



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

Variación genética y filogeográfica de las poblaciones  
mexicanas de *Basileuterus culicivorus* (Deppe, 1830)  
(Aves: Parulidae) a partir de DNAm.

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ DE JESÚS VÁZQUEZ VILLANUEVA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS**



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.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por dejarme desarrollar como profesionista.

A la Dra. Blanca Estela Hernández Baños por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por aguantar mis momentos de locura.

A los miembros del jurado: Dr. Juan José Morrone Lupi, Dr. Erik Alejandro García Trejo, Dra. Blanca Estela Hernández Baños, Dra. Angélica González Oliver y a la Dra. Livia Socorro León Paniagua. Por sus correcciones y comentarios.

A mis compañeras de laboratorio: Marisol Ramírez y Melisa Vázquez, por estar ahí siempre que las necesitaba, y porque gracias a ellas aprendí mucho de lo que ahora se en el laboratorio, porque las tardes en el laboratorio no hubieran sido las mismas sin su compañía.

A la M. en. C Luz E. Zamudio por tomarse la molestia de revisar mi trabajo.

Al Biólogo Jaime Castro Navarro, por su ayuda en la elaboración de los Mapas.

A mis compañeros y amigos de la Facultad con quien compartí los mejores momentos en la carrera que difícilmente olvidare: Luís Fernando E. “El Hoper”, Arturo Arellano “El chango”, Christian Alan, Guadalupe Roldan y Brenda Morales.

“Por ustedes amigos los que siempre estuvieron, por aquellos que se fueron, y por los que algún día pude traicionar”

## **Con mucho cariño y respeto.**

A mi Madre Eleazar Villanueva Arce por ser la persona más importante en mi vida, por su fortaleza, por enseñarme que la inteligencia viene en envase pequeño, porque me enseñó a valorar lo que tenemos, porque aguanta mis locuras, mis tropiezos, porque a pesar de todas mis tonterías siempre estará ahí para enseñarme el camino correcto, porque es y seguirá siendo la persona que más admiro en esta vida....TE AMO MADRE.

A mi padre José Luis Vázquez Vázquez que gracias a su carácter tuve herramientas para poder formar el mío, y que con el aprendí que las cosas buenas de la vida no siempre serán las mejores.

A mis Hermanas: Liliana Vázquez Villanueva, Miriam Elizabeth Vázquez Villanueva, Araceli Vázquez Villanueva, porque son un ejemplo y motivación a seguir, por soportarme tal y como soy, porque me han demostrado que la fortaleza de una mujer siempre será superior a la de un hombre, por estar ahí siempre que las necesito, por ser un pilar fundamental en mi familia, porque sé que estarán ahí en los momentos malos y en los buenos, por ser lo mejor de mi familia.

A mi hermano Luis Enrique Vázquez Villanueva, por compartir conmigo momentos que no se repetirán, por su tranquilidad y por ser un gran amigo.

A mi Tío: Salvador Villanueva Arce por su apoyo incondicional, por sus sabios consejos, por estar ahí siempre que lo necesito, por ser el mejor.

A mi abuela Ángela Arce Rosas por ayudarme a formar como persona, por sus regaños, porque a pesar de todo lo malo siempre tendrá una sonrisa para mí, por quererme y cuidarme a lo largo los años.

A mi abuelo Enrique Villanueva por darme la oportunidad de conocerlo y por enseñarme que la inteligencia no se muestra en un papel.

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN .....	1
Filogeografía.....	5
Variación Genética .....	6
2. ANTECEDENTES .....	8
3. HIPÓTESIS .....	13
4. OBJETIVOS .....	13
<b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Objetivo General.....	13
Objetivos particulares .....	13
5. MÉTODOS .....	14
Obtencion de las muestras .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Trabajo de laboratorio.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Extracción .....	14
Amplificación .....	15
Secuenciación.....	16
Edicion de secuencias.....	16
Reconstrucción filogenética .....	17
Construcción de la red haplotípica .....	18
Diferenciación genética .....	18
6. RESULTADOS .....	21
7. DISCUSIÓN .....	30
8. CONCLUSIÓN .....	37
9. BIBLIOGRAFÍA .....	38
APÉNDICE I .....	44

## RESUMEN

La variación geográfica presente en distintas especies de aves continentales constituye un escenario idóneo para analizar los procesos que determinan la distribución genealógica dentro y entre taxones cercanamente relacionados (Avise *et al.* 1987, Slatkin 1995). Las poblaciones mexicanas de *Basileuterus culicivorus* constituye un modelo que asume la presencia de linajes independientes debido a la distribución alopátrida que presenta. Se realizó un análisis con el marcador molecular ND2 para evaluar los patrones de variación geográfica, las relaciones filogenéticas presentes en las poblaciones empleando los tres criterios (MP, MV e IB), así como también pruebas demográficas y análisis genéticos. Los resultados genéticos así como las topologías resultantes sugieren límites entre las poblaciones, correspondientes a la distribución geográfica del complejo *B. culicivorus*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las especies son las unidades fundamentales para el estudio en cualquier campo de las ciencias biológicas (de Queiroz 2005), las cuales pueden presentar variaciones genéticas dentro de una misma población (Torres y Rodrigues 2010), mediante estudios ecológicos pero sobre todo los genéticos efectuados en poblaciones se ha logrado demostrar que una fuente principal de variación genética es causada por el aislamiento geográfico (Moritz 2002), estableciendo así diferencias genéticas dentro de un mismo linaje (Avice 2000).

Estas diferencias genéticas en algunos taxones han sido utilizadas para explicar cuestiones históricas y evolutivas que conducen a la especiación (Milot *et al.* 2000) todo esto se basa en el flujo génico, la dinámica poblacional, factores internos como los niveles de intercambio genético entre poblaciones hermanas (poblaciones de una misma especie separadas físicamente por barreras geográficas), así como también factores externos destacando los referentes a los cambios climáticos y geológicos (Schaal *et al.* 1998) por mencionar solo unos ejemplos.

En este contexto algunas poblaciones naturales de especies geográficamente separadas presentan diferencias fenotípicas y genotípicas, estas diferencias han sido evaluadas ya sea para establecer patrones biogeográficos (Milot *et al.* 2000, Morrone 2005) o bien para establecer eventos históricos que hayan originado esta variación. Sin embargo en muchos de los casos la evidencia fenotípica no se utiliza para establecer patrones filogeográficos ya que la mayoría de estos análisis generan datos usando solo datos moleculares, por ello, las herramientas moleculares han revolucionado el estudio de las distintas especies analizadas, sobre todo en el campo de la sistemática molecular ya que ha habido un auge importante dentro de esta área de investigación (Avice 2000).

Los primeros estudios que se realizaron en esta área fueron basados en aloenzimas (electroforesis de proteínas principalmente), seguidos por estudios

donde utilizaban secuencias de aminoácidos, hibridación de Ácido desoxirribonucleico (DNA) y sitios de restricción (Aviso 2000, Espinosa 2002), con los que se pretendía evaluar la variabilidad pero sobre todo la estructura genética de una población, sin embargo los costos y la gran cantidad de trabajo requerido para la obtención de datos necesarios para los análisis eran exorbitantes (Espinosa 2002).

En fechas recientes se han utilizado marcadores moleculares (fragmentos de secuencias de DNA que se encuentran asociados a una parte del genoma) para establecer los niveles de polimorfismo, estas herramientas han sido utilizadas en distintos campos de la biología (ecología, evolución, biomédicas, etc.), la diferencia principal entre cada marcador es que cada uno presenta distintos niveles de polimorfismo. Los marcadores moleculares varían, dependiendo de la fuente de los mismos, estos pueden ser nucleares (microsatélites, polimorfismo de nucleótido simple, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) o pertenecientes a secuencias mitocondriales (mtDNA) (Anderson *et al.* 1995). Estos han sido de gran ayuda en la investigación básica (análisis filogenético y búsqueda de genes útiles) así como también en la aplicada (selección asistida por marcador, pruebas de paternidad y elementos traza) (Piñero *et al.* 2008).

Una de las grandes ventajas de utilizar un marcador molecular en estudios de variación genética es que se puede sintetizar muchas veces un fragmento de DNA, con una técnica conocida como PCR (por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction (Espinosa 2007). esta técnica puede ser empleada en otros campos de investigación como la medicina, permitiendo identificar virus y bacterias causantes de enfermedades, y en medicina forense en la identificación de cadáveres, entre otros muchos usos (Piñero *et al.* 2008).

La elección de estos marcadores depende en gran medida de los estudios que se pretendan realizar, el tipo de herencia, la facilidad en el uso y sobre todo el costo que generará (Piñero *et al.* 2008) cada marcador estará guiado por el



modelo apropiado de mutación y los algoritmos de inferencia de los parámetros genéticos.

Hoy en día una de las técnicas capaz de satisfacer las problemáticas de costo, la facilidad en su manipulación y que esencialmente ha demostrado la eficiencia de trabajar con datos moleculares por la facilidad de analizarlos cuantitativamente en comparación a los morfológicos, es la secuenciación directa de DNA (Quinn 1997, Espinosa 2002). Gracias al desarrollo de nuevas teorías y métodos analíticos que se han utilizado en la sistemática molecular se han logrado restablecer algunas cuestiones de diversificación para varios grupos taxonómicos relacionados genéticamente, utilizando principalmente las secuencias nucleotídicas (DNA) (*e.g.* Milot *et al.* 2000, Lovette y Bermingham 2002, Torres y Rodríguez 2010, Lovette *et al.* 2010).

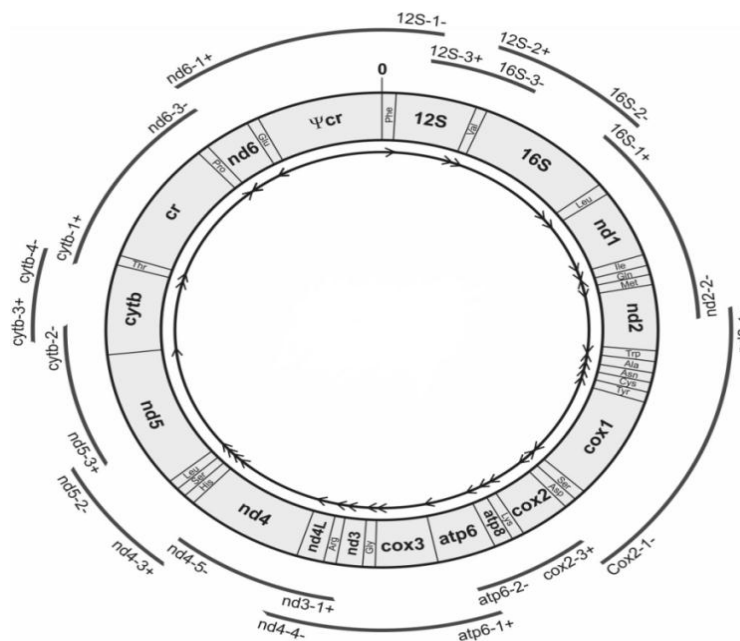
Son muchos los estudios que contemplan el uso del genoma mitocondrial (mtDNA) como principal marcador molecular para inferir el pasado evolutivo y la historia demográfica de las poblaciones o especies analizadas (Avise 2000), esto se debe a que el mtDNA en la mayoría de los vertebrados posee una de las fuentes más importantes de información evolutiva y puede utilizarse en estudios de variación geográfica o bien como se mencionó antes para la reconstrucción de la historia evolutiva de los seres vivos (Avise *et al.* 1987, Futuyma 1998, Avise 2000), así como para calcular el tiempo de divergencia entre los grupos analizados (Barber y Klicka 2010).

