



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Filogenia y variación genética de *Amazilia rutila*
(Lesson, 1842) (Aves: Trochilidae)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A
P R E S E N T A:

ALMA MELISA VÁZQUEZ LÓPEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ
BAÑOS

2012



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.

El que no posee el don de maravillarse
ni de entusiasmarse más le valdría estar muerto,
porque sus ojos están cerrados.

Albert Einstein.

Si puedes mirar, ve. Si puedes ver, repara .

José Saramago.

El conocimiento es patrimonio de la humanidad,
no es solo tuyo,
transmítelo para beneficio de toda la humanidad.

Anónimo.



Amazilia rutila, morfotipo de las Islas Marías. Por Ana Hernández Ramírez.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
RESUMEN	II
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES.....	4
1.1.1 <i>Trochilidae</i>	4
1.1.2 <i>Género Amazilia</i>	6
1.1.3 <i>Generalidades de Amazilia rutila</i>	8
II. OBJETIVO GENERAL	12
III.MÉTODOS	13
3.1 TRABAJO DE LABORATORIO.....	13
3.2 ANÁLISIS DE SECUENCIAS	17
3.2.1 <i>Análisis filogenéticos</i>	18
3.2.2 <i>Estructura y variación genética</i>	20
IV. RESULTADOS	21
4.1 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	23
4.2 ESTRUCTURA Y VARIACIÓN GENÉTICA	27
V. DISCUSIÓN.....	31
VI. CONCLUSIONES.....	35
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	36
APÉNDICE 1.....	42
APÉNDICE 2.....	45
APÉNDICE 3.....	48
APÉNDICE 4.....	50
APÉNDICE 5.....	51

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi *alma máter* porque a lo largo de mi carrera universitaria no solo recibí conocimiento científico, sino que amplíé mi criterio y mis valores humanos.

A la Facultad de Ciencias por ofrecerme un mundo de conocimiento y también la oportunidad de conocer a los mejores maestros y los mejores amigos.

A mi asesora la Dra. Blanca Estela Hernández Baños por recibirme como parte de su equipo de trabajo y brindarme sus conocimientos y confianza para poder realizar este proyecto.

Al Museo de Zoología Alfonso L. Herrera por recibirme en sus instalaciones como alumna y como compañera.

A la DGAPA por los proyectos PAPIIT IN-202509, IN-225611 por el apoyo económico para la realización de este proyecto y las becas otorgadas para mi terminación de estudios y realización de tesis.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona por su apoyo para la realización de la metodología de este proyecto.

A mis compañeros del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera por compartir su conocimiento, su trabajo y esfuerzo, en el campo, en el laboratorio y en la facultad (Mari, Luz, Pertusi, Santiago, Jaime).

A los revisores de mi tesis por sus aportaciones y comentarios: Dr. Juan José Morrone Lupi, Dra. María del Coro Arizmendi, Dr. José Martín García Varela y M. en C. Luz Estela Zamudio Beltrán.

A Ana Hernández Ramírez por las ilustraciones de *Amazilia rutila*.

A mis padres por cuidarme, quererme y sobre todo por ser los autores de mi formación humana y académica, sin ustedes nada sería posible. Gracias mamá por tu amor incondicional, gracias papá por tu fortaleza, sé que aunque no estás físicamente siempre vivirás en mí.

A mi familia por todo su apoyo, cariño y comprensión a lo largo de toda mi vida, nada sería posible sin ustedes, los quiero mucho. Mis hermanos mis cómplices y compañeros de vida, abuelita Lulú eres un ejemplo de mujer para mi, te quiero mucho.

A mis amigos por su apoyo, sus palabras y sobretodo por su alegría, los quiero mucho .

A Rubén por el tiempo que hemos compartido.

RESUMEN

La variación morfológica y etológica registrada entre las poblaciones de las especies ha sido establecida a lo largo del tiempo por eventos históricos relacionados al aislamiento y diferenciación de las mismas. Los avances en la sistemática molecular han permitido realizar estudios filogenéticos en varias aves mesoamericanas, descubriéndose que factores como una topografía compleja y fluctuaciones del clima han tenido como consecuencia el surgimiento de linajes genéticamente independientes dentro de las especies. El colibrí canelo *Amazilia rutila* es residente de los bosques tropicales caducifolios a una altitud de 0-1600 msnm a lo largo de la costa del Pacífico (incluidas las Islas Tres Marías) y la costa del Atlántico en México y Centroamérica, basándose en su morfología y distribución fragmentada han sido descritas cuatro subespecies: *diluta* en el noroeste de México, en Nayarit y Sinaloa; *graysoni* residente de las Islas Tres Marías; *rutila* desde Jalisco hasta Oaxaca, Yucatán hasta Honduras y oeste de Costa Rica y *corallirostris* desde el Sur de Chiapas, Yucatán y hasta Centroamérica. El objetivo de este trabajo fue determinar las relaciones filogenéticas y la variación genética de las poblaciones de *A. rutila*, así como las relaciones filogenéticas entre *Amazilia rutila*, *Amazilia yucatanensis* y *Amazilia tzacatl*. Se obtuvieron un total de 61 secuencias para los genes ND2 y COI, con las cuales se realizaron los siguientes análisis: matriz de distancia, análisis filogenéticos: máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana y de genética de poblaciones. Los análisis filogenéticos revelan la presencia de cinco linajes dentro del complejo *A. rutila*: **Pacífico Norte, Pacífico Centro, Islas Marías, Chiapas y Península de Yucatán-Centroamérica**, las poblaciones de los linajes encontrados muestran poco flujo génico en los análisis de genética de poblaciones. El patrón geográfico encontrado es consistente con otros estudios filogeográficos de aves mesoamericanas que habitan las tierras bajas y su estructura geográfica está asociada a barreras y discontinuidades geográficas en las tierras bajas, por ejemplo las poblaciones de las Islas Tres Marías muestran una divergencia genética respecto a sus congéneres continentales. El linaje Pacífico Centro y Chiapas probablemente divergieron debido al surgimiento del Istmo de Tehuantepec en el Plioceno medio y tardío y las regresiones-transgresiones marinas durante el Plioceno, sin embargo al no obtenerse un reloj molecular no es posible asegurar la asociación de ciertos eventos histórico-geológicos con la divergencia en las poblaciones del complejo. Por otra parte falta completar el muestreo en Centroamérica para descartar la presencia de más de un linaje dentro de esa área. La distribución geográfica de los linajes no es del todo consistente con las subespecies actualmente descritas para *A. rutila*, por lo que se sugiere la continuidad de este estudio con genes nucleares y la calibración de un reloj molecular, que permita un reordenamiento taxonómico dentro del complejo. Por otra parte se reafirman las estrechas relaciones filogenéticas de *A. rutila*, *A. yucatanensis* y *A. tzacatl* dentro del grupo “Esmeraldas” en la familia Trochilidae.

I. INTRODUCCIÓN

La existencia de variaciones morfológicas y etológicas entre las poblaciones de varias especies ha sido establecida a lo largo del tiempo por varios eventos históricos asociados al aislamiento de las mismas y su posterior diferenciación. En este sentido, el uso de marcadores moleculares como el ADN (Ácido desoxirribonucleico) ha resultado una herramienta relevante para el entendimiento de la estructura poblacional, de los procesos microevolutivos que actúan intra e interpoblacionalmente y de los procesos históricos-biogeográficos de los distintos linajes genéticos (Avice *et al.* 1987, Zink y Barrowclough 2008). Lo anterior ha hecho posible plantear hipótesis sobre eventos comunes de vicarianza, dispersión y mecanismos geológicos, ecológicos y etológicos que pudieron haber actuado en los linajes, permitiendo no sólo la comparación de poblaciones de la misma especie, sino la comparación entre linajes de distintas especies, incluso en aquellas que no comparten un ancestro común inmediato (Lanteri y Confalonieri 2002).

En las últimas décadas el avance de la sistemática molecular, ha permitido analizar la variación genética entre las poblaciones y las relaciones filogenéticas entre ellas en varios grupos biológicos (Boyce *et al.* 1994, Brow *et al.* 1994, Bond y Stockman 2008, Yang Liu *et al.* 2012). Un caso particular es el estudio de las aves de tierras altas en Mesoamérica. En dichos estudios se ha descubierto que factores como: una topografía compleja, varios tipos de vegetación, restricción de hábitat e incluso factores históricos como las fluctuaciones del clima y las variaciones del nivel del mar durante el Mioceno y Pleistoceno, han mantenido a las poblaciones de ciertas especies lo suficientemente aisladas y con bajos niveles de flujo génico a través del tiempo, por lo que en la actualidad algunas poblaciones representan linajes genéticos con una estructura genética definida (Haffer y Prance 2001, García-Moreno *et al.* 2004, Miller *et al.* 2005, Pérez-Emán 2005, Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008, Puebla-Olivares *et al.* 2008, Barber y Klicka 2010, Barrera-Guzmán *et al.* 2012). Sin embargo, pocos son los estudios realizados en la avifauna habitante de tierras bajas mesoamericanas, de los cuales se han logrado rescatar patrones filogeográficos. En algunos de ellos existe una clara correspondencia del fenotipo y los linajes genéticos con la distribución geográfica de las especies. Un ejemplo de esto es el caso de las Islas Mariás donde residen varias subespecies endémicas. Estas subespecies comparten la característica común de una diferenciación morfológica clara respecto a sus congéneres continentales, además

de una estructura genética poblacional y la presencia de un linaje genético insular (Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Smith *et al.* 2011, Montaña-Rendón 2011). Otro ejemplo es la Península de Yucatán (Smith *et al.* 2011, González *et al.* 2011) y poblaciones del sureste del Pacífico (García-Deras *et al.* 2007). En contraste, otros patrones filogeográficos no presentan dicha correspondencia morfológica y genética en todas las especies actualmente estudiadas, y en muchos casos no es posible obtener un patrón geográfico claro en las poblaciones de las regiones del norte y centro del Pacífico (García-Deras *et al.* 2007, González *et al.* 2011, Montaña-Rendón 2011). Por otro lado un estudio basado en secuencias de ADNmt mostró que las especies de tierras bajas mesoamericanas, presentan una tasa de diversificación baja y constante a través del tiempo y dichas tasas de diversificación al ser extrapoladas al presente reportan un número mayor de linajes que los descritos actualmente (Weir 2006). Estos descubrimientos además de la presencia de algunos linajes genéticamente independientes encontrados en las citas anteriores, soportan la idea de que en las tierras bajas pueden encontrarse linajes crípticos dentro de las especies (Zarza *et al.* 2008).

En este contexto el colibrí canelo *Amazilia rutila* (Trochilidae) (Lesson 1892) representa un modelo interesante para la búsqueda de un patrón de variación genética y la presencia de más de un linaje genético en sus poblaciones a lo largo de su distribución geográfica, debido a sus características de hábitat, distribución y variación morfológica. *A. rutila* habita las tierras bajas a lo largo de la costa del Pacífico (incluyendo las Islas Marías) desde Sinaloa hasta el centro de Costa Rica, y en la costa del Atlántico la Península de Yucatán hasta Costa Rica lo que representa una importante porción del territorio mesoamericano (Véase Fig. 1). Tiene una variación morfológica moderada compuesta por una variación morfométrica y de coloración de plumaje en poblaciones de las Islas Marías y solamente morfométrica en las poblaciones de la Península de Yucatán. Basándose en su fragmentada distribución geográfica se han descrito cuatro subespecies algunas de ellas con una variación morfológica prácticamente nula (Howell y Webb 1995, AOU 1998, Schuchmann 1999). En este estudio se pretende dar un primer acercamiento a la información filogenética y de variación genética entre las poblaciones del colibrí canelo, contribuyendo al esclarecimiento del estatus taxonómico de sus poblaciones, reconociendo similitudes con otros patrones geográficos ya encontrados en otras aves de tierras bajas mesoamericanas y en el mejor de los casos favoreciendo el reconocimiento de poblaciones importantes para la conservación.

Amazilia rutila pertenece al grupo de “Esmeraldas” de la familia Trochilidae, la monofilia de las esmeraldas no ha sido descartada, sin embargo se ha propuesto la inclusión de otros géneros con base a sus características morfológicas (McGuire *et al.* 2008). En contraste es probable que el género *Amazilia* no tenga un origen monofilético, del cual se han logrado rescatar ciertos grupos, uno de ellos es el formado por las especies *A. rutila*, *Amazilia yucatanensis* y *Amazilia tzacatl*, con registros de hibridación en Centroamérica (Weller y Schuchmann 1999). Estas tres especies no solo comparten una estrecha relación filogenética, sino un importante solapamiento de distribución geográfica y de hábitat (Fig.1), en este estudio se pretende contribuir al esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre *A. rutila*, *A. yucatanensis* y *A. tzacatl*, utilizando como grupo externo otras esmeraldas .

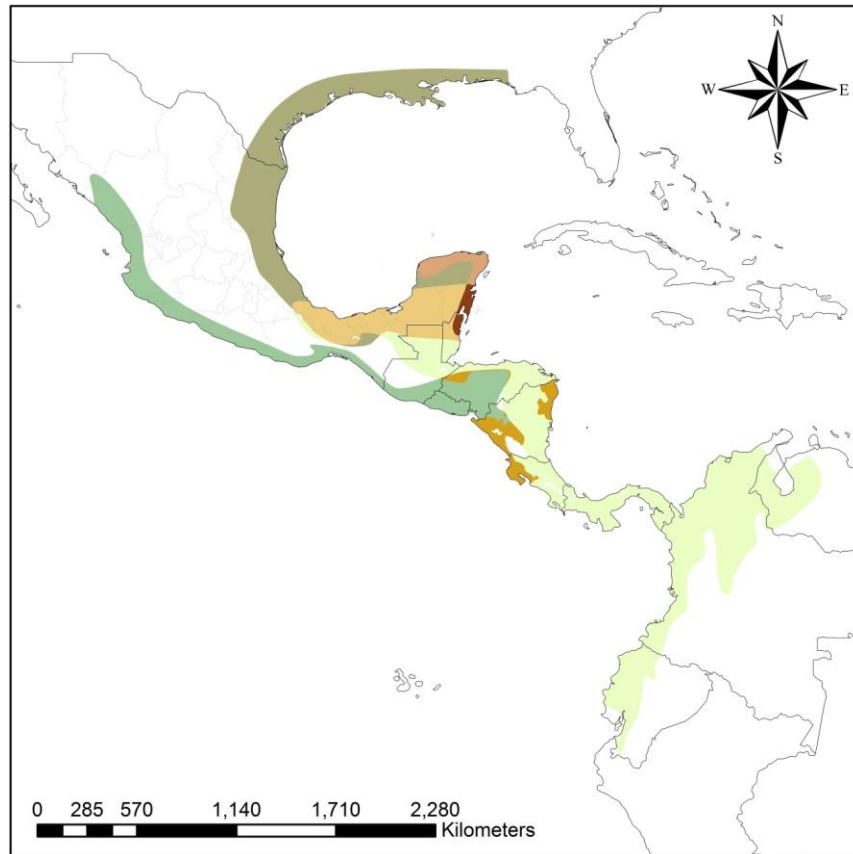


Fig. 1 Relaciones espaciales de tres especies del género *Amazilia*. ■ *A. rutila*, *A. yucatanensis*, y *A. tzacatl* ■ *A. rutila*-*A. yucatanensis*
■ *A. rutila*-*A. tzacatl* ■ *A. tzacatl*-*A. yucatanensis* ■ *A. rutila* ■ *A. yucatanensis* ■ *A. tzacatl*.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Trochilidae

La familia Trochilidae, mejor conocida como la familia de los colibríes (Apodiformes: Apodidae, Hemiprocnidae, Trochilidae), es endémica del continente americano y es considerada la segunda familia más diversa de América y la cuarta del mundo (Ornelas 1996). Varios estudios han sido enfocados en describir las causas de esta diversidad así como las relaciones filogenéticas de los distintos grupos (Bleiweis 1997,1998,McGuire *et. al* 2007,2008). Mediante el uso de caracteres moleculares y datos paleontológicos, se ha propuesto que la familia surgió en el Mioceno, periodo en el cual los colibríes tuvieron una amplia radiación debido a diversas causas, entre las cuales destacan: los cambios de clima, la formación de nuevas orogenias en Norte y Sudamérica y la coadaptación con las plantas debido a sus hábitos nectarívoros. Lo que resultó en el aislamiento de muchas poblaciones de colibríes, favoreciendo la especiación y la coexistencia entre ellas. Los puntos más importantes de distintos autores que han realizado estudios en taxonomía e historia biogeográfica de la familia Trochilidae son los siguientes:

- a) Divisiones informales con base en caracteres morfológicos, conductuales y moleculares: mangos, coquetas, esmeraldas, gemas de montaña, brillantes, abejas, topazas, ermitaños y Patagona (Bleiweiss *et al.*1994, 1997,Schuchmann 1999 y McGuire *et al.* 2007).
- b) Oficialmente se reconocen dos subfamilias en las que se ha dividido la familia Trochilidae: Trochilinae (no-ermitaños) y Phaethornithinae (Ermitaños) (Gould 1861, Ridgway 1911, AOU 1998), aunque la monofilia de familia Trochilidae está comprobada, se ha sugerido que probablemente las subfamilias sean polifiléticas (Bleiweiss *et al.* 1994, 1997 y McGuire *et al.* 2007), por lo que algunos autores han hecho propuestas de clasificación de las subfamilias de Trochilidae, dichas propuestas se citan a continuación: Schuchmann (1999) propone agregar dos subfamilias Doryferinae (género *Androdon* y *Doryfera*) con base en musculatura del cuello y estructura del canto, y Lophonitinae (Coquetas y Thorntails) por el desarrollo del opérculo nasal y las primarias. McGuire *et al.* (2007) con caracteres de genes mitocondriales y nucleares sostiene que el uso de la subfamilia Trochilinae es inadecuado, debido a que probablemente se trate de un grupo polifilético, pues las especies *Florisuga mellivora* (Jacobino cuello blanco) y *Topaza pella* (Topacio carmesí) se

encontraron en un clado basal que sostiene a los Ermitaños, y a los demás clados que pertenecen a la subfamilia Trochilinae. En 2008 (McGuire) basándose en sus estudios anteriores propone una taxonomía filogenética flexible a futuras aportaciones, ya que, varias relaciones filogenéticas están aún sin resolver, en primera instancia propone cambiar el nombre de la familia a Pantrochilidae el cual señala como un nombre más inclusivo, pues contendría a los registros fósiles de colibríes y a las especies vivas que actualmente pertenecen a la familia Trochilidae. En segundo lugar propone mantener a la subfamilia Phaetornithinae, pero reserva el uso de la subfamilia Trochilinae, ya que, su monofilia aún no está comprobada. Tercero sugiere ocho grupos que pueden ser tratados como tribus bajo el sistema de clasificación Linneano (Tabla 1)

Tabla. 1 Propuesta taxonómica filogenética (McGuire 2008)

Tribus	Descripción
Florisugini	Géneros: <i>Florisuga</i> y <i>Topozae</i> así como, las especies hermanas que se descubran a las descritas actualmente.
Polytmini	Incluye a las especies agrupadas informalmente como “Mangos”.
Lesbiini	Incluye a las especies agrupadas informalmente como “Coquetas”.
Coeligenini	Incluye a las especies agrupadas informalmente como “Brillantes”.
Patagonini	Incluye a la especie <i>Patagona gigas peruviana</i> .
Lampornithini	Incluye a las especies agrupadas informalmente como “Gemas de montaña”.
Mellisugini	Incluye a las especies agrupadas informalmente como “Abejas”.
Trochilini	Incluye a las especies agrupadas informalmente como “Esmeraldas”.

