



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Variación genética del carpintero ahumado *Picoides fumigatus*  
(Aves: Picidae. Picinae)**

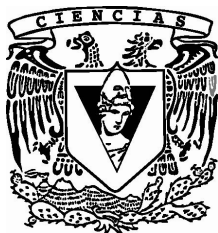
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G O**

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

**JESÚS SANTIAGO GARCÍA**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS  
(AÑO 2013)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Santiago  
García  
Jesús  
54 29 59 29  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
304183838
2. Datos del Tutor  
Dra.  
Blanca Estela  
Hernández  
Baños
3. Datos del Sinodal 1  
Dra.  
Livia Socorro  
León  
Paniagua
4. Datos del Sinodal 2  
Dra.  
Roxana  
Acosta  
Gutiérrez
5. Datos del Sinodal 3  
Dr.  
Juan José  
Morrone  
Lupi
6. Datos del Sinodal 4  
M. en C.  
Luz Estela  
Zamudio  
Beltrán
7. Datos del Trabajo Escrito  
Variación genética del carpintero ahumado *Picooides fumigatus* (Aves: Picidae. Picinae)  
59 p.  
2013

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haber sido parte fundamental de mi formación académica.

A la Dra. Blanca Estela Hernández Baños, porque con su apoyo y recibimiento en su laboratorio, este trabajo pudo ser realizado.

A Germán García Lugo, por la realización de ilustraciones de las subespecies de *P. fumigatus* presentes en México.

Al financiamiento otorgado por el PAPIIT-UNAM para el proyecto No. IN-225611 “Filogenia molecular y filogeografía del complejo *Eugenes fulgens* (Aves: Trochilidae) utilizando genes mitocondriales y nucleares” a cargo de la Dra. Blanca Estela Hernández Baños.

A los miembros de mi jurado Dra. Blanca Estela Hernández Baños, M. en C. Luz Estela Zamudio Beltrán, Dra. Livia León Paniagua, Dra. Roxana Acosta Gutiérrez y al Dr. Juan José Morrone Lupi, que gracias a sus valiosas aportaciones y comentarios este escrito pudo ser mejorado.

Al Doctor Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza y al Biólogo Alejandro Gordillo Martínez, por el préstamo del Handbook of the birds of the world. Volumen 7; para la obtención de imágenes e información relacionada con el tema de tesis.

A los curadores de las colecciones de piel y tejido del Museo de Zoología “Alfonso Luis Herrera” de la Facultad de Ciencias UNAM: Blanca Estela Hernández Baños y Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la UNAM y la Facultad de Ciencias que durante todo este tiempo ha sido mi casa, donde he vivido momentos únicos, tanto en el ámbito académico como en el social.

A la Doctora Blanca Estela, pues si su ayuda no hubiese sido posible, la realización de mi servicio social en la colección de tejidos y posteriormente la realización de tesis.

A mis padres Cristela y Camerino, gracias a ellos he podido llegar a ser la persona que soy, pues sus consejos ayuda y ánimo en todo momento me han hecho sentir arropado.

A mis abuelitas † Teresa y Soledad que me cuidaron desde pequeño.

A mi hermana Lorena, con quien he compartido momentos difíciles y alegres, además de brindarme su apoyo incondicional.

A mi hermano Gustavo.

A mi Familia en general.

A la persona que se ha vuelto parte de mi familia, Alma Violeta quien me ha brindado momentos realmente hermosos.

A mis compañeros de cubil, M en C. Luz Estela, Biól. Anuar, Biól. Alma Melisa “Gibson” por ayudarme a realizar análisis de este trabajo, Biól. Marisol por los comentarios y sugerencias de un primer escrito y su ayuda para generar la imágenes, además porque el discutir cosas con todos ellos, me hizo buscar más respuestas a las preguntas se surgían en el día a día.

## ÍNDICE

Resumen .....	vii
Abstract .....	viii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Estructura genética.....	2
1.2 Marcadores moleculares .....	5
1.3 Genoma mitocondrial.....	6
1.4 Intrones.....	8
1.5 Antecedentes.....	9
1.6 Descripción de la especie .....	14
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. ....	
III OBJETIVOS .....	17
3.1 Objetivo general: .....	17
3.2 Objetivos específicos: .....	17
3.3 Hipótesis .....	17
IV MÉTODO .....	18
4.1 Obtención de las muestras.....	18
4.2 Trabajo de laboratorio.....	18
4.3 Edición de secuencias .....	20
4.4 Alineamiento de secuencias.....	21
4.5 Análisis de Estructura y variación genética .....	22
4.6 Reconstrucción de relaciones filogenéticas .....	23
4.7 Distribución <i>mismatch</i> .....	25
V RESULTADOS.....	25
5.1 Estructura y variación genética .....	25
5.2 Análisis filogenéticos .....	28
5.3 Distribución <i>mismatch</i> .....	38
VI DISCUSIÓN .....	39
VII CONCLUSIONES .....	44
VIII Literatura consultada .....	45
Apéndice 1.- Protocolo de extracción de DNA.....	58
Apéndice 2. Lista de especies utilizadas en este estudio .....	60
Apéndice 3.- Matriz de distancias genéticas de <i>Nei</i> .....	61

## Resumen

En este estudio se determinó la variación genética presente para poblaciones del carpintero ahumado *Picoides fumigatus* en México, actualmente hay descritas cinco subespecies en función a sutiles diferencias morfológicas en toda el área de su distribución, para el país se tienen reportadas dos: *Picoides fumigatus sanguinolentus* y *P. f. oleaguineus*. Se empleó el marcador mitocondrial NADH deshidrogenasa (ND2) para explorar la variación genética y se dio un primer enfoque al utilizar el marcador nuclear ACOI INTRON 10 para dar soporte a las reconstrucciones filogenéticas realizadas con Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Los resultados mostraron la existencia de dos entidades evolutivas pues el valor obtenido por  $F_{ST} = 0.91521$  indica que existe más variación entre las poblaciones que dentro de ellas, además en cada topología obtenida se observó la correspondencia de la separación de dos subclados, por un lado se agrupan las muestras de los estados de Oaxaca, Campeche y Chiapas y por el otro las muestras de Hidalgo, Veracruz y Puebla; que concuerdan con los análisis genéticos, es decir podemos reconocer el clado PCM correspondiente a la subespecie *P. f. oleaguineus* (Hidalgo, Puebla y Veracruz) que se distribuye en la parte norte del país y el otro clado en la parte sureste PSM correspondiente a la subespecie *P. f. sanguinolentus* (Oaxaca, Chiapas y Campeche), observándose que la Faja Volcánica Transmexicana es una fuerte barrera para la distribución de estas dos subespecies. Los resultados también indican que el marcador nuclear ACO1 INTRON 10 aporta información acerca de la reconstrucción obtenida en este trabajo apoyando lo encontrado con el gen mitocondrial ND2.

## Abstract

We determined the genetic variation in Mexican populations of smoky-brown woodpecker; there are five subspecies described according to subtle morphological differences in all area of distribution in Mexico we found two subspecies: *Picoides fumigatus sanguinolentus* and *P. f. oleagineus*. We used the mitochondrial marker NADH dehydrogenase (ND2) to explore the genetic variation and a preliminary approach and used the nuclear marker ACO1 INTRON 10 for support to the phylogenetic reconstructions undertaken with Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian Inference. The results showed the existence of two evolutionary units based on the value of  $F_{ST}= 0.91521$ . It indicates that exist more variation between the populations that among them, additionally in each topology obtained correspondence of the split of two clades was the same. One group includes to the subspecies *P. f. sanguinolentus* Oaxaca, Campeche, and Chiapas, and another includes samples correspondent to the subspecies *P. f. oleagineus* from Veracruz, Puebla, and Hidalgo. These results are supported by the genetic analysis. The nuclear marker used in this study provides information about the evolution of the group and supports the hypothesis found by the mitochondrial marker.



## I. INTRODUCCIÓN

La biología evolutiva tiene como principio entender cómo se originó y ha ido cambiando la diversidad biológica a lo largo del tiempo (Cracraft & Prum, 1988). Así lugares, con alta diversidad en ecosistemas se vuelven fundamentales para investigar los procesos implicados en el modelado de la variación genética que resulta la materia para estudiar el proceso de la especiación (Haffer, 1969).

Una manera de comprender la situación biológica actual de México, es analizando su fisiografía (Toledo, 1982), pues su paisaje se ve dominado principalmente por cadenas montañosas y cuencas (Hernández-Baños *et al.*, 1995) aunque al norte del país hay una gran meseta rodeada por la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental, que son cadenas montañosas formadas en diferentes momentos de la historia geológica (López de Llergo, 2003). Sus tipos de suelo y su variedad de climas, producto de la distribución heterogénea de la humedad como consecuencia de ser una masa continental estrecha su influencia directa de dos masas oceánicas, así como el efecto de las sombras orogénicas formadas por los grandes cuerpos montañosos que flanquean al territorio mexicano a lo largo y ancho del mismo (Ramos, 1993) ocasionando que los aspectos ecológicos y geológicos para México sean complejos (García-Moreno *et al.*, 2004). Además, una de las cualidades más importantes para el país es su ubicación geográfica en el continente americano, pues es la zona de contacto de dos grandes regiones biogeográficas: la región Neártica (Norteamérica) y la Neotropical (América Latina y el Caribe) (García-Moreno *et al.*, 2006), además de la culminación de la formación del Istmo de Panamá hace aproximadamente 3.5 m.a. Este puente terrestre sirvió como corredor biológico para el intercambio faunístico entre estas dos regiones biogeográficas mencionadas, algunas veces el Istmo de Panamá actuó como una barrera para los organismos marinos pues quedaron aisladas las aguas del Océano Atlántico y las del Pacífico (Marshall *et al.*, 1982; Coates *et al.*, 1992). Y en los organismos terrestres, aunque les sirvió de puente, también fue una barrera de distribución. Todas estas características y tipos de relieve han ayudado

a que la distribución de los organismos se vea influenciada, delimitándolos a ciertas áreas muy particulares, propiciando en algunos de ellos una distribución muy restringida e incluso de endémicidad (Fa & Morales, 1993; Flores-Villela, 1993; Pérez-Emán, 2005; Castoe *et al.*, 2009). Pues se presentan condiciones que se vuelven barreras para la dispersión y colonización en organismos que no pueden flanquearlas (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Barber & Klicka, 2010). Todo lo anterior ha tenido consecuencias en la región donde se presenta alta diversidad de aves (Haffer, 1990).

El elevado número de hábitats en el territorio nacional ha permitido realizar diversos trabajos con el grupo de las aves. Estos estudios incluyen el establecimiento de áreas de endemismo (Marks *et al.*, 2002), de variación genética (Miller *et al.*, 2010), biogeográficos (Navarro *et al.*, 2004; Vilaca and Santos, 2010), filogeográficos (Hackett, 1996; González *et al.*, 2003; Eberhard & Bermingham, 2005; Tavares *et al.*, 2006; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2011). También estudios de esta índole se han realizado con otros vertebrados como mamíferos (Sullivan *et al.*, 1997; Eizirik *et al.*, 2001; Cortés-Ortiz *et al.*, 2003; Rico *et al.*, 2008) reptiles (Zarza *et al.*, 2008; Daza *et al.*, 2009) y anfibios (Mulcahy *et al.*, 2006; Conlon *et al.*, 2010).

### 1.1 Estructura genética

La variación genética es determinada por las diferencias que existen entre secuencias de la misma región del DNA, estas diferencias llegan a generar cambios en la morfología, fisiología de los individuos, afectando la supervivencia y reproducción de los mismos; así las fuerzas evolutivas modifican la variación genética, mientras que la selección y mutación la aumentan, por otro lado la deriva génica y la endogamia la disminuyen. Para describir cómo se encuentra distribuida la variación genética dentro y entre las poblaciones se han establecido aproximaciones las cuales se les ha asignado el término “estructura genética” (Trejo, 2005), al igual que la estimación del flujo génico como ha sido el modelo de islas de Wright en donde al interior de una especie, con un número

dado de poblaciones, cada población reemplaza una parte de sus residentes, a partir de individuos obtenidos al azar de otras poblaciones locales (Turner *et al.*, 2000).

Los factores ecológicos y/o demográficos pueden modificar la estructura poblacional volviéndola dinámica, para que las poblaciones alrededor de una especie cambien y así puedan adaptarse o extinguirse (Astorga & Ortiz, 2006), ya que la evolución adaptativa es uno de los procesos fundamentales que buscan comprender tanto la ecología como la biología evolutiva. Pues los organismos al ser tan complejos fenotípicamente y sobre todo genotípicamente, los estudios que en ellos se realizan es a través de un número limitado de caracteres, ya que muchos de ellos están influenciados por decenas o cientos de loci (Postma & Van Noordwijk, 2005).

Una especie puede estar estructurada con una distribución continua o no, y cuando las poblaciones presentan una conectividad mínima o nula entre ellas como resultado de la fragmentación de su hábitat, la disminución en la cantidad de individuos que se dispersan es un factor que condiciona el tamaño efectivo poblacional y flujo génico (Lindsay *et al.*, 2008), así como también puede ser determinante en formar unidades genéticamente distintas (Marks *et al.*, 2002).

Las barreras contra la dispersión pueden influir directamente en la variación geográfica de las poblaciones, aquellas que presenten preferencias por un determinado hábitat, su capacidad de dispersión así como las características topográficas de una región tales como los ríos, cadenas montañosas o hábitats disyuntos pueden inhibir la vagilidad de las especies (Brawn *et al.*, 1996; Keever *et al.*, 2009), ya que es importante para los análisis evolutivos (Barber & Klicka, 2010) entender el proceso de diversificación mediante barreras o dispersión que se considera como el primer paso hacia la especiación alopátrica (Endler, 1977).

La diferenciación genética en aves se considera baja, más que en otros vertebrados por la gran movilidad que tienen. Éstas presentan altos niveles de flujo génico y un tamaño

efectivo de la población alto (Winker *et al.*, 2000). En otros casos más, en ciertas especies el equilibrio existente entre la migración y la deriva génica contrarrestan el efecto del aislamiento geográfico (Galbusera, 2004).

En el flujo génico intervienen diferentes mecanismos (migración, eventos de extinción y colonización, movimiento de gametos) que dan como resultado el movimiento de genes de una población a otra dentro de la misma especie (Slatkin, 1981), aunque puede llegar a darse entre diferentes especies conocido como la introgresión (Saetre *et al.*, 2001). De esta manera, una población representa una poza génica común y al interior de ella las fuerzas evolutivas actúan, manteniendo y eliminando la variación genética (Eguiarte, 2009). Estos mecanismos ayudan a que se puedan dar adaptaciones locales resultando en evolución adaptativa para ambientes complejos (Whitlock & McCauley, 1999), esto es de gran importancia entre las poblaciones, pues mantiene la integridad de una especie (Wolf & Soltis, 1992). Este proceso es un componente esencial de la estructura poblacional ya que los niveles y patrones son los que precisan el nivel en el cual una población de cierta especie se considera como una unidad evolutiva independiente, ya que si existe un grado de flujo génico bajo entre poblaciones de una especie, estas pueden llegar a diferenciarse, pero si existe una gran cantidad de flujo génico entre las poblaciones, estas podrán evolucionar conjuntamente (Slatkin, 1994).

El flujo génico se puede estimar a partir de métodos directos o indirectos para ver la vagilidad de los individuos así como de los gametos. Los primeros se pueden realizar a partir de marcaje o anillamiento mediante captura y recaptura de individuos, análisis de parentesco, con este tipo de metodologías se permite establecer que tanto se han movido los alelos, aunque este tipo de estudios no son un tanto confiables pues llega a establecerse un grado de incertidumbre ya que no se sabe si los individuos se logran reproducir, además de que se mide el desplazamiento en lugares donde puede que no sea el área de distribución de la especie y no contribuya al aporte genético (Whitlock & McCauley, 1999). A su vez los métodos indirectos tratan de comparar secuencias

nucleotídicas para detectar diferencias a nivel molecular, para ver el grado de similitud o diferenciación que presenten los organismos y determinar cuan cercanos o diferentes son los individuos de las poblaciones de una especie (Eckert *et al.*, 2008).

## 1.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares constituyen métodos de análisis genético-moleculares basados en la detección de polimorfismos en proteínas y a nivel secuencia de DNA (Trejo, 2005). Caracterizados como puntos de referencia ubicados en el genoma, sirven como herramientas para revelar lugares de variación a nivel de secuencia de DNA (Allendorf *et al.*, 2010) y ayudan a detectar la variación genética que puedan llegar a presentarse dentro y entre las especies (Frankham *et al.*, 2002).

