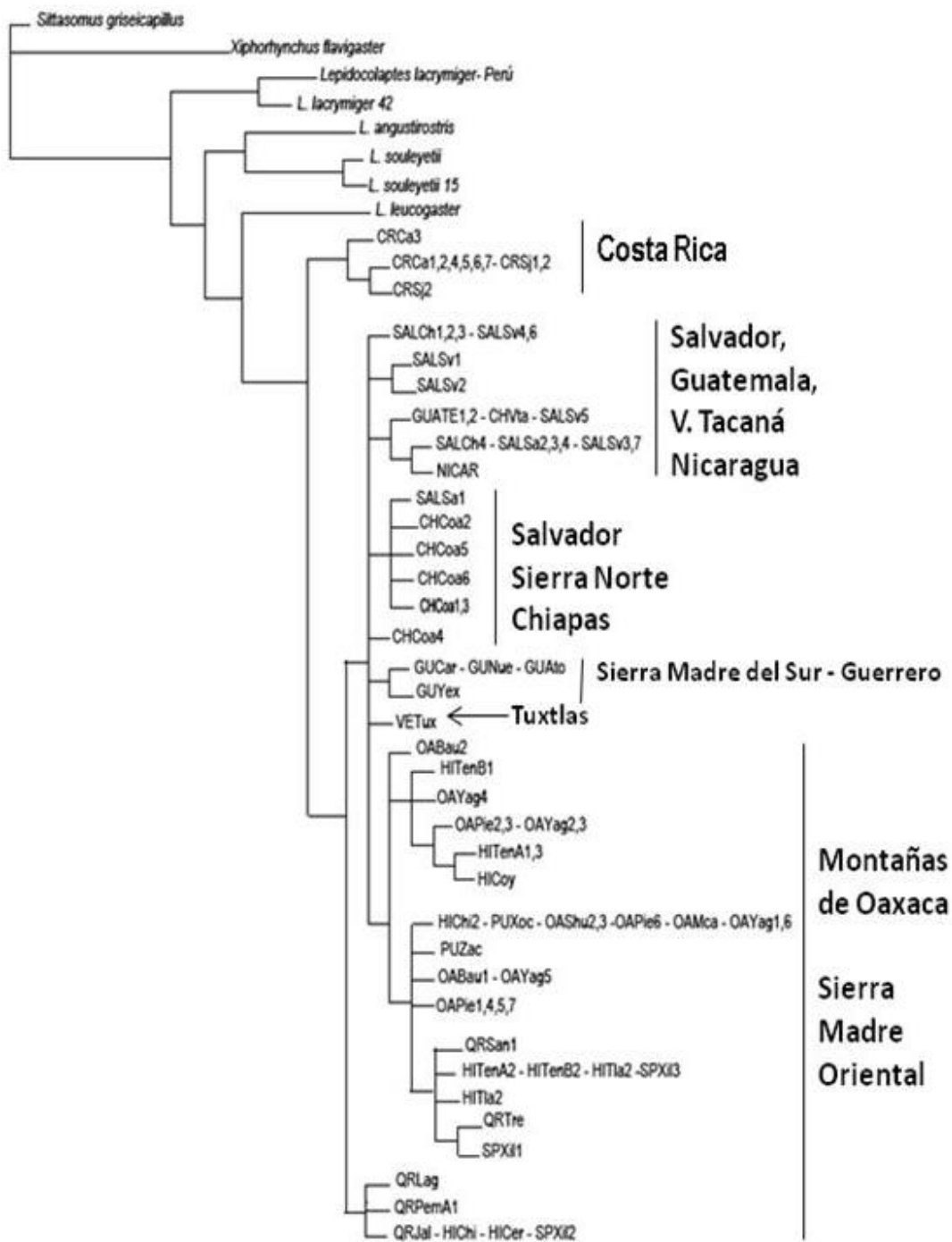
- Templeton, A. R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789–809.
- Templeton, A. R. 2006. *Populations genetics and microevolutionary theory*. John Wiley & Sons. Inc. Canada.
- Templeton, A. R. 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology* 17: 1877-1880.
- Templeton, A. R., E. Boerwinkle & C. F. Sing. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* 117: 343–351
- Templeton, A. R., E. Routman & C. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Terborgh, J. 1971. Distribution on environmental gradients: Theory and preliminary interpretation of distributional patterns in the avifauna of Cordillera Vilcabamba, Peru. *Ecology* 52: 23-40
- Wijninga, V. M. 1995. A first approximation of montane forest development during the Late Tertiary in Colombia. Pp. 23–34 EN Churchill, S. P., Balslev, H., Forero, E. & Luteyn, J. M. (eds.). *Biodiversity and conservation of Neotropical montane forests*. New York Botanical Garden.