Algunas de las propiedades que hacen que el mtDNA sea un marcador muy utilizado en la mayoría de los estudios filogeográficos a nivel microevolutivo para gran parte de los vertebrados se enlistan a continuación (Quinn 1997, Futuyma 1998, Hwang y Kim 1999, Avise 2000):

- Esta molécula presenta un gran polimorfismo y una alta tasa de mutación por lo que evoluciona con una tasa mucho mayor a la presente en el DNA nuclear de copia única.

- Las variaciones del mtDNA en su mayoría son sustituciones nucleotídicas.
- La herencia mtDNA es casi siempre materna y normalmente no presenta recombinaciones genéticas intermoleculares.
- La mayoría de los individuos son homoplásicos para un mtDNA prevalente.

Como ya se ha mencionado este genoma ha sido utilizado en diferentes campos de la biología evolutiva por la rápida evolución que ha presentado en animales (Futuyma 1998, Avise 2000) justificando así su utilidad en escalas microevolutivas en contraparte al uso de genes nucleares. El mtDNA en el caso de los vertebrados es una molécula circular (16-20 kilobases) que contiene 37 genes que codifican 22 tRNAs, 13 proteínas específicas involucrados en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa, 2 rRNAs y una región control que inicia la replicación y la transcripción (Futuyma 1998, Avise 2000), (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema que muestra los genes componentes de la mitocondria (12s rRNA y 16s rRNA: genes que codifican el ARN ribosomal, nd1,nd2, nd3, nd4, nd5 y nd6: genes que codifican el complejo NADH deshidrogenasa, cox1, cox2 y cox3: genes que codifican el complejo de citocromo oxidasa, atp6: genes que codifican el complejo ATP-sintasa, cytb:

**genes que codifican el complejo ubiquinona-citocromo b oxido-reductasa y cr: genes pertenecientes a la región control, tomado de Haring *et al.* 2001.**

Este genoma ha generado datos que ayudan a explicar los patrones de variación individual a niveles de poblaciones, que han sido completados con análisis genéticos de mayor alcance, todo esto para tener una mayor claridad de los procesos que están actuando en la distribución geográfica de los linajes, su historia de vida y sobre todo los eventos que están llevando a la especiación (Avice *et al.* 1987, Avice 2000).

### Filogeografía

La filogeografía es una disciplina “reciente” la cual se desprende de la biogeografía, esta disciplina tiene como objetivo principal analizar los procesos que determinan la distribución de los linajes genealógicos dentro y entre taxones cercanamente emparentados (Avice *et al.* 1987, Slatkin 1995), restableciendo así linajes evolutivos a través del tiempo (Avice 2000, Cruzan y Templeton 2000, Torres y Rodrigues 2010). Desde sus orígenes la filogeografía incorpora disciplinas como la biología molecular, filogenética, genética de poblaciones, la autoecología, la demografía y la etología entre otras (Avice 2000). La filogeografía tiene como principio básico la reconstrucción filogenética, sobreponiendo en el espacio geográfico filogenias de linajes mitocondriales para localizar patrones que permitan inferir los procesos históricos y demográficos que les dieron origen (Piñero *et al.* 2008); esta disciplina puede ser utilizada en la descripción y el reconocimiento de entidades evolutivas a escalas de poblaciones o especies. Los métodos para efectuar un análisis filogeográfico varían según el objetivo principal de cada autor, que van desde la creación de topologías generadas con programas de cómputo (árboles y redes de haplotipos) y por otro lado los resultados generados a partir de las secuencias nucleotídicas utilizando diversos estadísticos que evalúan la variación genética en distintas formas, todo esto ha sido posible gracias al desarrollo de una teoría matemática y estadística de los procesos de bifurcación denominada teoría de la coalescencia (Piñero *et al.* 2008), esta teoría

a grandes rasgos hace referencia a que todos los alelos de un gen en una generación derivan o convergen hacia un único alelo ancestral de tal forma que al ver hacia atrás en el tiempo, los haplotipos de cualquier gen ya sea mitocondrial o nuclear, eventualmente convergen en un ancestro común. Por lo tanto, una de las principales aplicaciones efectuadas en los estudios filogeográficos ha sido el poder determinar el grado de estructura genética de una población a lo largo de su área de distribución (Vázquez 2007).

### Variación Genética

Es posible estudiar las poblaciones e individuos de una misma especie con patrones morfológicos y conductuales distintos debido a la variación genética presente entre ellos (Espinosa 2002, Hedrick 2005). En sentido amplio definir la variación génica es hablar de la expresión genética en forma distinta debido a la diferenciación alélica intra e interpoblacional, esta variación se ha catalogado de cuatro maneras distintas en función a su adecuación (variación de alelos letales, deletéreos o neutros, y la asociada con alelos que aumentan la adecuación de sus portadores) asimismo se pueden dividir en dos, los que analizan los rasgos cualitativos y aquellos que analizan rasgos cuantitativos (Piñero *et al.* 2008). Los factores principales que afecta la cantidad de variación genética entre las poblaciones son la selección natural, la endogamia, la deriva génica y la mutación (Futuyma 1998, Hedrick 2005).

Un componente principal de la variación genética entre las poblaciones y que actualmente ha generado datos estadísticos importantes sobre las características genéticas en una población es el flujo génico, el cual nos indica mediante números generados con estadísticos, si es que está sucediendo intercambio de genes entre poblaciones cercanamente relacionadas de manera natural. El flujo génico en estudios realizados en el pasado era considerado de poca importancia evolutiva, sin embargo ha demostrado ser un importante componente de la estructura poblacional y sus niveles determinan hasta qué grado cada población de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin

1995, Piñero *et al.* 2008). Su estudio ha sido de gran importancia en biología evolutiva, se ha visto que si se encuentra en niveles relativamente altos en especies genéticamente relacionadas, todas ellas evolucionaran conjuntamente, en contra parte al encontrarse en niveles de flujo génico bajos, las especies empezarán a divergir, esto se verá reflejado en el aislamiento reproductivo y por ende en el establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin 1994, Slatkin 1995).

Existen diferentes métodos para poder analizar y estimar la cantidad de flujo génico en una población. Por un lado tenemos los métodos directos, basados principalmente en observaciones o experimentos que miden el grado de dispersión de gametos o individuos y que tienen como objetivo la estimación de datos ecológicos y demográficos (*e.g.* Tasa de migración  $m$ ) y por otro lado tenemos a los métodos indirectos que se emplean analizando secuencias nucleotídicas, estos últimos han sido una herramienta de gran utilidad en biología evolutiva y el principio básico por el cual se rigen es observar la distribución espacial de los alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo génico (Slatkin 1995). Cabe mencionar que para los análisis generados en cualquiera de los métodos se requieren programas de cómputo que ayuden ejemplificar los resultados obtenidos.

## 2.- ANTECEDENTES

Dentro del territorio mexicano se presenta una alta diversidad biológica (Flores y Gerez 1994), producto de una combinación de variantes topográficas y climáticas, aunado a la evolución geológica, la cual ha tenido una fuerte influencia en los distintos hábitats que se han generado en el territorio (Padilla 2007). Asimismo, la ubicación geográfica de México hace que se distinga por ser el territorio de unión de dos regiones biogeográficas, la Neártica y la Neotropical, esto se ve reflejado en la evolución de especies de distinta afinidad ecológica y geográfica.

De acuerdo con puntos de vista taxonómicos recientes en México de sus casi 1200 especies de aves, cerca de 250 son endémicas (Torres y Navarro 2000), por lo que el país es reconocido como un importante centro de evolución para este grupo de vertebrados, dichos datos se pueden corroborar gracias a que existen inventarios que proporcionan información acerca de las especies que habitan no solo en el territorio mexicano, sino también en gran parte del mundo.

La historia evolutiva de las aves que habitan en México ha generado datos que abordan dos grandes hipótesis acerca del origen y diversificación de los distintos taxones presentes en el Nuevo Mundo, la primera proponen periodos de glaciaciones (eventos cíclicos) como el momento clave de la radiación de aves y otros vertebrados (Avice y Walker 1997, Webb y Bartlein 1992), y la segunda que involucra procesos geológicos como principal causa-efecto (Cracraft y Prum 1998, Morrone 2005), sin embargo estas ideas no son mutuamente excluyentes entre sí. Otros estudios sugieren que la fecha de radiación para algunos grupos de aves se centra entre el Plioceno y Pleistoceno, sobre todo para regiones de Norte América (Pérez-Emán 2005).

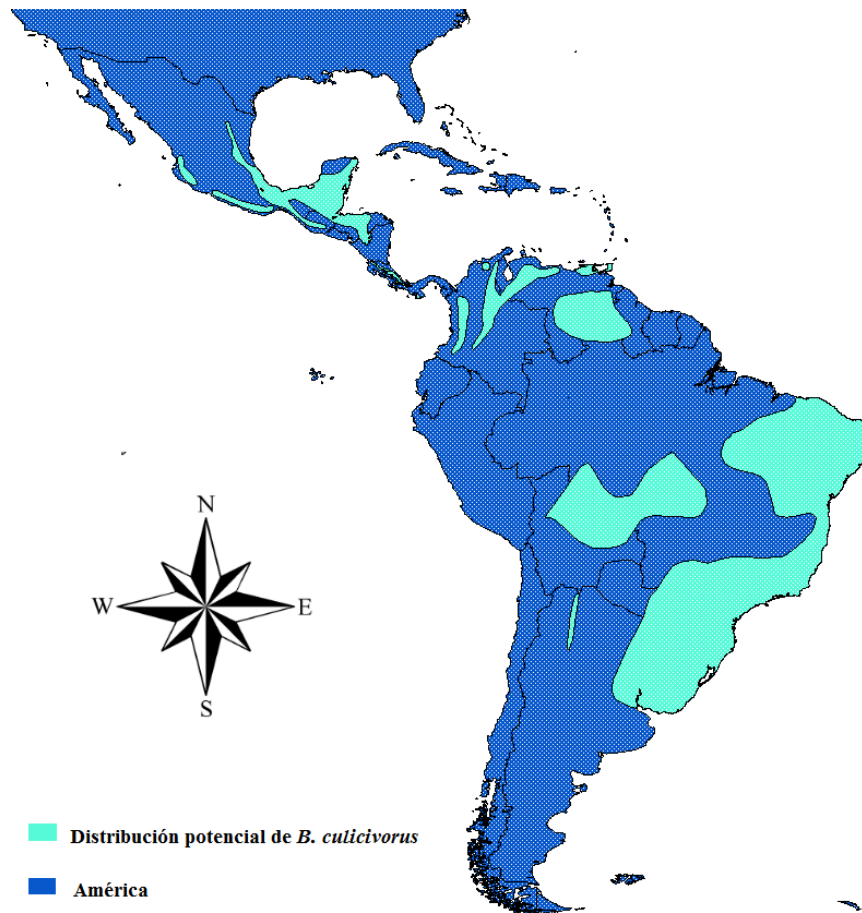
Estas propuestas difieren en el tiempo de diversificación de los taxones estudiados, por tal motivo los datos de variación geográfica y genética que se generen a futuro presentaran un avance importante para esclarecer el momento

clave de radiación no solo de aves sino de otros vertebrados (Klicka y Zink 1997, Zink y Klicka 2006).