El utilizar marcadores moleculares de distinto origen, nos ofrecen una medida precisa para hacer comparaciones entre organismos e inferir genealogías que muestran las relaciones entre los organismos (Pace, 1997), y con el desarrollo de técnicas moleculares en estudios de evolución ha permitido tener una comprensión más amplia de la diversidad genética dentro de las poblaciones naturales (Excoffier *et al.*, 1992). Para el presente trabajo utilizamos como marcadores moleculares, el gen mitocondrial NADH deshidrogenasa (ND2), y el nuclear ACO1 INTRON-10.

La utilización del DNA se ha percibido como una huella genética que al compararse con un conjunto de secuencias de la misma o diferente especie nos brinda un estimado del grado de parentesco; de este modo los genomas que se heredan uniparentalmente, (mitocondria) y que no sufren del proceso de recombinación pueden proporcionar información acerca de las relaciones filogenéticas entre los individuos (Soranzo *et al.*, 1999). Los métodos moleculares han ofrecido un gran número de caracteres nuevos “marcadores moleculares” que han resultado de gran utilidad en estudios de sistemática (Hackett, 1996). Sin embargo una molécula que se emplea en análisis genéticos y

filogenéticos debe presentar una serie de atributos que la hagan elegible (Awise *et al.*, 1987):

-Ser distintiva, ampliamente distribuida para asegurar comparaciones homólogas entre un amplio rango de organismos.

-Ser un material fácil de aislar y experimentar.

-Presentar una estructura genética sencilla, carente de características complicadas tales como DNA repetitivo, elementos transponibles, pseudogenes o intrones.

-Exhibir un modo sencillo de transmisión genética, sin recombinación o reordenamientos genéticos.

-Proporcionar estados de carácter elegibles de aquellas interrelaciones filogenéticas, que deben ser inferidas por criterios razonables de parsimonia y por las propuestas de análisis evolutivos.

-Evolucionar rápidamente, de tal manera que nuevos estados de carácter surjan dentro del tiempo de vida de una especie. De este modo el mtDNA se convierte en la molécula indicada en reunir estas características, (Awise *et al.*, 1987).

### 1.3 Genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial animal es una molécula uniforme, pequeña (*ca.* 16-20 kb) y circular, constituido por un total de 37 genes, de estos 22 codifican para RNA de transferencia, 13 para polipéptidos que forman parte de los complejos multienzimáticos útiles en los procesos de la mitocondria y los dos restantes para RNA ribosomales, carece de intrones (regiones no codificantes) por lo que este genoma es altamente compacto (Stansfield, 1992), también cuenta con una región control o *D-Loop* Displacement loop (*ca.*

1 kb) que es el fragmento más variable, pues su tasa de mutación es alta y se encarga de controlar la transcripción y replicación (Clayton, 1992). Presenta un papel fundamental en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa para generar la energía celular (Birky *et al.*, 1989). En todos los vertebrados el contenido genético mitocondrial es el mismo sin embargo, el arreglo de sus componentes varía en las aves con respecto a mamíferos y anfibios (Quinn, 1997) (Figura 1).

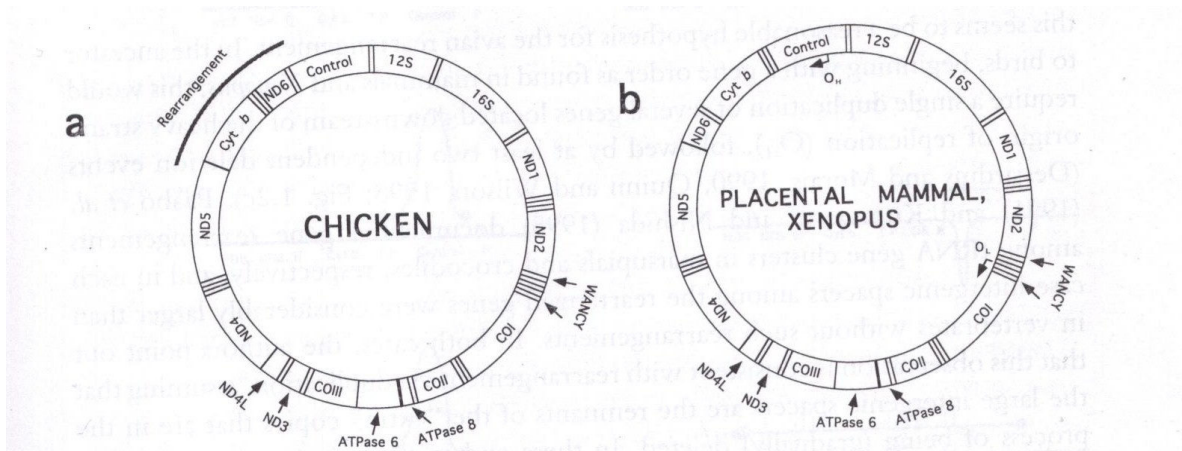


Figura 1.- Genomas mitocondriales de tres grupos de vertebrados tomada de: Quinn, 1997.

El mtDNA ha venido a revolucionar los estudios de variación genética y filogeografía, en comparación con otros marcadores que se habían utilizado, éste se ha vuelto importante pues no presenta recombinación (donde el material genético de los progenitores se intercambia), a diferencia del DNA nuclear, donde sí se da la recombinación durante el proceso de la meiosis. En cada célula somática, existe un gran número de mitocondrias (cientos o miles) y por lo tanto una gran cantidad de la molécula que se hereda mediante la madre, esta característica hace que la mayoría del polimorfismo que presenta no esté bajo selección (Avice *et al.*, 1983) pues las mitocondrias del padre se quedan en la cola del espermatozoide no ingresan al interior del ovulo y las que lo llegan a hacer son degradadas.

A diferencia del DNA nuclear el mtDNA no presenta histonas asociadas a él, permitiéndole evolucionar mucho más rápido que una copia de DNA nuclear, ya que la mutación es el proceso que ocasiona variación, principalmente por sustituciones nucleotídicas (Brown *et al.*, 1979).

#### 1.4 Intrones

Descubiertos en 1977 independientemente por Phillip A. Sharp y Richard J. Roberts, revolucionaron el campo científico al demostrar que las secuencias codificantes de DNA “exones” se encuentran intercaladas con secuencias no codificantes “intrones”, (Roy & Gilbert, 2006). Inicialmente se pensaba que los intrones se presentaban sólo en eucariontes y no en procariontes, siendo esta una de las diferencias más notables entre los dos grandes grupos de organismos. Pues mientras que para los eucariontes el proceso de transcripción se lleva a cabo en el núcleo donde todo un gen es convertido en pre-mRNA, para posteriormente eliminarle los intrones y pegar sólo los exones mediante el *splicing* y así el producto pueda ser leído y convertido en proteínas u otros RNA’s sin en cambio en procariontes el proceso de transcripción y traducción es realizado a la par (Lynch & Richardson 2002). Aunque se ha detectado la presencia de intrones en algunos procariontes como *Thermosynechococcus elongatus* (Nakamura *et al.*, 2002).

Estas secuencias se han ocupado en análisis filogenéticos para obtener árboles de genes que puedan llegar a ser congruentes con los árboles de especies y establecer de una forma precisa las relaciones entre individuos de una especie o entre especies. Su valor como marcador molecular radica en que son secuencias que evolucionan de forma neutral y más rápido que los exones, pero un poco más lento que los genes de la mitocondria (Baker *et al.*, 2006).

Estos marcadores moleculares combinados con la técnica de la PCR por sus siglas en inglés (reacción en cadena de la polimerasa), ha permitido el aumento en los análisis genéticos, pues es un componente básico y esencial que ha revolucionado el campo de la biología



molecular. La PCR es una técnica *in vitro* que permite obtener varias copias de un segmento específico de DNA en pocas horas. Desarrollada por Kary Mullis en los 80's, siendo la enzima DNA polimerasa que actúa en las células la molécula clave (Mifflin, 2003).

## 1.5 ANTECEDENTES

### *Familia Picidae*

La familia Picidae está constituida por tres subfamilias: Jynginae, Picumninae y Picinae (Peters, 1948; Short, 1982; Winkler & Christie, 2002), para las cuales se han descrito aproximadamente 225 especies, presentan una distribución casi cosmopolita, excepto Madagascar, continente australiano y regiones polares (Howell & Webb, 1995; Fuchs *et al.*, 2006). Junto con las familias Ramphastidae, Bucconidae, Capitonidae, Galbulidae, Indicatoridae, Lybiidae, Megalaimidae, constituyen el orden de los Piciformes (Gill & Donsker, 2012).

Los carpinteros "verdaderos" (Piciformes: Picidae: Picinae), han sido considerados un grupo uniforme y monofilético, con poca información acerca de sus caracteres ancestrales debido al sesgo en el registro fósil (Webb & Moore, 2005; Zelenkov, 2007), algunos autores han postulado que este grupo es relativamente joven dentro de las aves pues se habían encontrado huesos que databan del Plioceno (Short, 1974), aunque el origen de este grupo se ha remontado aún más en el pasado pues para el 2001, en Alemania se reportó el hallazgo de un tarsometatarso de piciforme en sedimentos del Oligoceno, el cual presenta similitud en tamaño y forma al de la especie *Dendropicos fuscescens* (Mayr, 2002).

Las aves pertenecientes a esta subfamilia (Picinae) cuentan con una serie de sinapomorfías que les han permitido vivir en los árboles; cuentan con un pico fuerte que es delgado hacia la parte posterior el cual les ayuda a excavar en los troncos para formar cámaras de anidamiento, dormitorios y para obtener alimento; el cráneo está muy endurecido así previenen daños a nivel cerebral (Howell & Webb, 1995); los orificios del

rostro como ojos y nostrilos cuentan con protecciones propias para evitar la introducción de partículas arrojadas al momento del golpeo en el árbol: en los primeros una membrana delgada es cerrada milésimas de segundos antes del contacto, mientras que en la superficie de los nostrilos de un gran número de carpinteros se encuentran cubiertos por mechones de plumas que se disponen hacia adelante; un aparato hioideo elongado que le da soporte a la lengua la cual presenta una serie de proyecciones “lengua parvada” (Webb & Moore, 2005) apta para sus hábitos alimenticios que les permite sacar insectos y larvas del interior de los árboles; los muslos son cortos y fuertes; los dedos de los pies tienen garras, y estos se encuentran en una posición zigodáctila, la cola cuenta con plumas en donde sus ejes son rígidos y las puntas acuminadas que le ayudan a dar soporte al ave en los troncos, introduciéndose en las irregularidades en los troncos, funcionando como un accesorio para apoyar el resto del cuerpo, permitiendo al animal que se aferre verticalmente y ascienda a lo largo del árbol. Este conjunto de características han resultado ser fundamentales en la biología de este grupo de aves, al brindarles una gran capacidad para cincelar la corteza de los árboles y poder alimentarse de las larvas e insectos adultos, aunque incluyen también en su dieta savia de los árboles, frutos y semillas (Fuchs, 2006).

En la mayoría de las especies de carpinteros, suele haber dimorfismo sexual en áreas pequeñas bien definidas como la cabeza y el cuello, exhibiendo una amplia variedad de tonos y colores que se han ocupado para asignarles sus nombres comunes y para su clasificación, a menudo son sedentarios a lo largo de su área de distribución (Stradi *et al.*, 1998). El número de géneros y especies puede variar dependiendo del autor, sin embargo de acuerdo con Winkler & Christie (2002) existen cerca de 183 especies agrupadas en 23 géneros para la subfamilia Picinae (“carpinteros verdaderos”).

A partir de características morfológicas y osteológicas se ha tratado de agrupar a estos organismos (Goodge, 1972), sin embargo, la revisión taxonómica más reciente de este grupo de aves, fue realizada por Lester Short (1982) quien agrupó a estos organismos tomando como base caracteres etológicos, biogeográficos y similitudes en la coloración

del plumaje; características que para este autor se compartían entre varios grupos de organismos cercanamente relacionados, a partir de ello los agrupo en seis grandes tribus (Melanerpini, Colaptini, Campephilini, Meiglyptini, Campetherini y Picini), de acuerdo con lo anterior el Género *Picoides* fue asignado a la tribu Campetherini.

En 1997 Moore & DeFilippis utilizando los marcadores moleculares de *Cyt-b* y *B-fibrinogen* intron 7, se exploraron las relaciones filogenéticas entre algunas especies de carpinteros y ver si coincidían con las clasificaciones propuestas anteriormente con base en caracteres morfológicos, etiológicos y biogeográficos, pues argumentaban que se necesitan respaldar las filogenias con datos moleculares y morfológicos, para aportar un grado de certeza mayor en la reconstrucción filogenética, así mismo las filogenias basadas en caracteres moleculares deben de realizarse con varios marcadores moleculares o genes de distinta naturaleza. Pues cuando se ocupan diferentes secuencias de genes mitocondriales el resultado filogenético es el mismo, pues estos se heredan como una sola molécula, así cuando se respaldan filogenias moleculares mitocondriales con nucleares se reduce el margen de error (Prychitko & Moore, 1997).

Posteriormente en otro estudio donde utilizaron los genes mitocondriales *COI* y *Cyt-b*, cuyo objetivo fue determinar el efecto que pueda tener la cantidad de pares de bases de la secuencia de un gen dado, en la resolución de la relaciones filogenéticas en grupos taxonómicos que hayan evolucionado recientemente, como es la familia Picidae, llegando a la conclusión de que efectivamente este tipo de genes mitocondriales son útiles al momento de querer resolver filogenias en organismos con tiempos de evolución relativamente cortos (DeFilippis & Moore, 2000).

Hasta hace unos años el estudio de las relaciones taxonómicas existentes entre los organismos se desarrollaba a través de la comparación de características anatómicas, fisiológicas, miológicas o conductuales de los representantes vivos y también de los ejemplares fósiles; actualmente la biología molecular y la genética permiten relacionar a los organismos a través del análisis del material genético transmitido a lo largo de la

historia evolutiva (Rivas, 1999). Por lo cual análisis realizados a partir de datos moleculares no consideran la agrupación de carpinteros en seis tribus si no en tres Dendropicini, Malarpicini y Megapicini (Webb & Moore, 2005; Fuchs *et al.*, 2007; Benz *et al.*, 2011). De igual forma la especie *Picoides fumigatus* hasta hace un par de años era considerada como *Veniliornis fumigatus* (Short, 1982), ya que en el 2006 William Moore y colaboradores realizaron un estudio donde utilizaron dos genes mitocondriales para resolver las relaciones filogenéticas de los géneros *Veniliornis*, *Picoides* y *Piculus*. Encontrando que los dos primeros son mutuamente parafiléticos, pues las topologías obtenidas a partir de Análisis Bayesiano, de Máxima Verosimilitud y Máxima Parsimonia indican que especies anteriormente clasificadas dentro de un género aparecen en otro, tal es el caso de la especie *Picoides fumigatus* la cual se creía pertenecía al género *Veniliornis* y en ese estudio aparece dentro del clado de los *Picoides* pequeños de Norteamérica, con un valor de apoyo de 100% en las tres topologías inferidas (Figura 2), mientras que otras especies del género *Picoides* aparecen dentro del clado del género *Veniliornis* (Moore *et al.*, 2006). Con la evidencia de este estudio en el año 2012 la especie *Veniliornis fumigatus* fuera transferida al género *Picoides*, para así ser renombrada como *Picoides fumigatus* (Chesser *et al.*, 2012).

Además Webb y Moore argumentan que la coloración en los carpinteros a través de su historia evolutiva se ha perdido o ganado de forma convergente (Webb & Moore, 2005), esta propiedad tal vez ha llegado a ser consecuencia de selección asociada al tipo de hábitat, por lo que algunas especies del género *Picoides* habrían perdido el modelo barrado dorsal como consecuencia de vivir en ambientes con vegetación densa (Webb & Moore, 2005) y por tal motivo algunas designaciones de especies colocadas en un determinado grupo son incorrectas y es necesario reevaluar las clasificaciones con base en criterios moleculares y morfológicos (Weibel & Moore, 2002a; Weibel and Moore, 2002b; Fuchs *et al.*, 2006 Benz *et al.*, 2011).