- c) Los colibríes se originaron en tierras bajas de Sudamérica (Bleiweis 1998, McGuire *et al.* 2007) afirmación sustentada por: siete de los nueve clados de colibríes incluyendo seis basales se originaron en Tierras Bajas de Sudamérica, el ancestro común de los tres clados más basales de colibríes Topazas, Ermitaños (Hermits) y Mangos (Mangoes), probablemente tenía una distribución de tierras bajas. Posiblemente sólo Gemas de

Montaña (Mountain Gems) y Abejas (Bees) surgieron en tierras altas (McGuire *et al.* 2007).

- d) La radiación de especies de colibríes en su mayoría fue por una invasión de Sur a Norte en el continente americano, por lo que los taxa de Centroamérica, Norteamérica y el Caribe tienen una colonización reciente (Bleiweis 1998 y McGuire *et al.* 2007). Sin embargo, los estudios de McGuire se contrastan con los de Bleiweis, debido a que el clado formado por Coquetas y Brillantes comparten un ancestro común que habría surgido en tierras altas.
- e) A pesar de su origen en Tierras bajas la mayor parte de la diversidad de la familia está relacionada con la distribución de tierras altas (alrededor de los 2000 msnm) (Bleiweis 1998, Altshuler *et al.* 2004, McGuire *et al.* 2007, Parra *et al.* 2011).

1.1.2 Género *Amazilia*

El género *Amazilia* se encuentra dentro del grupo de colibríes “Esmeraldas” el cual fue postulado con base en características del músculo cervical, patrones de vuelo únicos en machos, patrones de coloración del plumaje y estructura del nido, y ha sido sustentado por análisis genéticos incluso proponiéndole una subfamilia (McGuire *et al.* 2008). El género *Amazilia* cuenta con 30 a 32 especies (AOU 1998) y existen fuertes evidencias de que se trata de un género polifilético, Weller (1998, 2000) y Schuchmann (1999), recuperan algunos grupos y proponen una clasificación en cuatro géneros menos inclusivos: *Agyrtria* (Reichenbach 1854), *Amazilia* (Lesson 1843), *Polyerata* (Heine 1863) y *Saucerottia* (Bonaparte, 1850). El reordenamiento hecho basándose en características morfológicas como coloración del plumaje y análisis biogeográficos se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2. Reordenamiento del género *Amazilia* (Weller 1998, 2000 y Schuchmann 1999)

Género <i>Agyrtria</i> :		Género <i>Amazilia</i> :	
<i>A. leucogaster</i>	<i>A. versicolor</i>	<i>A. tzacatl</i>	<i>A. rutila</i>
<i>A. rondoniae</i>	<i>A. brevirostris</i>	<i>A. yucatanensis</i>	<i>A. castaneiventris</i>
<i>A. francaiae</i>	<i>A. candida</i>	<i>A. amazilia</i>	<i>A. alticola</i>
<i>A. cyanocephala</i>	<i>A. violiceps</i>		
<i>A. viridifrons</i>			
Género <i>Polyerata</i> :		Género <i>Saucerottia</i> :	
<i>P. fimbriata</i>	<i>P. lactea</i>	<i>S. saucerrottei</i>	<i>S. cyanifrons</i>
<i>P. amabilis</i>	<i>P. rosenbergi</i>	<i>S. edward</i>	<i>S. cyanura</i>
<i>P. boucardi</i>	<i>P. luciae</i>	<i>S. beryllina</i>	<i>S. viridigaster</i>
		<i>S. cupreicauda</i>	<i>S. tobaci</i>

McGuire *et al.* (2007, 2008) secuenció 151 especies de colibríes, entre ellas 10 pertenecen al género *Amazilia*. Con base en sus resultados realiza una pequeña crítica a la clasificación formal del género y a la descrita anteriormente con los siguientes argumentos: en sentido *sensu* estricto *Amazilia* no es monofilético. Las especies *Chysuronia onenone*, *Damophila julie* además de tres especies de *Hylocharis* (*H. cyanus*, *H. grayi* y *H. sapphirina*) y *Lepidopyga caeruleocauda*, forman parte del grupo formado por las especies de *Amazilia*. Sin embargo, no hace una propuesta taxonómica por las siguientes razones: la primera es que los ejemplares de hembras del género *Amazilia* son difíciles de identificar, lo cual probablemente esté modificando resultados, aunque los ejemplares fueron confirmados morfológicamente y molecularmente. Segundo es probable que exista hibridación, la cual es muy común en colibríes incluso entre diferentes géneros. Tercero el problema de la taxonomía de *Amazilia* es más grande que el presentado en dicho artículo por lo que se considera irresponsable pasar todas las especies a los demás géneros por lo que la reconstrucción del género necesita más estudios morfológicos y genéticos.

En dicho estudio se recupera el grupo formado por *A. rutila* y *A. tzacatl* a su vez este clado es basal del clado formado por las demás especies de *Amazilia* grupo en el que se integran las especies de otros géneros (Fig.2), esto coincide con otros estudios donde se sugiere una relación filogenética estrecha entre *A. rutila*, *A. tzacatl* y *A. yucatanensis* (Schuchmann 1999).

Debido al problema taxonómico y filogenético dentro del género, en este estudio se pretende establecer las relaciones filogenéticas entre *Amazilia rutila*, *Amazilia yucatanensis* y *Amazilia tzacatl*, pues como se mencionó anteriormente se ha postulado que presentan una relación filogenética estrecha, utilizando como grupo externo *Amazilia versicolor*, *Amazilia franciae* y *Aphantochroa cirrochloris*.

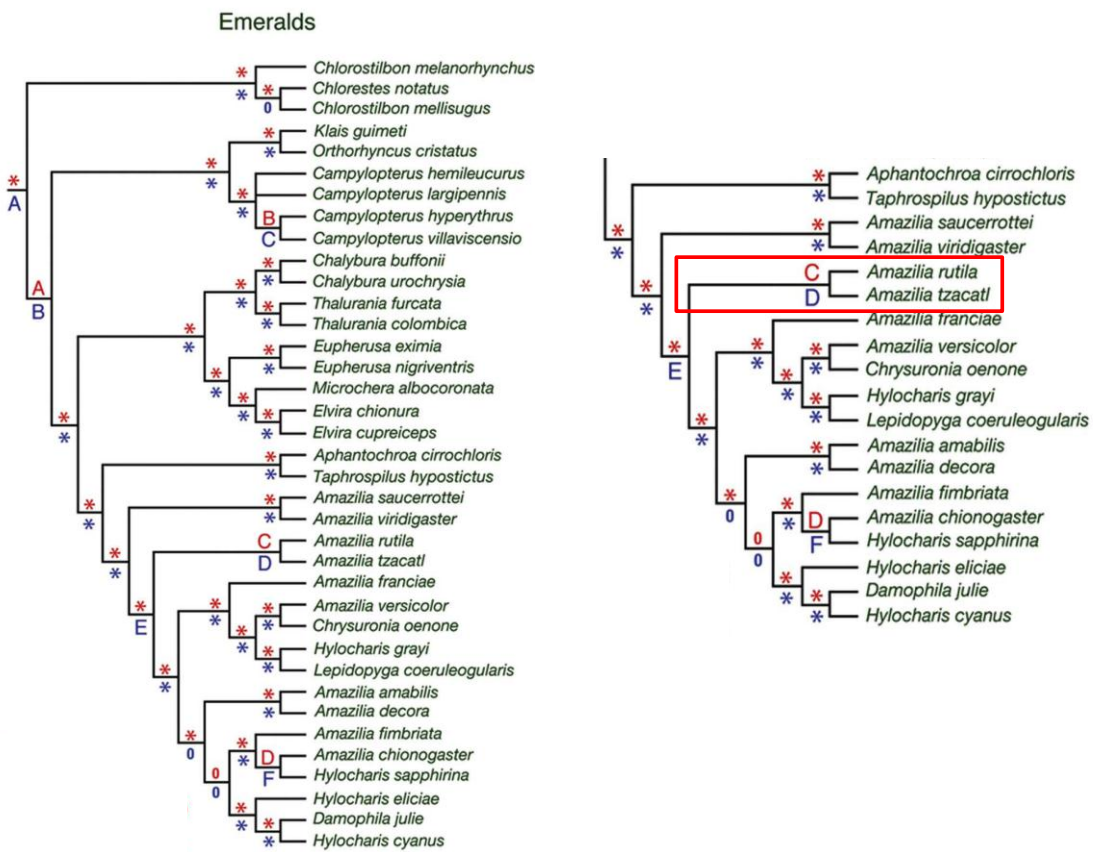


Fig. 2. Clado de "Esmeraldas" y del género *Amazilia* tomado de McGuire *et al.* 2007.

1.1.3 Generalidades de *Amazilia rutila*

Amazilia rutila (colibrí canelo) habita en los bosques tropical caducifolio a una altitud de 0 a 1600 msnm (Howell y Web 1995). Es una especie residente de México desde Sinaloa, a lo largo de la Costa del Pacífico (incluyendo las Islas Tres Marías) hasta Chiapas y en la Península de Yucatán (incluyendo las Islas Holbox, Contoy, Mujeres, e Islas Cancún y Cayo Culebra) en lo que

respecta a Centroamérica desde Belice (incluyendo “offshore cays”), en los áridos Valles interiores de Guatemala y Honduras, y en Mosquitia en el Este de Honduras a la Costa Mosquitos del Noroeste de Nicaragua y hasta el Centro de Costa Rica (Fig. 3). No se han documentado movimientos migratorios (Howell 1995, AOU 1998). Como se ha mencionado, actualmente se han descrito cuatro subespecies, con base en su morfología y biogeografía (Schuchmann 1999).

A continuación se describen las cuatro subespecies:

- *A. r. diluta* (Van Rossem 1938): En el noroeste de México, en Nayarit y Sinaloa. El plumaje inferior presenta una coloración más opaca.
- *A. r. graysoni* (Lawrence, 1866): Residente de las Islas Marías (Nayarit, México). Coloración más opaca y mayor tamaño en todos los caracteres morfométricos.
- *A. r. rutila* (Lesson, 1842): Desde Jalisco hasta Oaxaca, Yucatán hasta Honduras y oeste de Costa Rica.
- *A. r. corallirostris* (Bourcier y Mulsant, 1846): Desde el Sur de Chiapas, Yucatán y hasta Centroamérica. Plumaje inferior con coloración más intensa y en el cuello manchas blancas más conspicuas, en algunos individuos la cola presenta una coloración castaño-rojiza más intensa.

La taxonomía de *Amazilia rutila* ha cambiado a través del tiempo (Tabla 3) desde que fue descrita por primera vez por Lesson (1842) bajo el nombre de *Ornysmia cinnamomea*, posteriormente De Lattre (1843) nombra a la especie bajo el nombre de *O. rutila*, con una distribución de Jalisco a Oaxaca, Yucatán hasta Honduras y Costa Rica. En 1843 Lesson describe al género *Amazilia* adjudicando a *Ornysmia* como sinónimo y reconociendo como sinónimo el nombre *Amazilia cinnamomea* que actualmente se considera inválido. Algunas de las subespecies reconocidas en la actualidad han sido consideradas en el pasado como especies separadas: en 1846 Bourcier y Mulsant describe a *Trochilus corallisrostris*, por medio de ejemplares colectados en Escuintla, Guatemala. Posteriormente Gould (1861) nombra dicha especie como *Amazilia corallirostris* haciendo alusión a los mismos ejemplares, se describe un patrón de plumaje muy similar al de *A. rutila* pero con una intensidad de color mayor, dichas descripciones son reconocidas como un sinónimo de la subespecie *A. r. corallirostris*. Las poblaciones de las Islas Marías son descritas como una especie diferente *Amazilia graysoni* (Lawrence 1866) con

características morfológicas muy similares a *A. rutila* pero de mayor tamaño. Nelson en 1898 limita a la subespecie *Amazilia cinnamomea saturata* basándose en la intensidad del color rojizo en la parte inferior del cuerpo descrito en un ejemplar de Huehuetán, Chiapas. En 1910 Ridway describe una nueva especie *Amazilia bangsi* que corresponde a un individuo híbrido de *A. rutila* y *A. tzacatl* encontrado en el Volcán de Miravalle, Costa Rica.

Dichas variaciones taxonómicas basadas en las sutiles diferencias morfológicas, la fragmentada distribución geográfica, así como la presencia de cuatro subespecies descritas, remontan a la necesidad de esclarecer las relaciones filogenéticas de las poblaciones de *Amazilia rutila*, para lo que resulta adecuado el uso de los caracteres moleculares específicamente el ADN mitocondrial, pues se ha comprobado su eficacia en los límites de especies de diversos taxones.

Tabla 3. Historia taxonómica de *Amazilia rutila* (Lesson, 1842)

Aportación taxonómica y autor	Descripción
<i>Ornysmia cinnamomea</i> (Lesson, 1842)	Primera descripción de <i>Amazilia rutila</i> ejemplar tipo colectado en Acapulco, Guerrero. Rev. Zool. París, 5, p. 175 (Acapulco, Guerrero).
<i>Ornysmia rutila</i> (De Lattre, 1843)	Sinónimo
<i>Amazilia</i> (Lesson, 1843)	Se implementa el género <i>Amazilia</i> y se establece como sinónimo de <i>Amazilia rutila</i> , <i>Ornysmia cinnamomea</i> y <i>Ornysmia rutila</i>
<i>Trochilus corallirostris</i> (Bourcier y Mulsant, 1846) Sinónimo de <i>A. r. corallirostris</i>	Nombre de especie descrita para ejemplares de <i>Amazilia rutila</i> colectados en Escuintla, Guatemala.
<i>Amazilia graysoni</i> (Lawrence, 1866)	Nombre de especie asignada a ejemplares de <i>A. rutila</i> colectados en las Islas Marías.
<i>Amazilia cinnamomea saturata</i> (Nelson, 1898)	Huehuetán, Chiapas (sinónimo <i>A. r. corallirostris</i>)
<i>Amazilia bangsi</i> (Ridway, 1910)	Híbrido entre <i>Amazilia rutila</i> y <i>Amazilia tzacatl</i> , colectado en el Volcán de Miravalles, Costa Rica.