La importancia de realizar estudios de variación geográfica utilizando marcadores moleculares en las aves, sobre todo en aquellas que se encuentran distribuidas alopátricamente aportaran evidencia de los eventos que dieron origen a la divergencia, “si es que existe”, entre las poblaciones hermanas.

Otra razón importante es que generar estudios que aporten conocimiento de la riqueza genética, la cual suponemos actúa de manera directa en los procesos evolutivos dando origen a cambios en los organismos estudiados, serán útiles no solo con fines académicos, sino también con fines de conservación.

El “arañero”, *Basileuterus culicivorus* descrita por Cabanis en 1848, pertenece a la familia Parulidae del orden Passeriformes (Stiles y Skutch 1989, AOU 2011, Spicer y Dunipace 2004), se distribuye ampliamente desde América central hasta el noreste de Argentina (Capllonch 2007), (Figura 2), forma parte de una radiación de aves pertenecientes al Nuevo Mundo (Lovette y Bermingham 2002).



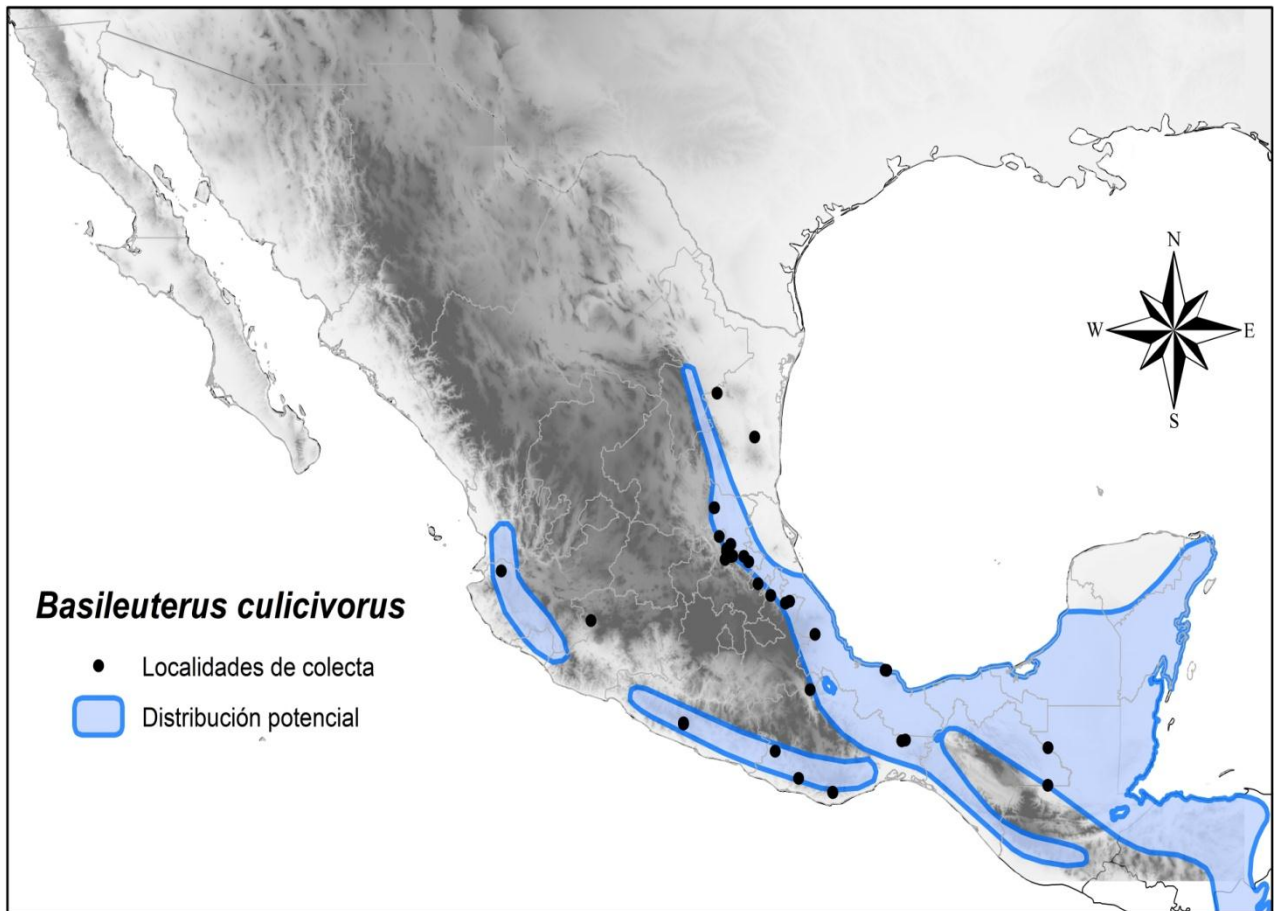
**Figura 2. Mapa que muestra la distribución geográfica de *B. culicivorus*. En México, Centro y Suramérica (Torres y Rodrigues 2010).**

Ave considerada como indicadora de disturbios ambientales (e.g incendio forestal, uso agropecuario, etc) (Capllonch 2007), su distribución suele estar acompañada con sus hábitos alimenticios, puede encontrarse en el sotobosque y muy rara vez entre las copas de los arboles altos, por ende, su dieta corresponde principalmente de pequeños insectos y arácnidos que se encuentran a una altura relativamente baja, y sobre la hojarasca (Chatellenaz 2008). Son aves que no emprenden grandes vuelos, aunque se les ha llegado a observar en islas cercanas al continente (Lovette y Bermingham 2002). Desde su descripción ha presentado problemas taxonómicos, gracias a la pobre diferenciación morfológica, debido a lo anterior las subespecies descritas necesitan referencias genéticas que aporten evidencia significativa de la estructura poblacional, la cual está teniendo una fuerte influencia en la distribución espacial de los haplotipos resultantes (Lovette y Bermingham 2002).



El debate taxonómico que se ha generado en años recientes se ha centrado en ubicar a *B.culicivorus* como especie hermana de *B. hypoleucus* (Chatellenaz 2008, Torres y Rodrigues 2010) aunque otros autores mencionan que las dos especies forman solo una *B. culicivorus* presentado 2 subespecies. Datos moleculares proponen que el Pleistoceno fue el periodo clave para la diversificación de esta especie dentro de Sur y Norte América (Torres y Rodríguez 2010).

Las poblaciones Mexicanas de esta especie se ubican en la vertiente del pacífico: en el sur de Nayarit y gran parte de Jalisco, en el sur de Guerrero y la vertiente de Oaxaca, gran parte del sureste de Chiapas, en el norte de Nuevo León y sur de Tamaulipas, en el noreste de San Luis Potosí, norte de Hidalgo, gran parte del estado de Veracruz, noreste de Puebla, sureste de Campeche, Quintana Roo, según la American Ornithologists Union (AOU 2011) (Figura 3).



**Figura 3. Mapa que muestra las localidades de colecta y la distribución geográfica de *B. culicivorus* en México.**

Debido a su distribución alopátrida (distribución que presentan algunas especies separadas físicamente por barreras geográficas) (Del Hoyo *et al.* 1999) hace que sean un modelo apropiado para evaluar la hipótesis de diversificación y aislamiento genético presente en las poblaciones. El objetivo del estudio que se plantea aquí intenta aportar datos sobre la estructura genética a partir de datos moleculares sobre la distribución geográfica de los linajes de la especie *Basileuterus culicivorus* en el territorio mexicano.

### 3. HIPÓTESIS

La distribución alopátrida presente en la especie *Basileuterus culicivorus* dentro del territorio mexicano supone la existencia de diferenciación genética, por lo que se esperará que existan distintas entidades evolutivas diferentes.

### 4. OBJETIVOS

#### Objetivo general

- Analizar la composición genética y los aspectos filogeográficos de *Basileuterus culicivorus* en el territorio mexicano, a partir de datos de DNA mitocondrial (NADH2)

#### Objetivos particulares

- Obtener las secuencias para el gen mitocondrial NADH deshidrogenasa (ND2: 1041 pares de bases, pb) de la especie *Basileuterus culicivorus* de las poblaciones mexicanas
- Realizar las reconstrucciones filogenéticas utilizando los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) y de inferencia bayesiana (IB).
- Analizar la variación genética entre grupos y entre las poblaciones del complejo *Basileuterus culicivorus*.
- Determinar si es que existe un patrón filogeográfico mediante los haplotipos de *B. Culicivorus*.
- Establecer si es que las barreras geográficas promueven la diferenciación genética de las poblaciones de *B.culicivorus* en el territorio mexicano.

## 5. MÉTODOS

### Obtención de las muestras

Se colectaron ejemplares de *Basileuterus culicivorus* en las distintas localidades correspondientes a su área de distribución por integrantes de las diversas áreas de trabajo del Museo de Zoología “Alfonso Luis Herrera” de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En este trabajo se utilizaron 45 muestras de tejidos para la especie *Basileuterus culicivorus*, además de incluir 5 secuencias pertenecientes al grupo externo publicadas en el GenBank ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)) dando un total de 50 secuencias utilizadas para el análisis filogenético.

### Trabajo de Laboratorio

Se obtuvieron las secuencias de DNA mitocondrial (mtDNA) siguiendo los siguientes pasos:

- Extracción

Se realizó la extracción correspondiente de DNA mitocondrial (mtDNA) en 45 ejemplares *Basileuterus culicivorus*, siguiendo el protocolo de extracción Qiagen DNeasy (Spin-column Protocol). El cual se describe a continuación:

1. Para cada muestra se tomó una alícuota de tejido y se depositaron en tubos de polipropileno (tubos Eppendorf de 1.5ml).
2. Se le agregó 20  $\mu$ L de Proteínasa K a cada muestra (10mg/ml)
3. Posteriormente cada muestra fue incubada a 56°C por aproximadamente 8 horas con agitación periódica.
4. Una vez terminado el tiempo de digestión se agregó 200  $\mu$ L de Buffer AL a cada muestra agitando con un vórtex al final.
5. Se agregó 200  $\mu$ L de etanol (96 -100%) agitando con un vórtex al final.