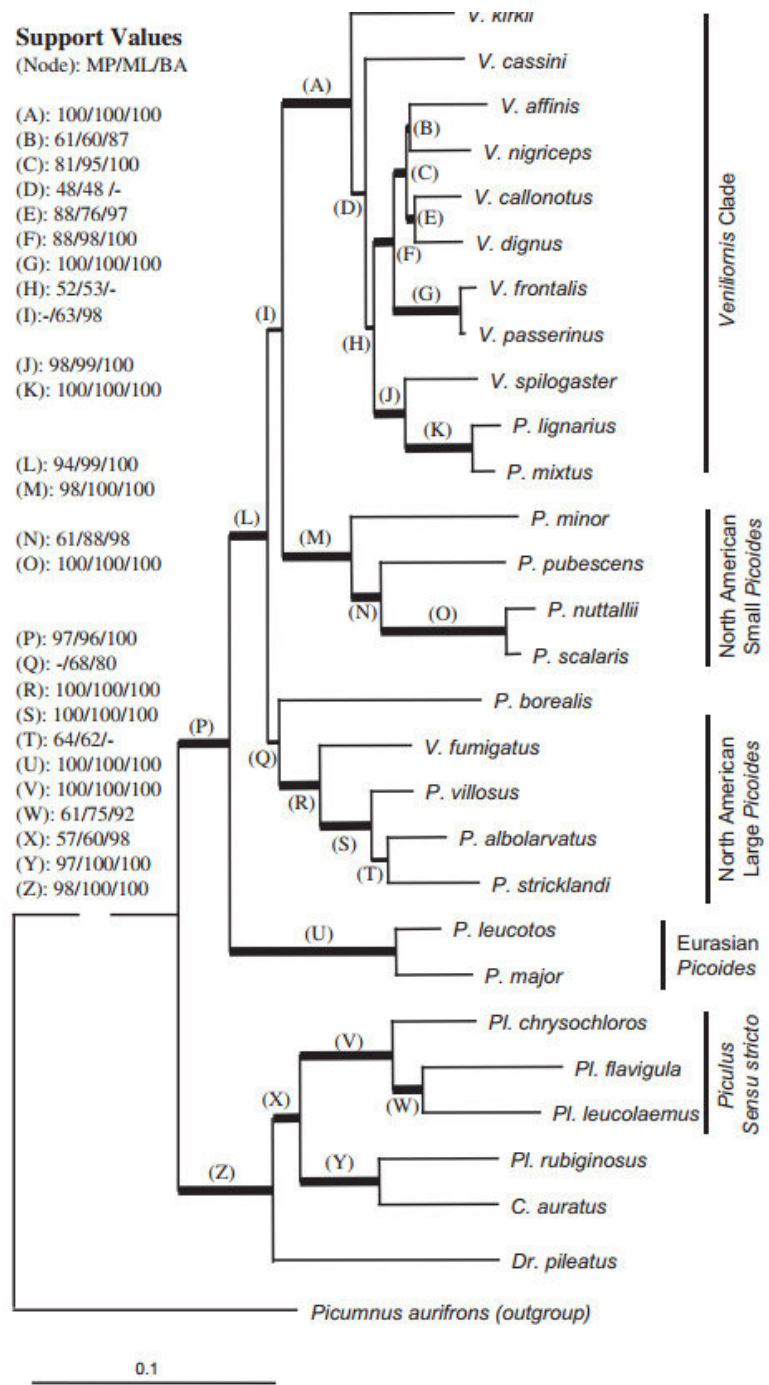


Figura 2.- Ubicación taxonómica de *Picoides fumigatus* con base en caracteres moleculares, tomada de Moore *et al.*, 2006.

## 1.6 Descripción de la especie

Short (1982) agrupo dentro del género *Picoides* una gran cantidad de organismos con representantes en los continentes americano, africano, asiático y europeo, siendo el género más diverso dentro de los pájaros carpinteros (Winkler *et al.*, 1995), aunque estudios moleculares han demostrado que este género es un conglomerado de varios grupos donde se han hecho inclusiones de especies que han resultado pertenecer a otros géneros (Weibel & Moore, 2002a; Weibel & Moore, 2002b; Moore *et al.*, 2006). El hábitat donde se les puede encontrar son sabana y praderas, la coloración presente en este tipo de aves es caracterizada por tener un plumaje negro con blanco con un modelo de barrado dorsal o ventral (Moore *et al.*, 2006).

*Picoides fumigatus* fue descrito en 1840 por d'Orbigny, mide de 15-18 cm, el peso puede variar de los 30 a los 50g, es una especie que se distribuye desde la parte central de México hasta el norte de Argentina (Howell & Webb, 1995).

En el macho las plumas de la cabeza en su base son color rojo oscuro y hacia la parte distal son más claras, para la garganta y el cuello predomina el color olivo, la espalda puede ser marrón, rojizo marrón u olivo, en el rostro predomina el amarillo y pecho olivo oscuro (Howell & Webb, 1995). El pico es gris oscuro y su base gris claro. Tanto las plumas cobertoras de las alas como las plumas de la parte superior de la cola son color marrón oscuro en sus bordes, pueden ser rojas, doradas e incluso anaranjadas, las plumas remeras y las rectrices negruzcas. A diferencia del macho, en la hembra predomina el marrón oscuro desde la frente hasta la nuca, a veces con algunos manchones en blanco, el pico es gris claro en la punta y la base gris oscuro (Winkler & Christine, 2002). La cría suele presentar una coloración ligeramente más clara que los adultos, con algunas líneas blancas al interior de las plumas secundarias (Stiles & Skutch, 1989).

La especie suele habitar claros de los bosques, matorrales, bosques secundarios, bosques húmedos, bosques nubosos, puede estar al interior o en el borde de los mismos, suele

encontrarse también en los plantíos, forrajea en lo alto del dosel o bordes inferiores (AOU, 1998), a menudo se posa en ramas delgadas, en las tierras bajas hay una preferencia por los bordes de los bosques y riveras de los ríos, además puede encontrarse desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm en Tierra Blanca, Perú (Winkler & Christine, 2002).

Con respecto a sus hábitos alimenticios recorren lo alto del dosel, la parte inferior de los bosques hacia sus bordes, maleza y árboles aislados para atrapar escarabajos pequeños y sus larvas, que obtienen al picotear continuamente los troncos, algunas veces consumen frutos, el forrajeo puede ser sólo o en grupo después del periodo de crianza. Por otro lado la crianza se da entre los dos padres, así como la construcción del nido a una altura que puede ir desde 1.5-8 m desde el suelo, ponen cuatro huevos. A lo largo de su área de distribución es posible que varíe el periodo de cría. Los padres viven juntos todo el año sin embargo duermen en agujeros diferentes (Howell & Webb, 1995; Winkler & Christine, 2002).

Para esta especie a lo largo de su amplia y variada distribución geográfica se han descrito cinco subespecies (morfotipos) con base en tamaño, peso, longitud alar y coloración incluyendo las diferentes tonalidades que presentan (ver tabla 1) (Winkler & Christine, 2002). Del total de subespecies, en México se encuentran dos: *Picoides fumigatus olaequineus* y *Picoides fumigatus sanguinolentus* (Figura 3).

<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. f. oleagineus</i> (Reichenbach, 1854) Este de México. El plumaje que rodea al ojo es blanco (anillo ocular), presenta un peso de 36-49g y su longitud alar es mayor a la de <i>P. f. sanguinolentus</i>.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. f. sanguinolentus</i> (P. L. Sclater, 1859) Centro y sur de México al oeste de Panamá. Más pequeño que <i>P. f. oleagineus</i> con un peso de 31-42g, longitud alar más pequeña, sin anillo ocular y con coloración marrón en el cuerpo más abundante.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. f. reichenbachi</i> (Cabanis &amp; Heine, 1863) norte y Noreste de Venezuela. Moderadamente parecido a la subespecie <i>P. f. sanguinolentus</i>, sin embargo presenta la longitud alar más corta y con la coloración marrón mate.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. f. fumigatus</i> (d'Orbigny, 1840) Este de Panamá, sur de Colombia a través de Ecuador, este de Perú, oeste de Bolivia y Norte de Argentina.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>P. f. obscuratus</i> (Chapman, 1927) suroeste de Ecuador (El Oro y oeste de Loja) noroeste de Perú. Plumaje color marrón grisáceo.</li> </ul>

Tabla 1. Características de las subespecies reconocidas dentro de *Picoides fumigatus*.



Figura 3. Individuos representantes de las dos subespecies de México arriba *P. f. oleagineus* abajo *P. f. sanguinolentus* (tomado de Winkler & Christine, 2002).



## II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

*Picoides fumigatus* presenta cinco subespecies reconocidas, para México se reportan dos; *Picoides fumigatus oleaguineus* en la parte este de México y *Picoides fumigatus sanguinolentus* del centro y sur de México hasta Panamá, ambas especies presentan diferencias morfológicas. El análisis de variación genética aportará la información necesaria para determinar si las dos subespecies presentan diferencias a nivel genético que apoyen el estatus actual de dos subespecies diferentes para México.

## III OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general:

- a) Determinar la variación genética de las poblaciones de *Picoides fumigatus* en México mediante las secuencias de DNA mitocondrial del gen ND2 y del DNA nuclear intron 10.

### 3.2 Objetivos específicos:

- a) Establecer la estructura genética de las poblaciones de *Picoides fumigatus* en México.
- b) Establecer una hipótesis acerca de las relaciones entre las poblaciones mexicanas de *P. fumigatus*.
- c) Proponer una hipótesis acerca del estatus de la distribución de las poblaciones de *P. fumigatus*.

### 3.3 Hipótesis

Al presentar el carpintero ahumado una distribución disyunta, y ocupar diversas áreas de la República Mexicana se espera que las dos subespecies descritas por Reichenbach, 1854 y P. L. Sclater, 1859, se encuentren aisladas y que cada una de ellas cuente con su propia identidad genética por un bajo o nulo flujo genético, debido al aislamiento geográfico existente entre ellas.

## IV Método

### 4.1 Obtención de las muestras

Se utilizaron muestras de corazón, hígado y/o músculo, pertenecientes a la colección de tejidos de Aves del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias UNAM provenientes de diversas salidas al campo, así como muestras del Natural History Museum de la Universidad de Kansas, EUA.

### 4.2 Trabajo de laboratorio

El DNA fue extraído de 31 muestras preservadas en etanol (músculo, hígado o corazón) de éstas 17 pertenecen a la especie *Picoides fumigatus* (Figura 4 puntos de colecta de esta especie), y 14 muestras más (3 *Picoides villosus*, 2 *Piculus aeruginosus*, 1 *Piculus auricularis*, 1 *Picoides arizonae*, 5 *Picoides jardinii* y 2 *Melanerpes aurifrons*) utilizando el kit de extracción *DNeasy Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), siguiendo el protocolo de la manufactura ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) Apéndice 1. La información de las localidades de colecta y de los ejemplares se presenta en el Apéndice 2.

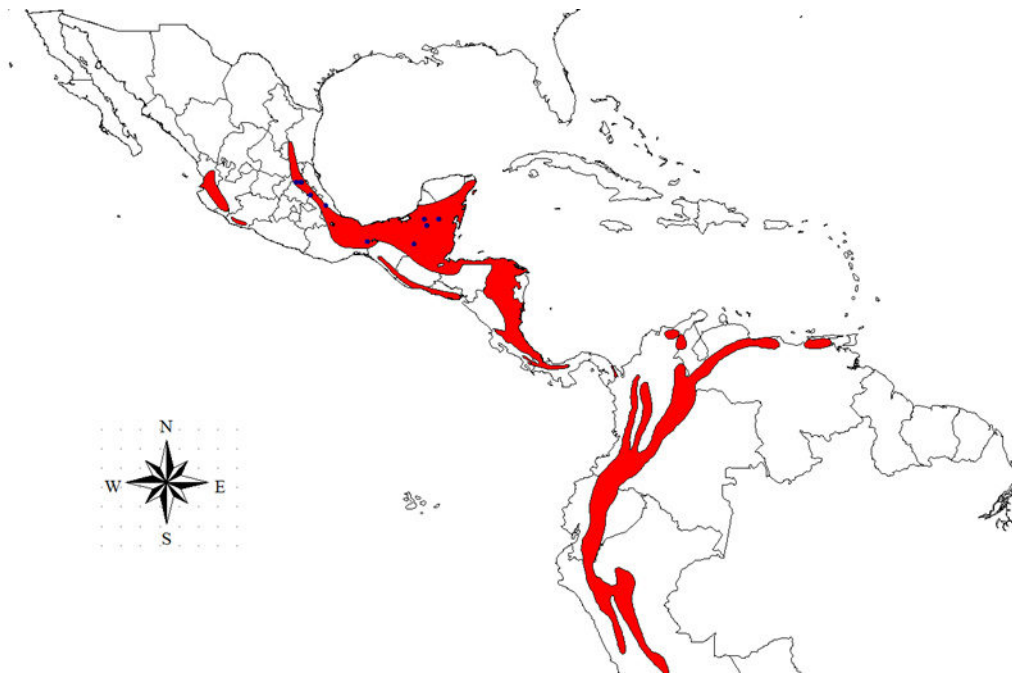


Figura 4. En azul puntos de colecta y en rojo distribución potencial de *P. fumigatus*.

-Las muestras fueron amplificadas con la técnica de PCR para los dos genes, se llevó a cabo en un Termociclador *Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Para amplificar el gen nuclear ACO1-INTRON 10, se utilizaron los Primers (ACOI-I10m13F y ACOI-I10m13R) y para amplificar el gen mitocondrial ND2 se utilizaron los primers (H6313-L5219 o H1056U- L5215U) ver cuadro 1.

Oligonucleótido	Marcador molecular	Secuencia	Fuente
H6313	ND2	CTC TTA TTT AAG GCT TTG AAG GC	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
L5219	ND2	CCC ATA CCC CGA AAA TGA TG	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
H1056U	ND2	GGA TAA CA TTT CAC ACA CAG GRT YTA AGG CTT TGA AGG CCT TYG G	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
L5215U	ND2	TAT CGG GCC CAT ACC CCG AAW AT	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
ACOI-I10m13F	ACO1 INTRON-10	CAC GAC GTT GTA AAA CGA CCT GTG GGA ATG CTG AGA GAT TT	Cadena <i>et al.</i> , 2007
ACOI-I10m13R	ACO1 INTRON-10	GGA TAA CAA TTT CAC ACA CAG CAG GCT GCA GCA AGG CAC AAC AGT	Cadena <i>et al.</i> , 2007

#### Cuadro 1.- Primers utilizados en este trabajo.

-Las amplificaciones para ND2 y el marcador nuclear ACOI-INTRON1 10 fueron realizadas a un volumen final de 20µl donde 7.01 µl de H<sub>2</sub>O, 2.88 µl de Buffer A, 2.88 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1.45 µl de dNTP's 10X (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.32 µl de los primers (H6313-L5219 o H1056U-L5215U) o ACOI10m13F y ACOI-I10m 13R según fuera el fragmento deseado a obtener, más (10pmol/ µl), 0.14 µl de Taq polimerasa y 5 µl de DNA para cada muestra.

-Las condiciones óptimas para la amplificación del marcador nuclear fueron, fase inicial desnaturalización a 94°C por 30s, elongación 30 ciclos 56°C por 45s y 70°C a 2 minutos y una extensión final de 72°C por 12 minutos.

-Todos los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa, a una concentración del 1 % teñido con Bromuro de Etidio, los resultados positivos se preservaron a temperatura de -20°C para su posterior secuenciación en la institución High-Throughput Sequencing Solutions administrada por la Universidad de Washington, en el Departamento de Ciencias Genómicas.

#### 4.3 Edición de secuencias

Todas las secuencias fueron alineadas y editadas automáticamente con el programa SEQUENCHER 4.8 (GeneCodes Ann Arbor, MI, EUA). Para alinear y obtener la secuencia consenso para cada muestra de ND2, se utilizaron como referencia las secuencias de *Veniliornis fumigatus* (DQ479179) y *Picoides villosus* (HQ889613.1) de GENBANK; para el marcador nuclear ACO1 INTRON-10 al no haber secuencias disponibles en GENBANK para alinear las secuencias obtenidas se procedió a utilizar la secuencia que presentó la mayor longitud (YACH061 *P. fumigatus* 1086pb), ella sirvió como molde para comenzar a

remover los fragmentos “sucios” y dejar limpias las secuencias en cada una de las ellas se realizó el ensamblaje de las secuencias para generar las secuencia consenso “contig”.

En la mayoría de las muestras secuenciadas se lograron recuperar secuencias para ambas hebras de DNA en otras sólo se obtuvieron fragmentos de la hebra correspondiente a “F” o “R”, posteriormente el conjunto de secuencias para los dos marcadores moleculares fueron guardadas en formato FASTA para su posterior utilización.

#### 4.4 Alineamiento de secuencias

El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Posterior al alineamiento se utilizó Modeltest 3.7 (Posada & Crandall, 1998) para buscar el modelo apropiado de sustitución nucleotídica para ser utilizado con Máxima Verosimilitud, bajo el criterio de Akaike en el programa Modeltest Test 3.7 (Posada & Crandall, 1998).