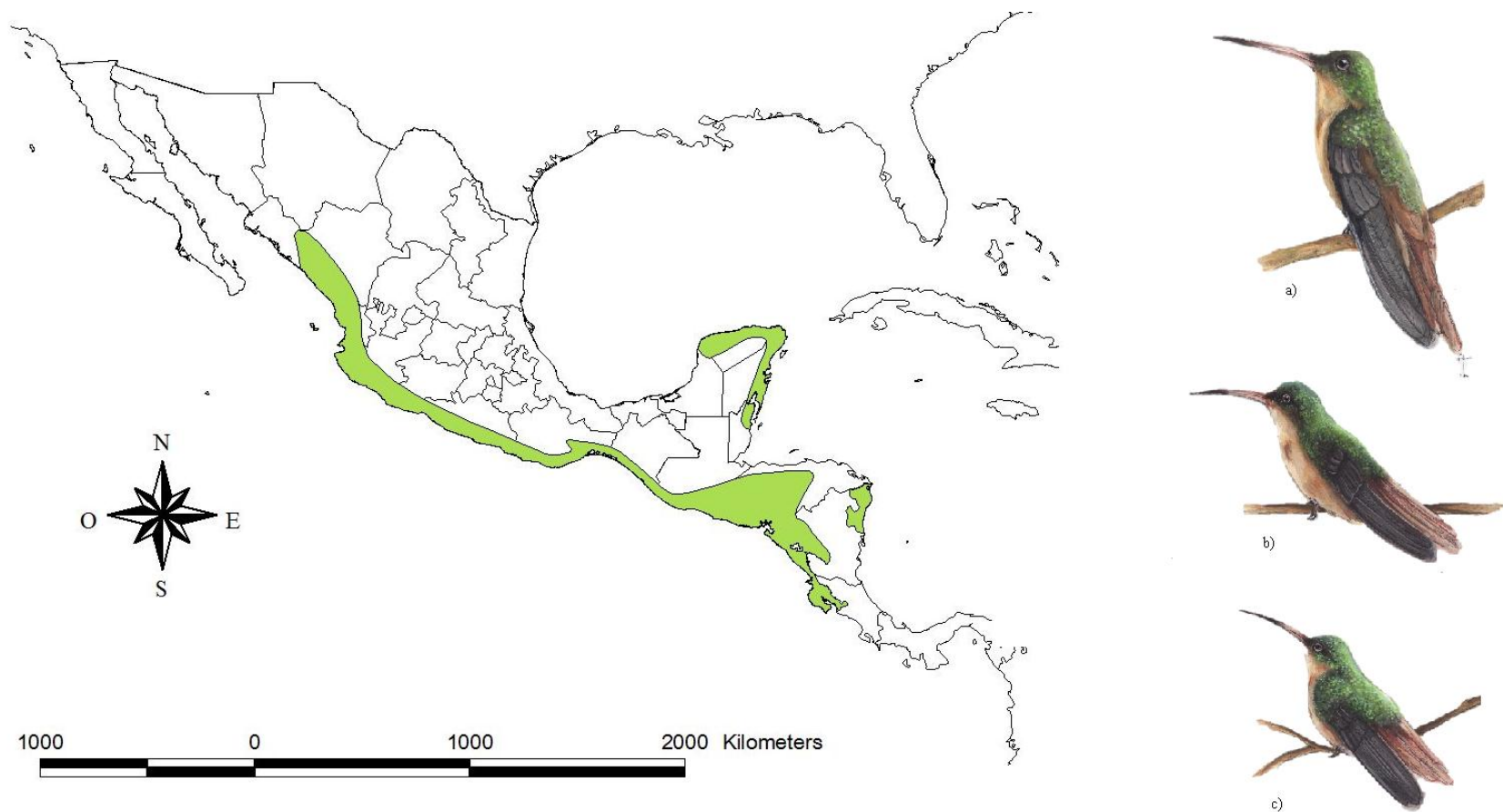


Fig.3 Distribución geográfica de *Amazilia rutila*. a) Morfotipo de Islas Tres Marías. b) Morfotipo continental. c) Morfotipo de la Península de Yucatán.

II. OBJETIVO GENERAL

Proponer una hipótesis acerca de las relaciones filogenéticas y la variación genética dentro de las poblaciones del colibrí canelo (*Amazilia rutila*) empleando marcadores moleculares.

Objetivos particulares

- a) Generar una hipótesis a de las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *A. rutila*, utilizando los genes mitocondriales: NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) y Citocromo oxidasa I (COI).
- b) Analizar la variación y estructura genética dentro y entre las poblaciones de *A. rutila*.
- c) Determinar las distancias genéticas entre los diferentes grupos obtenidos con los genes ND2 y COI.
- d) Determinar la relación entre *A. rutila*, *A. yucatanensis* y *A. tzacatl* utilizando los genes mitocondriales ND2 y COI.

III.MÉTODOS

3.1 Trabajo de laboratorio

Obtención de muestras. En este trabajo se utilizaron muestras de tejido (hígado, corazón y músculo) de un total de 69 individuos, de los cuales 57 pertenecen a la especie *Amazilia rutila* y 12 a la especie *Amazilia yucatanensis* y una de *Amazilia tzacatl*, las muestras de tejido provienen de la Colección de Tejidos del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, UNAM.

La posición geográfica de las localidades muestreadas para ambas especies se encuentran en el siguiente mapa:

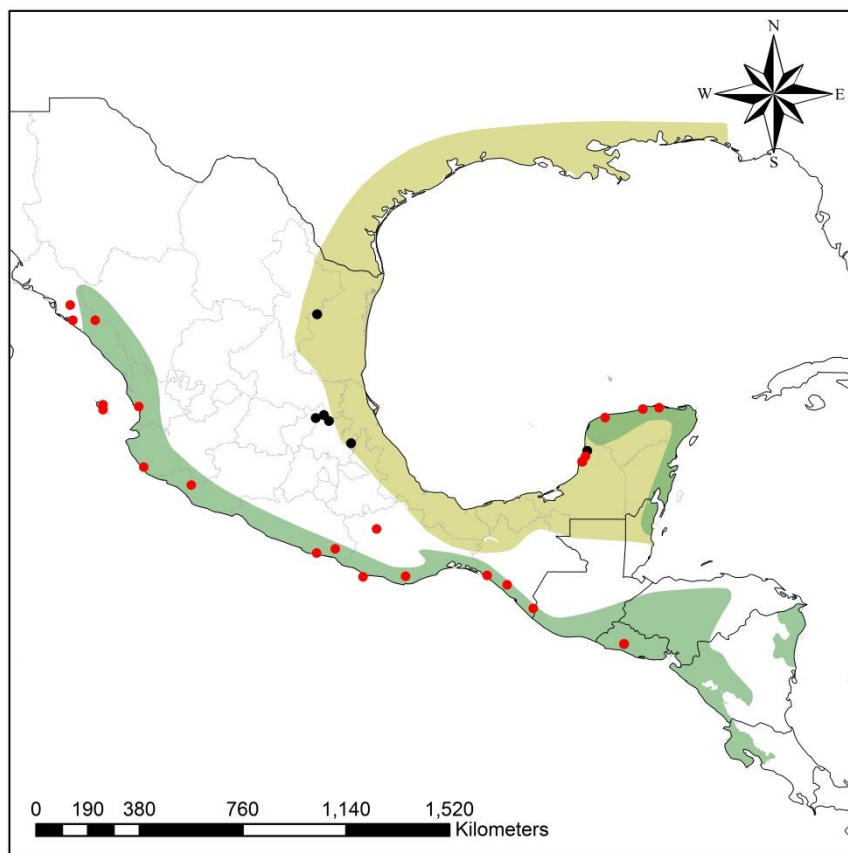


Fig. 4. Localidades muestreadas para *A. rutila* en puntos rojos y *A. yucatanensis* puntos negros.

De cada una de las muestras originales de la colección se tomó una pequeña porción la cual se colocó en tubos de 1.5 mL, para su procesamiento en el laboratorio.

Extracción de ADN. Fue realizada mediante el Kit de extracción DNeasy de Qiagen (siguiendo las especificaciones del fabricante).

También se utilizó el protocolo de extracción de ADN NaCl–Cloroformo que a continuación se detalla:

- Se colocó una pequeña porción (aprox. 50mg) de tejido en un microtubo de 1.5 ó 2.0 mL adicionando 40µL de buffer de lisis y 90µL de SDS al 10%, se homogenizó el tejido en partículas finas, apoyándose de un mortero o pistilo, se añadió 20µL de proteinasa K, incubándose a 65°C de una a tres horas, o toda la noche. Se añadió 200µL de NaCl saturado (6M). Se agitó vigorosamente por inversión durante 5 minutos (No vórtex). Se incubó en baño de hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos transfiriendo 500µL de sobrenadante en un tubo limpio.
- Posteriormente se adicionó al tubo, 350 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), agitando vigorosamente por inversión durante 5 minutos (No vórtex) para centrifugar a 14,000 rpm durante 20 minutos, por último se transfirieron 400 a 600 µL del sobrenadante a un tubo limpio.
- Después se adicionó 1000µL de etanol al 100% frío, mezclando por inversión. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos, y se decantó el etanol se adicionaron 500µL de etanol, y se agitó por inversión durante 5 minutos. Para después centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos, decantar, por último se secó el etanol (con una secadora) y disolvió el ADN con 100µL de agua o TE agitando con vórtex.

Para registrar la presencia de ADN en las extracciones se realizó una electroforesis en gel de agarosa. El gel de agarosa se preparó colocando 50µl de Buffer TBE 1X (Tris ácido bórico y EDTA), 0.5 g de agarosa, se cargó cada una de las celdas del gel con 5µl de ADN y 5µl del colorante azul de bromofenol 5X, posteriormente se aplicaron 80 voltios por 50 minutos,

concluido el tiempo, el gel fue teñido durante 20 minutos en una solución de bromuro de etidio y agua, al término de dicho tiempo se observó en Transilumindor.

Amplificación de ADN. Para amplificar el ADN se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), con el siguiente protocolo: 12.5µL de agua inyectable estéril, 2.5µL de buffer [500mM KCl, 100 mM Tris – HCl (pH 9.1) y 0.1 % Triton X-100], 2.5µL de deoxinucleótidos 10X (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.5µL de oligonucleótido 1 (10mM), 2.5 µL de oligonucleótido 2 (10mM), 2.0µL de 5mM MgCl₂, 0.2µL de amplificasa (5u/µL) y 2µL de ADN.

También se utilizó la amplificasa RedTaq[®] (Sigma-Aldrich) usando el siguiente protocolo: 13.75µL de agua inyectable estéril, 2.5µL Buffer 10X con MgCl₂, 0.5µL de deoxinucleótidos 10X (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 2.5µL de oligonucleótido 1 (10mM), 2.5µL de oligonucleótido 2 (10mM), 1.25µL RedTaq[®] (DNA polimerasa- red dye) y 2 µL de ADN.

Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados en las amplificaciones por PCR.

Oligonucleótido	Gen	Secuencia	Referencias
L5219	ND2	CCCATACCCCGAAAATGATG	Sorenson <i>et al.</i> 1999.
H6313	ND2	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	Sorenson <i>et al.</i> 1999.
L5758	ND2	GGCTGAATRGGMCTNAAYCARAC	Sorenson <i>et al.</i> 1999.
H5766	ND2	GGATGAGAAGGCTAGGATTTTKCG	Sorenson <i>et al.</i> 1999.
F1	COI	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	Chaves <i>et al.</i> 2008.
R2	COI	ACTACATGTGAGATGATTCCGAATCCAG	Chaves <i>et al.</i> 2008

La amplificación se llevó a cabo en los termocicladores (GeneAmp PCR System 9700) con los siguientes programas:

- ND2 L5219-H6313. Se desnaturalizó 94°C por 10 minutos, 30 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 30 segundos, alineamiento 54°C por 45 segundos, extensión de oligonucleótidos 72°C durante 10 minutos, cada ciclo con una extensión final de 72°C por 10 minutos.
- ND2 internos. Desnaturalización de 94°C durante 5 minutos, 5 ciclos con una desnaturalización de 94°C durante 20 segundos, alineamientos de 55°C por 10 segundos,

extensión de oligonucleótidos 72°C por 1 minuto y 10 segundos. 10 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 20 segundos, alineamiento 55°C durante 10 segundos, extensión de oligonucleótidos 72°C por 1 minuto y 10 segundos. 30 ciclos con una desnaturalización de 94°C durante 20 segundos, alineamiento 54° por 10 segundos, extensión de oligonucleótidos 72°C durante 1 minuto y 10 segundos, por último una extensión final de 72°C durante 7 minutos.

- COI. Desnaturalización de 94°C por 1 minuto, 5 ciclos con una desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, alineamiento de 45°C por 1 minuto con 30 segundos, extensión de oligonucleótidos 72°C durante 1 minuto. 30 ciclos 94°C durante 30 segundos, alineamiento de 51°C por 1 minuto y 30 segundos, por último una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Realizada la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos para corroborar que esta haya sido exitosa. El gel de agarosa se preparó colocando 50µl de Buffer TBE 1X (Tris ácido bórico y EDTA), 0.5 g de agarosa; se cargó cada una de las celdas del gel con 5µl de producto PCR y 2µl del colorante azul de bromofenol 5X; posteriormente se aplicaron 80 voltios por 50 minutos, concluido el tiempo, el gel fue teñido durante 20 minutos en una solución de bromuro de etidio y agua, concluido dicho tiempo se observó en una cámara de rayos UV.

La mayor parte de los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a la Institución High-Throughput Sequencing Solutions administrada por la Universidad de Washington, en el Departamento de Ciencias Genómicas.

Las muestras que no fueron enviadas a dicha Institución tuvieron el siguiente tratamiento: Purificación. Se realizó mediante la técnica del kit de purificación Vivid Violet (precipitante visible, marca CHIMEREX).

Secuenciación. Primero se realizó la reacción de secuencia, con el siguiente protocolo: 2µL de Big dye, 2µL de Buffer, 0.5µL de oligonucleótido, 2.5µL de agua inyectable estéril y 3µL de la purificación de productos de PCR. La amplificación se realizó en los termocicladores (GeneAmp PCR System 9700), debido a que sólo algunos productos de PCR de ND2 recibieron este tratamiento, se utilizó el programa descrito anteriormente para oligonucleótido internos de ND2.

Una vez que se obtuvo la amplificación, la limpieza se hizo utilizando el siguiente protocolo: en un tubo de 1.5µL mezclar 1µL de 3mNaOAc, 25µL ETOH y 10µL de reacción de secuencia, incubar durante 20 minutos a -20°C, centrifugar 20 minutos a 13,000rpm, enjuagar con etanol al 70% (100µL) mezclar por inversión, centrifugar a 13,000rpm por 10 minutos, decantar sobrenadante y secar. Las muestras purificadas se secuenciaron con un secuenciador modelo 310 AppliedBiosystems (Instituto de Biología UNAM).

3.2 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas de *Amazilia rutila*, *A. yucatanensis* y *A. tzacatl* se alinearon y editaron en el programa SEQUENCHER 4.8. Utilizando como referencia las siguientes secuencias *Amazilia rutila* ND2 (EU042522) y *Amazilia rutila* COI (EU442323). Una vez alineadas se convirtieron en formato fasta en un documento de texto, para poder introducir las al programa Clustal X 2.1 (Larkin, 2007) donde se realizó un alineamiento múltiple progresivo y se guardaron en formato NEXUS.

Se crearon tres matrices que se detallan a continuación:

- A) Una para el gen COI, con una secuencia de *Amazilia versicolor* (FJ027049) como grupo externo.
- B) Una para el gen ND2, con las siguientes secuencias como grupo externo: *Amazilia versicolor* (EU042525), *Amazilia franciae* (EU042521) y *Aphantochroa cirrochloris* (EU042528).
- C) Una matriz de genes concatenados (COI-ND2), donde se agregó a *Amazilia versicolor* (EU042525 - FJ027049) como grupo externo.

Las secuencias que se agregaron a las matrices y no fueron obtenidas en el laboratorio se obtuvieron de la base de secuencias GENBANK® y se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Secuencias obtenidas de la base de datos del GENBANK®

Nombre de especie	Gen	Clave de acceso	Bibliografía
<i>Amazilia rutila</i>	ND2	EU042522	McGuire <i>et al.</i> 2007
<i>Amazilia rutila</i>	COI	EU442323	Kent <i>et al.</i> 2008
<i>Amazilia tzacatl</i>	ND2	EU983391	McGuire <i>et al.</i> 2007
<i>Amazilia versicolor</i>	ND2	FJ027049	McGuire <i>et al.</i> 2007
<i>Amazilia versicolor</i>	COI	FJ027049	Kerr <i>et al.</i> 2009
<i>Amazilia franciae</i>	ND2	EU042521	McGuire <i>et al.</i> 2007
<i>Aphantochroa cirrochloris</i>	ND2	EU042528	McGuire <i>et al.</i> 2007

Se calcularon el número de sitios variables y no variables para cada una de las matrices en el programa PAUP versión 4.0 (Swofford 1999), la composición nucleotídica y la tasa promedio de transición y transversión se calculó en el programa MEGA 5.1 (Tamura *et al.* 2011).

Por medio del programa Network 4.6.0 y el algoritmo *Median Joining* se calculó la red de haplotipos (Bandelt *et al.* 1999), el número de haplotipos y sus frecuencias, para cada uno de los genes mitocondriales y los concatenados, utilizando sólo las especies *A. rutila* y *A. yucatanensis*.

Para obtener la distancia genética entre las secuencias se calculó la matriz de distancia genética en el programa PAUP versión 4.0 (Swofford 1999).

3.2.1 Análisis filogenéticos

Para las reconstrucciones filogenéticas se utilizaron tres métodos Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

El análisis de Parsimonia se realizó en el programa PAUP versión 4.0 (Swofford 1999), para cada una de las matrices, implementando las siguientes características: con un número de bootstrap de 100 y bajo el criterio de búsqueda heurística, al final de los árboles obtenidos se indicó al programa obtener un árbol consenso. Los análisis de Máxima parsimonia seleccionan una hipótesis filogenética usando el criterio de parsimonia, es decir, el menor número de pasos para obtener una hipótesis. La parsimonia es útil para secuencias de ADN de divergencia moderada, sin embargo, en el caso de secuencias con una mayor divergencia, en las cuales algunas ramas pueden

evolucionar a una tasa mayor que otras lo que hace posible que se acumulen varias homoplasias, al coincidir sustitución de nucleótidos que no tienen el mismo origen evolutivo, dando como resultado que dichas ramas se agrupen formando inferencias filogenéticas erróneas (Egan y Crandall 2006).