6. Se extrajo el contenido con una pipeta y se depositó en una columna DNEASY Mini de 2 ml.
7. Posteriormente se colocó en una centrifuga a una velocidad de 8000 rpm/1min. Una vez concluida la etapa de centrifugado se retiraron los tubos colectores y se desecharon.
8. Se colocó nuevamente la columna en un tubo colector y se le adicionó 500  $\mu$ L Buffer AW1, nuevamente centrifugando a 8000 rpm/1min. Una vez concluida la etapa de centrifugado se retiraron los tubos colectores y se desecharon.
9. Una vez más se colocaron las columnas en los tubos colectores agregándoles 500  $\mu$ L de Buffer AW2 centrifugando a 14000 rpm/3min. Desechando nuevamente el tubo colector.
10. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5ml adicionándole 100  $\mu$ L de Buffer AE a cada muestra. Se centrifugó a 8000 rpm/1min.
11. El producto de la extracción fue cuantificado mediante la electroforesis en un gel de agarosa al 0.5% en Buffer TAE 1X (Tris ácido acético y ácido etilendiaminotetraacético EDTA 0.5M) a un voltaje de 100 ampers durante 30 minutos, este gel fue teñido previamente con bromuro de etidio (0.625 mg/ml), en una solución de 0.5 mg/ml (1 gota/50 ml dsH<sub>2</sub>O), una vez transcurridos los 30 minutos se observó en un transiluminador para verificar que la extracción haya sido exitosa.

- Amplificación

La amplificación del fragmento de la subunidad 2 del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa (ND2) se realizó con los primers, L5219 :CCCATACCCCGAAAATGATG, L5758: GGCTGAATRGGMCTNNAAYCARAC y H6316: CTCTTATTTAAAGGCTTTGAAGGC (Sorenson *et al.*, 1998). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un volumen final de 25 $\mu$ L con 1.5  $\mu$ L de DNA después de estandarizar la mix-master incluyendo (12.5  $\mu$ L de

H<sub>2</sub>O, 2.5 µL de buffer a una concentración de 500 mM KCl, 100 mM Tris – HCl (pH 9.1) y 0.1 % Triton X – 100), 2.5 µL de deoxinucleótidos 10 X (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), los primers L5219, L5758 y H631 a una concentración de 10 mM que se ajustaron al volumen total de reacción en cada caso y 0.2 µL *Taq polimerasa* 5u/µL, para cada muestra. Las temperaturas utilizadas fueron de 94°C por 5 minutos, seguido 35 ciclos de 30 segundos a 95°C (refieren al periodo de desnaturalización), seguidas por el ciclo de alineamiento de 30 segundos a 45-52 °C, 2 minutos a 72 °C y por último el ciclo de extensión final a 72 °C por 10 minutos. Después de la (PCR) los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.5% teñido con bromuro de etidio (BrEt). Por último se observaron las muestras en un transiluminador para corroborar el fragmento amplificado, cabe resaltar que en cada PCR se incluye una muestra llamada control negativo que solo contenía agua inyectable.

- Secuenciación

Las muestras positivas fueron almacenadas en un congelador a -20°C para posteriormente ser enviadas al laboratorio de High-Troughput Genomics Unit de la Universidad de Washington, Seattle, EE.UU, para secuenciar las dos cadenas de mtDNA en un secuenciador automático modelo 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias publicadas en el GenBank ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)) para corroborar la similitud en cada una de ellas (Un proceso conocido como Blast).

### Edición de Secuencias

Las secuencias obtenidas del gen ND2 después de la reacción de secuenciación fueron editadas manualmente usando el programa Sequencher 4.8 (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI). Para el alineamiento de las secuencias se utilizó el programa Clustal X (Thompson et al. 1997). Una vez alineadas las

secuencias se realizó la búsqueda empírica de los parámetros del modelo evolutivo apropiado que mejor se ajustaba a las secuencias utilizando el programa ModelTest3.7 (Posada y Crandall 1998) por medio del criterio Akaike (AIC) utilizando el gen completo es decir sin particiones internas.

### Reconstrucción filogenética

Se realizaron reconstrucciones filogenéticas (árboles) mediante los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (IB) para establecer las posibles relaciones.

Para la construcción del árbol por el método de máxima parsimonia se utilizó el programa PAUP (Swofford 2002) realizando una búsqueda heurística para seleccionar el árbol vía stepwise addition por medio del algoritmo tree-bisection-reconnection (TBR), generando árboles de consenso con las topologías más parsimoniosas, utilizando un soporte para los nodos de 100 réplicas de bootstrap.

Por otro lado para la obtención del árbol de máxima verosimilitud se utilizó el programa PAUP (Swofford 2002), utilizando el mismo soporte de los nodos como en el caso del método de máxima parsimonia, solo que en este caso el programa calcula los parámetros del modelo de sustitución.

La inferencia bayesiana se desarrolló utilizando el programa Mr. Bayes 3.0 (Ronquis, y Huelsenbeck 2003) empleando el mejor modelo generado por ModelTest3.7. Utilizando 4 cadenas MCMC (Markov Chains Monte Carlo, 1 fría y 3 calientes) las cuales corrieron simultáneamente por 10,000,000 generaciones, muestreando arboles cada 500 generaciones, descartando los primeros 5,000 árboles (burn). Una vez descartados se realizó un consenso con los últimos 15,001 árboles correspondientes al 25 %. Una vez obtenidas las topologías para cada método se utilizó el programa FigTree v 1.3.1 (Rambaut 2006) para la edición de los árboles.

## Construcción de la red haplotípica

Se construyó una red de haplotipos Median Joining utilizando Network 4.6 (Bandelt *et al.* 1999) solo para las secuencias de *Basileuterus culicivorus* para obtener la relación haplotípica que se establece entre la especie.

## Diferenciación genética

En este apartado se consideró solo las secuencias de *B.culicivorus* para así poder identificar el comportamiento genético de esta especie, se definieron dos grandes grupos y que de aquí en adelante serán mencionados como “MSU” y “MNO” los cuales se encuentran separados geográficamente. El primero de ellos abarca la zona oeste de México que incluye la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre del Sur y la Cuenca del Río Balsas para los estados Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Campeche y Chiapas “MSU” y el grupo que abarca parte de la Sierra Madre Oriental para los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Puebla, Hidalgo, Veracruz, Querétaro “MNO” (Apéndice I). Para los análisis genéticos se tomaron 2 medidas las que contemplan solo los dos grupos y los que contemplan todas las poblaciones de individuos por localidad.

Se utilizó el programa DNAsp versión 4.5 (Rozas *et al* 2003) para evaluar la composición genética de acuerdo con métodos estadísticos:

Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), este índice define la diversidad genética a nivel nucleotídico dentro de una población (Nei 1987):

$$\pi = \sum_{i < j} \pi_{ij} / n_c$$

Donde  $n_c$  es el total de comparaciones y  $\pi_{ij}$  es la proporción de nucleótidos diferentes entre dos secuencias  $i$  y  $j$ .

Sitios segregantes o polimórficos ( $\theta$ ) Theta-Watterson (Watterson, 1975), indica el número de sitios nucleotídicos segregantes en una muestra de secuencias y se determina con la siguiente fórmula:



$$\theta_s = S / aL$$

Donde S es el número de sitios segregantes y aL es la medida armónica de la muestra.

La diversidad de los haplotipos (Hd), este parámetro hace referencia a la cantidad exacta de haplotipos que existen en las poblaciones estudiadas (Nei 1987):

$$Hd = n \left( 1 - \sum \bar{x}_i^2 \right) / (n - 1) : V_{(h)} = \left( \frac{n}{n - 1} \right)^2 V \left( \sum \hat{x}_i^2 \right)$$

Por último se calculó el promedio de las diferencias nucleotídicas (k) (Tajima 1983):

$$k = \sum \sum_{ij} k_{ij} / \binom{n}{2}$$

Mediante el software Arlequin v.3.1 (Schneider *et al.* 1997) se pretende analizar el comportamiento de la estructura genética en los grupos considerados para dicho estudio, estimando el porcentaje de variación debido a cada nivel poblacional, con este software se calcularon los índices de fijación asociados a la variación entre grupos, variación dentro de grupos, a la variación entre poblaciones y dentro de las poblaciones, con una significancia estadística de 1000 permutaciones (Wright 1931), resultados conocidos como análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffer *et al.* 1992).

Por otra parte se utilizó el software Arlequin v.3.1 (Schneider *et al.* 1997) para calcular la D-Tajima la cual pone a prueba una hipótesis nula de que existe

un equilibrio de mutación-deriva génica dentro de una población. Está basada en la detección de las diferencias entre los estimadores  $\theta$  y  $\pi$ .

Para los análisis de historia demográfica se realizaron las distribuciones de las diferencias pareadas Mismatch (Rogers y Harpending 1993) para los grupos (MNO y MSU) y para todos los individuos de *Basileuterus culicivorus*, realizando la gráfica correspondiente bajo el modelo de expansión demográfica, este análisis se basa en el conteo del número de diferencias entre cada par de secuencias. Estos datos fueron generados nuevamente con el software Arlequin v.3.1 (Schneider *et al.* 1997).

## 6. RESULTADOS

Se obtuvieron secuencias del gen mitocondrial NADH2 para 45 ejemplares de la especie *Basileuterus culicivorus*, las cuales representan las localidades de los individuos utilizados en este estudio. Por otra parte para enraizar los árboles fue necesario la utilización de cinco secuencias correspondientes al grupo externo obtenidas del GenBank ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)), *B. belli* (GU376905.1), *B. rufifrons* (AY327390.1), *B. melanogenys* (GU932051.1), *B. tristriatus* (AF383129.1) y *B. hypoleucus* (GU932050.1).

El modelo evolutivo que mejor se ajustó a los datos para el gen ND2 según Modeltest fue TIM1+G obteniendo un parámetro de distribución gamma de 0.2360.

Se lograron obtener las topologías de los árboles para los métodos MP, ML e IB (Figuras 4,5 y 6). El resultado del consenso para las topologías demuestra similitud entre los distintos árboles.