Fue construida una matriz en formato FASTA con todas las secuencias ND2 pertenecientes a *Picooides fumigatus*, para obtener los valores de las distancias genéticas para presentar un marco de referencia para ver cuanta variación se comparte entre poblaciones o grupos y así saber que tan similares o diferentes son las poblaciones que se comparan (Nei, 1972), en PAUP 4.6.0 (Swofford 2002).

Para la elaboración de las reconstrucciones filogenéticas fueron creadas tres matrices en formato FASTA, una para las muestras del gen ND2, otra para las muestras del nuclear y una más para los genes concatenados esta última matriz incluyo las secuencias que se obtuvieron tanto para ND2 y nuclear que correspondieran a la misma muestra.

#### 4.5 Análisis de Estructura y Variación genética

Dentro de los análisis que se pueden establecer para el análisis de la estructura genética de las poblaciones para una especie determinada se encuentran:

El estadístico  $F_{ST}$  de Wright que es posible obtenerlo a partir de un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), los valores obtenidos representan como está distribuida la variación genética entre las poblaciones de una especie, considerando cuantas mutaciones se presentan entre haplotipos y así evalúa las diferencias dentro y entre individuos de una población y entre poblaciones. De acuerdo con (Wright, 1921) la ecuación es representada de la siguiente manera.

$$F_{ST} = (HT - HS)/HT$$

Toma valores del cero al uno, cuando se obtienen valores cercanos a cero la interpretación que se le da es que la variación genética se encuentra distribuida homogéneamente sin en cambio cuando toma valores cercanos a uno la variación se distribuye heterogéneamente (Brown *et al.*, 2004). Este análisis junto con el de las diferencias pareadas, se realizó sólo con las secuencias de *Picoides fumigatus* obtenidas con el ND2 de las poblaciones mexicanas, ya que las secuencias del ACOI INTRON-10 fueron escasas, este análisis se efectuó utilizando el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2006), con una significancia estadística de 10, 000 permutaciones.

En el programa DNAsp v.5 (Librado y Rozas, 2009) se calcularon los parámetros de diversidad genética o haplotípica para las poblaciones de *Picoides fumigatus* procedentes de México; que es una medida que indica cual es la probabilidad de que dos individuos tomados al azar dentro de una población presenten diferentes haplotipos de mtDNA (Nei, 1987).

$$h = (n/n-1) (1 - \sum fi^2)$$

Donde  $f_i$  es la frecuencia del  $i$ ésimo haplotipo y  $n$  es el número de individuos muestreados.

Se calculó el índice de diversidad nucleotídica  $P_i$  para determinar el número promedio de diferencias por sitio de nucleótido cuando se comparan pares de haplotipos de mtDNA (Brown *et al.*, 2004).

$$P_i = [n/(n-1)] \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

Donde  $n$  es el número de haplotipos examinados,  $x_i$  es la frecuencia del  $i$ ésimo haplotipo en la muestra y  $\pi_{ij}$  es la proporción de diferencias entre los haplotipos.

Junto con estos análisis se calcularon los valores de la  $D$  de Tajima, para probar la neutralidad del marcador ND2 y determinar si alguno de las dos subespecies *P. f. oleaguineus* y *P. f. sanguinolentus* de aquí en adelante referidas como grupo PCM y PSM se encuentran en expansión poblacional.

#### 4.6 Reconstrucción de relaciones filogenéticas

Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron con los métodos (MP) Máxima Parsimonia, (ML) Máxima Verosimilitud, (IB) Inferencia Bayesiana, para lo cual fueron creadas tres matrices, una para secuencias del gen ND2, para este marcador adicionalmente se incluyeron muestras obtenidas del GENBANK de otros ejemplares de carpinteros para ser asignados como grupos externos (ver Apéndice 2) y poder explorar con que especie hay mayor parentesco; así como ver si las topologías para *Picooides fumigatus* resultaban monofiléticas a lo largo de los diferentes análisis, o había muestras que se unieran con las de otras especies de carpinteros, y de este modo detectar algún tipo de contaminación en las muestras centrales del estudio, mal catalogado de los tejidos, o una posible conexión filogenética no vista en análisis previos con carpinteros, la segunda matriz para secuencias del ACO1 INTRON-10 donde sólo se pudieron obtener 6

secuencias para *Picoides fumigatus* 2 para *Picoides villosus*, 1 para *Picoides arizonae*, 2 para *Piculus aeruginosus* y una para *Piculus auricularis*; la tercer matriz fue construida para genes concatenados (ND2 + ACO1 INTRON-10), en la cual solo incluyo las muestras presentes en ambos marcadores, el proceso de concatenado se llevó a cabo en PAUP 4.6.0 (Swofford, 2002).

El primer análisis en realizarse fue el de Máxima Parsimonia en el programa PAUP 4.6.0 (Swofford, 2002) para seleccionar el árbol consenso con las topologías más parsimoniosas bajo el algoritmo (TBR), para generar el árbol consenso, con número de bootstrap de 100 con este método se quiere obtener el árbol que posea aquella topología donde el menor número de cambios evolutivos expliquen las diferencias entre secuencias (Para las tres matrices).

El análisis de Máxima Verosimilitud se realizó una vez que se obtuvieron los modelos de sustitución nucleotídica para las tres matrices creadas, estos fueron obtenidos en Modeltest 0.1 (Posada & Crandall, 2008) bajo el criterio de Akaike (ACI: Akaike, 1973) los modelos que mejor se ajustaron se presentan posteriormente; de ahí los datos fueron analizados en el programa Garli 0.951 (Zwicki, 2006) con réplicas de bootstrap de 100 para posteriormente obtener el árbol consenso en el programa PAUP 4.0 (Swofford, 1999) para que a partir del modelo se busque e identifique la topología te presente la mayor probabilidad de explicar los cambios nucleotídicos entre cada secuencia (Felsenstein, 2004).

El análisis de Inferencia Bayesiana se realizó en el programa Mr. Bayes versión 3.0 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003), utilizando el modelo óptimo de sustitución nucleotídica que previamente se generó en Modeltest 0.1, para las tres matrices (ND2, ACO1 INTRON-10 y Concatenados) se corrió el análisis con tres cadenas una fría y dos calientes durante diez millones de generaciones con muestreo en cada 250 generaciones y con un número de árboles descartados del 25%.



#### 4.7 Distribución mismatch

Para el análisis demográfico de *Picoides fumigatus* se obtuvo la distribución *mismatch* en el programa DNAsp v.5 (Librado y Rozas, 2009) solo con las secuencias de México para *Picoides fumigatus* obtenidas con ND2; y así obtener información acerca de los tamaños poblacionales pasados de la especie (Rogers & Harpending, 1992), con este análisis se tabulan el número de diferencias por pares entre todas las secuencias de DNA, que se encuentran incluidas en una muestra (Harpending, 1994).

### V Resultados

#### 5.1 Estructura y variación genética

La estructura genética observada en el análisis de variación molecular (AMOVA) nos muestra que la variación genética dentro de las poblaciones es baja (8.84) a comparación del alto porcentaje de variación que se presenta entre las poblaciones (91.52) por lo cual el flujo genético es casi inexistente pues la  $F_{ST}$  obtenida fue de 0.91512, dicho resultado puede interpretarse que las poblaciones están fuertemente estructuradas (cuadro 2).

Las distancias pareadas obtenidas forman dos grandes grupos para las poblaciones mexicanas (*P. f. oleagineus* PCM=Hidalgo, Veracruz y Puebla; *P. f. sanguinolentus* PSM=Oaxaca, Chiapas y Campeche) cuyos valores al compararse entre ellas son altos tomando valores que van de los 0.80556 hasta 1.00000, lo que sugiere que estos grupos tienen valores altos de distancia genética, mientras que al interior de los grupos la diferenciación genética es baja.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	6	105.902	7.91529	91.52
Dentro de poblaciones	10	7.333	0.73333	8.84
Total	16	113.235	8.64862	
Índice de fijación	FST: 0.91521			

Cuadro 2. Análisis de Varianza Molecular AMOVA.

Para el primer grupo PCM los valores se presentaron en un rango de -1.00000 a 0.00000, éstos resultados sugieren que entre los individuos hay poca o nula variación genética; para el segundo grupo PSM los valores se presentaron de -0.60000 a 0.48148, lo que sugiere que también la diferenciación entre los individuos de éstas poblaciones es baja o nula. Cuando se incluye la muestra proveniente de Perú las diferencias pareadas cambian, ya que para Campeche, Chiapas, Veracruz y Puebla se alcanzan los valores más altos y sólo disminuyen los valores con Oaxaca e Hidalgo (cuadro 3).

	CAMPECHE	CHIAPAS	OAXACA	VERACRUZ	PUEBLA	HIDALGO	PERÚ
Campeche	0.00000						
Chiapas	0.00000	0.00000					
Oaxaca	0.48148	-0.60000	0.00000				
Veracruz	1.00000	1.00000	0.89873	0.00000			
Puebla	1.00000	1.00000	0.89873	0.00000	0.00000		
Hidalgo	0.95000	0.80556	0.84932	-1.00000	-1.00000	0.00000	
Perú	1.00000	1.00000	0.91579	1.00000	1.00000	0.81818	0.00000

Cuadro 3.-Distancias Pareadas FST (ND2).

Los valores de la matriz de distancias genéticas de Nei obtenidos en PAUP (Swofford 4.6.0. 2006), apoyan la formación de dos grupos PSM (Oaxaca, Chiapas y Campeche) y PCM (Hidalgo, Puebla y Veracruz) ver Apéndice 3.

A partir de los análisis de genética poblacional se logran obtener 6 haplotipos para *Picoides fumigatus*, 4 pertenecientes al grupo definido como Sur de México (PSM) *P. f. sanguinolentus* Y dos pertenecientes al grupo centro de México (PCM) *P. f. oleaguineus* obtenidos sólo con ND2. La diversidad haplotípica para el grupo PSM fue ligeramente mayor 0.455 al igual que la diversidad nucleotídica 0.00922 que la obtenida en el grupo PCM 0.400 y 0.00422 respectivamente; los valores obtenidos en la prueba de *D* de Tajima fueron positivos para el grupo PCM y negativos para el grupo PSM. Los valores negativos para la prueba de *D* de Tajima son indicadores de expansión poblacional cuando son significativos, el resultado de éste análisis para los dos grupos (PCM y PSM) muestran valores que no son significativos por lo que podemos asumir que las poblaciones están en estasis demográfico (cuadro 4).

GRUPO	N	H	HD	PI	W	K	D	P
Grupo 1 Sur (PSM)	12	4	0.455	0.00922	0.01696	6.045	-0.68107	>0.10
Grupo 2 centro (PCM)	5	2	0.400	0.00422	0.00506	2.800	0.02480	>0.10
Unidas (Grupo 1 y 2)	17	6	0.619	0.02132	0.01916	14.154	0.36355	>0.10

Cuadro 4. Valores estimados de diversidad genética presentes en cada grupo: número de muestras (N); número de haplotipos (H); diversidad haplotípica (HD); diversidad nucleotídica (PI); theta de Watterson (W); promedio de las diferencias nucleotídicas (k), *D* de Tajima (D), valor de significancia para *D* de Tajima (P).

## 5.2 Análisis filogenéticos

Se lograron obtener 31 secuencias para el gen ND2 de las cuales 17 pertenecen a *Picoides fumigatus* la longitud de esta se presentó en un rango de 727-1041pb y para el ACO1 INTRON-10 se obtuvieron 12 secuencias con longitudes variables en un rango de 895-1089pb de estas 6 pertenecen a *Picoides fumigatus*, 2 a *Picoides villosus*, 1 a *Picoides arizonae*, 1 a *Piculus auricularis* y 2 a *Piculus aeruginosus*.

Los modelos de sustitución nucleotídica obtenidos para realizar las reconstrucciones filogenéticas de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana para cada grupo de datos, bajo el criterio de Akaike se presentan en el siguiente cuadro 5.

<b>GEN</b>	<b>Modelo de sustitución</b>
<b>ND2</b>	<b>TIM3+1+G</b>
<b>ACO1 INTRON 10</b>	<b>TIM+1</b>
<b>ND2 + ACO1 INTRON 10</b>	<b>TPMu1+I+G</b>

Cuadro 5. Modelos de sustitución nucleotídica correspondientes a cada gen y genes concatenados.

Se lograron obtener las reconstrucciones filogenéticas bajo los criterios de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana para ND2, Intron10 ACOI, y concatenados, que se presentan a continuación.

- Máxima Parsimonia

Para los análisis de Máxima Parsimonia se logran obtener los árboles para las tres matrices (ND2, ACO1INTRON-10 y genes concatenados).

El árbol obtenido para ND2 (Figura 5) muestra que el clado de *Picoides fumigatus* está claramente diferenciado por lo que podemos asumir que es monofilético y además está

apoyado por valores de “bootstrap” (100%). Dentro del clado *Picoides fumigatus* se presentan dos grupos claramente diferenciados, uno que incluye a las poblaciones del PCM (Hidalgo, Veracruz y Puebla) subespecie *P. f. oleaguineus* y otro grupo a las poblaciones provenientes del PSM (Oaxaca, Chiapas y Campeche) subespecie *P. f. sanguinolentus*, sin embargo, la muestra procedente de Perú (21419) subespecie *P. f. fumigatus* a pesar de ser incluida en el clado no se ubica como grupo hermano de uno u otro clado de *P. fumigatus*, por otro lado el clado de las demás especies del género *Picoides* si resultan ser hermanas para el clado de *Picoides fumigatus* y estos dos a su vez son hermanos del clado de los *Veniliornis* (género exclusivo de Sudamérica).

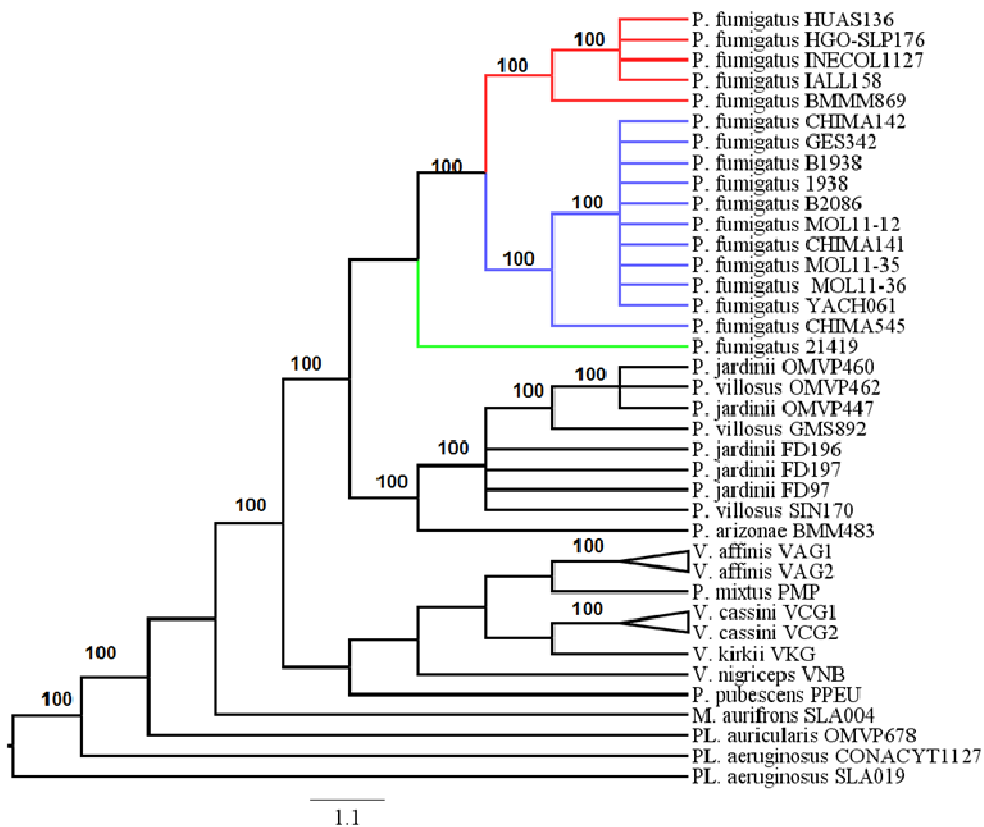


Figura 5.- Árbol obtenido por medio del método de Máxima Parsimonia, para el gen ND2, en rojo el grupo PCM (Hidalgo, Puebla y Veracruz), en azul PSM (Oaxaca, Chiapas y Campeche) y en verde la muestra proveniente de Perú, en cada nodo se indica el valor de apoyo de bootstrap.