Dichas homoplasias pueden disminuirse en las filogenias al calcularse modelos de evolución (sustitución de nucleótidos), estos modelos tienen como idea fundamental que ciertas sustituciones son más frecuentes que otras. Para obtener los modelos de evolución de cada una de las matrices, estas fueron introducidas al programa jModeltest 0.1 (Posada, 2008), mediante el criterio de información de Akaike (AIC: Akaike 1973).

Los modelos de evolución de nucleótidos, son útiles para el uso de estadísticos que estiman filogenias, uno de estos estadísticos es el de Máxima Verosimilitud (ML) en el cual con base a un árbol con longitudes de rama y un modelo evolutivo obtiene los cálculos de probabilidades de cambio en los estados de carácter y busca la topología que muestre el mejor ajuste entre los datos y el modelo (Felsenstein 2004). Dichos análisis se realizaron en el programa Garli versión 0.951 (Zwickl 2006), con 100 réplicas de bootstrap, posteriormente se hizo el consenso de los 100 árboles en el programa PAUP 4.0 (Swofford 1999).

Otro análisis que hace uso de los modelos de evolución, es la inferencia Bayesiana, este análisis se basa en la probabilidad posterior de un árbol, es decir, la filogenia con la máxima probabilidad dado un modelo de sustitución y el alineamiento. Este análisis se realizó en el programa Mr. Bayes versión 3.0 (Huelsenbeck y Ronquist 2002), con las siguientes características: tres cadenas, una fría y dos calientes en el análisis de Cadenas de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC), durante diez millones de generaciones, y se muestreó cada 250 generaciones, el número de árboles descartados (burnin) fue del 25%.

3.2.2 Estructura y variación genética

El análisis de variación molecular (AMOVA) es útil para observar la estructura poblacional, estima la diferenciación poblacional directamente de datos moleculares, probando la hipótesis de diferenciación (Excoffier et al. 1992) este análisis se realizó para cada gen obtenido y para ambos genes sólo para las secuencias de *A. rutila* en el programa Arlequín (Excoffier et al. 2006). Para estimar el grado de diferenciación entre las poblaciones, se calcularon las F_{st} de las poblaciones y las diferencias pareadas, por medio del programa Arlequín v. 3.1 (Excoffier et al. 2006), para las poblaciones de *A. rutila*. Con el programa DnaSP v. 5 (Librado y Rozas 2009) se calculó la diversidad haplotídica (H_d), el índice diversidad nucleotídica (Π), adicionalmente se calcularon los valores de la D de Tajima. Con el fin de obtener información demográfica del complejo *A. rutila* se obtuvieron distribuciones de las diferencias entre pares de secuencias (distribuciones *mismatch*), junto con las distribuciones se calculó el índice de *raggedness* (Harpending 1994) en el programa Arlequín v 3.1 (Excoffier et al. 2006).

IV. RESULTADOS

Para el gen mitocondrial ND2 se obtuvo un total de 69 secuencias, de las cuales 56 pertenecen a *Amazilia rutila*, 12 a *Amazilia yucatanensis* y 1 para *Amazilia tzacatl*. Para el gen COI se obtuvieron 61 secuencias, 51 pertenecen a *Amazilia rutila*, 9 a *Amazilia yucatanensis* y 1 a *Amazilia tzacatl*.

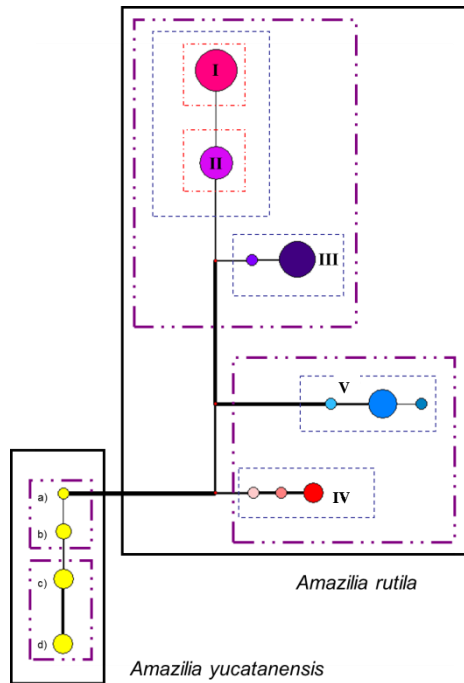
La composición nucleotídica promedio corresponde a los siguientes porcentajes T: 25.05%, C: 33.11%, A: 28.7% y G: 13.15%. La tasa promedio de transición es 22.689, y la de transversión 1.15.

Se obtuvieron 11 haplotipos para ND2 de los cuales 7 pertenecen a *A. rutila* y 4 a *A. yucatanensis*. 14 haplotipos para COI, 10 pertenecen a *A. rutila* y 4 a *A. yucatanensis* y 17 para genes concatenados 12 pertenecen a *A. rutila* y 5 a *A. yucatanensis*. En la figura 5 se observa la red de haplotipos obtenida para los dos genes mitocondriales y sus concatenados.

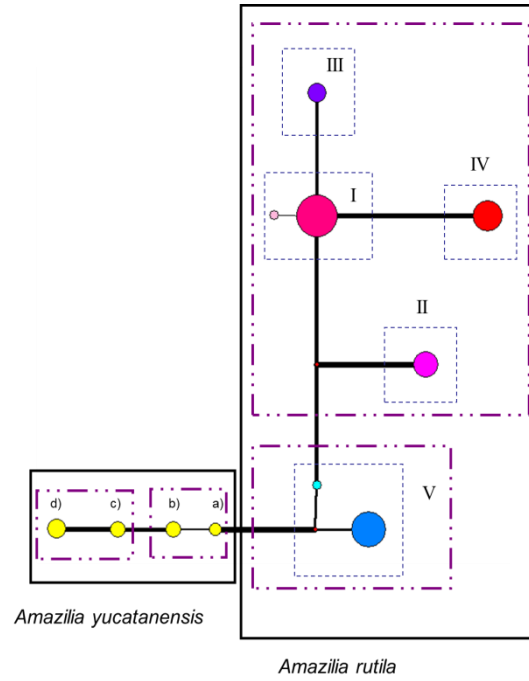
El cálculo de los sitios variables y no variables en los caracteres proporcionó los siguientes resultados: para el gen mitocondrial ND2 se obtuvo un total de 1031 caracteres, de los cuales 844 son constantes mientras que 187 son variables de estos 170 son filogenéticamente informativos. Para el gen mitocondrial COI el número total de caracteres es 570 de los cuales 465 son constantes y 105 son variables de los cuales 74 filogenéticamente informativos. Para los genes concatenados (COI-ND2) se obtuvo un total de 1601 caracteres, de los cuales 1285 son constantes y 316 variables de los cuales 224 son filogenéticamente informativos.

Las distancias genéticas obtenidas por medio de la matriz de distancia genética (Apéndice 4) se describen a continuación: se forman cinco grupos dentro de los cuales la distancia genética es equivalente al 0.0%. Estos grupos son **Pacífico-Norte**, **Islas Marías**, **Pacífico-Centro**, **Chiapas**, **Península de Yucatán-Centroamérica**. Los promedios de distancia entre los grupos son los siguientes: **Pacífico-Norte** 2.67%, **Islas Marías** 1.80%, **Pacífico-Centro** 2.58%, **Chiapas** 3.52428%, **Península de Yucatán-Centroamérica** 5.58%.

COI



ND2



GENES CONCATENADOS

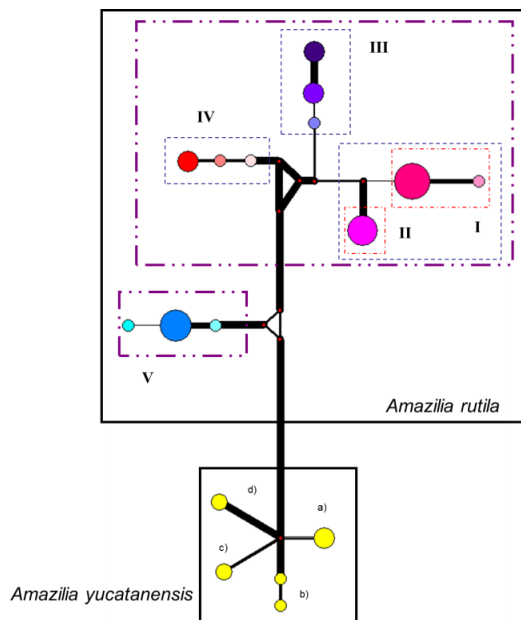


Fig. 5. Redes de haplotipos obtenidas para COI, ND2 y concatenados. **COI**. I: Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Colima. II: Islas Marías. III: Guerrero y Oaxaca. IV: Chiapas. V: Península de Yucatán y Centroamérica. a) Hidalgo. b) Tamaulipas. c) Hidalgo y Querétaro. d) Campeche. **ND2**. I: Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Colima. II: Islas Marías. III: Guerrero y Oaxaca. IV: Chiapas. V: Península de Yucatán y Centroamérica. a) Centroamérica. b) Campeche. c) Tamaulipas. d) Querétaro. **GENES CONCATENADOS**. I: Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Colima. II: Islas Marías. III: Guerrero y Oaxaca. IV: Chiapas. V: Península de Yucatán y Centroamérica. a) Campeche. b) Hidalgo. c) Tamaulipas. d) Querétaro. El tamaño de la circunferencia es proporcional a la frecuencia. El grosor de las líneas es proporcional a las mutaciones.

4.1 Análisis filogenéticos

El análisis filogenético de Máxima parsimonia (Apéndice 1) se obtuvo para las tres matrices, en las tres topologías se comparten los siguientes resultados: el grupo *A. rutila* es monofilético, *A. yucatanensis* y *A. tzacatl* forman un grupo hermano de *A. rutila*, dicho grupo es monofilético respecto a las secuencias de las demás esmeraldas. A continuación se describen los resultados obtenidos para el complejo *A. rutila* de las tres topologías obtenidas por el criterio de Máxima Parsimonia:

- a) En la topología obtenida para el gen COI dentro del complejo *A. rutila* se obtienen tres clados “mayores”: **Pacífico Norte-Centro** (bootstrap=100), **Chiapas** (bootstrap=100) y **Península de Yucatán-Centroamérica** (bootstrap=94.5). Dentro del grupo Pacífico Norte-Centro se forman dos grupos “menores” uno que agrupa a las poblaciones de Sinaloa, Nayarit, Colima y Jalisco en un solo clado y tiene como grupo hermano a las poblaciones de las Islas Marías. El segundo grupo “menor” agrupa en un solo clado las poblaciones de los estados Guerrero y Oaxaca.
- b) Para ND2 se forman dos clados “mayores”, uno que contiene toda la región del **Pacífico** (bootstrap=100), y otro que contiene la región de la **Península de Yucatán-Centroamérica** (bootstrap=100). Dentro del clado de la región del Pacífico se forman dos grupos “menores”, el primero soporta los clados de todas las poblaciones de Pacífico Norte-Centro a la vez este se subdivide en los siguientes 4 clados: un clado contiene a las poblaciones de Sinaloa y Jalisco, las poblaciones de las Islas Marías, las poblaciones de Guerrero, y las poblaciones de Nayarit, Colima y Oaxaca. El segundo grupo “menor” del Pacífico contiene a las poblaciones del estado de Chiapas.
- c) La topología de genes concatenados bajo el criterio de Máxima Parsimonia agrupa dos clados “mayores”, **Pacífico** (bootstrap=99) y **Península de Yucatán-Centroamérica** (bootstrap=100). Dentro del grupo “mayor” Pacífico se forman dos clados Pacífico Norte-Centro y Chiapas, en el clado del Pacífico Norte-Centro, se divide en tres clados: Pacífico Norte (Sinaloa, Jalisco, Nayarit y Colima), Islas Marías y Guerrero-Oaxaca.

Los resultados de los modelos evolutivos para poder realizar los análisis de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, calculados mediante el criterio de información de Akaike (AIC: Akaike 1973) son los siguientes (Tabla 6):

Tabla 6. Modelos evolutivos de sustitución nucleótidos

Gen	Modelo evolutivo
COI	TPM2uf + I
ND2	TIM 1 + G
Concatenados (COI-ND2)	TIM2 + I +G

Una vez obtenidos los modelos evolutivos se realizaron los análisis filogenéticos de Máxima Verosimilitud (Apéndice 2): se obtuvieron prácticamente las mismas topologías que las realizadas bajo el criterio de Máxima Parsimonia con valores de bootstrap mayores a 95 en la mayoría de los clados mayores obtenidos y los grupos menores que los forman.

En los análisis filogenéticos obtenidos por medio de Inferencia Bayesiana (Fig. 6 y Apéndice 3) se encontró que *A. rutila* es un grupo monofilético, que tiene como grupo hermano el clado formado por *A. yucatanensis* y *A. tzacatl*. A continuación se describen las tres topologías obtenidas por Inferencia Bayesina:

- a) En la topología obtenida para el gen COI (Apéndice 3) presenta dos clados “mayores” uno contiene a las poblaciones del **Pacífico Norte, Centro y las Islas Marías** y el otro grupo las poblaciones de **Chiapas y Península de Yucatán-Centroamérica**. El grupo Pacífico Norte-Centro e Islas Marías, está formado por tres grupos “menores”, el primero representado por las poblaciones de Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Colima, el segundo por las Islas Marías y el tercero por Guerrero y Oaxaca. El clado “mayor” Península-Centroamérica y Chiapas, está formado por dos grupos “menores”, Península de Centroamérica y Chiapas.
- b) En la topología obtenida para el gen ND2 (Apéndice 3) se presentan dos clados “mayores” **Pacífico y Península de Yucatán-Centroamérica**. El clado Pacífico se divide en tres grupos “menores”, el primero formado por las poblaciones de Sinaloa y Jalisco, el segundo por las poblaciones de las Islas Marías y el tercero por las poblaciones de Guerrero y Oaxaca, sin

embargo, con el gen ND2 no se definen en forma clara las relaciones que hay entre las poblaciones de los estados de Oaxaca, Colima y Nayarit.

- c) En la topología obtenida para genes concatenados (COI-ND2) se muestra en la figura 6 se observan dos clados “mayores” **Pacífico y Península de Yucatán-Centroamérica**. El clado Pacífico está formado por dos grupos “menores” el primero formado por las poblaciones de Sinaloa, Jalisco, Nayarit y Colima, el segundo formado por las poblaciones de las Islas Marías, el tercero por Guerrero y Oaxaca. De igual forma que las demás topologías el segundo clado “mayor” agrupa a las poblaciones de Centroamérica y la Península de Yucatán.

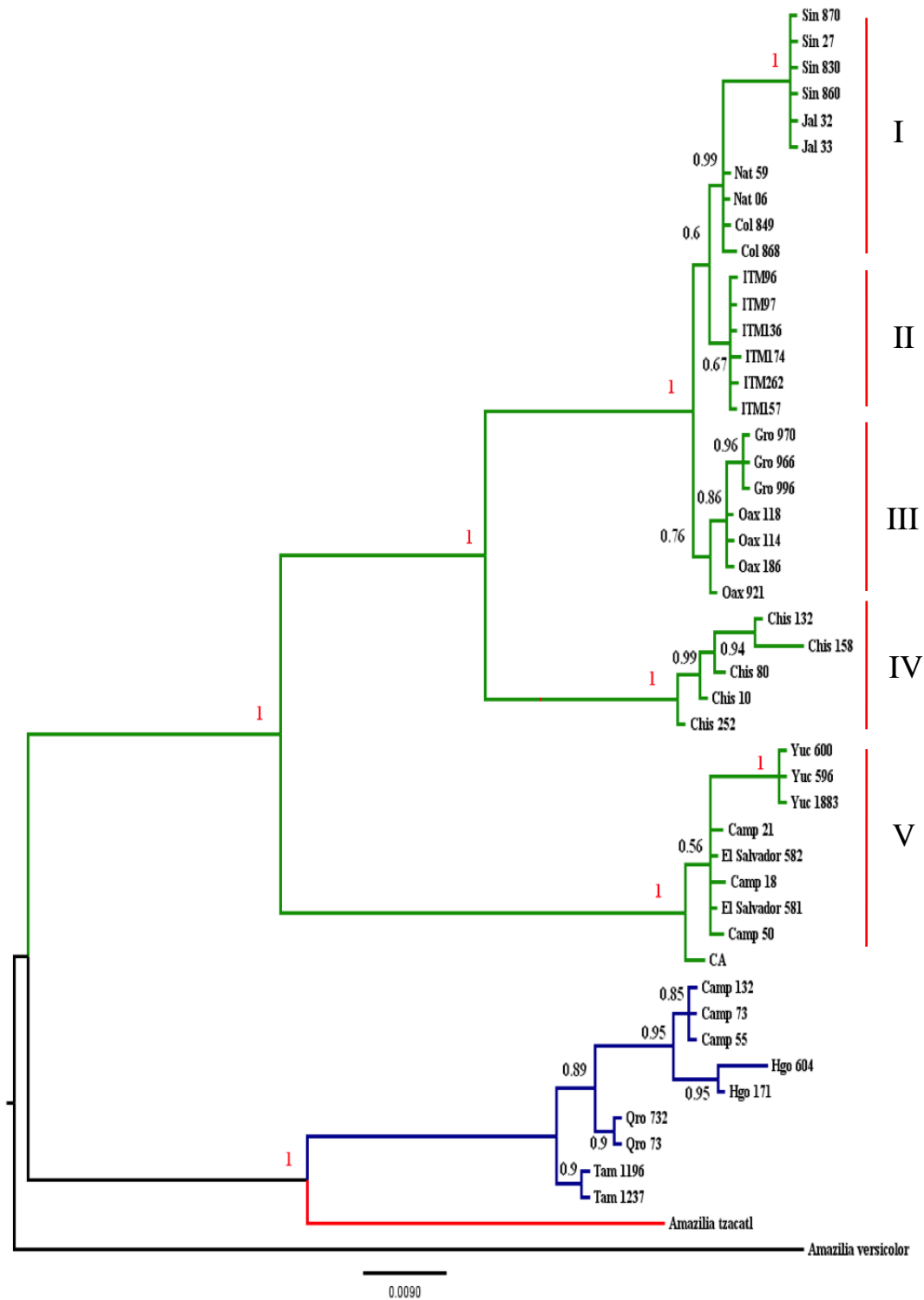


Fig. 6. Árbol obtenido por medio de Inferencia Bayesiana para genes concatenados. I: Sinaloa, Nayarit, Colima y Jalisco. II: Islas Marías. III: Guerrero y Oaxaca. IV: Chiapas. V: Campeche, Yucatán y Centroamérica. En rojo se marcan los valores de probabilidad iguales a 1. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*, negro: grupo externo.