- Yang, S. J., Z. H. Yin, X. M. Ma & F. M. Lei. 2006. Phylogeography of ground tit (*Pseudopodoces humilis*) based on mtDNA: Evidence of past fragmentation on the Tibetan Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 257-265.

ANEXO 1. Ejemplares utilizados en este estudio. Se indica el museo y la localidad de colecta.

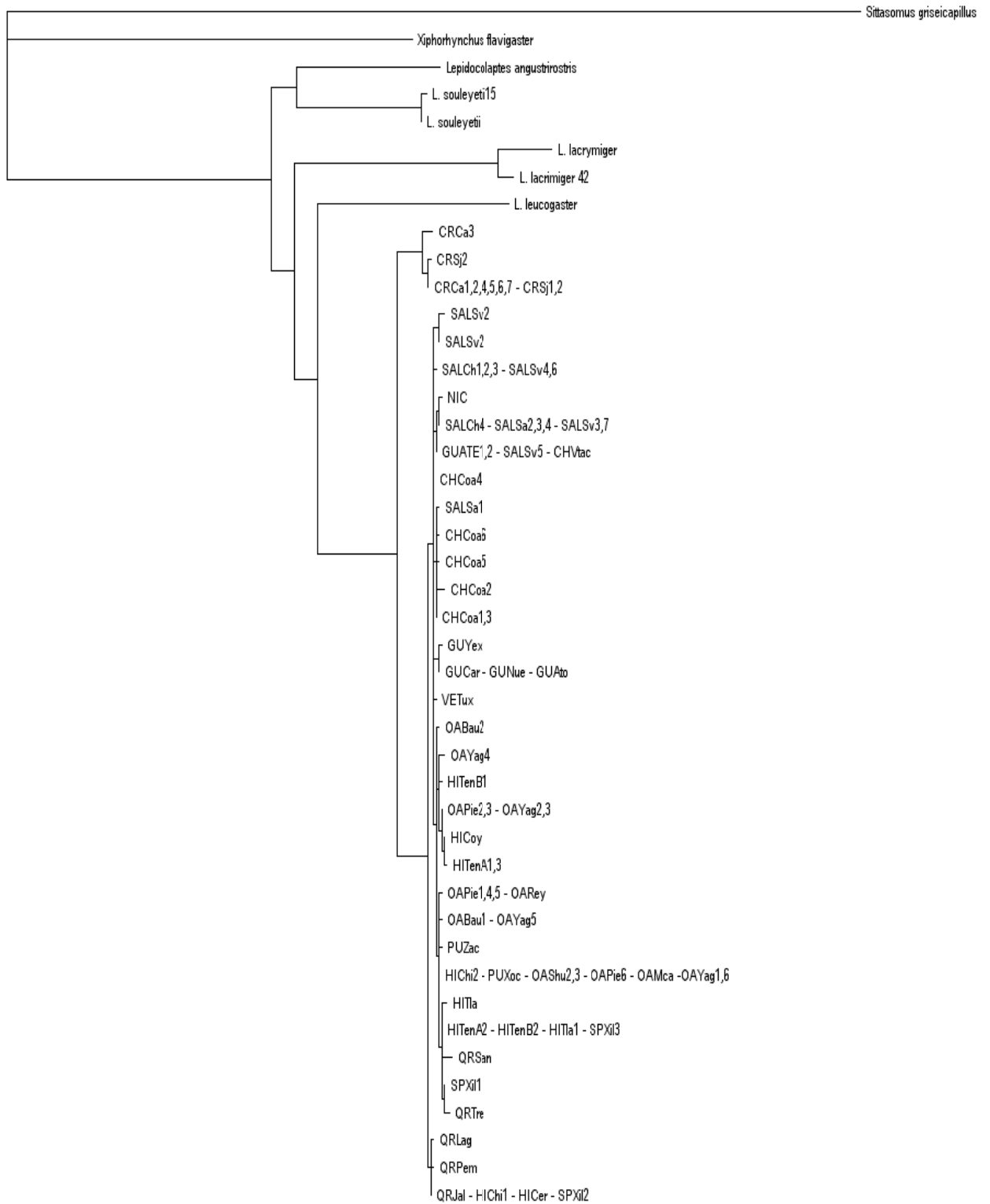
Taxón	Colección*	Numero Catálogo	Clave	Localidad	Estado/Provincia	País
<i>L. affinis</i>	MZFC	HUAS 78	SPXil1	La Victoria, Xilitla	San Luis Potosi	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	HUAS 80	SPXil2	La Victoria, Xilitla	San Luis Potosi	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	HUAS 141	SPXil3	La Victoria, Xilitla	San Luis Potosi	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	QRO 195	QRLag	Laguna de la Cruz	Querétaro	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	BMM 736	QRTre	Tres Lagunas, 7 Km S	Querétaro	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	QRO 283	QRPem	El Pemoche	Querétaro	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	QRO 095	QRSan	Santa Inés, 2Km W	Querétaro	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	BEHB 064	QRJal	Jalpan, 8Km SE	Querétaro	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	TEPE 26	HIChi1	Chilijapa	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	TEPE 27	HIChi2	Chilijapa	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	BMM 669	HITla1	Tlalchinol, 5Km E	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	BMM 677	HITla2	Tlalchinol, 5Km E	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	HGO-SLP 096	HICer	Cerro Jarros. El Sótano 1Km E	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	HGO-SLP 156	HICoy	El Coyol, 1Km E	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Conacyt 1518	HITenA1	Tenango de Doria, Rancho el Gosco	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Conacyt 1534	HITenA2	Tenango de Doria, Rancho el Gosco	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Conacyt 1558	HITenA3	Tenango de Doria, Rancho el Gosco	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	BMM 925	HITenB1	El Potrero, 5 km Tenango de Doria	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	TENAN 10	HITenB2	Tenango de Doria, El Potrero	Hidalgo	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	CUET 05	PUXoc	Xocoyolo	Puebla	Mex
<i>L. affinis</i>	UNLV	MBM 620	PUZac	Zacapoaxtla. Instituto Tecnológico	Puebla	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 034	OAShu1	Sierra de Huautla, Teotitlán, Pto Soledad	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Conacyt 788	OAShu1	Puerto Soledad	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 1134	OAMca	San Martín Caballero	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Yagila 15	OAYag1	Yaguila, Ixtlan	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Yagila 21	OAYag2	Yaguila, Ixtlan	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Yagila 31	OAYag3	Yaguila, Ixtlan	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Yagila 56	OAYag4	Yaguila, Ixtlan	