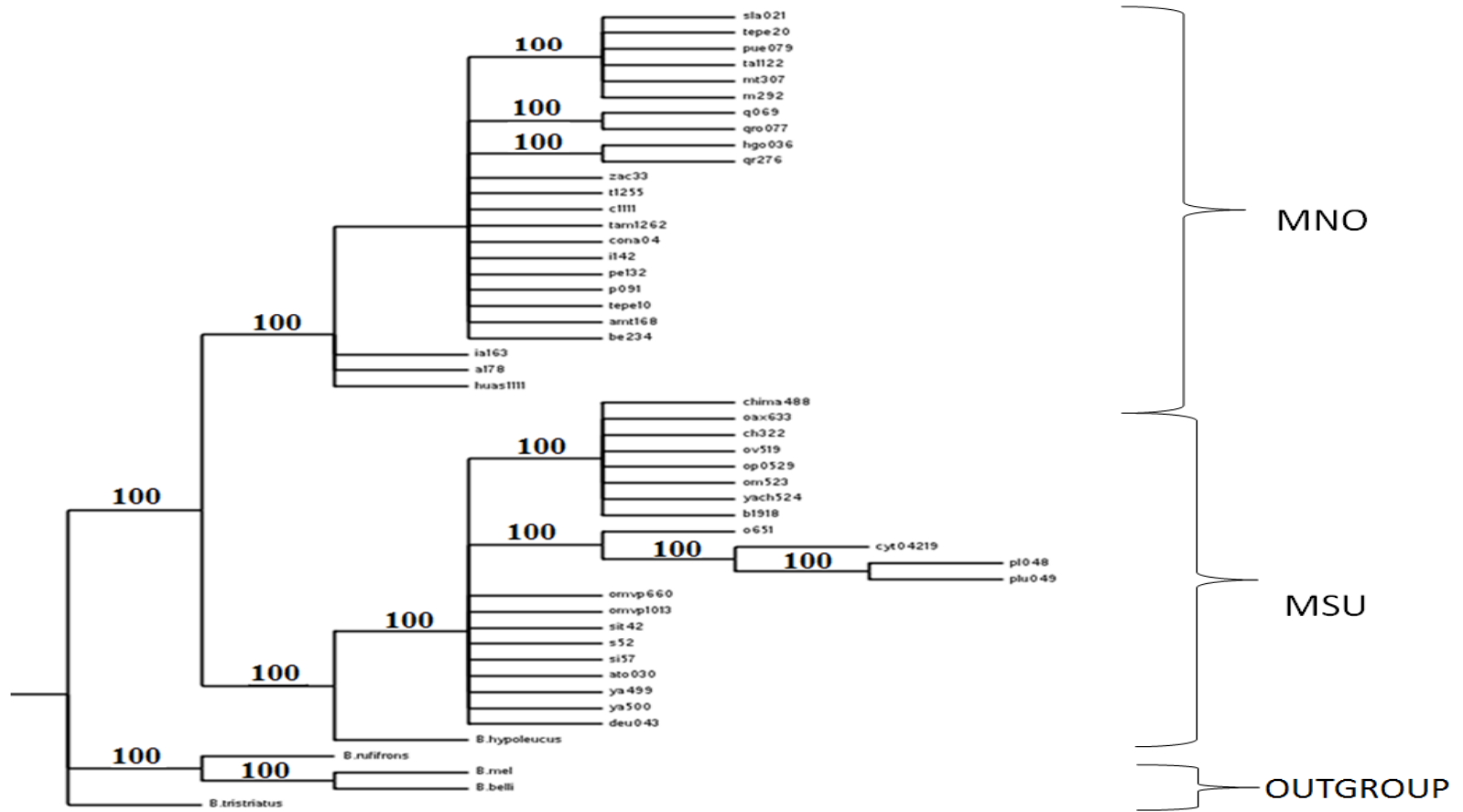


Figura 4. Reconstrucción filogenética por el método de máxima parsimonia. Los números sobre las ramas corresponden al soporte de bootstrap. Los nombres al final de cada rama corresponden a los números de catálogo. MNO zona este de México y MSU zona oeste de México, OUTGROUP corresponde al grupo externo.



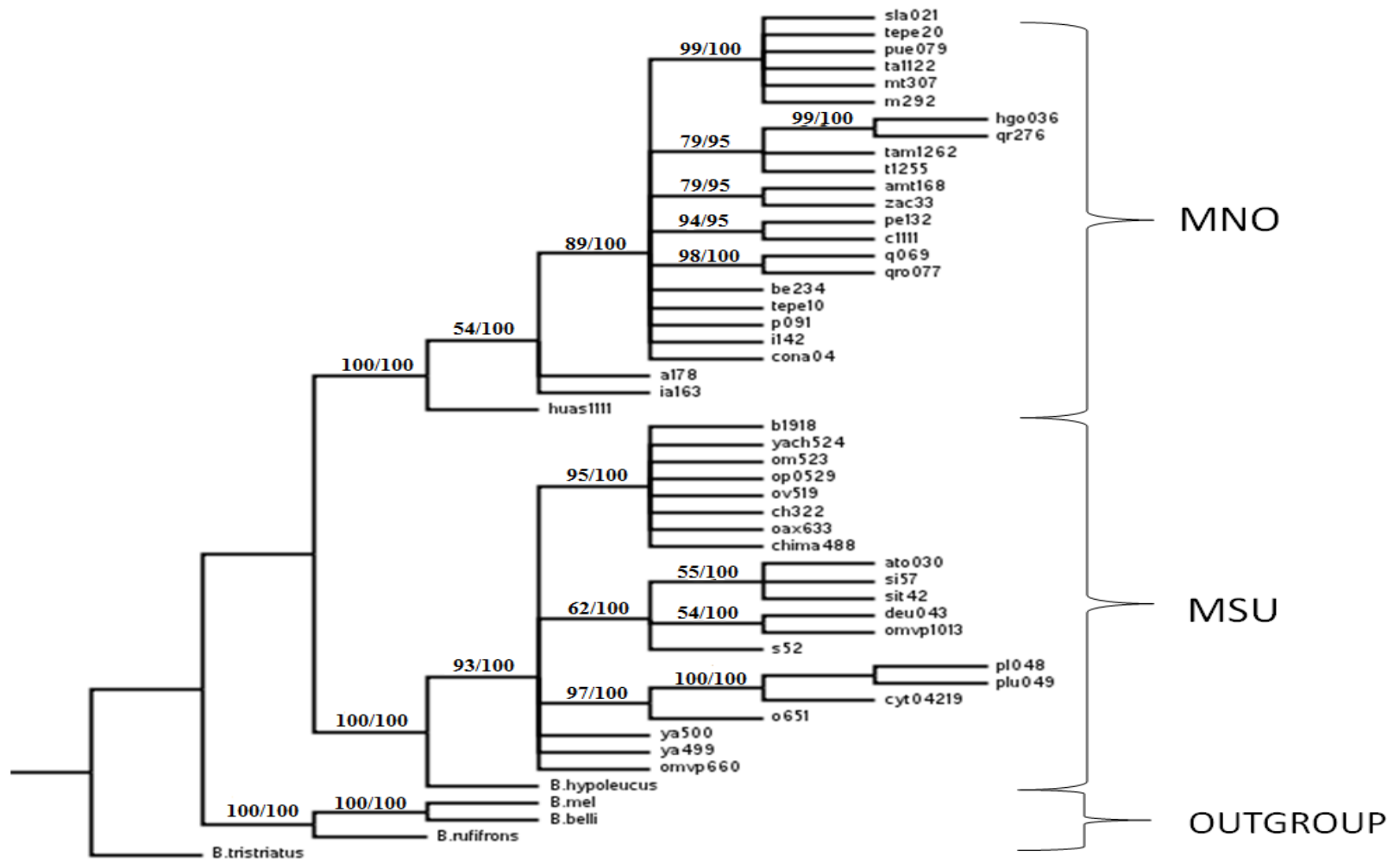


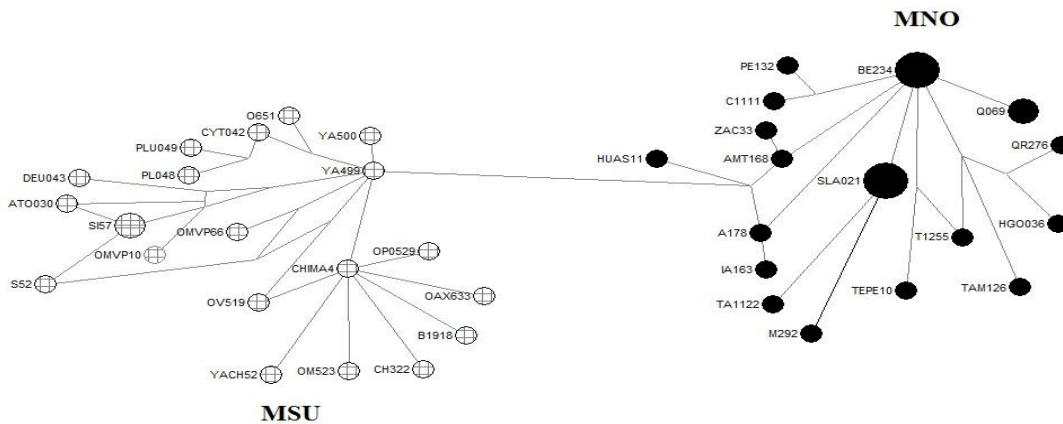
Figura 6. Reconstrucción filogenética por el método de inferencia bayesiana. Los números sobre las ramas corresponden a los valores de probabilidad. Los nombres al final de cada rama corresponden a los números de catálogo. MNO zona este de México y MSU zona oeste de México, OUTGROUP corresponde al grupo externo.

Dentro de las 45 secuencias de *B.culicivorus* se encontraron 37 haplotipos, 90 sitios variables y 56 sitios filogenéticamente informativos (Cuadro 1).

**Cuadro 1. Número de pares de bases (pb) para el gen ND2, sitios conservados (SC), sitios variables (SV), sitios parsimonia informativos (SPI), modelo evolutivo (ME).**

	pb	SC % (pb)	SV% (pb)	SPI% (pb)	ME
<b>ND2</b>	892	89.9%(802)	10.08%(90)	6.27%(56)	TIM1+G

En cuanto a las redes de haplotipos (Figura 7), se logran visualizar agrupaciones que coinciden con los clados y la distribución geográfica obtenida en las distintas topologías.



**Figura 7. Red de los haplotipos de *B.culicivorus*. El tamaño de los círculos corresponde a la proporción de frecuencias. Los nombres de los catálogos pueden corroborarse en el apéndice I.**

Se obtuvo el número total de haplotipos ( $H$ ), la diversidad de los haplotipos ( $Hd$ ), el valor de la *Theta de Watterson* ( $\theta$ ), la diversidad de nucleótidos( $\pi$ ) así como el promedio de las diferencias nucleotídicas ( $k$ ) y la prueba de neutralidad *D-Tajima* ( $D$ ) para ambos grupos (Cuadro 2).

El grupo que presenta una mayor diversidad haplotípica es la MSU (0.97) y el que presenta menor diversidad es el grupo MNO (0.93). Los valores de diversidad nucleotídica más altos fueron para el grupo MSU (0.00634), mientras que para el grupo MNO se observaron valores ligeramente más bajos (0.00478) (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Estimaciones de diversidad genética para cada grupo: número de muestras( $n$ ), número de haplotipos ( $H$ ), diversidad haplotípica ( $Hd$ ), *Theta de Watterson* ( $\theta$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), promedio de las diferencias nucleotídica ( $k$ ), prueba *D-Tajima* ( $D$ ).