4.2 Estructura y variación genética

En lo que respecta a los análisis de varianza molecular (AMOVA) disponibles en la tabla 7 el análisis se obtuvo para las tres matrices y en las tres se encontró que el porcentaje de variación genética es mucho mayor entre las poblaciones que dentro de las poblaciones donde es casi nulo, esto indica que las distintas poblaciones tienen poco intercambio genético entre ellas. La F_{ST} obtenida en la AMOVA es alta, pues rebasa el valor de 0.90 estos resultados indican un nivel de estructuración y diferenciación genética alta entre las poblaciones.

Tabla. 7 Análisis de Varianza Molecular AMOVA

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	10	662.067	19.870	98.72
Dentro de poblaciones	26	6.717	0.258	1.28
Total	36	668.784	20.128	
Índice de fijación	$F_{ST}: 0.98717$	Concatenados rutila		

Las distancias pareadas de F_{ST} (Tabla 8) muestran una clara diferenciación genética entre algunas poblaciones, pero en otras una diferenciación muy baja, esto coincide con las topologías obtenidas por medio de los distintos métodos filogenéticos. Poblaciones que forman un solo clado como es el caso de Colima-Jalisco, Nayarit y Sinaloa, tienen una F_{ST} entre ellas de 0.00, mientras que al compararse con otras poblaciones como Guerrero e Islas Marías, presentan valores de 1.0000 y con las demás poblaciones valores mayores a 0.9. Las poblaciones de Yucatán-Campeche y Centroamérica tienen un valor entre ellas de F_{ST} de 0.16088 y al compararse con más poblaciones presentan valores mayores a 0.9. En el caso de las poblaciones de Guerrero y Oaxaca comparten entre ellas un valor de F_{ST} de 0.03448, mientras que al compararse con otras poblaciones presentan valores que van de 0.9 a 1.0. Chiapas y las Islas Marías tienen valores de 0.9 a 1.0 al compararse con todas las poblaciones.

Tabla 8. Distancias pareadas FST (genes concatenados)

*Números en rojo: valores de FST más altos.

	Chiapas	Colima – Jalisco	Guerrero	Islas Marías	Oaxaca	Yucatán – Campeche	Centroamérica	Nayarit	Sinaloa
1	0.0000								
2	0.9781	0.0000							
3	0.9802	0.9431	0.0000						
4	0.9868	0.9416	1.0000	0.0000					
5	0.9779	0.8750	0.7647	0.9602	0.0000				
6	0.9889	0.9947	0.9967	0.9977	0.9946	0.0000			
7	0.9778	0.9851	0.9863	0.9921	0.9847	0.1130	0.0000		
8	0.97585	-0.2631	1.0000	1.0000	0.9012	0.9963	0.9820	0.0000	
9	0.9827	0.0000	1.0000	1.0000	0.9333	0.9972	0.9891	0.0000	0.0000

En la prueba de diferencias pareadas (*pairwise differences*) para ambos genes (Tabla 9), se observa que la diferencia genética entre algunas poblaciones es alta, en contraste a las diferencias dentro de las poblaciones que es baja.

Tabla 9. Distancias pareadas de poblaciones (genes concatenados)

Arriba de la diagonal: promedio de distancias pareadas entre poblaciones (PiXY). Elementos de diagonal: promedio de distancias pareadas dentro de poblaciones (PiX). Debajo de la diagonal: distancias corregidas de distancias pareadas $(PiXY - (PiX + PiY)/2)$.

	Chiapas	Colima – Jalisco	Guerrero	Islas Marías	Oaxaca	Yucatán – Campeche	Centroamérica	Nayarit	Sinaloa
1	1.400	46.450	47.200	47.200	45.950	73.200	72.200	46.200	46.200
2	45.500	0.500	5.250	3.250	4.000	75.250	74.250	0.250	0.250
3	46.500	5.000	0.000	6.000	1.250	74.000	73.000	5.000	5.000
4	46.500	3.000	6.000	0.000	4.750	74.000	73.000	3.000	3.000
5	45.000	3.500	1.000	4.500	0.500	73.250	72.250	3.750	3.750
6	72.333	74.833	73.833	73.833	72.830	0.333	1.111	75.000	75.000
7	70.500	73.000	72.000	72.000	71.000	-0.055	2.000	74.000	74.000
8	45.500	0.000	5.000	3.000	3.500	74.833	73.000	0.000	0.000
9	45.500	0.000	5.000	3.000	3.500	74.833	73.000	0.000	0.000

En los valores obtenidos de diversidad haplotídica (Hd) y diversidad nucleotídica (Pi), se encontró poca o nula variación en las poblaciones de *A. rutila* para genes concatenados (Tabla 10). Las poblaciones que mostraron valores más altos de diversidad (Hd y Pi) fueron Centroamérica, Chiapas, Jalisco-Colima y Oaxaca. Por otra parte el valor de Tajima's D sólo pudo calcularse en cinco poblaciones, la población de Yucatán-Campeche presenta un valor de Tajima's D negativo indicando una posible expansión poblacional después de un cuello de botella, los demás valores de Tajima's D obtenidos presentan valores positivos y bajos de Tajima's D asociado a niveles bajos de polimorfismo, probablemente por una disminución de población. Los valores de diversidad haplotídica (Hd) y diversidad nucleotídica (Pi) y Tajima's D fueron mayores en todo el conjunto de poblaciones, que dentro de cada una de las poblaciones, por lo tanto los niveles de polimorfismo son mayores en todo el complejo de *A. rutila* que dentro de las poblaciones.

Tabla 10. Parámetros de diversidad genética calculados para las poblaciones de *Amazilia rutila* (genes concatenados)

Localidad	Núm. de secuencias	Núm. de haplotipos	Hd(diversidad haplotípica)	Pi (diversidad nucleotídica)	Varianza de diversidad haplotípica	Tajima's D	p (valor de significancia)
Chiapas	10	3	0.622	0.00094	0.01913	0.62422	> 0.10
Jalisco-Colima	8	2	0.429	0.00032	0.02846	0.33350	>0.10
Guerrero	6	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-
Islas Mariás	12	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-
Yucatán-Campeche	12	3	0.439	0.00036	0.02498	-0.84971	>0.10
Centroamérica	6	2	0.533	0.00121	0.02963	1.1214	>0.10
Oaxaca	8	2	0.429	0.00032	0.02846	0.33350	>0.10
Sinaloa	8	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-
Nayarit	4	1	0.000	0.00000	0.00000	-	-
Todas las localidades	96	20	0.917	0.04723	0.00017	0.82192	>0.10

La gráfica de distribuciones *mismatch* del complejo *A. rutila* (fig. 7) presenta una distribución multimodal, asociada a poblaciones en equilibrio demográfico y que no han presentado una reciente expansión demográfica (Rogers y Harpending 1992, Hudson y Slatkin, 1991), el índice de *ruggednes* puede indicar una población en equilibrio demográfico y sin expansión demográfica.

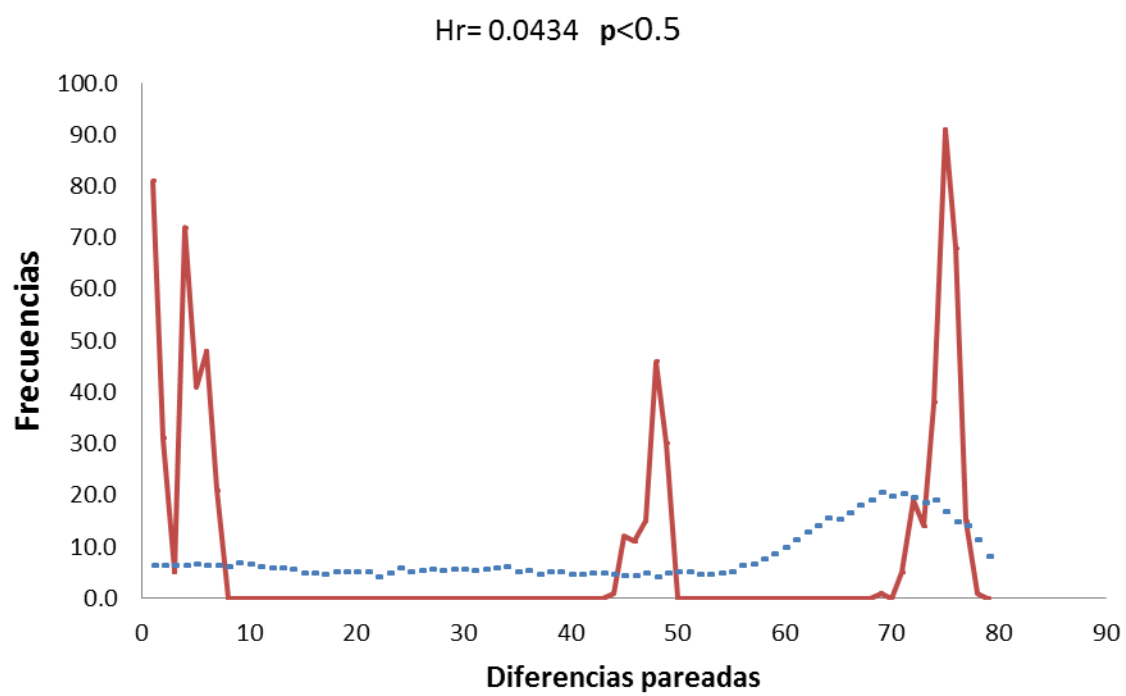


Fig. 7. Distribuciones *mismatch* obtenidas con genes concatenados en el complejo *A. rutila*. Línea continua corresponde a los valores observados, en puntos valores esperados. Hr= índice de *raggedness*. p= valor de significancia.

V. DISCUSIÓN

Los análisis de distancia genética, filogenéticos y de genética de poblaciones revelan la existencia de cinco grupos divergentes dentro del complejo *Amazilia rutila*, los cuales son consistentes con otros estudios de aves habitantes de tierra bajas mesoamericanas (Cortés *et al.* 2008, García-Deras *et al.* 2008, Vázquez-Miranda *et al.* 2009, González *et al.* 2011, Miller *et al.* 2011, Montaña 2011, Smith *et al.* 2011) y con otros vertebrados (Mulcahy *et al.* 2006, Zarza *et al.* 2008). Estos grupos divergentes muestran un patrón geográfico en la red de haplotipos obtenida (Fig. 5), este tipo de patrón se ha asociado al aislamiento por distancia debido a niveles bajos de flujo génico y a la fragmentación histórica de las poblaciones (Avice *et al.* 1987, Templeton 1995, Avice 2000). En los árboles filogenéticos se localiza a *A. rutila* como el grupo hermano del clado formado por *A. yucatanensis* y *A. tzacatl*. Las tres especies representan un grupo monofilético respecto a las demás esmeraldas utilizadas en este análisis, coincidiendo con la sistemática basada en caracteres morfológicos (Schuchmann 1999) y la filogenia molecular de la familia Trochilidae (McGuire *et al.* 2007).

La estructura geográfica y genética de las poblaciones de *A. rutila* se puede explicar con base a las barreras o discontinuidades geográficas, tal es el caso del grupo **Islas Marías**, este grupo presentó una distancia genética de 1.80%, con un haplotipo único ausente en todas las muestras del continente, valores de F_{ST} , distancias pareadas (*pairwise differences*) y diversidad nucleotídica indican poco flujo génico con sus congéneres del continente. Estos resultados son similares a otros estudios realizados en taxones con poblaciones en este archipiélago *Icterus pustulatus graysoni*, *Turdus rufopalliatus graysoni* y *Cardinalis cardinalis mariae* (Cortés *et al.* 2008, Smith *et al.* 2011, Montaña 2011). Este último con una distancia genética de 1.65%, sin embargo no se encuentra un tiempo de divergencia igual o parecido al surgimiento de las Islas Marías, por lo que es probable que estos linajes sean temporalmente más próximos a la separación geológica de las poblaciones. Las diferencias morfológicas en las poblaciones de las Islas Marías han sido históricamente descritas e incluso se le ha llegado a considerar como una especie distinta (Lawrence 1866, Navarro y Peterson 2004) y de acuerdo al AOU (1998) son una subespecie endémica (*A. r. graysoni*), cuyas diferencias son: una coloración del plumaje menos

brillante y medidas morfométricas mayores en comparación de las poblaciones continentales (Lawrence 1866, Ridway 1882, Simon 1921, AOU 1998, Navarro-Sigüenza y Peterson 2004) este patrón morfológico se ha observado en otras subespecies endémicas de aves que habitan las islas: *Turdus rufopalliatus*, *Thryothorus felix*, *Melanotis caerulescens*, *Cyananthus latirostris* e *Icterus pustulatus* (Grant 1965), y como se ha mencionado anteriormente algunos con una diferenciación genética importante. A diferencia de los complejos *I. pustulatus* y *T. rufopalliatus* la divergencia genética de las poblaciones en el complejo *A. rutila*, no sólo se mantiene entre las poblaciones insulares y continentales, sino también dentro de éstas últimas, así el grupo **Pacífico Norte** está formado por las poblaciones de Sinaloa, Nayarit y Colima-Jalisco, entre dichas poblaciones se encontraron valores bajos de FST y distancias pareadas y al compararse con las demás poblaciones los valores fueron altos lo que indica un grado de diferenciación alto en este linaje, presentó un porcentaje de distancia genética de 2.67%. Sin embargo la distancia genética obtenida entre este grupo divergente y los grupos Islas Marías y Pacífico Centro (Guerrero y Oaxaca) fue moderada: 0.23% y 0.33% respectivamente. El grupo **Pacífico Centro** se encuentra bien definido y está limitado por la provincia fisiográfica Sierra Madre del Sur, de igual forma que los linajes anteriores es posible encontrar una similitud de este grupo divergente en otros estudios de aves (Vázquez-Miranda *et al.* 2009, Smith *et al.* 2011,). Los límites genéticos del grupo **Chiapas** presentaron mayor correspondencia con los resultados y la posición geográfica de las muestras, con clados bien definidos en todos los análisis filogenéticos, obteniéndose un clado monofilético con valores de distancia genética de 3.52%, y una FST mayor a 0.9 para las muestras con localidades en el estado de Chiapas. La historia geológica de esta área geográfica se ha asociado a la presencia de linajes en otros taxones de tierras altas (Sullivan *et al.* 2000, García-Moreno *et al.* 2004, Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008) y bajas (Mulcahy *et al.* 2006, García-Deras *et al.* 2007), principalmente por la formación del Istmo de Tehuantepec entre el Plioceno medio y el tardío y las regresiones-transgresiones marinas durante el Plioceno tardío (Barber y Klicka 2010). En el estudio de filogeografía de *Campylopterus rufinucha* (Vázquez-Miranda *et al.* 2009) a pesar de la falta de reloj molecular, se asocia la divergencia de las poblaciones que habitan el este y oeste (Chiapas y Guerrero-Oaxaca respectivamente) del Istmo por medio de los valores de distancia genética 4.1% obtenidas con ADNmt (ND2 específicamente) sugiriendo dicha divergencia en el Plioceno tardío fecha relacionada con el surgimiento del Istmo de Tehuantepec, la similitud de los valores de distancia genética del grupo Chiapas encontrado en *A. rutila*, así como la coincidencia de

distribución geográfica y tipo de hábitat en ambas especies exponen la probabilidad de una asociación entre el Istmo de Tehuantepec y la separación de poblaciones de *A. rutila* que permitió su diferenciación genética y la formación de un clado monofilético. La divergencia genética de poblaciones encontrada en taxones de tierras bajas del sureste sugiere la necesidad de estudios filogeográficos posteriores donde se obtenga el reloj molecular que pueda corroborar al Istmo de Tehuantepec como una barrera geográfica importante para las tierras bajas en Mesoamérica.