El árbol obtenido con el marcador molecular nuclear ACO1 INTRON-10 (Figura 6) presenta un clado con valores de apoyo altos (100%) para los *Picoides fumigatus* presentándonos que es un grupo monofilético dentro de él hay una politomía pues no se resuelven las relaciones al interior del mismo aunque dos secuencias provenientes de Hidalgo (HUAS136 y BMM869 correspondientes a la subespecie *P. f. oleaguineus* se unen entre ellas; por una parte las secuencias correspondientes a la subespecie *P. f. sanguinolentus* no se agrupan todas juntas pues una secuencia de Chiapas (YACH061) se une con una de Oaxaca (B2086) y 2 muestras más provenientes de Oaxaca (CHIMA142) y Campeche (MOL11-35) sólo son incluidas en el clado de la especie pero no se agrupan con alguna otra muestra esto puede ser explicado por la falta de inclusión de las poblaciones faltantes, ya que como se menciona anteriormente solamente se pudo secuenciar un total de 12 muestras para este marcador, de las cuales 6 pertenecen a *Picoides fumigatus*.

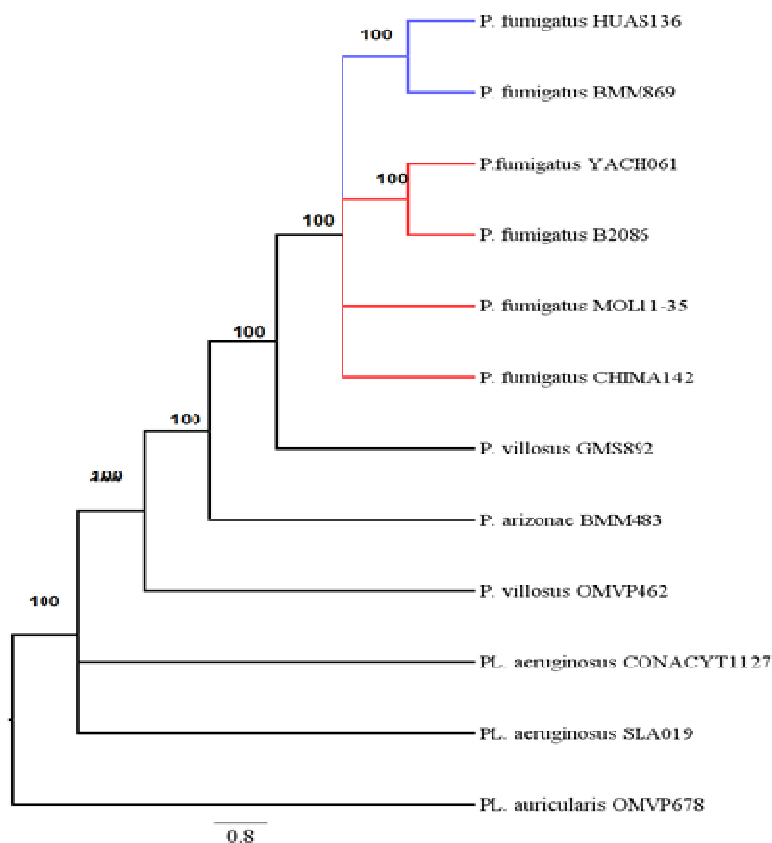


Figura 6.- Árbol obtenido por medio de Máxima Parsimonia, para ACOI INTRON-10, en azul (Hidalgo), en rojo (Oaxaca, Chiapas y Campeche), se muestran los valores de bootstrap.

El árbol obtenido del análisis concatenado (mitocondrial + nuclear) presenta una topología al igual que las obtenidas con ND2 y el ACOI INTRON 10, donde se muestra que el grupo de *P. fumigatus* es monofilético (Figura 7); dentro de *P. fumigatus* se unen las muestras de Hidalgo (BMM869 y HUAS136) subespecie *P. f. oleaguineus* en un grupo con valor de soporte de (100%), mientras que en el otro grupo correspondiente a *P. f. sanguinolentus* se apoya con el mismo valor aunque al interior del mismo se unen dos muestras una de Campeche (B2086) y una de Chiapas (YACH061), sin embargo, la relación con las otras dos muestras (CHIMA142 y MOL11-35) no está claramente establecida. Lo anterior podría explicarse por la falta de secuencias para resolver totalmente la topología del árbol, además la muestra proveniente de Perú no se incluyó pues no existe secuencia en GENBANK y en el laboratorio no se pudo obtener.

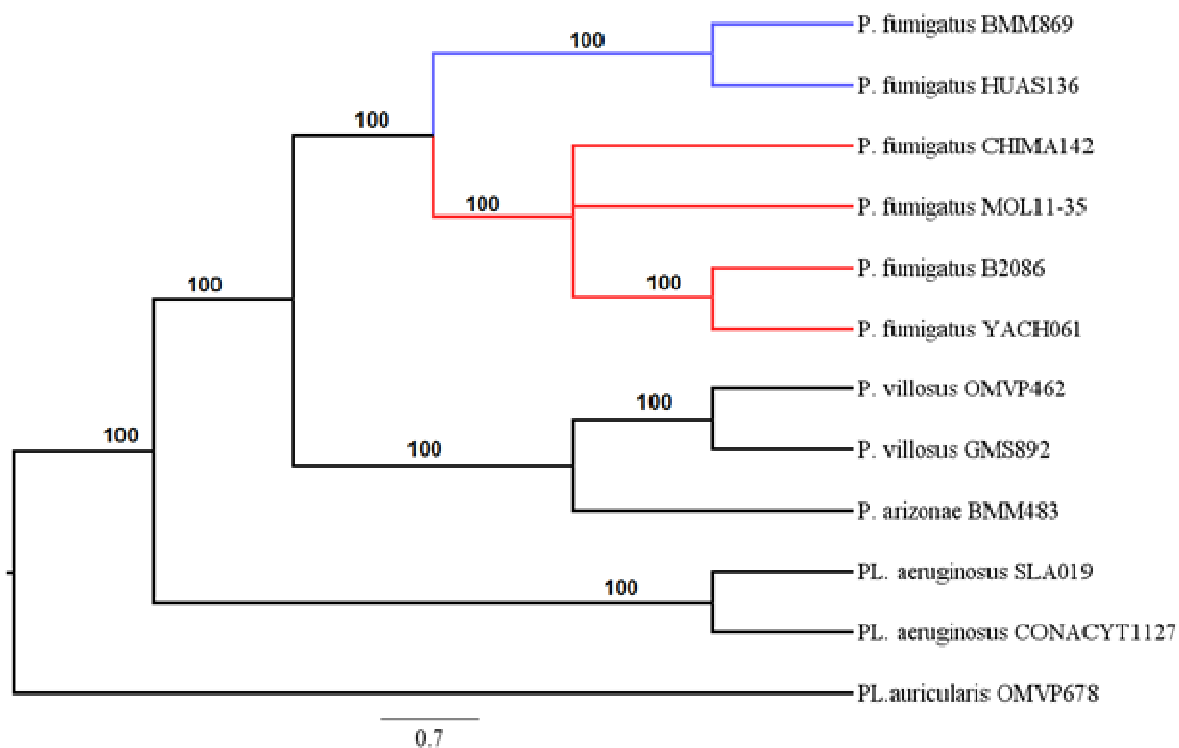


Figura 7.- Árbol obtenido con Máxima Parsimonia para marcadores concatenados, en azul (Hidalgo) en rojo (Oaxaca, Chiapas y Campeche), *Piculus auricularis* grupo externo.

- Máxima Verosimilitud

A partir de los modelos evolutivos se efectuaron los análisis filogenéticos con Máxima Verosimilitud, para ND2 (Figura 8) la topología obtenida nos muestra un clado monofilético para *P. fumigatus* aunque con un valor de apoyo muy bajo (58%), hay cierto parecido con la topología obtenida con Máxima Parsimonia en cuanto a que todas las muestras correspondientes a *P. f. sanguinolentus* se agrupan entre ellas con valor de (97%), las muestras correspondientes a *P. f. oleaguineus* se agrupan con un valor de (97%) a excepción de la muestra de Hidalgo (BMM869) y nuevamente la muestra de Perú subespecie *P. f. fumigatus*, no logran ser ubicadas al interior del clado de *P. fumigatus* esto podría interpretarse como una falta de muestras en el análisis.

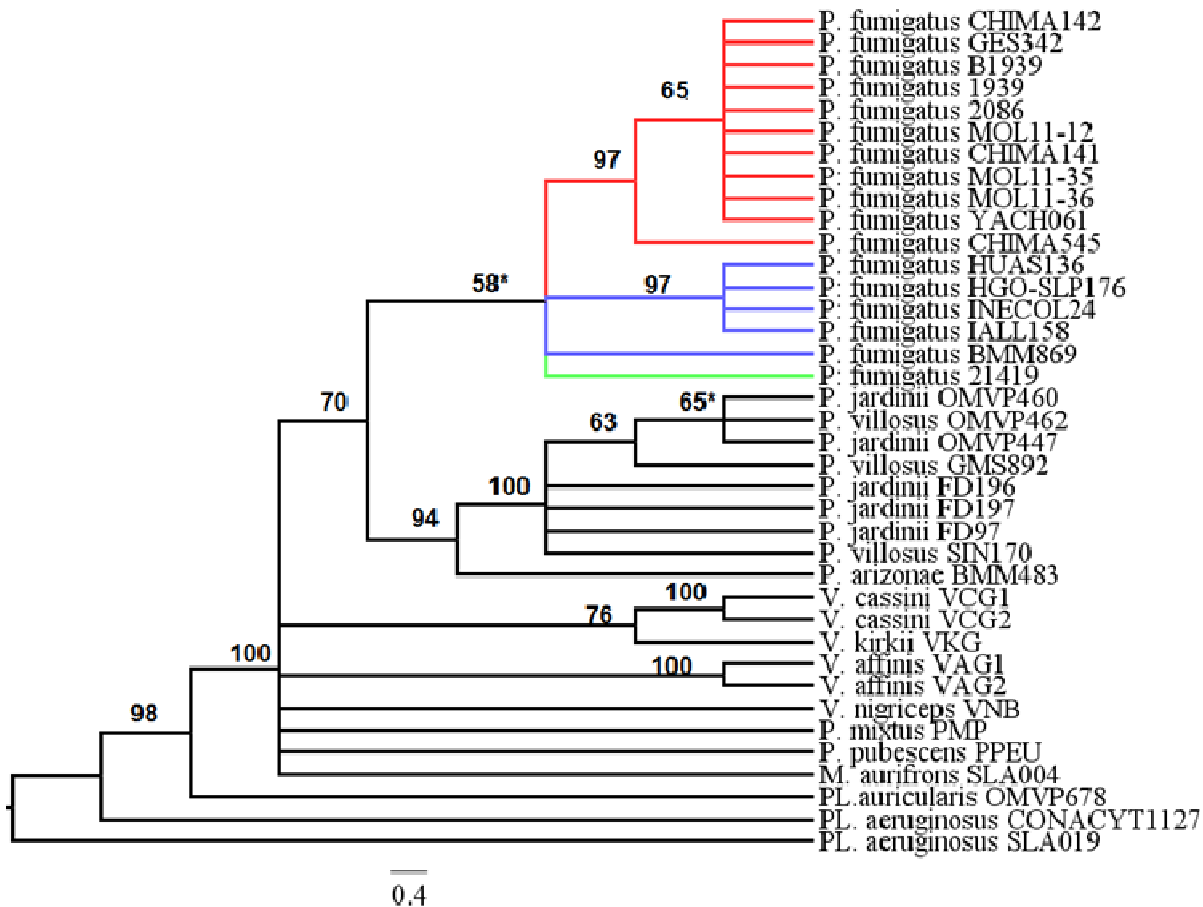


Figura 8.- Árbol obtenido con Máxima Verosimilitud para ND2, en rojo (Chiapas, Oaxaca y Campeche) en azul (Hidalgo, Puebla y Veracruz), en verde muestra del Perú.



En el caso del marcador nuclear (Figura 9) en el análisis de Máxima Verosimilitud se forma el clado del carpintero ahumado sin embargo el valor de apoyo de las ramas es relativamente bajo (70%), presentándose una vez más una politomía, la topología encontrada para las muestras de *P. fumigatus* es la misma que la obtenida con el análisis de Máxima Parsimonia aunque con valores más bajos en los agrupamientos de las muestras pertenecientes a la subespecie *P. f. oleaguineus*, de Hidalgo (BMM869 y HUAS136) con valor de apoyo (57%), las muestras de la subespecie *P. f. sanguinolentus* de los estados de Oaxaca (B2086 ) se une con una muestra de Chiapas (YACH061) con valor de apoyo de (70%), y nuevamente las muestras de los estados de Campeche (MOL11-35) y la otra de Oaxaca (CHIMA142) no se agrupan con nadie, cabe destacar que en éste análisis la muestra de Perú ya no se utilizó pues no existen secuencias de este marcador en GENBANK y no se obtuvo en laboratorio.

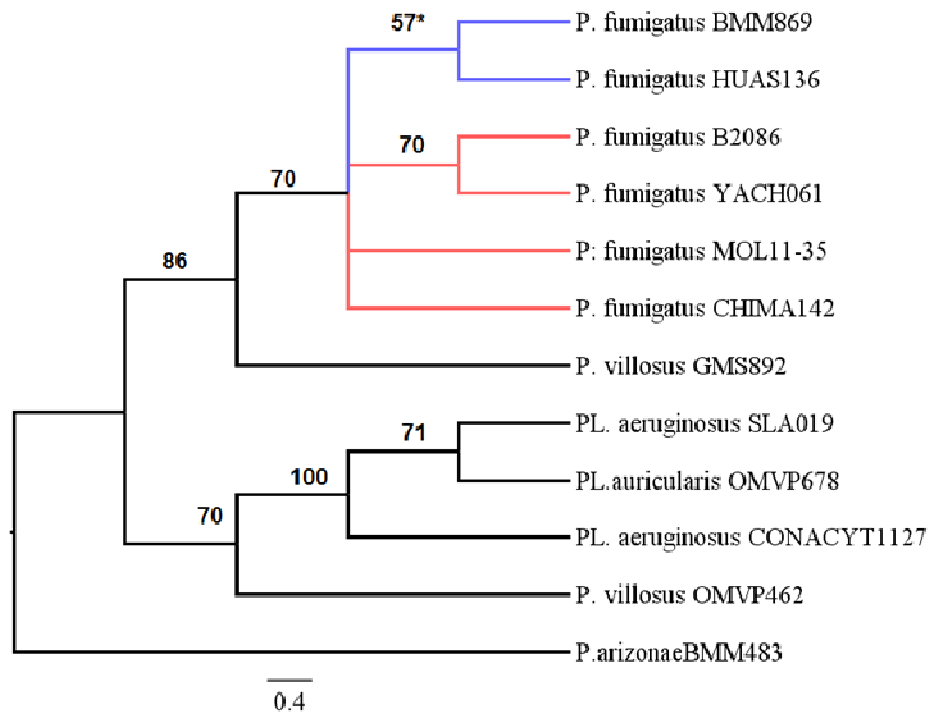


Figura 9.- Árbol obtenido con Máxima Verosimilitud para ACOI INTRON 10, en azul Hidalgo PCM=*P. f. oleaguineus*, en rojo (PSM=Oaxaca, Chiapas y Campeche)=*P. f. sanguinolentus*.

Por último en análisis concatenado (Figura 10) muestra una topología donde las muestras de *P. fumigatus* siguen formando un grupo monofilético con un valor de apoyo moderadamente alto (89%) aunque se puede observar que las muestras provenientes del Sur-Sureste mexicano forman un clado subespecie *P. f. sanguinolentus*, mientras que las de Hidalgo (HUAS136 y BMM869) subespecie *P. f. oleagineus* se presentan basalmente.