<b>Grupo</b>	<b><math>n</math></b>	<b><math>H</math></b>	<b><math>Hd</math></b>	<b><math>\theta</math></b>	<b><math>\pi</math></b>	<b><math>k</math></b>	<b>Tajima's <math>D</math></b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>Grupo 1 (MNO)</b>	24	17	0.93	0.00884	0.00478	4.268	-1.55	0.10
<b>Grupo 2 (MSU)</b>	21	20	0.97	0.00912	0.00634	5.659	-1.052	0.10
<b>Grupo 1 y 2 (Incluyen todas las poblaciones)</b>	45	37	0.977	0.0199	0.0255	22.747	0.66983	0.10

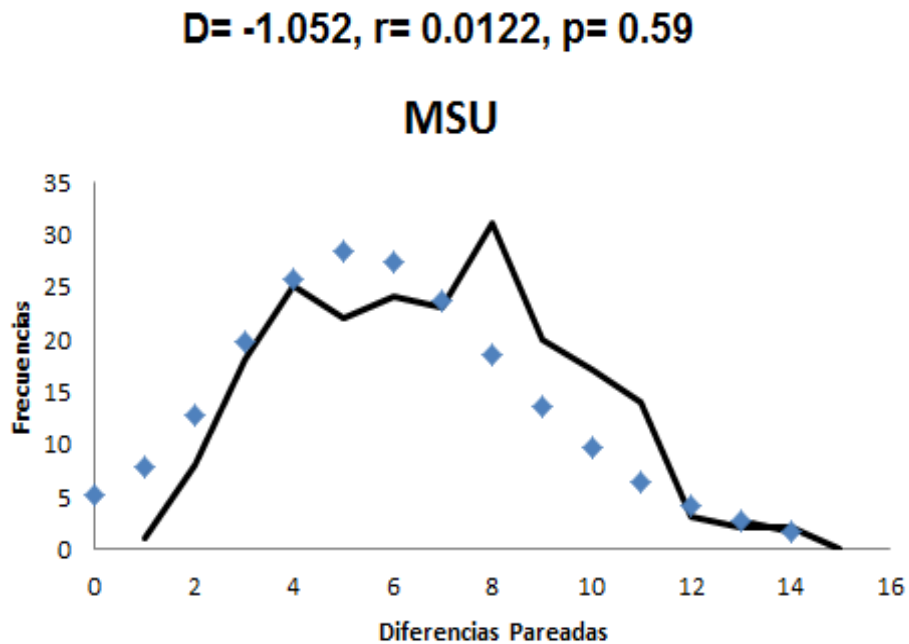


El análisis de AMOVA nos mostró los niveles de diversidad genética dentro y entre los grupos (Excoffier *et al.* 1992), en la cuadro 3 se muestran los valores obtenidos a partir de las secuencias mitocondriales, donde se observa una alta variación genética entre los grupos (87.58%), y no así, dentro de ellos donde se observa una diferencia menor (12.42%). Por otra parte el estadístico Fst arroja un resultado cercano a la unidad (0.87584), este estadístico nos habla del estructuramiento genético entre los grupos, si es cercano a uno ejemplifica la alta estructura genética, en contra parte si es cercano a cero se dice que las poblaciones evaluadas tienen poca estructuración genética (Wright 1931).

**Cuadro 3. Resultados del AMOVA para los grupos (MSU), (MNO) y para las poblaciones dentro y entre.**

<b>Resultados del AMOVA</b>					
<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>	<b>d.f. (grados de libertad)</b>	<b>Índice de fijación Fst</b>
<b>Entre grupos (<math>\Phi_{ct}</math>)</b>	397.997	17.656	87.58	1	0.87584
<b>Dentro de grupos (<math>\Phi_{st}</math>)</b>	107.625	2.50291	12.42	43	0.87584
<b>Entre poblaciones (<math>\Phi_{sc}</math>)</b>	434.206	10.72708	83.10	10	0.83104
<b>Dentro de poblaciones (<math>\Phi_{st}</math>)</b>	74.150	2.18088	16.90	34	0.83104
<b><math>\alpha=0.05</math></b>					

Los análisis demográficos de los grupos muestran curvas unimodales para ambos, visualmente se observa que las curvas se ajustan al modelo de expansión demográfica (Figura 8 y 9).



**Figura 8. Distribución Mismatch para el grupo MSU. La línea punteada corresponde a las frecuencias simuladas mediante un modelo de expansión demográfica y la línea sólida corresponde a las frecuencias observadas para las diferencias nucleotídicas pareadas en la especie *B.culicivorus*,  $D=D$  de Tajima,  $D<0$  hace referencia a la expansión poblacional,  $r=$  Harpending's Raggedness Index,  $p<0.05$  significativo = la población no presenta expansión demográfica.**

$D = -1.55$ ,  $r = 0.138$ ,  $p = 0.093$

### MNO

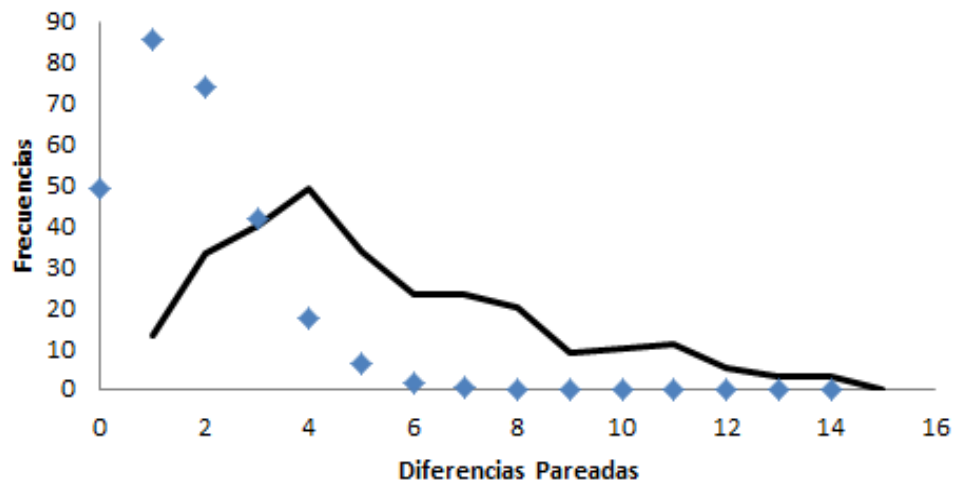


Figura 9. Distribución Mismatch para el grupo MNO. La línea punteada corresponde a las frecuencias simuladas mediante un modelo de expansión demográfica y la línea sólida corresponde a las frecuencias observadas para las diferencias nucleotídicas pareadas en la especie *B.culicivorus*,  $D = D$  de Tajima,  $D < 0$  hace referencia a la expansión poblacional,  $r =$  Harpending's Raggedness Index,  $p < 0.05$  significativo = la población no presenta expansión demográfica.

## 7. DISCUSIÓN

Mediante los resultados obtenidos a partir de secuencias mitocondriales del gen NADH2 para la especie *B. culicivorus* se logra observar un patrón filogeográfico de la categoría I (Avice *et al.* 1987), que muestra las topologías genéticas con una divergencia antigua y en ella visualizan linajes separados alopatridamente, con haplogrupos restringidos a un área geográfica determinada, corroborando así que el tiempo transcurrido ha sido idóneo para separar genéticamente las poblaciones, al realizar un análisis detallado de todas las topologías resultantes, se aprecian 3 clados perfectamente estructurados con valores de bootstrap significativamente altos, así como probabilidades posteriori significativas (Figuras 4,5,6), los dos primeros clados corresponden a los grupos definidos en este estudio como (MNO y MSU).

El tercer y último clado corresponde al grupo externo, el resultado de todas las topologías demuestran la unión de una de las secuencias descargadas del GenBank ([www.ncbi.gov](http://www.ncbi.gov)) correspondiente a la especie *Basileuterus hypoleucus* agrupándose con el grupo MSU, debido a la similitud que presenta su secuencia, en esta especie se han generado debates sobre su clasificación y si debe ser o no considerada como especie filogenéticamente distinta a *Basileuterus culicivorus*, esto ha generado diversas hipótesis que argumentan que las dos especies (*B.culicivorus* y *B. hypoleucus*) en el pasado compartieron una historia evolutiva y eran un mismo linaje (Torres y Rodrigues 2010).

Una investigación previa propone que la diversificación entre estas dos entidades evolutivas, se generó entre los periodos del Plioceno-Pleistoceno, señalado como periodo de diferenciación para algunos Parulidos (Pérez-Emán 2005), argumentando como principal causa las fluctuaciones climáticas y eventos geológicos que generaron fragmentaciones y reconexiones entre los distintos hábitats, las cuales afectaron de manera directa la avifauna del Neotrópico, llevando a diversos grupos a diferenciarse (Avice y Walker 1997, Weir 2006, Barber y Klicka 2010).

Datos moleculares sugieren que *B. culicivorus* y *B. hypoleucus* representan linajes diferentes, y que su diversificación se estableció en los periodos antes mencionados, aunque estos autores proponen que estas dos especies no se separan completamente ya que probablemente puede existir flujo genético entre ellas (Torres y Rodrigues 2010).

Por el arreglo que muestran las topologías se observa que aunque la secuencia de *B. hypoleucus* no se relaciona con ningún haplotipo de México, la secuencia es reconocida como similar por el algoritmo empleado en este estudio, y la agrupa en el clado MNO, grupo que posiblemente se le parece genéticamente, esto aseguraría que muy probablemente conservan características genéticas entre las poblaciones que le dieron origen en un pasado geológico, y las que la hicieron colonizar parte de Sudamérica región geográfica donde se distribuye actualmente esta especie (*Basileuterus hypoleucus*).

Se ha propuesto una teoría que explicaría la divergencia entre estas dos especies la cual argumenta que debido a un evento de colonización único y continuo las poblaciones de *Basileuterus culicivorus* migraron del norte ancestral a través de una ruta hacia el sur de América (Curson *et al.* 1994, Pérez-Emán 2005), por lo anterior, el origen de la especie *B. hypoleucus* en Sudamérica es mucho más reciente, entonces la divergencia entre las poblaciones de *B. culicivorus* y *B. hypoleucus* resulta ser mucho más joven de lo que se cree, debido a esto conservan una huella genética entre sus poblaciones, muy probablemente el aislamiento de poblaciones pertenecientes de *B. culicivorus* cercanas a Brasil y Paraguay lugar donde se distribuye actualmente *B. hypoleucus*, fueron las responsables de la presente diferenciación genética entre los linajes, y de la cual surgen dos entidades evolutivas distintas, estableciendo así el origen de estas dos especies (Emsen *et al.* 2008), sin embargo en el estudio de Torres y Rodrigues (2010) se presenta evidencia que *B. hypoleucus* y *B. culicivorus* podrían seguir estando relacionados genéticamente sobre todo en las poblaciones cercanas y de

las cuales comparten distribución geográfica, aquí hay que hacer notar que la distribución de *B. culicivorus* en el sur de América abarca gran parte de la distribución que presenta *B. hypoleucus* y es probable que exista flujo genético entre estas dos especies. Por tal motivo en este trabajo no podríamos concluir a grandes rasgos sobre la diversificación de estas dos especies, pues la falta de muestras podría estar arrojando un resultado erróneo, en la monofilia obtenida para este estudio.

Por otro lado gráficamente la red haplotípica muestra una fuerte estructura filogeográfica separando los haplogrupos en dos, demostrando así que las topologías obtenidas mediante los distintos métodos (MP, MV y IB) asemejan la distribución espacial de los filogrupos encontrados (Bandelt *et al.* 1999), y donde se observa una separación geográfica marcada por 33 mutaciones, este resultado no es extraño ya que se ha observado en otros grupos de aves donde se han encontrado patrones filogeográficos similares (García-Moreno *et al.* 2004, Cadena *et al.* 2007, Cortés-Rodríguez *et al.* 2008, Barrera-Guzmán *et al.* 2012), por el contrario otros grupos de aves analizados que presentan una distribución geográfica discontinua o restringida y de las cuales se esperaría obtener diferencias genéticas entre las poblaciones, no es así, ya que presentan patrones de distribución haplotípica de una forma continua, debido a lo anterior los haplotipos resultantes carecen de una separación geográfica (Arbeláez-Cortés *et al.* 2010), este tipo de patrones asumen que las poblaciones tienen un origen reciente y los linajes están teniendo un alto flujo génico, relacionándolos evolutivamente (Avice 2000) .