La mayor distancia genética se observó en el grupo **Península de Yucatán-Centroamérica** con 5.58%, la presencia de un linaje en la Península de Yucatán coincide con otros estudios de aves como *Campylopterus curvipennis pampa* y *Cardinalis cardinalis coccineus* (González *et al.* 2011, Smith *et al.* 2011), sin embargo los valores de distancia genética de dichos estudios es moderada (0.35 en *coccineus*) respecto al encontrado en *A. rutila*, por otro lado algunas otras similitudes se comparten con algunos estudios por ejemplo los valores altos de distancia genética entre poblaciones costeras este-oeste ha sido observada en aves norteamericanas (Kerr *et al.* 2007, Toews e Irwin 2008), probablemente al poco intercambio genético provocado por la distancia geográfica y discontinuidades geológicas de las poblaciones al encontrarse en extremos del continente, otra similitud son los valores altos de FST y distancias pareadas (*pairwise differences*) ambos encontrados en *A. rutila* y *C. c. pampa*, dichos valores son característicos de poblaciones con estructura genética y bajo flujo génico con otras poblaciones. Las tres muestras de Centroamérica se agrupan dentro de este clado en los análisis filogenéticos y presentan valores de distancia genética, FST y diferencias pareadas (*pairwise differences*) similares. Esta afinidad genética del sureste mexicano con las poblaciones centroamericanas fue también encontrada en el estudio de filogeografía del colibrí *Amazilia tzacatl* también habitante de las tierras bajas de Mesoamérica (Miller *et al.* 2011). Las diferencias morfológicas descritas para las poblaciones centroamericanas son una mayor intensidad de coloración del plumaje descrito en ejemplares de Guatemala y que inicialmente se consideraron una especie aparte del complejo de *A. rutila* bajo el nombre de *Trochilus corallirostris* (Bourcier y Mulsant 1846), no obstante en este estudio el muestreo de Centroamérica es muy pequeño por lo que faltaría completarlo para poder definir su estatus en los linajes encontrados o la probable existencia de más de un linaje en Centroamérica.

Las subespecies actualmente descritas para *A. rutila* no coinciden en su totalidad con los grupos genéticamente divergentes encontrados:

El grupo **Pacífico Norte** contiene a las subespecies *diluta* y *rutila*, el grupo **Pacífico centro**: sólo contiene a la subespecie *rutila*, el grupo **Chiapas** está contenido en la subespecie *corallirostris*, el grupo **Península de Yucatán-Centroamérica** contiene a la subespecie *corallirostris*, el único grupo que coincide completamente con una subespecie es **Islas Marías** que contiene a la subespecie *graysoni*. Las diferencias entre la taxonomía actual del complejo (basados en morfología y biogeografía) y los resultados de este estudio, revelan la necesidad de ampliar los datos genéticos con genes nucleares para poder definir los linajes dentro del complejo *A. rutila* y hacer una propuesta taxonómica nueva, así como obtener un reloj molecular que ayude a interpretar la relación entre los linajes y su relación con la historia geológica de las tierras bajas. Estos estudios ayudarían a contribuir con la determinación de regiones importantes para la conservación de la diversidad biológica en las tierras bajas.

VI. CONCLUSIÓN

En este estudio se identificaron cinco grupos divergentes en el complejo *Amazilia rutila*, por medio de los análisis filogenéticos y de variación genética en los genes mitocondriales ND2 y COI. Se encontró un patrón geográfico asociado a las discontinuidades geográficas a lo largo de la distribución de *A. rutila* y el muestreo obtenido para este estudio. Al reconocerse similitudes con otros patrones geográficos encontrados por medio de caracteres genéticos en aves mesoamericanas de tierras bajas se logró asociar ciertos eventos geológicos como la formación del Istmo de Tehuantepec y las regresiones-transgresiones marinas de esa área con la existencia de los grupos Pacífico Centro y Chiapas, sin embargo la falta de un reloj molecular no permite datar el origen de ciertos grupos divergentes. La ausencia de un muestreo completo en Centroamérica limita el esclarecimiento de más linajes dentro de la distribución de *A. rutila* en dicha zona. En esta tesis se presenta el primer acercamiento a la filogenia y variación genética de las poblaciones del colibrí canelo *Amazilia rutila*. Se sugiere la continuación de este estudio con la obtención de genes nucleares y la escala temporal de la divergencia de los linajes obtenidos, estos datos contribuirán a una replantación taxonómica basada en la historia evolutiva de las poblaciones del complejo.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

American Ornithologist's Union. 1998. Check-list of North American Birds. 7a. edición. Washington D C.

Altshuler D. L., R. Dudley y A. J. McGuire 2004. Resolution of a paradox: Hummingbird flight at high elevation does not come without a cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 51: 17731-17736.

Avice J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders 1987. Intraespecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-552.

Avice J. C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge, M. A. USA.

Bandelt H. J., P. Foster y A. Röhl. 1999. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48.

Barber B. R. y J. Klicka. 2010. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proceedings of the Royal Society*. 277: 2675-2681.

Barrera-Guzmán A. O., B. Milá, L. A. Sánchez-González y A. G. Navarro-Sigüenza. 2012. Speciation in an avian complex endemic to the mountains of Middle America (*Ergaticus*, Aves: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 907-920.

Bleiweiss R., J. A. W. Kirsch y J. C. Matheus 1994. DNA hybridization evidence for subfamily structure among hummingbirds. *Auk* 111: 8-19.

Bleiweiss R., J. A. W. Kirsch y J. C. Matheus 1997. DNA hybridization evidence for the principal lineages of hummingbirds (Aves : trochilidae). *Molecular Biology and Evolution*. 14: 325 – 343.

Bleiweiss, R. 1998. Tempo and mode of hummingbird evolution. *Biological Journal of the Linnean Society* 65:63-76.

Bond J. E. y A. K. Stockman. 2008. An integrative Method for Delimiting Cohesion Species: Finding the Population-Species Interface in a Group of Californian Trapdoor Spiders with Extreme Genetic Divergence and Geographic Structuring. *Systematic Biology* 57: 628-646.

Boyce T. M., M. E. Zwick y C. F. Aquadro 1994. Mitochondrial DNA in the bark weevils: Phylogeny and evolution in the *Pissodesstrobi* species group (Coleoptera: Curculionidae). *Molecular Biology and Evolution* 11: 183 – 194.

Brown W. M., O. Pellmyr, J. N. Thompson y R. G. Harrison. 1994. Phylogeny of *Greya* (Lepidoptera: Proxidae), based on nucleotide sequence variation in mitochondrial cytochrome oxidase I and II: Congruence with morphological data. *Molecular Biology and Evolution* 11: 128 – 141.

Chaves A. V., C. L. Clozato, D.R. Lacerda, H.E.R. Sari y F.R. Santos. 2008. Molecular taxonomy of Brazilian tyrant-flycatchers (Passeriformes, Tyrannidae). *Molecular Ecology*. 8:1169- 1177.

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

Cortés-Rodríguez N., B. E. Hernández-Baños, A. G. Navarro-Sigüenza y K. E. Omland 2008. Geographic Variation And Genetic Structure In The Streak-Backed Oriole: Low Mitochondrial DNA Differentiation Reveals Recent Divergence. *The Condor* 4: 729-739.

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

Excoffier L. G. y S. Schneider. 2006. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

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

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

- Kerr C. V. K., M. Y. Stoeckle, C. J. Dove, L. A. Weigt, C. M. Francis y P. D. N. Hebert. 2007. Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology* 7: 535-543.
- García-Deras G. M., N. Cortés-Rodríguez, M. Honey, A. G. Navarro-Sigüenza, J. García-Moreno y B. E. Hernández-Baños. 2007. Phylogenetic relationships within the genus *Cyanthus* (Aves: Trochilidae), with emphasis on *C. Doubledayi*. *Zootaxa*. 1742: 61-68.
- García-Moreno J., A. G. Navarro-Sigüenza, A. Townsend P. y L. A. Sánchez-González 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 5: 368-382.
- Grant P. R. 1965. A systematic study of the terrestrial birds of the Tres Marias Islands, Mexico. *Postilla*. 90:1-106.
- González C., J. F. Ornelas y C. Gutiérrez-Rodríguez. 2011. Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennins*). *BMC Evolutionary Biology* 11:38.
- Haffer J. y G. T. Prance 2001. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana* 16: 579-605.
- Harpending H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66: 591-600
- Howell S. N. G. y S. Webb. 1995. A guide to the Birds of Mexico and Northern Central America. Oxford University Press, Oxford. Pp. 851.
- Huelsenbeck J. P. y F. Ronquist 2002. Mr. Bayes, a program for the Bayesian inference of phylogeny. v.2.0b.
- Lanteri A. A. y V. A. Confalonieri. 2002. Filogeografía: Objetivos, métodos y ejemplos. En: Llorente B. J. y J. J. Morrone (Eds.) Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. México, UNAM, pp. 185-193.

Larkin M. A., G.Blackshields, N. P.Brown, R.Chenna, P. A.McGettigan, H.McWilliam, F.Valentin, I. M.Wallace, A.Wilm,R. Lopez, J. D.Thompson, T. J.Gibson, D. G. Higgins.2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.

Librado P. and J.Rozas.2009.DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-145.

Mulcahy D. G., B. H. Morril y J. R. Mendelson 2006. Historical biogeography of lowland species of toads (*Bufo*) across the Trans-Mexican Neovolcanic Belt and the Isthmus of Tehuantepec. *Journal of Biogeography*. 33: 1889-1904.

McGuire J. A., C. C.Witt, D. L. Altshuler y J. V.Remsen Jr. 2007. Phylogenetic systematic and biogeography of hummingbirds: bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. *Systematic Biology*. 56: 5:837 – 856.

McGuire J. A., C. C. Witt, J. V. Jr. Remsen, Dudley R. y D. L. Altshuler.2008. A higher-level taxonomy for hummingbirds. *Journal Ornithology*. 150: 155-165.

Miller K. G., M. A. Kominz, J. V. Browning, J. D. Wright, G. S. Mountain, M. E. Katz, P. J. Sugarman, B. S. Cramer, N. Christie-Blick y S. F. Pekar 2005. The Phanerozoic record of global sea-level change. *Science*. 310: 1293-1298.

Miller M. J., M. J. Lelevier, E. Bermingham, J. Klicka T., P. Escalante y K. Winker.Phylogeography of the Rufous-Tailed Hummingbird (*Amazilia tzacatl*).*The Condor*. 113: 806-816.

Montaño-Rendón M. 2011. Filogeografía del zorzal dorsirrofo (*Turdus rufopalliatus*: Aves: Turdidae), con énfasis en el estatus de las poblaciones de las Islas Tres Marías. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.

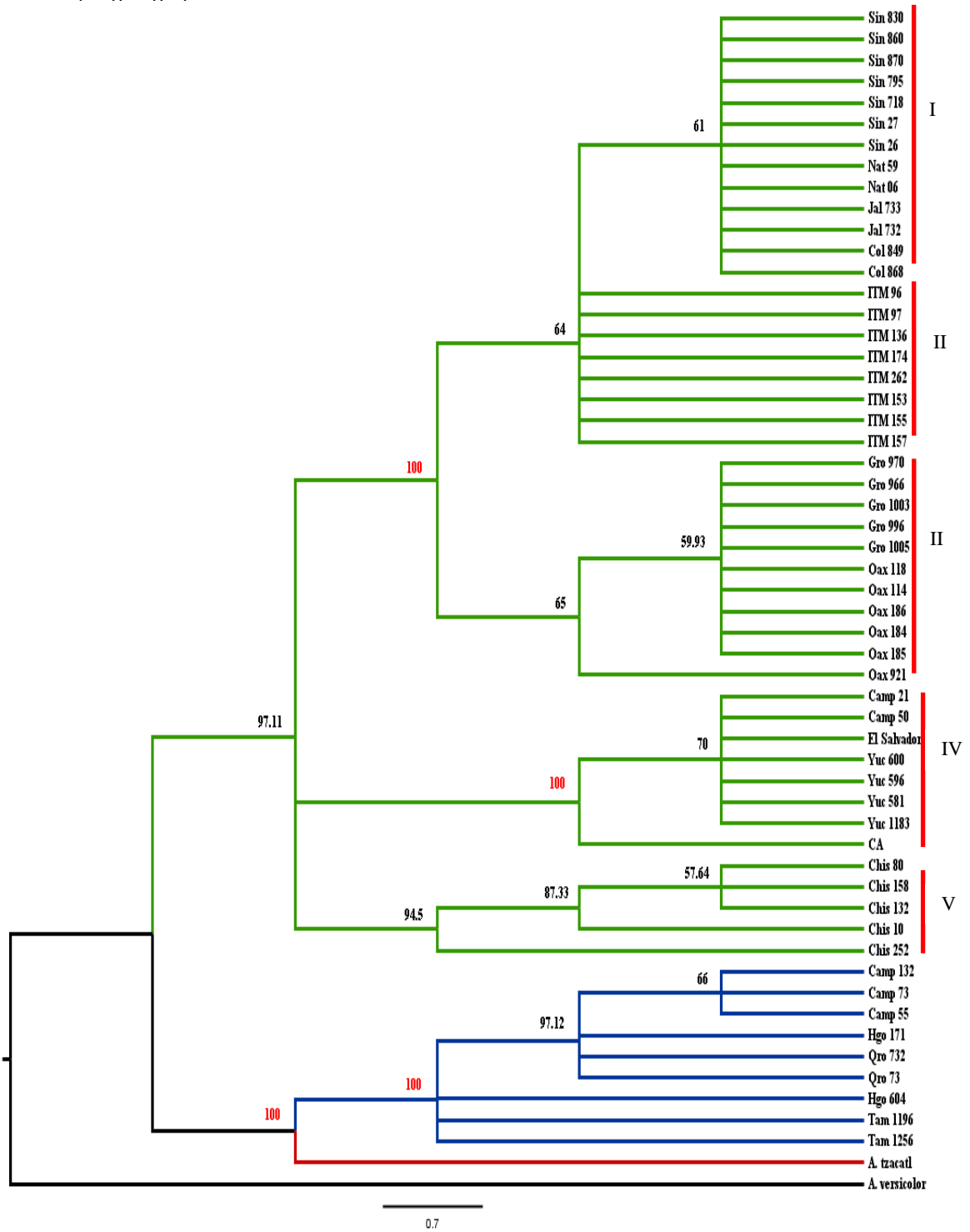
Navarro-Sigüenza A. G. y A. T. Peterson 2004. An alternative species taxonomy of the birds of Mexico. *Biota Neotropica* 4:1-32.

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

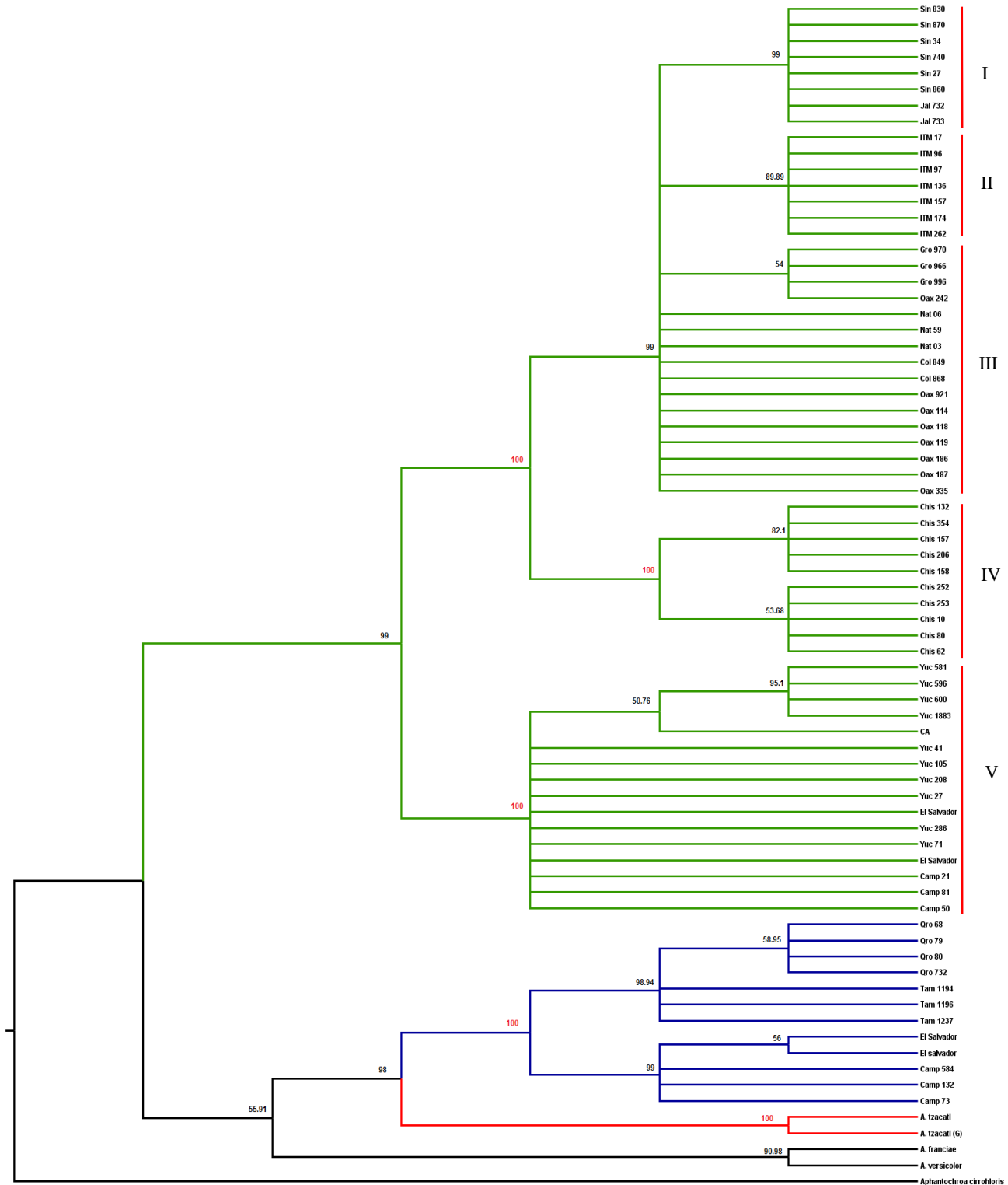
- Ornelas J. F. 1996. Origen y evolución de los colibríes. *Revista Ciencias* 42: 38-47.
- Parra J. L., C. Rahbek, J. A. McGuire y C. H. Graham. 2011. Contrasting patterns of phylogenetic assemblage structure along the elevational gradient for major hummingbird clades. *Journal of Biogeography* 12: 2350-2361.
- Pérez-Emán. 2005. Molecular phylogenetics and biogeography of the Neotropical redstarts (*Myioborus*; Aves, Parulinae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 37: 511-528.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25: 1253-1256.
- Puebla-Olivares F., E. Bonaccorso, A. Espinosa de los Monteros, K. E. Omland, J. E. Llorente-Bousquets, A. T. Peterson y A. G. Navarro-Sigüenza. 2008. Speciation in the esmerald toucanet (*Aulacorhynchus prasinus*) complex. *Auk*. 125: 39-50.
- Schuchmann K. L. 1999. Family Trochilidae (hummingbirds). En *Handbook of the birds of the world* (Eds.) del Hoyo J., A. Elliot, J. Sargatal. Barcelona: Lynx. 468-680 pp.
- Smith T. B., Escalante P., Hernández-Baños B. E., Navarro-Sigüenza A. G., Rohwer S. y Klicka J. 2011. The role of historical and contemporary processes on phylogeographic structure and genetic diversity in the Northern Cardinal *Cardinalis cardinalis*. *BMC Evolutionary Biology* 11: 136.
- Sorenson M. D. 2003. Avian mtDNA primers. < <http://people.bu.edu/MSOREN/Bird.mt.Primers.pdf> > (Marzo, 2010)
- Sullivan J., E. Arellano y D. S. Rogers. 2000. Comparative Phylogeography of Mesoamerican Highland Rodents: Concerted versus Independent Response to Past Climatic Fluctuations. *The American Society of Naturalists*. 155: 755-768.
- Swofford D. L. 1999. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Vr. 4.0 b8. Sinauer Associates. Sunderland Massachusetts.
- Tamura K., Peterson D., N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.