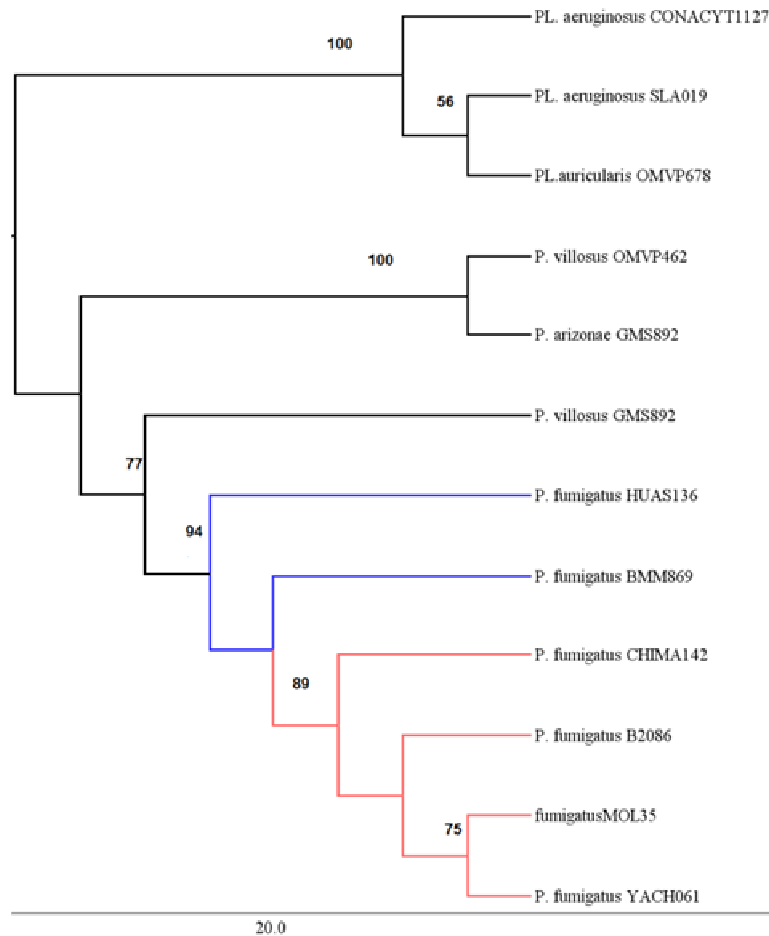


Figura 10.- Árbol para genes concatenados a partir de Máxima Verosimilitud, en azul Hidalgo PCM= *P. f. oleagineus* y en rojo (PSM=Oaxaca, Chiapas y Campeche)= *P. f. sanguinolentus*.

- Inferencia Bayesiana

La reconstrucción de Inferencia Bayesiana para ND2 (Figura 11) muestra el clado de *Picooides fumigatus* monofilético, apoyado con un valor de (87%); al interior del se forman dos grupos uno que incluye las muestras provenientes de los estados de Hidalgo, Veracruz y Puebla=PCM correspondientes a la subespecie *P. f. oleaguineus* con valor de soporte de (86%) y otro grupo donde se unen las muestras de los estados de Oaxaca, Chiapas y Campeche=PSM correspondientes a la subespecie *P. f. sanguinolentus* por un lado y en el otro extremo la muestra proveniente de Perú (21419) correspondiente a la subespecie *P. f. fumigatus* todo este grupo tiene un valor bajo de soporte (51%), aunque sólo las muestras del sureste mexicano se agrupan entre ellas con un valor alto de soporte (100%).

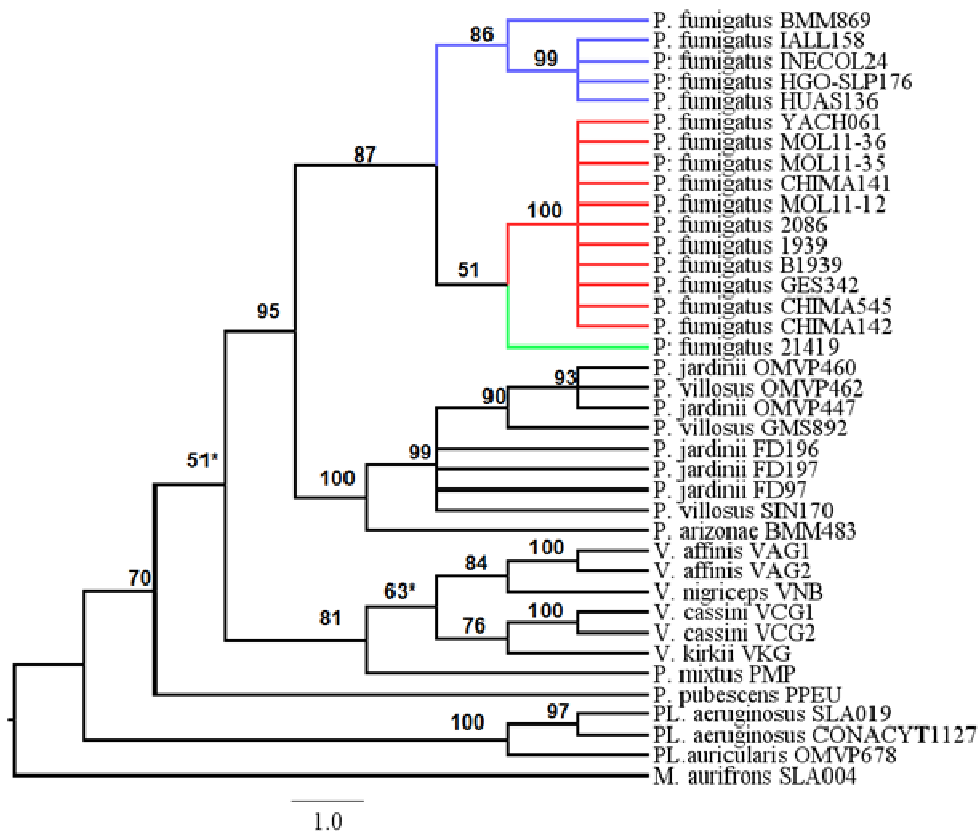


Figura 11.- Árbol obtenido con Inferencia Bayesiana, para ND2, en rojo (PCM=Hidalgo, Puebla, Veracruz), subespecie *P. f. oleaguineus*; en azul (PSM=Oaxaca, Campeche y Chiapas), subespecie *P. f. sanguinolentus* en verde muestra de Perú (21419) subespecie *P. f. fumigatus*.

La reconstrucción bayesiana para el nuclear (Figura 12) apoya con mayor probabilidad el clado del carpintero ahumado que el obtenido con ND2, con un (95%) aunque no resuelve claramente las relaciones entre las muestras, sin embargo, continúa presentando las topologías obtenidas con los análisis de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud.

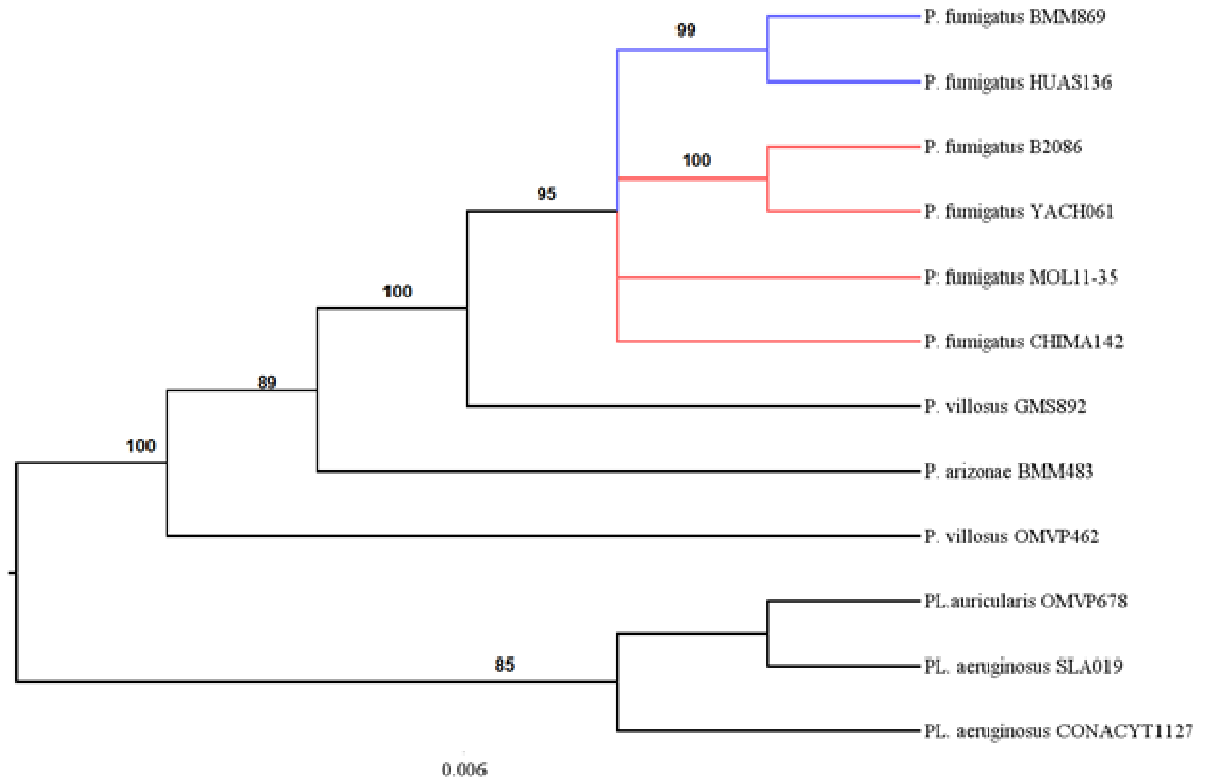


Figura 12.- Árbol obtenido con Inferencia Bayesiana para ACOI INTRON-10, en azul Hidalgo=PCM (BMM869 y HUAS136), subespecie *P. f. oleagineus*, en rojo (Oaxaca, Chiapas y Campeche)=PSM, subespecie *P. f. sanguinolentus*.

El árbol para genes concatenados de inferencia Bayesiana (Figura 13) arroja un clado soportado por (83%) para la especie *Picoides fumigatus*, al interior del mismo se presentan dos subclados resueltos con valores altos uno con (96%) para las muestras de Hidalgo, que aquí sólo se obtuvieron como pertenecientes al grupo PCM, subespecie *P. f. oleaguineus* y el otro con (100%) para el grupo PSM, subespecie *P. f. sanguinolentus* en donde al menos se contó con una muestra proveniente de Oaxaca, Chiapas y Campeche.

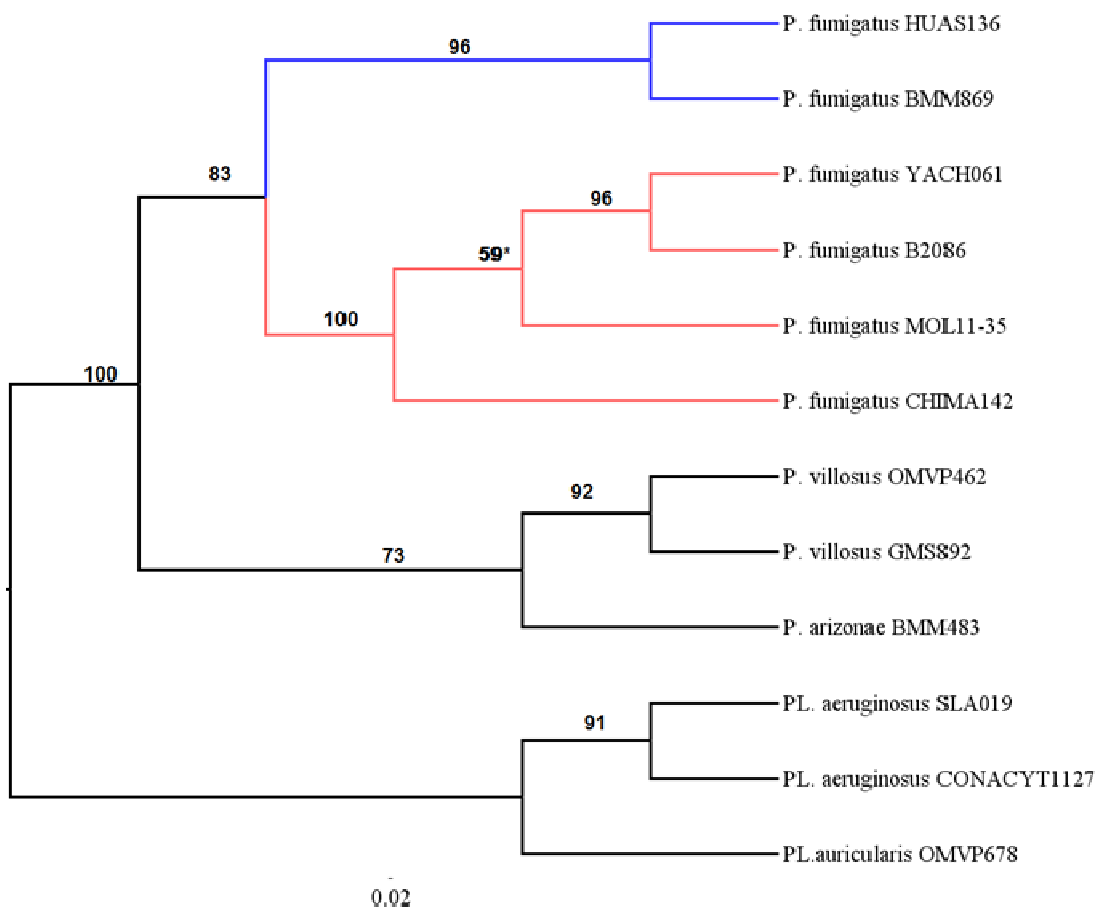


Figura 13.- Árbol obtenido a partir de Inferencia Bayesiana para genes concatenados, en azul Hidalgo, en rojo (Oaxaca, Chiapas y Campeche).

### 5.3 Distribución *mismatch*

Debido al bajo número de muestras obtenidas para la especie *P. fumigatus* con el marcador ACOI INTRON-10 (2 para la parte central de México y 4 para el sur) solo se calcularon con el gen ND2, particionando los datos en dos grupos PCM y PSM, adicionalmente se realizó agrupando todas las muestras.

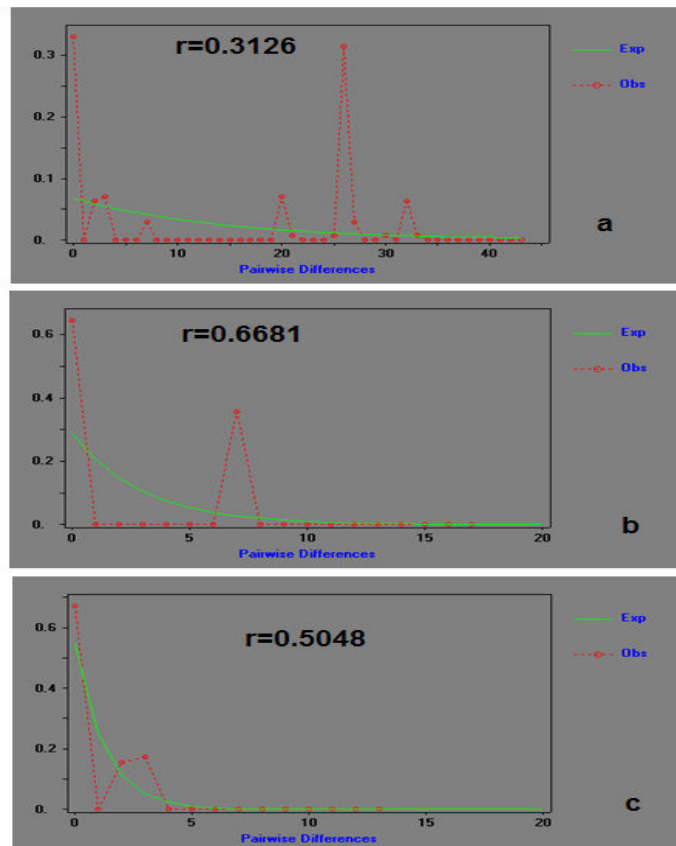


Figura 5.- Distribuciones *mismatch* para (a) todas las poblaciones de México, (b) PCM centro de México y (c) PSM sur de México. La línea verde indica los valores esperados bajo un modelo de expansión poblacional y la línea roja los valores esperados de las muestras. R= índice de *raggedness*,  $p > 0.05$  valor de significancia en todos los casos.

En los tres gráficos obtenidos se aprecia que la distribución *mismatch* es multimodal, tal distribución al parecer no se ajusta al modelo de expansión poblacional, por otro lado la prueba de expansión demográfica resultó ser no significativa pues el índice de significancia fue  $p > 0.05$ , ya que valores menores a 0.04 son considerados significativos y se presentan cuando las poblaciones están en expansión (Harpending, 1994).