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Yagila 57	OAYag5	Yaguila, Ixtlan	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	Yagila 62	OAYag6	Yaguila, Ixtlan	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 801	OABau1	San Juan Bautista Atatlaha	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 800	OABau2	San Juan Bautista	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 259	OAPie1	Cerro Piedra Larga, El Aguacate	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 276	OAPie2	Cerro Piedra Larga	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 355	OAPie3	Cerro Piedra Larga, El Aguacate	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 370	OAPie4	Terraceria Aguacate a Sn Seb. Jilotepec	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 442	OAPie5	Terraceria Aguacate a Sn SeB. Jilotepec	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 253	OAPie6	Cerro Piedra Larga, El Aguacate	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	OMVP 239	OAREy	Reyes Llano Grande	Oaxaca	Mex
<i>L. affinis</i>	FMNH	343239	VETux	Sierra de Santa Marta, El Bastonal	Veracruz	Mex
<i>L. affinis</i>	FMNH	394020	GUAto	Atoyac	Guerrero	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	AMT068	GUCar	Carrizar de Bravo	Guerrero	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	SIT 73	GUNud	Nueva Delhi	Guerrero	Mex
<i>L. affinis</i>	UNLV	MBM 801	GUYex	Yextla 17Km ENE, Los Otates	Guerrero	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	SIT 121	CHCoa1	Coapilla	Chiapas	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	SIT 140	CHCoa2	Coapilla	Chiapas	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	SIT 150	CHCoa3	Coapilla	Chiapas	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	SIT 153	CHCoa4	Coapilla	Chiapas	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	SIT 154	CHCoa5	Coapilla	Chiapas	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	SIT 106	CHCoa6	Coapilla	Chiapas	Mex
<i>L. affinis</i>	MZFC	BONA 46	CHVtac	Volcán Tacaná	Chiapas	Mex

<i>L. affinis</i>	UNLV	MBM 10552	GUATE1	Santa María de Jesús 5Km SSW	Quezaltenango	Guat
<i>L. affinis</i>	UNLV	MBM 10553	GUATE2	Santa María de Jesús 5Km SSW	Quezaltenango	Guat
<i>L. affinis</i>	KU	9014	SALCh1	La Laguna, La Montañona	Chalatenango	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	9018	SALCh2	La Laguna, La Montañona	Chalatenango	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	9022	SALCh3	La Laguna, La Montañona	Chalatenango	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	9082	SALCh4	La Laguna, La Montañona	Chalatenango	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	8276	SALSa1	Metpán, Parque Nacional Monte Cristo	Santa Ana	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	9397	SALSa2	Metpán, Parque Nacional Monte Cristo	Santa Ana	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	9402	SALSa3	Metpán, Parque Nacional Monte Cristo	Santa Ana	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	9434	SALSa4	Metpán, Parque Nacional Monte Cristo	Santa Ana	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	