A pesar de los diferentes métodos utilizados para la obtención de las topologías, se muestra evidencia clara de la separación que presentan los haplotipos generando dos filogrupos, debido a la presencia de barreras geográficas, por un lado tenemos la Sierra Madre Oriental que abarca desde el norte de Tamaulipas hasta el sur de Veracruz, para las poblaciones que se encuentran en el sureste mexicano algunas de las barreras más importantes que

aíslan las poblaciones con la parte norte del territorio es la Sierra Madre del Sur, El Istmo de Tehuantepec así como el Eje Neovolcánico Transversal, en la parte oeste a la Sierra madre Occidental, una región considerada como una importante área de endemismo para diferentes taxones y sobre todo para las aves (García y Navarro 2004), algunos estudios han obtenido resultados donde mencionan que estas barreras geográficas contribuyen al aislamiento y diferenciación genética de muchas especies de aves (Marshall y Liebherr 2000, Puebla-Olivares *et al.* 2008, Barber y Klicka 2010, González *et al.* 2011), y que además pueden representar etapas tempranas en los procesos de especiación (González *et al.* 2011), en la mayoría de los casos se ha presentado evidencia que estas barreras tienen implicaciones directamente en el flujo de genes (Storfer *et al.* 2007), y que a mayor tiempo de aislamiento mayor diferenciación genética entre las poblaciones, teniendo así impacto evolutivo a distintas escalas (macro y micro evolutivo) (Navarro *et al.* 2001, Arbeláez-Cortés *et al.* 2010), considerando lo anterior, aseguramos que para la especie *Basileuterus culicivorus* estas barreras antes mencionadas y que concuerdan con la separación de los grupos están actuando de manera directa en el intercambio genético y son responsables de la variación establecida entre los grupos que se presentan en este estudio, debido a la separación de las poblaciones en el pasado. Por tal motivo se observa que el estructuramiento de los haplotipos presenta un alto grado de diferenciación para los grupos analizados (MNO y MSU), y que visualmente podemos agruparlos en dos, los haplotipos que se encuentran distribuidos hacia la zona oeste (MSU) y los que toman una distribución hacia el este de México (MNO).

Sin embargo y a pesar de que las barreras geográficas son causantes de fenómenos como la divergencia entre grupos cercanamente relacionados llevándolos a la especiación (Morrone 2005), no siempre se espera que suceda esto, ni es una regla que se establezca para los distintos grupos taxonómicos, ya que existen casos donde se observa que a pesar de la presencia de barreras geográficas las poblaciones no muestran diferencias genéticas significativas, una explicación de esto podría ser la capacidad que presentan algunas especies al

establecerse en lugares estratégicos y que a pesar de que se encuentren cercanas a barreras geográficas, estas no aíslan del todo las poblaciones, permitiendo así que la interconexión genética prevalezca, este tipo de patrones sugiere que las poblaciones están en expansión y que el tiempo transcurrido entre ellas no ha sido suficiente para aislarlas genéticamente, presentando evidencia que apunta a ser consideradas como una misma entidad evolutiva (Cortés-Rodríguez *et al* 2008). Como se observa en nuestro patrón filogeográfico para este estudio existe suficiente evidencia para descartar lo anterior y sugerir que los grupos analizados muestran una identidad genética propia y que corresponde al aislamiento por distancia entre los haplogrupos.

Las topologías generalmente son usadas para visualizar de una manera clara y precisa si es que existe un patrón filogeográfico entre las especies analizadas, sin embargo estas se pueden utilizar para conocer e inferir las relaciones evolutivas realizando métodos que analizan y describen estas relaciones de manera genética (Aguirre 2007), observando los resultados de los análisis genéticos que se presentan en este estudio se sugiere la bipartición de los grupos.

Los análisis genéticos realizados a partir de las secuencias mitocondriales para el gen ND2 muestran que si hay variación genética entre los grupos, revelando la capacidad evolutiva que caracteriza este genoma (Avice 2000), los haplotipos obtenidos fueron 37 de 45 ejemplares secuenciados, 17 haplotipos se agrupan en la población definida como (MNO) y 20 quedan dentro de la población (MSU), un número elevado al ser comparado con la muestra, la diversidad haplotípica muestra valores altos para los grupos I y II ( $Hd= 0.93$  y  $0.97$ ) respectivamente, mientras que la diversidad nucleotídica para los grupos I y II fue ( $\pi = 0.00478$  y  $0.00634$ ) (Cuadro 2), escenario donde se puede argumentar que los grupos aportan evidencia evolutiva que asume la diferenciación entre ellos, comparando estos datos con estudios previos (Marshall y Liebherr 2000, Puebla-Olivares *et al.* 2008, Barber y Klicka 2010, González *et al.* 2011), podemos contemplar que el aislamiento por distancia ha afectado directamente las



poblaciones que se encuentran separadas geográficamente y que además se encuentran genéticamente muy variables, estos datos concuerdan con la diversidad nucleotídica ya que la evidencia sugiere que los grupos están presentando expansión poblacional.

Los valores obtenidos a partir del análisis de varianza molecular (AMOVA) muestran valores altos de variación genética entre los grupos (87.58%) y no así dentro de ellos (12.42%) resultado del cual se puede hacer referencia al poco flujo genético que existe entre las poblaciones pertenecientes a los grupos separados por las barreras geográficas, eventualmente se cree que a través del tiempo han ido aislándose genéticamente (González *et al.* 2011), estos resultados al ser comparados con la monofilia obtenida sugeriría que los grupos se encuentran en proceso temprano de especiación y que probablemente cada uno conforma un linaje evolutivo diferente, este patrón filogeográfico que podemos corroborar con bases genéticas es un patrón de discontinuidad y diferenciación alopátrica. Por otro lado el estadístico  $F_{st}$  nos arroja un valor cercano a la unidad  $F_{st}=0.87584$ , con este valor cercano a la unidad se sugiere un escenario donde el flujo genético es escaso para los grupos analizados, además estos valores obtenidos establecen un nivel de estructura genética evidente, y de los cuales podemos diferenciar dos filogrupos, el que corresponde a MSU y el grupo MNO.

Por otro lado, las gráficas de diferencias pareadas (mismatch) están constituidas por curvas unimodales bajo el modelo de expansión demográfica, y de las cuales se argumenta que las poblaciones se encuentran en expansión demográfica, estos datos son corroborados al observar los valores negativos para la prueba  $D$  de Tajima los cuales indican también expansión demográfica entre las poblaciones que se encuentran dentro de los grupos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la diversidad genética y reforzándolos con los estadísticos para las pruebas de historia demográfica se puede inferir que las poblaciones que se encuentran dentro de los grupos, son poblaciones donde la diversidad genética está influyendo en la estructura filogeográfica de *B.culicivorus* en el territorio mexicano.

Los resultados obtenidos sugieren límite genético en la distribución geográfica para la especie *B. culicivorus* en México, resaltando que aunque solo se utilizó un gen mitocondrial y del cual se han mencionado limitantes (Funk y Omland 2003), este fue de gran utilidad en la resolución de las separaciones entre los grupos, mediada por los distintos análisis generados (las 33 mutaciones que separan la red de haplotipos, los altos valores de bootstrap así como de probabilidades posteriori obtenidos en las topologías, la marcada estructura genética generada por la AMOVA), todo lo anterior sugiere un escenario donde el flujo genético es la principal causa de la divergencia entre los grupos.

Aunque nuestros resultados afirman la separación evidente de los grupos distribuidos en la zona este y oeste del territorio mexicano, para tener un análisis completo y de mayor alcance sobre la historia evolutiva de *B. culicivorus* en México, sería necesario incorporar otros genes mitocondriales además de incluir genes nucleares, así como también, la realización de sus pruebas genéticas correspondientes y establecer si la filogenia y los índices genéticos son similares a los de este estudio, con ello tendríamos una resolución más amplia de los procesos que posiblemente están actuando de manera natural en su distribución.

## 8. CONCLUSIÓN

- El gen mitocondrial NADH2 fue útil para establecer los límites geográficos de los dos grupos propuestos como existentes en la especie *Basileuterus culicivorus*.
- La monofilia obtenida concuerda con la distribución haplotípica para los grupos evaluados.
- La diversidad genética para cada uno de los grupos es alta.
- El patrón filogeográfico obtenido, asume la presencia de dos linajes evolutivamente distantes separados por 33 mutaciones *Basileuterus culicivorus* (MNO y MSU) en el territorio mexicano.
- El flujo genético entre los grupos es casi nulo.
- Se recomendaría obtener análisis con otros genes, sobre todo nucleares, para corroborar estos resultados.

## 9.BIBLIOGRAFÍA.

Aguirre, E. 2007. Flujo Génico: Métodos para estimarlo y marcadores moleculares Cap. 2. En: Eguiarte, L. E., Souza, V y Aguirre, X. Compiladores. Ecología Molecular. México. SEMARNAT, INECOL, UNAM Y CONABIO. Pp49-61.

American Ornithologists Union. 2011. Fifty-Second Supplement to the American Ornithologists' Union Check-List of North American Birds. Auk. 3: 600-613.

Anderson, T. J., Komuniecki, R., Komuniecki, P. R. y J. Jaenike. 1995. Are mitochondria paternally inherited in *Ascaris*? Int. J. Parasitol., 25: 1001-1004.

Arbeláez-Cortés, E., Nyári, A. y Navarro-Sigüenza, A. 2010. The differential effect of lowlands on the Phylogeographic pattern of a Mesoamerican montane species (*Lepidocolaptes affinis*, Aves: Furnariidae). Molecular Phylogenetics and Evolution. 57: 658-668.

Avise, J. C., Arnold. J., Martin. B. R., Bermingham E., Lamb T., Neigel. E. J., Rebb A.C. y Saunders C.N. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Reviews of Ecology and Systematics.18: 489-522.

Avise, J C. y Walker. D. 1997. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. Proceedings Royal Society B. 265: 457-463.

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

Bandelt, H. J., Forster, P. y Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. 16 :34-48.

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

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

Cadena, C.D., Klicka, J. y Ricklefs, R.E. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane región: Molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush-finches (Aves, Emberizidae). 3: 993-1016.

Capllonch, P, 2007. Distribución latitudinal y altitudinal de tres especies del género *Basileuterus* en el noreste argentino. Hornero. 22: 23-28.

Chatellenaz, M.L. 2008. Ecología Alimentaria de dos especies simpátricas del género *Basileuterus* en el noreste de Argentina. *Hornero*. 23: 87-93.

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

Cracraft, J. y Prum, O. 1998. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution*. 42: 603-620.

Cruzan, M.B. y Templeton, A.R. 2000. Paleogeography and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution*. 15: 491-496.

Curson, J., Quinn, D., Beadle, D., 1994. *New World Warblers*. Christopher Helm, London

Del Hoyo, J., Elliott, A. y Sargatal, J. (eds.) 1999. *Handbook of the Birds of the World*. Vol. 15. Lynx Edicions. Barcelona. 793 pp.

Emsen, J.V., Cadena, C.D., Jaramillo, A., Nores, M., Pacheco, J.F., Robbins, M.B., Schulenberg, T.S., Stiles, F.G., Stotz, D.F., Zimmer, K.J. 2008. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union.