- Templeton A. R. 1995. Biodiversity at the molecular genetic level: experiences from disparate macroorganisms. *Biodiversity: measurement and estimation*. pp 59-64.
- Toews D. P. L. y D. E. Irwin. 2008. Cryptic speciation in a Holarctic passerine revealed by genetic and bioacoustic analyses. *Molecular Ecology*. 17: 2961-2705.
- Vázquez-Miranda H., A. G. Navarro-Sigüenza y K. E. Omland. 2009. Phylogeography of the Rufous-Naped Wren (*Campylorhynchus rufinucha*): Speciation and Hybridization in Mesoamerica. *The Auk*. 126: 765-778.
- Weir J. T. 2006. Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and Highland neotropical birds. *Evolution*. 60: 842-855.
- Weller A.-A. 2000. Biogeography, geographic variation and habitat preference in the Amazilia Hummingbird, *Amazilia amazilia* Lesson (Aves: Trochilidae), with notes on the status of *Amazilia aticola* (Gould). *Journal für Ornithologie*. 141: 93-101.
- Weller A.-A. y K.-L. Schuchmann. 1999. Geographic variation in the southern distributional range of the Rufous-tailed Hummingbird, *Amazilia tzacatl* De la Llave, 1832: A new subspecies from Nariño, southwestern Colombia. *Journal für Ornithologie*. 140: 457-466.
- Yang Liu, Y. Shi-xiong, J. Peng-zhan y G. Li-zhi. 2012. Phylogeography of *Camellia taliensis* (Theaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA: insights into evolutionary history and conservation. *BMC Evolutionary Biology*. 12: 92.
- Zarza E., V. H. Reynoso y C. B. Emerson. 2008. Diversification in the northern Neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*. 17: 3259-3275.
- Zink R. M. y G. F. Barrowclough. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*. 17: 21017-2121.
- Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

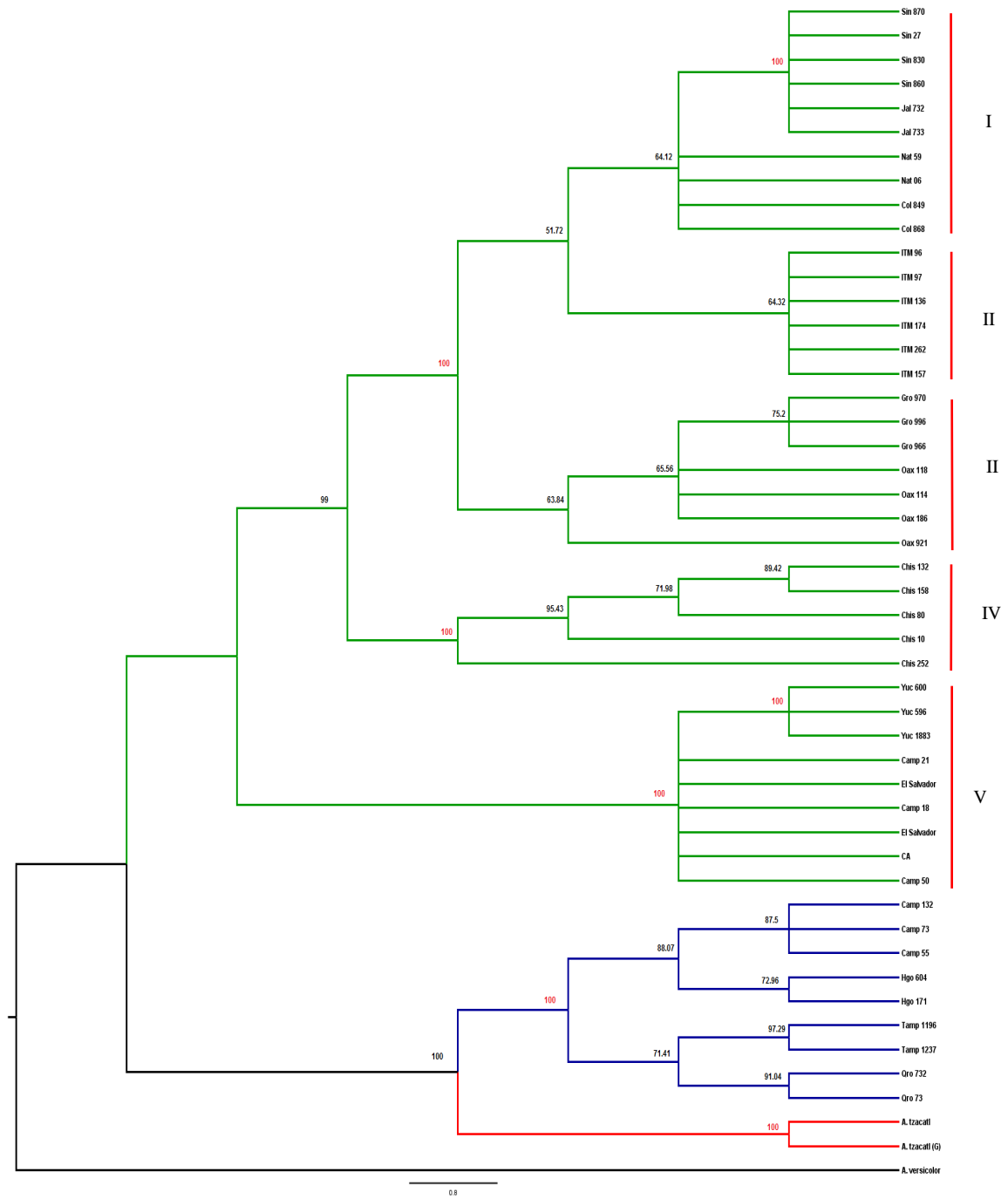
Apéndice 1.Árbol obtenido por medio del método Máxima Parsimonia, para el gen COI. I: Sinaloa, Jalisco, Colima, Nayarit. II: Islas Marías. III: Guerrero y Oaxaca. IV: Campeche, Yucatán y Centroamérica. V: Chiapas. En rojo se marcan los valores de bootstrap iguales a 100. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*, negro: grupo externo.



Apéndice 1. Continuación. Árbol obtenido por medio del método Máxima Parsimonia, para el gen ND2. I: Sinaloa y Jalisco. II: Islas Marías. III: Guerrero, Oaxaca, Colima y Nayarit. IV: Campeche, Yucatán y Centroamérica. V: Chiapas. En rojo se marcan los valores de bootstrap iguales a 100. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*, negro: grupo externo.

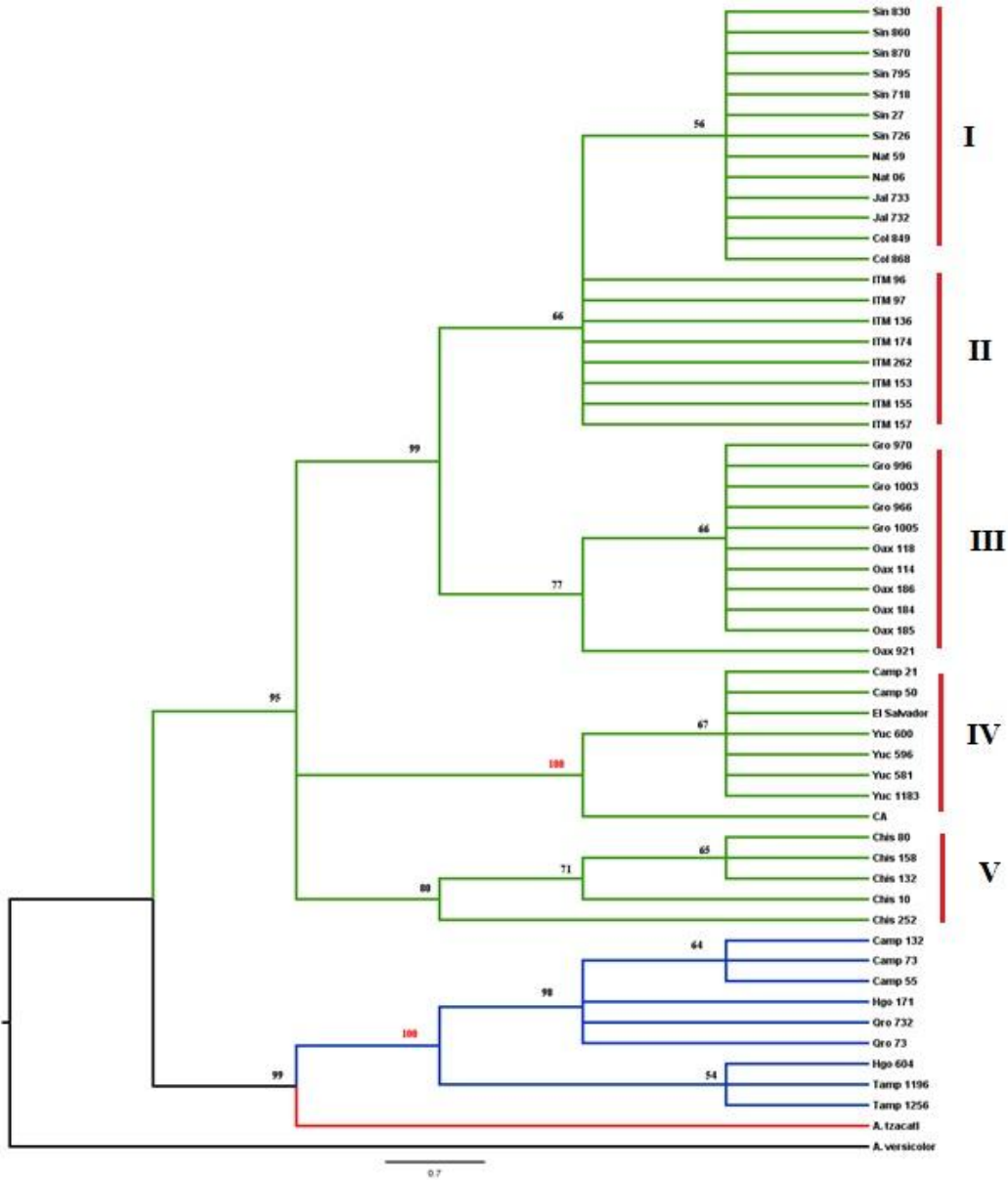


Apéndice 1. Continuación.Árbol obtenido por medio del método Máxima Parsimonia, genes concatenados. I: Sinaloa y Jalisco. II: Islas Marías. III: Guerrero, Oaxaca, Colima y Nayarit. IV: Campeche, Yucatán y Centroamérica. V: Chiapas. En rojo se marcan los valores de bootstrap iguales a 100. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*, negro: grupo externo.

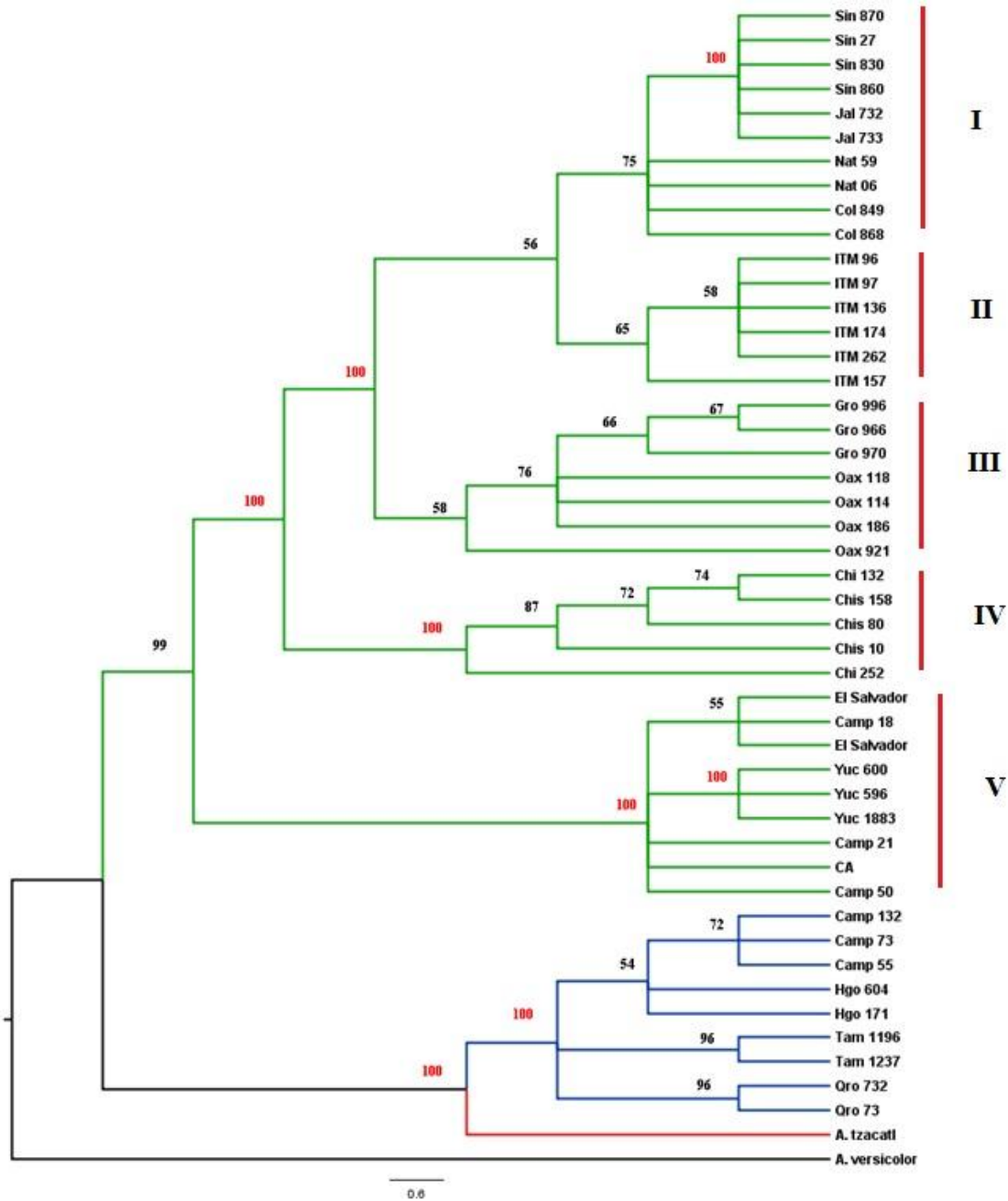


Apéndice 2.