6454	SALSV1	Nuevo Tepetitán, Volcán San Vicente	San Vicente	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	6482	SALSV2	Nuevo Tepetitán, Volcán San Vicente	San Vicente	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	7676	SALSV3	Nuevo Tepetitán, Volcán San Vicente	San Vicente	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	7677	SALSV4	Nuevo Tepetitán, Volcán San Vicente	San Vicente	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	7771	SALSV5	Nuevo Tepetitán, Volcán San Vicente	San Vicente	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	7772	SALSV6	Nuevo Tepetitán, Volcán San Vicente	San Vicente	Sal
<i>L. affinis</i>	KU	7790	SALSV7	Nuevo Tepetitán, Volcán San Vicente	San Vicente	Sal
<i>L. affinis</i>	UNLV	MBM 4379	NIC	Matagalpa	Matagalpa	Nic
<i>L. affinis</i>	LSU	B19853	CRSj1	2 km SW Ojos Agun km 77 Pan Am Hwy	San José	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19778	CRSj2	Villa Mills km 95 Pan American Hwy	San José	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19899	CRSj3	Ca 2km S Villa Mills km 96 Pan Am Hwy	San José	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19839	CRCa1	3 km ENE Villa Mills	Cajamarca	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19875	CRCa2	Ca 2km S Villa Mills km 96 Pan Am Hwy	Cajamarca	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19834	CRCa3	3 km ENE Villa Mills	Cajamarca	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19878	CRCa4	Ca 2km S Villa Mills km 96 Pan Am Hwy	Cajamarca	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19877	CRCa5	Ca 2km S	Cajamarca	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19835	CRCa6	Ca 2km S Villa Mills km 96 Pan Am Hwy	Cajamarca	CR
<i>L. affinis</i>	LSU	B19862	CRCa7	3 km ENE Villa Mills km 98 Pan Am Hwy	Cajamarca	CR
<i>L. souleyetti</i>	MZFC	Yach 155		Zona Arqueológica, Yaxchilan	Chiapas	Mex
<i>L. souleyetti</i>	MZFC	Chima 473		Chalchijapa, 2.3Km Pblo. Galeras	Oaxaca	Mex
<i>L. leucogaster</i>	MZFC	BMM 470		El batel	Sinaloa	Mex
<i>L. lacrymiger</i>	CORBIDI			Tutumbaro	Ayacucho	Per
<i>L. lacrymiger</i>	FMNH	429952		Pillahuta, Pautarcambo	Cuzco	Ecu
<i>L. angustirostris</i>	UWBM	UWBM77383		Lag. Caucaya. Gutierrez. Prov. Cordillera	Sta. Cruz.	Bol
<i>X. flavigaster</i>	MZFC	BMM 861		9km NO Car. Tehuatlan-Huatzalingo	Hidalgo	Mex

* MZFC = Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias de la UNAM; KU = Natural History Museum University of Kansas; UNLV = Marjorie Barrick Museum University of Nevada; LSU = Museum of Natural History Louisiana State University; FMNH = Field Museum of Natural History; UWBM = Burke Museum University of Washington. CORBIDI: Centro de Ornitología y Biodiversidad, Lima. Perú.



ANEXO 2. Hipótesis filogenética bajo Máxima Parsimonia (Topología idéntica al árbol de Máxima Verosimilitud ver Anexo 3). Árbol de 684 pasos (Ci= 74; Ri=75). Para el significado de las abreviaturas ver Anexo 1.



ANEXO 3. Hipótesis filogenética bajo el criterio de Máxima Verosimilitud ($-\ln L = 5780.12126$). Para el significado de las abreviaturas ver Anexo 1.