Espinosa, de los M.A. 2002. Sistemática y evolución molecular: su importancia en la conservación de las aves. En: Gómez, de S.H. y Oliveras de I.A (Eds.). *Conservación de aves experiencias en México*. CIPAMEX. México, D.F.

Espinosa, A. L. 2007. Filogeografía y Vertebrados Cap. 17. En: Eguiarte, L. E., Souza, V y Aguirre, X. Compiladores. *Ecología Molecular*. México. SEMARNAT, INECOL, UNAM y CONABIO. Pp517-539.

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

Flores, V. O. y Gerez, P. 1994. *Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso del suelo*. México, Ediciones técnico científicas SA de CV.

Funk, D.J. y Omland, K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 34: 397-423.

Futuyma, D.J. *Evolutionary biology*. Massachusetts, Sinauer Associates, 1998.

García-Trejo, E., Navarro-Sigüenza, A. 2004. Patrones biogeográficos de la riqueza de especies y el endemismo de la avifauna en el oeste de México. *Acta Zoológica Mexicana*. 20: 167:185.

García-Moreno, J., Navarro-Sigüenza, A., Townsend, A. y Sánchez-González, L. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the Common Bush-tanager (*Chlorospinifus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogebetics and Evolution*: 33: 186-196.

González, C., Ornelas, J., Gutierrez-Rodríguez, C. 2011. Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology*. 11: 1-38.

Haring, E., Kruckenhauser, L., Gamauf, A., Riesing J.M. y Pinsker, W, 2001. The Complete Sequence of the Mitochondrial Genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) Indicates an Early Split in the Phylogeny of Raptors. 18: 1892-1904.

Hedrick, P. 2005. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publisher. United States of America.

Hwang, U. y Kim, W. 1999. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mtDNA commonly used in Molecular Systematics. *The Korean Journal of Parasitology*. 37: 215-228.

Klicka, J. y Zink, R., 1997. The importance of Recent Ice Ages in Speciation: A Failed Paradigm . *Science Society for Molecular Biology and Evolution*. 277: 1666-1669.

Lovette, I.J. y Bermingham, E. 2002. What is a wood-warbler? Molecular characterization of a monophyletic Parulidae. *Auk* 119: 695-714.

Lovette, I.J, Pérez-Emán, J.L. y Sullivan, J. 2010. A comprehensive multilocus phylogeny for the wood-warblers and a revised classification of Parulida (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57: 753-770.

Marshall, C. y Liebherr, J. 2000. Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. *Journal of Biogeography*. 27: 203-216.

Milot, E., Lisle, G. y Hobson, K. 2000. Phylogeography and genetic structure of northern populations of the yellow warbler (*Dendroica petechia*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 9: 667-681.

Morrone, J.J. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 76: 207-252.

Morrone, J.J. 2005. Sistemática, biogeografía, evolución: los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio. Facultad de Ciencias UNAM, Distrito Federal, México.

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

Navarro-Sigüenza, A., Peterson, Lopez-Medrano. Y Benitez, D.2001 Species limits in Mesoamerican *Aulacorhynchus* Toucanets. *Wilson Bulletin*. 113: 363-372.

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

Padilla, J. R. 2007. Evolución geológica del sureste mexicano desde el Mesozoico al presente en el contexto regional del Golfo de México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. Tomo LIX, numero. 1: 19-42.

Pérez-Emán, J.L. 2005. Molecular phylogenetics and biogeography of the Neotropical redstarts (*Myioborus*; Aves, Parulinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37: 511-528.

Piñero, D., Barahona. A., Eguiarte. L., Rocha. A., Salas. A. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En: *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, Pp. 415-435.

Posada, D. y Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA Substitution. *Bioinformatics*. 9: 817-818.

Puebla-Olivares, F., Bonaccorso, E., Espinosa de los Monteros, A., Omland, K. E., Llorente-Bousquets, J. E., Townsend, A., Y Navarro-Sigüenza, A.G. 2008. Speciation in the Emerald Toucanet (*Aulacorhynchus prasinus*) complex. *Auk*. 135: 39-50.

De Queiroz, K. 2005. Ernst Mayr and the modern concept of species. *PNAS*. 102: 6600-6607.

Quinn, T. 1997. Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome. En: Mindell, D.(Ed.). *Avian Molecular Evolution and systematics*, Academic Press, EUA. 382 pp. (4-23).

Rambaut, A. 2006. FigTree. Institute of Evolutionary Biology. University of Edinburgh. UK.

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

Ronquis, F. y Huelsenbeck, J.P. 2003. Mr Bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.

Rozas, J., Librado, P., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X. y Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19: 2496-2497.

Schneider, S., Roessli, D. y Excoffier, I. 1997. Arlequin: A software for Population Genetics data analysis. Geneva, Switzerland: University of Geneva, Genetics and Biometry laboratory.

Schaal, B.A., D.A. Hayworth, K.M. Olsen, J.T. Rausher, W.A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7:465-474.

Slatkin, M. 1994. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.

Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E., Yuri, T. y Mindell, D.P., 1998. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular. Phylogenetics. Evolution*. 12: 105–114.

Spicer, G.S. y Dunipace, L. 2004. Molecular phylogeny of songbirds (Passeriformes) inferred from mitochondrial 16S ribosomal RNA gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 30: 325-335.

Stiles, F.G. y Skutch, A. F. A guide to the birds of Costa Rica. Ithaca, New York, Comstock publishing associates, 1989.

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

Swofford, D. L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), 4.0 ed, Sinauer, Sunderland, MA.

Torres, S.V. y Rodrigues, F. 2010. Biogeographic history of the species complex *Basileuterus culicivorus* (Aves, Parulidae) in the Neotropics. *Molecular. Phylogenetics and. Evolution*. 57:585-597.

Torres, M.G. y Navarro-Sigüenza. A. 2000. Los libries de México, brillo de la biodiversidad. *CONABIO. Biodiversistas*. 28: 1-6.



Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 24:4876-4882.

Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics.* 105:437-460.

Vázquez, E. 2007. Filogeografía y Vertebrados Cap. 14. En: Eguiarte, L. E., Souza, V y Aguirre, X. Compiladores. *Ecología Molecular.* México. SEMARNAT, INECOL, UNAM Y CONABIO. Pp441-461.

Watterson, G.A. 1975. "On the number of segregating sites in genetic models without recombination.", *Theoretical Population Biology.* 7 (2): 256-276.

Webb, T. III y Bartlein, P.J. 1992. Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annual Reviews of Ecology and Systematics.* 23:141-173.

Weir, J.T. 2006. Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland Neotropical birds. *Evolution.* 60:842-855.

Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics.* 16: 97-159.

Zink, R.M. y Klicka, J. 2006. The tempo of avian diversification: A response to Johnson and Cicero. *Evolution.* 60:411-412.

Zwicl, D.J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion Ph. D. dissertation, University of Texas, Austin.

## Apéndice I

Localidades de colecta de *B. culicivorus* zona este de México (grupo MNO).

Estado	Localidad	Catalogo	Coordenadas
Hidalgo	El coyol, 1km al Este.	AMT 168	21.06667,-9873
Hidalgo	El coyol, 1km al Este.	AMT 178	21.06667,-9873
Hidalgo	San Simón.	Tepe 10	999,999
Hidalgo	San Simón.	Tepe 20	999,999
Hidalgo	Pilcuatla.	BEHB 234	20.95,-9855
Hidalgo	Cerro Jarros, 1km al Este.	HGO-SLP 036	20.993.-99.145
Hidalgo	El coyol, 1km al Este.	SLA 021	21.07,-98.95
Hidalgo	Huayapa.	HUAS111	21.064,-98.672
Tamaulipas	Zona arqueológica El Sabinito, 5 km al Noroeste.	CONACYT 1111	23.66028, -98.4
Tamaulipas	Zona arqueológica El Sabinito, 5 km al Noroeste	CONACYT 1122	23.66,-98.4
Tamaulipas	San Pablo Vista Hermosa.	CONACYT 1262	24.61,-99.35
Tamaulipas	San Pablo Vista Hermosa.	CONACYT 1255	24.61,-99.35
Veracruz	Arroyo Cayoapan, 10 km. al Este de Teocelo.	MT 307	19.36,-96.87
Veracruz	Arroyo Cayoapan, 10 km. al Este de Teocelo.	MT 292	19.36,-96.87
Veracruz	Zacualpan.	Zac 33	20.46,-98.31
Puebla	Salto Chico, camino a Presa Necaxa.	IALL 163	20.21,-97.99
Puebla	Salto Chico, camino a Presa	IALL 142	20.21,-97.99
Puebla	Cuitchat, 8km Nor-Este de Cuetzalan.	PUE 091	20.09,-97.51
Puebla	Cuitchat, 8km Nor-Este de Cuetzalan.	PUE 079	20.09,-97.51
Puebla	Jonotla.	PUE 132	20.04,-97.62
San Luis P.	San Nicolás de los Montes en el Río	CONACYT O433	22.12,-99.4183
Querétaro	El pemoche.	QRO 276	21.22,-99.10
Querétaro	Tangojé.	QRO 069	21.16,-99.10
Querétaro	Tangojé.	QRO 077	21.16,-99.10

**Localidades de colecta de *B. culicivorus* zona oeste de México (grupo MSU)**

Estado	Localidad	Catalogo	Coordenadas
Guerrero	Nueva Delhi.	SIT 057	17.41,-100.2
Guerrero	Nueva Delhi.	SIT 052	17.41,-100.2
Guerrero	Nueva Delhi.	SIT 042	17.41,-100.2
Guerrero	El Molote.	ATO 030	17.44.-100.2
Chiapas	Porción norte de la Omega, Monumento Natural.	YACH 499	16.90,90.97
Chiapas	Porción norte de la Omega, Monumento Natural.	YACH 500	16.90,-90.973
Chiapas	Zona Arqueológica de Yaxchilán.	YACH 524	16.08.-90.97
Oaxaca	Yucunino, cerca de Santa Ana del Progreso, Putla.	OMVP 660	16.82,-97.88
Oaxaca	Distrito de Juquila, 4km al Este Pequeñas Negras.	OMVP 1013	16.23,-97.28
Oaxaca	Chalchijapa, 2,3 km al noreste del poblado.	CHIMA 322	17.06,-94.58
Oaxaca	Chalchijapa.	CHIMA 488	17.05,-94.673
Oaxaca	Finca el Brasil.	CONACYT 04219	15.93,-96.42
Oaxaca	Pluma Hidalgo, el Brasil.	PLU 049	15.93,-96.42
Oaxaca	Pluma Hidalgo, el Brasil.	PLU 048	15.93,-96.42
Oaxaca	Puerto de la Soledad.	OMVP 633	18.16,-96.99
Oaxaca	Ejido clemencia.	OMVP 651	18.16,-96.99
Oaxaca	Chalchijapa, 2.3 km antes del pueblo en galera.	OMVP 0519	17.06,-94.58
Oaxaca	Chalchijapa, 2.3 Km antes del pueblo en Galera	OMVP 523	17.051, -94.58
Oaxaca	Chalchijapa, 2.3 Km antes del pueblo en Galera	OMVP 0529	17.051, -94.58
Michoacán	La verdura	DEUT 043	19.66,-102.54
Campeche	Calackmul el arroyo silvituc.	B 1918	18.85, -89.57