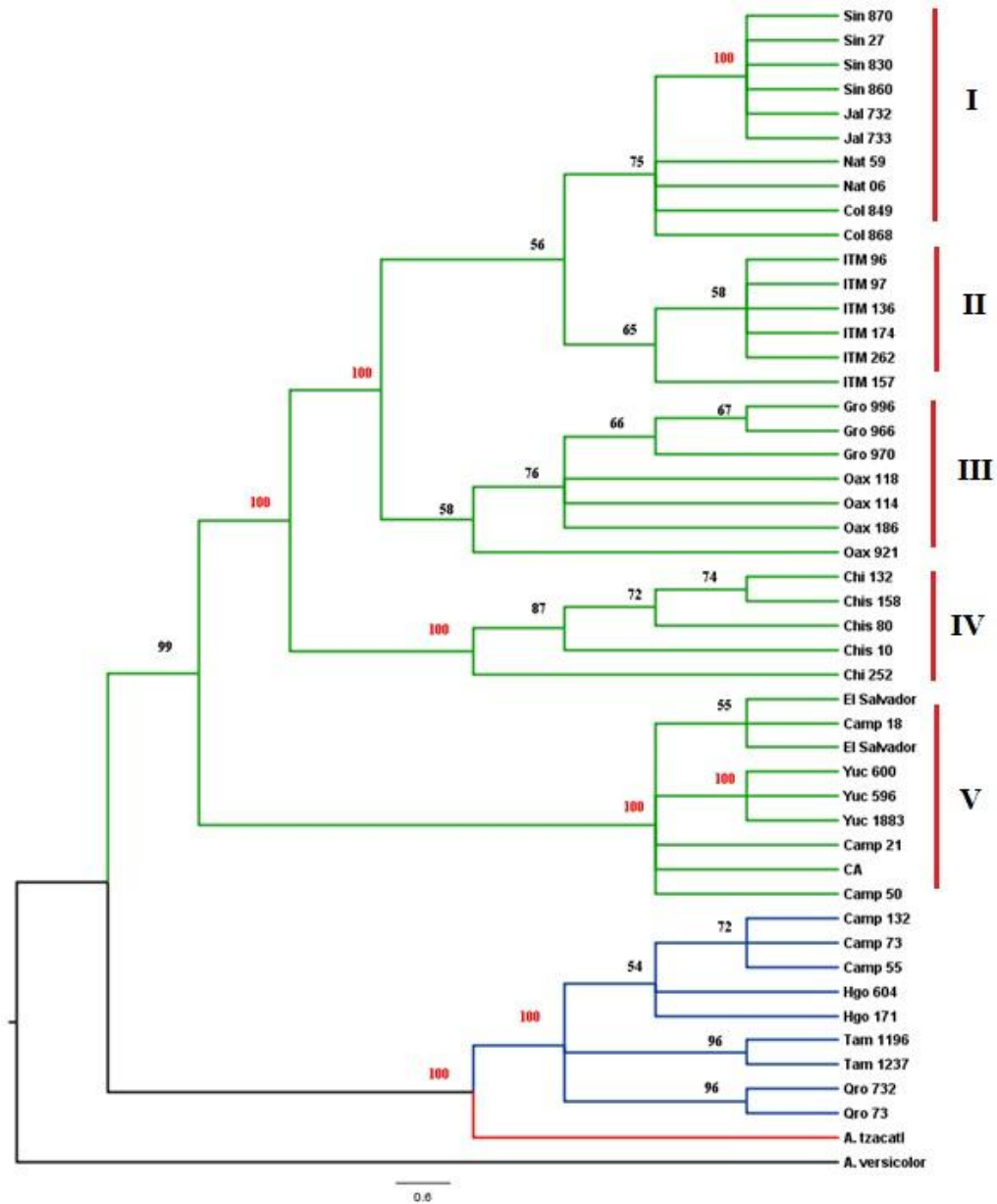
Árbol obtenido por medio del método Máxima Verosimilitud para el gen COI. I: Sinaloa y Jalisco. II: Islas Marías. III: Guerrero, Oaxaca, Colima y Nayarit. IV: Campeche, Yucatán y Centroamérica. V: Chiapas. En rojo se marcan los valores de bootstrap iguales a 100. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*, negro: grupo externo.



Apéndice 2. Continuación. Árbol obtenido por medio del método Máxima Verosimilitud para el gen ND2. I: Sinaloa y Jalisco. II: Islas Marías. III: Guerrero, Oaxaca, Colima y Nayarit. IV: Campeche, Yucatán y Centroamérica. V: Chiapas. En rojo se marcan los valores de bootstrap iguales a 100. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*, negro: grupo externo.

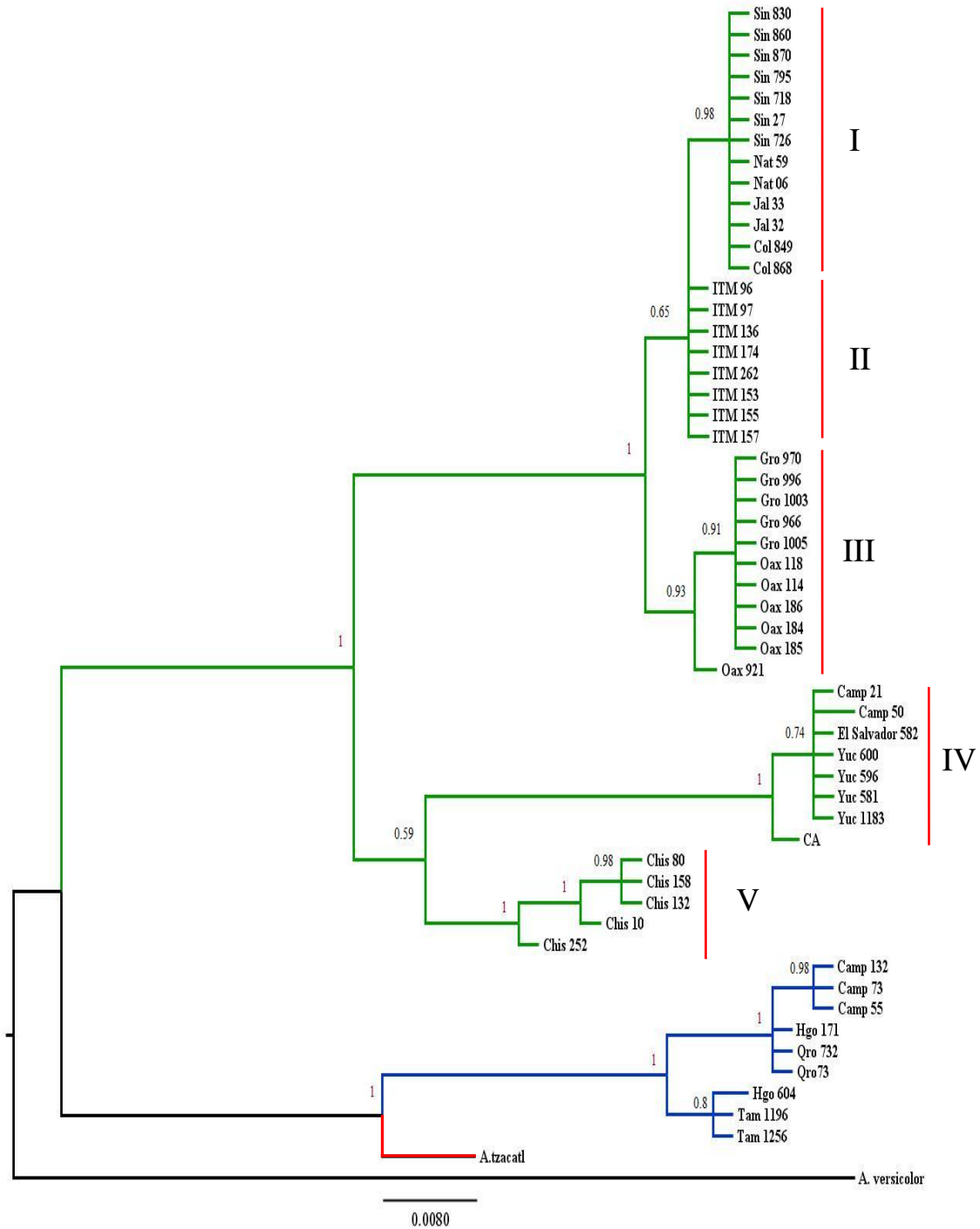


Apéndice 2. Continuación. Árbol obtenido por medio del método Máxima Verosimilitud para genes concatenados I: Sinaloa y Jalisco. II: Islas Marías. III: Guerrero, Oaxaca, Colima y Nayarit. IV: Campeche, Yucatán y Centroamérica. V: Chiapas. En rojo se marcan los valores de bootstrap iguales a 100. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*, negro: grupo externo.

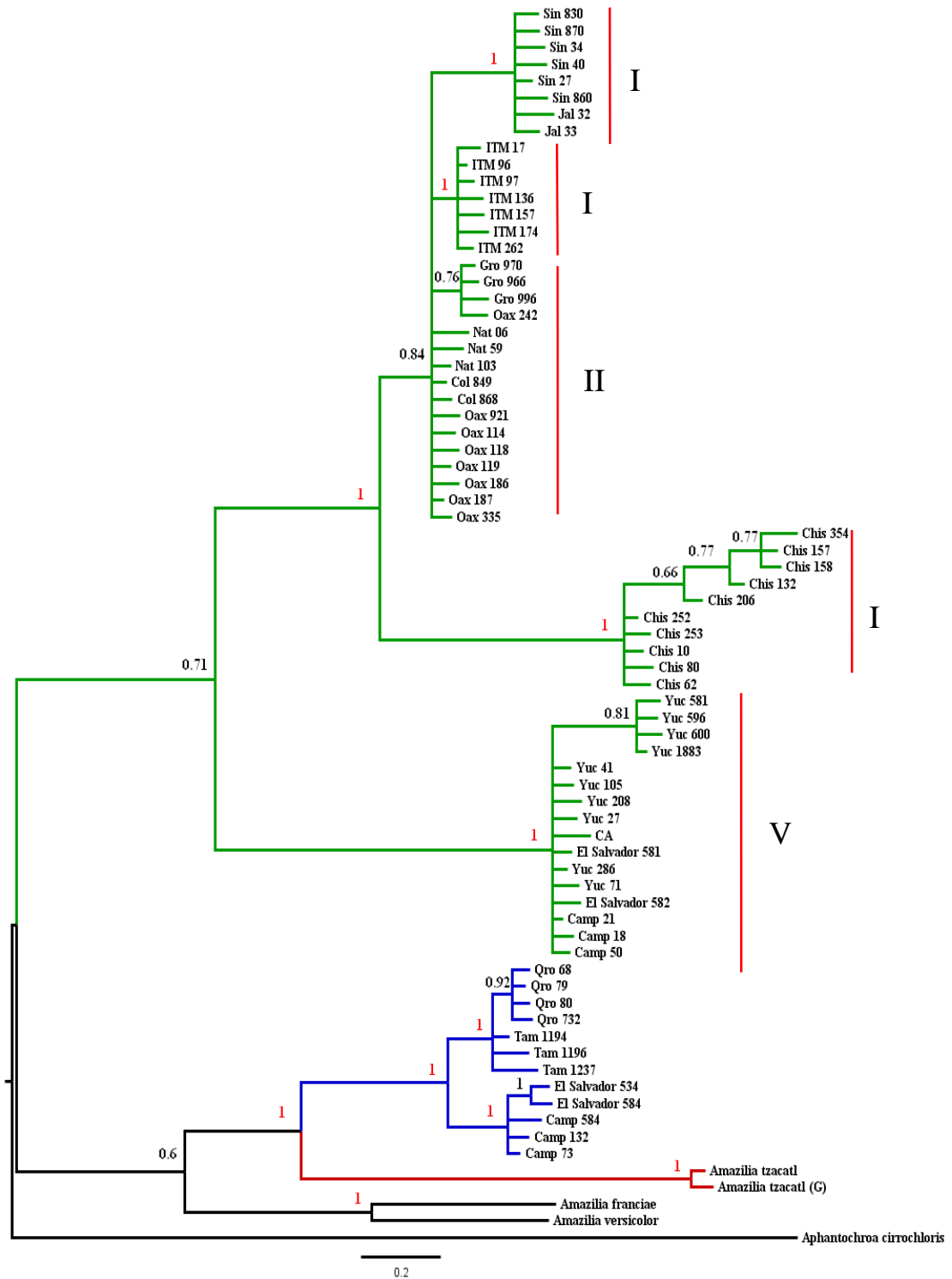


Apéndice 3.

Árbol obtenido por medio del método de Inferencia Bayesiana para el gen COI. I: Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima. II: Islas Marías. III: Guerrero y Oaxaca. IV: Campeche, Yucatán y Centroamérica. V: Chiapas. En rojo se marcan los valores de probabilidad iguales a 1. Ramas verdes: *A. rutila*, azules: *A. yucatanensis*, rojo: *A. tzacatl*. negro: grupo externo.



Apéndice 3. Continuación. Árbol obtenido por medio del método de Inferencia Bayesiana para el gen ND2. I: Sinaloa y Jalisco. II: Islas Marías. III: Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Colima. IV: Chiapas. V: Campeche, Yucatán y Centroamérica. En rojo se marcan los valores de probabilidad iguales a 1. Ramas verdes: A. rutila, azules: A. yucatanensis, rojo: A. tzacatl, negro: grupo externo.



Apéndice 5. Localidades muestreadas para *A. rutila* y *A. yucatanensis*

Catálogo	Localidad	Latitud	Longitud
B 596 B 600 B 1883	Rancho Sinkahuel, ¿? Km E Dzilam de Bravo, Yucatán.	21.46	-88.566
CHAM 07 32 CHAM 07 33	Chamela (Centro Vacacional Sección 47 SENTE), Jalisco.	19.545	-105.083
CHIS 10 CHIS 62 CHIS 80	Mpio. Pijiapan, Rancho Lluvia de Oro a 900m NW de la Ranchería Las Guadalupe, Chiapas.	15.644	-93.055
CHIS 132 CHIS 157 CHIS 158	Mpio. Tonalá, Laguna La Joya, 1.7 km E del Rancho El Vergel, Chiapas.	15.954	-93.716
CHIS 206 CHIS 252 CHIS 253	Mpio. Tuxtla Chico, Rancho El Porvenir Carretera Tapachula-Cd. Hidalgo Km 6.5, Chiapas.	14.857	-92.198
CHIS 354	Mpio. Tonalá, Laguna La Joya, 1.7 km E del Rancho El Vergel, Chiapas.	15.954	-93.716
CONACYT 849 CONACYT 868	Municipio Tepames, Las Cuevas, Colima.	18.951	-103.509
CONACYT 966 CONACYT 996 CONACYT 970 CONACYT 1003 CONACYT 1005	Mpio. San Luis Acatlán 2km NE de El Carmen, Guerrero.	16.836	-98.747
DEUT 21	Estación Biológica Hampolol, 10 km N de Campeche, Campeche.	19.899	-90.469
EAG 34	El Limón, Sinaloa.	24.916	-107.516
GMS 921	San Gabriel Mixtepec, Puerto Escondido 5km, Oaxaca.	15.906	-97.828
ITM 96 ITM 97	Isla María Magdalena, Nayarit.	21.449	-106.428
ITM 136 ITM 157 ITM 262	Isla María Madre, Nayarit.	21.609	-106.558
JK04 242	Puerto Escondido a 5 Km N, Oaxaca.	15.906	-97.828
KU 581 KU 582	El Salvador.	13.690	-89.19
OMVP 184 OMVP 185	Mpio. Putla El Amate a 1Km N del Amate 7.5Km SE de Putla, Oaxaca.	17.493	-97.378
ORT 06 ORT 59 ORT 103	Mpio. San Blas 3.5 Km N de Syngaita, Nayarit.	21.552	-105.247

PLU 114 PLU 118 PLU 119 PLU 186 PLU 187	Mpio. Pluma Hidalgo, Finca El Carmen, Oaxaca.	15.925	-96.421
SAR 7740	El Limón, Sinaloa.	24.916	-107.516
SINA 07 018 SINA 07 026 SINA 07 035	Mpio. Culiacán Club de Caza Pichigüila, Sinaloa.	24.412	-107.433
VGR 830 VGR 860 VGR 870	Cosalá, Sinaloa.	24.412	-106.690
YUC 71 YUC 105 YUC 174 YUC 181 YUC 286	Mpio. Progreso Castro, Saburas de Tzekel 16 km de Chuburná Puerto, Yucatán.	21.186	-89.816
Y 408 18 Y 408 50	Mpio Campeche, Ejido Chulbac, La Sabana, Campeche.	19.730	-90.580

Amazilia yucatanensis

Catálogo	Localidad	Latitud	Longitud
Y 408 208 Y 408 218	Anexa Chunkilin, Rancho San Salvador Mpio. Río Lagartos, Yucatán	21.509	-88.029
BEHB 73 BEHB 80	8 Km SE de Jalpan, Querétaro.	21.1733	-99.395
BEHB 604	Tenango de Doria, Hidalgo.	20.3383	-98.226
BMM 732	7 Km S de Tres Lagunas, Landa Matamoros, Querétaro.	21.276	-99.125
CONACYT 1194 CONACYT 1196 CONACYT 1256	Rancho San Pablo 3 km W Vista Hermosa, Soto la Marina, Tamaulipas.	24.616	-99.350
HGO-SLP 132	Tachich a 15 Km W, Tenabó, Campeche	20.088	-90.413
HGO-SLP 171	El Coyol, 1 Km al E, Pisaflores, Hidalgo	21.075	-98.955
KU 534 KU 584	El Salvador	13.690	-89.190
Y 408 50 Y 408 73	Mpio. Candelaria, Ejido el Pañuelo, Campeche	19.727	-90.577