## VI DISCUSIÓN

- Variación genética y estructura poblacional

De acuerdo con los valores encontrados dentro del análisis de variación genética a partir de varianza molecular (AMOVA) en *Picooides fumigatus*, podemos decir que se presentan al menos dos unidades claramente diferenciadas. Los valores más altos de variación genética se presentan entre los grupos 91.52%, estos datos encontrados nos indican que PCM *P. f. oleaguineus* y PSM *P. f. sanguinolentus*, son grupos que se han formado por el bajo flujo génico que existe entre ellos y el entrecruzamiento es inexistente, al contrario de lo que ocurre dentro de los grupos donde los valores de variación 8.84% son bajos, lo que sugiere que los individuos se están entrecruzando al interior de cada grupo. Estos resultados junto con el estadístico  $F_{st}$  que nos arrojó un valor muy cercano a la unidad  $F_{st}=0.91521$  sugieren que el intercambio de inmigrantes que se pueda dar es nulo entre los grupos PCM y PSM, por ende el flujo genético también, así que al menos existen dos pozas genéticamente diferenciadas para estas poblaciones de la especie *Picooides fumigatus*.

La tabla de las diferencias pareadas y la de distancias genéticas nos muestran un patrón claro de diferenciación genética, donde las muestras de Oaxaca, Chiapas y Campeche presentan valores bajos de diferenciación entre ellas, al igual que las muestras de Hidalgo, Puebla y Veracruz, no así al compararse las entre ellas PCM-PSM de México, por lo que las distancias pequeñas al interior de los grupos puede ser resultado de que las poblaciones se han separado recientemente, o es una población donde el flujo genético es suficiente como para contrarrestar la diferenciación, sin embargo, al ser la variación genética grande como se ve al compararse por grupos PCM (Hidalgo, Puebla y Veracruz) y

PSM (Oaxaca, Chiapas y Campeche) es posible que los grupos se hayan separado mucho tiempo atrás conformando poblaciones pequeñas, pues su observación y colecta raras veces se da, de tal manera que el flujo genético sea limitado entre los dos grupos propiciado a la diferenciación de los mismos, por lo tanto los individuos de poblaciones o grupos más próximos están más emparentados entre sí que aquellos que se localizan más distantes. Por lo que el analizar datos genéticos comparados entre poblaciones en un contexto espacial, nos proporciona información sobre el grado de estructuración poblacional y la tasa de dispersión a través del paisaje (Scribner *et al.*, 2005).

El gen ND2 ha ayudado a determinar el grado de diferenciación poblacional en la especie *Picoides fumigatus* ya que los diferentes genes contenidos en el genoma mitocondrial son aptos para este tipo de resultados, ya que no presentan recombinación, son haploides, y su herencia es exclusivamente materna (Zink, 2002). En el grupo PSM =*P. f. sanguinolentus* se presenta valores ligeramente mayores de diversidad nucleotídica, haplotípica y número de haplotipos, por ejemplo la diversidad nucleotídica para el grupo (PCM) =*P. f. oleagineus* es de 0.00422 y para (PSM) *P. f. sanguinolentus* es de 0.00922, con estos datos podemos determinar probablemente hacia donde se expandió una especie en tiempos históricos, pues el área donde existe menor valor de diversidad nucleotídica han sido las poblaciones colonizadas (Zink, 2002), de este modo *Picoides fumigatus* se extendió desde la parte del sureste mexicano donde hay mayor diversidad nucleotídica hacia Veracruz, Puebla e Hidalgo donde existe menor; lo anterior mencionado complementa lo propuesto por Moore *et al.*, (2006) quienes sugieren que *Picoides fumigatus* se originó en Norte América y se extendió hacia Centro y Sudamérica. Aunque la idea de expansión en México de sur a norte faltaría complementarse con un mayor número de muestras y con un análisis de tiempos de divergencia, ya que la cantidad para cada grupo es diferente y esto en cierto grado esto pudo afectar los valores obtenidos.

Los grandes periodos fríos en la tierra presentados hace 2.4 m.a. Han determinado los modelos de variación genética (Hewitt, 2000), así mismo esto ha determinado grandes



cambios en su distribución, expresándose de diferente forma en zonas boreales, tropicales y templadas. Las especies de zonas templadas y boreales presentaron expansiones hacia altitudes y latitudes menores a lo que comúnmente se les encontraba y las especies tropicales se concentraron en áreas un poco más cálidas (Hewitt, 1989).

- Reconstrucción filogenética.

Los datos obtenidos con los diferentes métodos para las tres matrices utilizadas en el presente estudio siempre apoyan el clado constituido por la especie *Picoides fumigatus*, sin inclusiones de muestras de otras especies en él, o de muestras de esta especie unidas con las de otros géneros.

Para los análisis con los métodos Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud para el ND2 se observa que no siempre se forman dos clados uno correspondiente al grupo PCM subespecie *P. f. oleaguineus* y el grupo PSM subespecie *P. f. sanguinolentus* y que a su vez la muestra de proveniente de Perú (21419) *P. f. fumigatus* sea incorporada como hermana de los dos grupos mexicanos. Pues en el primer análisis la muestra de Perú es excluida y puesta como hermana del clado de la especie *Picoides fumigatus* el cual tiene valor de soporte de (100%), por otra parte con el análisis de Máxima Verosimilitud se forma el clado de la especie *Picoides fumigatus* con valor de apoyo bajo (58%) aunque al interior del mismo no se resuelven las relaciones y se forma una politomía; para la reconstrucción a partir de Inferencia Bayesiana se forma el clado monofilético apoyado por (87%) dentro de él se separan las muestras del grupo PCM correspondientes a la subespecie *P. f. oleaguineus* apoyado con (86%) y otro grupo con valor bajo de (51%) donde se unen todas las muestras del grupo PSM sureste de México, subespecie *P. f. sanguinolentus* y la muestra de Perú (21419) subespecie *P. f. fumigatus*, muy probablemente se deba a que está un poco más relacionada con este grupo, aunque en presencia de otras secuencias Sudamericanas pueda agruparse con ellas con valores de apoyo aún más altos.

Las reconstrucciones filogenéticas obtenidas con Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, para el ACO1 INTRON-10 y genes concatenados apoyan los resultados obtenidos para ND2 resultando así que el clado de la especie *Picooides fumigatus* es monofilético y con respecto a muestras pertenecientes de otros géneros no se unen con ellas en ninguna reconstrucción, ya sea utilizando cualquiera de los dos marcadores o los concatenados, de tal manera que este marcador nuclear parece apoyar las construcciones filogenéticas con genes mitocondriales en este caso ND2.

El ejercicio de incorporar secuencias de otros géneros de carpinteros obtenidas en el laboratorio y de obtenidas de GENBANK arrojó datos que redescubren las propuestas de revisiones taxonómicas propuestas por otros autores Moore *et al.*, 2006.

Un punto importante sobre la topología de los diferentes árboles construidos con los tres métodos, para marcadores concatenados y nuclear, es que en algunos clados aunque hace la separación de las diferentes muestras de la diversa localidades, no los logra presentar en una topología un poco más estructurada, siendo muy posible el hecho de que estas secuencias nucleares evolucionen a una tasa más lenta que los genes mitocondriales, por lo tanto ayudan a resolver divergencias en tiempo geológico más largo (Avice, 2000; Baker *et al.*, 2000) además de que la secuencia del nuclear influya más en la topología al unirse con el mitocondrial y al ser utilizadas en carpinteros donde se ha determinado que en la mayoría de sus géneros la especiación se ha dado en tiempos muy cortos (DeFilippis & Moore, 2000; Moore *et al.*, 2006), aunque los árboles obtenidos para genes concatenados, a partir de los análisis de Máxima Parsimonia y sobre todo Inferencia Bayesiana, forman dos clados correspondientes a cada subespecie presentes en México

Es necesario obtener un muestreo más amplio para los grupos encontrados así como para la parte vertiente del Pacífico, ya que de esta región no se contó muestras de tejido, cabe señalar que si hay ejemplares preservados en piel, además de acuerdo con los registros de la base de datos del MZFC "Alfonso L. Herrera" corresponden a la subespecie *Picooides*

*fumigatus oleaguineus* (Navarro-Sigüenza & Peterson, 2004) por lo que uno esperaría a que muestras provenientes de ese lugar por la distribución alopátrica así como por la evidencia de no expansión demográfica se formara un clado más para las poblaciones de México, sin embargo, el tiempo desde que fueron colectados años 80's hace difícil la obtención de DNA a partir de plumas, puesto que con las muestras más antiguas de tejido fue complicado obtener las secuencias del marcador mitocondrial y mucho más para el nuclear.

- Expansión demográfica

Las gráficas de distribución de *mismatch* no se ajustan a la hipótesis de crecimiento poblacional, así mismo los valores para la *D* de Tajima no son significativos por lo que se corrobora, que la gran mayoría de los carpinteros presentan hábitos muy sedentarios (Prychitko & Moore, 1997; Stradi *et al.*, 1998; Webb & Moore, 2005; Moore *et al.*, 2006), aunado a la posibilidad de que la Faja Volcánica Transmexicana en su parte oriental sea una barrera que limite el movimiento de individuos de *P. fumigatus* de la parte norte (Hidalgo, norte de Puebla y Veracruz) hacia el sur (Oaxaca, Chiapas y Campeche) y viceversa, además esta provincia fisiográfica es una región donde se concentran un gran número de taxones endémicos (Marshall & Liebherr, 2000; García-Trejo y Navarro, 2004), así mismo la escasa vagilidad del ave puede tener efecto en los datos de las gráficas obtenidas, un punto de comparación similar es la especie hermana *Picoides villosus*, trabajos de variación genética y crecimiento poblacional de este carpintero, indican que también presenta niveles bajos de flujo genético entre grupos por la falta de movimiento entre los individuos de sus poblaciones y se han diferenciado en tres grandes grupos dos para norte América y uno para centro América y que estos comenzaron a diferenciarse durante el Wisconsiniano (~100 mil años) como resultado de las fluctuaciones climáticas (Graham 2004).

## VII CONCLUSIONES

- Se presenta diferenciación genética clara entre los dos grupos evaluados PCM subespecie *P. f. oleaguineus* y PSM subespecie *P. f. sanguinolentus*, por lo que se postula que la escasa movilidad así como La Faja Volcánica Transmexicana estén evitando el flujo genético entre los dos grupos, también hay evidencia de ser poblaciones que están en estasis demográfico.
- La especie *Picoides fumigatus* es un grupo monofilético, el cual al interior presenta dos clados uno perteneciente a la parte centro de México (Norte de Veracruz y Puebla más Hidalgo), subespecie *P. f. oleaguineus* y el otro parte del sur (Oaxaca, Chiapas y Campeche), subespecie *P. f. sanguinolentus*; adicionalmente una muestra de Sudamérica (Perú), subespecie *P. f. fumigatus*, que se acopla con las muestras procedentes del sur de México pero con valores bajos de bootstrap.
- Se necesita realizar un análisis de tiempos de divergencia para determinar hace cuanto que comenzaron a separarse los clados, pues la idea general es que *Picoides fumigatus* se originó en Norte América y de ahí se extendió hacia Centro y Sudamérica (Moore *et al.*, 2006). Aunque con los valores obtenidos de diversidad nucleotídica podemos llegar a establecer que las poblaciones del Sur de México pudieron originar a las poblaciones de Puebla, Veracruz e Hidalgo.

- Para este trabajo se realizó un primer enfoque con secuencias nucleares, que apoyan los datos arrojados por el gen mitocondrial, aunque se deben de obtener las secuencias faltantes del ACOI INTRON-10 para el total de muestra utilizadas con ND2.
  
- Es necesario un muestreo más amplio del área de distribución del carpintero ahumado no sólo en las vertientes del Golfo de México y Océano Pacífico para México sino también de Sudamérica, para realizar un examen más robusto de Filogeografía para determinar los posibles linajes que llegarán a presentarse en aquellas áreas de distribución potencial donde no se tiene ejemplares.

## VIII Literatura consultada

Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. *In* B. N. Petrov and F. Csaki (Eds). Second international symposium on information theory. Pp.267-281. Budapest: Akademiai Kiado.

American Ornithologist's Union. 1998. Check-list of North American Birds. AOU, USA.

American Ornithologist's Union. 2012. Check-list of North American Birds. AOU, USA.

Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A and Luikart, G. 2010. Genomic and the future of conservation genetics. *Genetics*, 11: 697-709.

Antuñado, S. E., Aranda, G. M., Marrett, R. 2000. Tectónica de la sierra Madre Oriental, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. V. LIII

Arbeláez-Cortés, E., Navarro-Sigüenza, A. G & García-Moreno, J. 2011. Phylogeny of woodcreepers of the genus *Lepidocolaptes* (Aves, Furnariidae), a widespread Neotropical taxon. *Zoologica Scripta*, 41(4):363-373.

Astorga, M. P & Ortíz, J. C. 2006. Variabilidad genética y estructura poblacional del tunicado *Pyura chilensis* Molina, 1782, en la costa de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 79:423-434.

Avise, J. C., Shapira, J. F., Daniel, S. W., Aquadro, C. F., Lansman, R. A. 1983. Mitochondrial DNA differentiation during the Speciation Process in *Peromyscus*: *Molecular Biology Evolution*, 1(1): 38-56.

Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C and Saunders N, C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Reviews. Ecology Systematics*. 18: 489-552.

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

Baker C. S., Lukoschek V., Lavery S., Dalebout M. L., Yong-un M., Endo T., Funahashi N. 2006. Incomplete reporting of whale, dolphin and porpoise 'bycatch' revealed by molecular monitoring of Korean markets. *Animal Conservation*,9:474-482.

Benz, B. W., Robbins, M. B., Peterson, A. T., 2011. Molecular phylogenetics, vocalizations, and species limits in *Celeus* woodpeckers (Aves: Picidae): *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61:29-44.

Birky, C. W., Fuerst, P., Maruyama, T. 1989. Organelle gene diversity under migration, and drift: Equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics*, 121(3):613-627.

Brawn, J. D., Collins, T. M., Medina, M & Bermingham, E. 1996. Associations between physical isolation and geographical variation within three species of Neotropical birds. *Molecular Ecology*, 5:33-46.

Brown, W., M, J. George & A. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceeding of the Natural Academy of Sciences of the United States of America (USA)*, 76: 1967-1971.

Brown, L. M., Ramey, R. R., Tamburini, B & Gavin, T. A. 2004. Population structure and mitochondrial DNA variation in sedentary Neotropical birds isolated by forest fragmentation. *Conservation Genetics*, 5:743-757.

Cadena, C. D., Klicka, J and Ricklefs, R. E. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: Molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush-finches (Aves, Embrizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(3):993-1016.

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

Chesser, R. T., Banks, R. C., Barker, F. Cicero, C., Dunn, J. L., Kratter, A. W., Lovette, I. J., Rasmussen, P. C., Remsen, J. V., Rising, J. D., Stotz, D. F & Winker, K. 2012. Fiety-Third supplement to the American Ornithologists 'Union Check-List of North American Birds. *AUK* 129(3):573-588.

Clayton, D. 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *International Revision Cytology*, 141:217-232.

Coates, A. G., Jackson, J, B.C., Collins, L. S., Cronin, T. M., Bybell, L. M., Jung, P., Obando, J. A. 1992. Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin*, v. 104, p. 814-828.

Conlon, J. M., Coquet, L., Leprince, J., Jouenne, T., Vaudry, H and King, J. D. 2010. Primary structures on skin antimicrobial indicate a close, but not conspecific, phylogenetic

relationships between the leopard frogs *Lithobates onca* and *Lithobates yavapaiensis* (Ranidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151:313-317.

Cortés-Ortiz, L., Bermingham, E., Rico, C., Rodríguez-Luna, E., Sampaio, I and Ruíz-García, M. 2003. Molecular Systematics and biogeography of the Neotropical monkey genus, *Alouatta*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1):64-81.

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

Cracraft, J. & R. O. Prum. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some Neotropical birds. *Evolution*, 42:603-620.

Daza, J. M., Smith, E. N., Páez, V. P and Parkinson, C. L. 2009. Complex evolution in the Neotropics: The origin and diversification of the widespread genus *Leptodeira* (Serpentes: Colubridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53:653-667.

DeFilippis, V. R., Moore, W. S. 2000. Resolution of phylogenetic relationships among recently evolved species as a function of amount of DNA sequence: An empirical study based on Woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 16(1):143-160.

Eberhard, J. R and Bermingham, E. 2005. Phylogeny and comparative biogeography of *Pionopsitta* parrots and *Pteroglossus* toucans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36:288-304.

Eckert, C. G., Samis, K. E., Loughheed, S. C. 2008. Genetic variation across species geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17:1170-1188.

Eguiarte, L. E. 2009. Nueva guía para principiantes en genética de poblaciones. Páginas 83-102 *En Evolución Biológica* (J. J. Morrone y P. Magaña, Eds.). *Una visión actualizada desde la revista Ciencias*. Press, Distrito Federal, México.

Eizirik, E., Jae-Heup, K., Menotti-Raymond, M., Crawshaw, P. G., O'Brien, Stephen. J and Johnson, W. E. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10:65-79.

Ellegren, H. 1992. Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites a new approach to studies of genetic relationships in birds. *Auk*, 109:886–895.



Endler, J. A. 1977. *Geographic Variation, Speciation, and Clines*. Princeton University Press, Princeton. Pp. 230.

Excoffier, L., Smouse, P. E and Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 131: 497-491

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

Fa, J. E., and L. M. Morales. 1993. Patterns of mammalian diversity in Mexico. Pages 319-361 *In: Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (T. P. Ramamorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, Eds.). Oxford Univ. Press, New York.

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

Flores-Villela, O. 1993. Herpetofauna of Mexico: Distribution and endemism. Pages 253-280 *In: Biological diversity of Mexico: Origins and distribution* (T. P. Ramamorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, Eds.). Oxford Univ. Press, New York.

Frankham, R., Ballou, J. D & Briscoe, D. A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.

Fuchs, J., Ohlson, J. I., Ericson, P. G. P & Pasquet, E. 2006. Molecular phylogeny and biogeographic history of the piculets (Piciformes: Picumninae). *Journal of Avian Biology*, 37:487-496.

Fuchs, J., Ohlson, J. I., Ericson, P. G. P., Pasquet, E. (2007). Synchronous intercontinental splits between assemblages of woodpeckers suggested by molecular data: *Zoologica Scripta*, 36:11-25.

Galbusera, P., Githiru, M., Lenssen, L and Matthysen, E. 2004. Genetic equilibrium despite habitat fragmentation in an Afrotropical bird. *Molecular Ecology*, 13:1409-1421.

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

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

García-Trejo, E y Navarro- Sigüenza, A. G. 2004. Patrones Biogeográficos de la riqueza de especies y el endemismo de la avifauna del oeste de México. *Acta Zoológica Mexicana*, 20(002):167-185.

Gill, F & D Donsker (Eds). 2013. IOC World Bird Names (v 3.3). Available at <http://www.worldbirdnames.org>.

Glen MacDonald. 2003. Realms Regions and Provinces, the biogeographic subdivisions of the earth Cap 5. *In: Biogeography (Introduction to space time and life)*. Pp. 299-321. (T. P. Ramamorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, Eds.). Oxford Univ. Press, New York.

González, M. A., Eberhard, J. R., Lovette, I. J., Olson, S. L Bermingham, E. 2003. Mitochondrial DNA Phylogeography of the Bay Wren (Troglodytidae: *Thryothorus nigricallopus*) complex. *The Cooper Ornithological Society*, 105:228-238.

Goodge, W. R. 1972. Anatomical evidence for phylogenetic relationships among woodpeckers. *AUK*, 89:65-85.

Graham, B. A. 2004. The population Genetics and Phylogeography of the hairy woodpecker (*Picoides villosus*). Thesis of Master of Science. University of Regina.

Hackett, S. J. 1996. Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (5) 2:368-382.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. *Science*, 165(3889):131-137.

Haffer, J. 1990. Avian species richness in tropical South America. *Neotropical Fauna Environment*, 25:157-183.

Harpending, H. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66:591-600.

Hernández-Baños, B. E., Peterson, A. T., Navarro-Sigüenza, & Escalante-Pliego, P. 1995. Bird faunas of the humid montane of Mesoamerica: biogeographic patterns and priorities for Conservation. *Bird Conservation International*, 5:251-277.

Howell, S. N & Webb, S. 1995. A guide to the Birds of Mexico and Northern Central America. Oxford University Press, Oxford. Pp.458.

Janke, A., and Arnason, U. 1997. The complete mitochondrial genome of *Alligator mississippiensis* and the separation between recent archosauria (birds and crocodiles). *Molecular Biology and Evolution*, 14:1266-1272.

Hewitt, G. M. in Speciation and its Consequences (eds. Otte, D. & Endler, J.) 85-110 (Sinauer associates, Sunderland, MA, 1989).

Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405:907-913.

Horváth, M., Szabó, K., Kóvacs, S., Chavko, J., Hornung, E & Kalmár, L. 2009. Genetic structure of the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in Slovakia. *Slovak Raptor Journal*, 3:21-28.

Keever, C. C., Sunday, J., Purtiz, J. B., Toonen, R. J., Grosberg, R. K and Hart, M. W. 2009. Discordant distribution of populations and genetic variation in a sea star with high dispersal potential. *Evolution*, 63(12):3214-3227.

Kerr, K, C. R. 2011. Searching for evidence of selection in avian DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 11:1045-1055.

Leafloor, J. O., Ankney, C. D., Rusch, D. H., 1998. Environmental effects on body size of Canada geese: *The AUK*, 115(1): 26-33.

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

Lynch, M., Richardson, A. O. 2002. The evolution of splicesomal introns. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12:701-710.

Lindsay, D. L., Barr, K. R., Lance, R. F., Tweddale, S. A., Hayden, T. J and Leberg, P. L. 2008. Habitat fragmentation and genetic diversity of an endangered, migratory songbird, the golden-cheeked warbler (*Dendroica chrysoparia*). *Molecular Ecology*, 17: 2122-2133.

López de Llergo, R. 2003. Principales rasgos geográficos de la República Mexicana. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*, 50:26-41.

Mayr, G. 2002. The earliest fossil record of modern-type piciform bird from the Oligocene of Germany. *Journal Ornithology*, 142:2-6.

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

Marshall, L.G., Webb, S.D., Sepkoski, J.J & Raup, D. M. 1982. Mammalian evolution and the Great American Interchange. *Science*, 215:1351-57.

Marshall, C. J., Liebherr, J. K. 2000. Cladistic Biogeography of the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, 27(1): 203-216.

Mifflin, T. E. 2003. Setting up a PCR laboratory Cap 1. *In*: Dveksler, G. S & Dieffenbach, C. W. Compilations. PCR primer a laboratory manual 2da Ed. Pp. 5-15.

Miller, M. J., Bermingham, E., Klicka, J., Escalante, P and Winker, K. 2010. Neotropical birds show a humped distribution of within-population genetic diversity along a latitudinal transect. *Ecology Letters*. 13:576-586.

Mittermeier, R. A., Gil, P. R., Hoffman, M., Pilgrim, J., Brooks, T., Mittermeier, C. G., Lamoreux, J. & da Fonseca, G. A. B. 2005. Hotspots revisited: Earth's biological richest and most endangered terrestrial ecoregions. Conservation International, Washington, DC.

Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49:718-726.

Moore, W. S., Weibel, A. C & A. Agius. 2006. Mitochondrial DNA phylogeny of the woodpecker genus *Veniliornis* (Picidae, Picinae) and related genera implies convergent evolution of plumage patterns: *Biological Journal of the Linnean Society*, 87:611-624.

Morán, Z, D. J., Martiny, B., Tolson, G., Pichardo, S. G., Aldave, A. L., Bernal, H. Ma del S., Romo, M. C., Serrano, M. R., Schaaf, P., Romo, S. G. 2000. Geocronología y características geoquímicas de las rocas magmáticas terciarias de la Sierra Madre del Sur. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. V. LIII: 27-58.

Mulcahy, D. G., Morril, B. H., Mendelson, J. R. 2006. Historical biogeography of lowland species of toads (*Bufo*) across the trans-Mexican neovolcanic belt and the Isthmus of Tehuantepec. *Journal of Biogeography*, 33(11):1889-1904.

Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T & Ben-Sasson, S. A. 1996. Microsatellite spreading in the human genome: Evolutionary mechanisms and structural implications. *Proceeding Natural Academy of the Sciences U. S. A*, 93:6470-6475.

Naka, L. N., Bechtoldt, C. L., Henriques, L. M and Brumfield, R. T. 2012. The role of physical barriers in the location of avian suture zones in the Guiana shield, northern Amazonia. *The American Naturalist*, 197(4):115-132.

Nakamura. Y., Kaneko. T., Sato. S., Ikeuchi. M., Katoh. H., Sasamoto. S., Watanabe. A., Iriguchi. M., Kawashima. K., Kimura. T., Kishida. Y., Kiyokawa. A., Kohara. M., Matsumoto. M., Matsuno. A., Nakazaki. N., Shimpo. S., Sugimoto. M., Takeuchi. C., Yamada. M and Tabata. S. 2002. Complete genome structure of the Thermophilic Cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Search*, 9:123-130.

Navarro, A.G., Garza-Torres, H.A., López de Aquino, S., Rojas-Soto, O., Sánchez-González, L. A. 2004. Patrones biogeográficos de la avifauna de la Sierra Madre Oriental, México. En Luna I, Morrone JJ, Espinosa D (Eds.) Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. CONABIO-UNAM. México. Pp. 439-467.

Navarro-Sigüenza, A and Peterson, T. 2004. An Alternative species taxonomy of the birds of Mexico. *Biota Neotropica*, 4(2):1-32.

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

Overton, L. C., Rhoads, D. D., 2006. Molecular phylogenetic relationships of *Xiphidiopicus percussus*, *Melanerpes*, and *Sphyrapicus* (Aves: Picidae) based on cytochrome *b* sequence: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41:288-294.

Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276: 734-740.

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

Peters, J. L. 1948. Check-list of the birds of the world. Cambridge. Harvard University Press. 6.

Posada, D & Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14(9):817-818.

Postma, E & Van Noordwijk, A. J. 2005. Genetic variation for clutch size in natural populations of birds from a reaction norm perspective. *Ecology*, 86(9):2344-2357.

Prychitko, T. M and Moore, W. S. 1997. The utility of DNA Sequences of an intron from the B-Fibrinogen gene in phylogenetic analysis of woodpeckers (Aves: Picidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, (8)2:193-204.

Prychitko, T. M and Moore, W. S. 2000. Comparative Evolution of the Mitochondrial Cytochrome *b* gene and nuclear B-Fibrinogen Intron 7 in Woodpeckers. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7):1101-1111.

Quinn, T, W. 1997. Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome Part 1. In Mindell, D. P, Edited. *Avian Molecular Evolution and Systematics*. United States of America. Academic Press. Pp. 4-10.

Ramamorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, Eds.). Oxford Univ. Press, New York. Flores-Villela, O. 1993. Herpetofauna of Mexico: Distribution and endemism. Pages 253-280 *In* Biological diversity of Mexico: Origins and distribution (T. P. Ramamorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, Eds.). Oxford Univ. Press, New York.

Ramos, E. L. 1993. Procesos geológicos internos y externos *En: Geología general y de México*. 7 Ed. México. Editorial Trillas, 76-80.

Rico, Y., Lorezno, C., González-Cózatl, F. X and Espinoza, E. 2008. Phylogeography and population structure of the endangered Tehuantepec jackrabbit *Lepus flavigularis*: implacations for conservation. *Conservation Genetic*, 9:1467-1477.

Rivas, G. Ma. del Carmen. 1999. Origen y evolución de los pinnípedios Cap. 3. En Eguiarte, L. E., Núñez-Farfán, J. Compiladores. La Evolución Biológica. México. *Ciencias, UNAM*. Pp. 321-336.

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

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

Roy, S. W and Gilbert, W. 2006. The evolution of splicesomal introns: patterns, puzzles and progress. *Reviews Genetics*, 7:211-221.

Saetre, G-P., Borge, T., Lindell, J., Moum, T., Primmer, C. R., Sheldon, B. C., Haavie, J., Johnsen, A., Ellegren, H. 2001. Speciation, introgressive hybridization and nonlinear rate of molecular evolution in flycatchers. *Molecular Ecology*, 10:737-749.

Scribner, K, Blanchong., J. A, Bruggeman., D. J, Epperson, B, K., Lee, C. Y., Pan, Y. W., Shorey RI, Prince HH, Winterstein SR, Luukkonen DR (2005) Geographical genetics: conceptual foundations and empirical applications of spatial genetic data in wildlife management. *Journal of Wildlife management*, 69:1434-1435.

Short, L. L. 1974. Piciformes. In "Encyclopedia Brittanica," Vol. 14, pp. 447-452. Encyclopedia Brittanica, Inc., Chicago.

Short, L. L. 1982. Woodpeckers of the World. Delaware Museum of Natural History, USA.

Slatkin, M. 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics*, 99:323-335.

Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure, en L.A. Real (ed.), Ecological genetics, Princeton University Press, Princeton, pp. 3-18.

- Soranzo, N., J. Porvan, Y W. Powell. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome*, 42:158-161.
- Sorenson, M.D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T. & Mindell, D. P. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12:105-114.
- Stansfield, W. D. 1992. *Genética*. McGraw-Hill, México.
- Stiles, G. F & A. F. Skutch., (1989). Family and Species Accounts, *In*: Comstock, P. (Ed), A guide to the Birds of Costa Rica: EUA, Cornell University Press, 63-466.
- Stradi, R., J. Hudon., G. Celentano., E. Pini., 1998. Carotenoids in bird plumage: the complement of yellow and red pigments in true woodpeckers (Picinae): *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120:223-230.
- Sullivan, J., Markert, J. A, and Kilpatrick, W. 1997. Phylogeography and Molecular Systematics of the *Peromyscus aztecus* species group (Rodentia: Muridae) inferred using Parsimony and Likelihood. *Systematics Biological.*,46(3):426-440.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and others methods). Ver. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tavares, E. S., Baker, A. J., Pereira, S. L and Miyaki, C. Y. 2006. Phylogenetic Relationships and Historical Biogeography of Neotropical Parrots (Psittaciformes: Psittacidae: Arani) Inferred from Mitochondrial and Nuclear DNA sequences. *Systematics Biology*, 55(3):454-470.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882.
- Toledo, V. M. 1982. Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico, Pp. 63-71 *In*: G. T. Prance (Eds). *Biological diversification in the tropics*. Columbia University Press, New York.
- Trejo, L. 2005. *Genética de poblaciones de Agave striata zucc.* Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Turner, T. F., Trexler, J. C., Harris, J. Land Haynes, J. L. 2000. Nested cladistic analysis indicates population fragmentation shapes genetic diversity in a freshwater mussel. *Genetics*, 154:777-785.

Vázquez-Domínguez. E., Castañeda-Rico. S., Garrido-Garduño y Gutiérrez-García, T. A. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82:277-297.

Vilaca, S. T and Santos, F. R. 2010. Biogeographic history of the species complex *Basileuterus culicivorus* (Aves, Parulidae) in the Neotropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 57:585-597.

Webb, D. M., W. S. Moore., 2005. A phylogenetic analysis of woodpeckers and their allies using 12S, Cyt b, and COI nucleotide sequence (class Aves; order Piciformes): *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36:233-248.

Weibel, A.C., W. S. Moore. 2002a. Molecular Phylogeny of a Cosmopolitan Group of Woodpeckers (Genus *Picoides*) Based on *COI* and *cyt-b* Mitochondrial Gene Sequences: *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22(1):65-75.

Weibel, A. C., W. S. Moore. 2002b. A test of a Mitochondrial gene-based phylogeny of Woodpeckers (Genus *Picoides*) using an independent nuclear gene, B-Fibrinogen intron 7. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22(2):247-257.

Weir, J. T., Bermingham, E., Miller., M. J., Klicka, J. & Gonzáles, M. 2008. Phylogeography of a morphologically diverse Neotropical montane species, the common Bush-Tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 650-664.

Wetmore, A. 1960. "A Classification for the birds of the world", Smith Misc. Coll. 139 (1), 1-37.

Whitlock. M, C & McCauley, D. E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}$  not equal to  $1/(4Nm + 1)$ . *Heredity*, 82:117-125.

Wink, M. 2006. Use of DNA markers to study bird migration. *Journal of Ornithology*, 147:234-244.

Wickliffe, J. K., Hoffmann, F. G., Carroll, D. S., Dunini-Barkovskaya, Y. V., Bradley, R. D and Baker, R. J. 2003. Intron 7 (FGB-I7) of the fibrinogen, B beta polypeptide (FGB): A nuclear DNA phylogenetic marker for mammals. *Occasional Papers*, 219:1-6.

Winker, K., Graves, G. R and Braun, M. J. 2000. Genetic differentiation among populations of a migratory songbird: *Limnothlypis swainsonii*. *Journal of Avian Biology*, 31:319-328.

Winkler, H., Christine, D. A, Nurey D. 1995. *Woodpeckers: a guide to the woodpeckers of the world*. Boston, New York: Houghton Mifflin.



Winkler, H., Christie, D. A., 2002. Family Picidae (woodpeckers). *In*: del Hoyo, J., Elliot, A., Sargatal, J. (Eds.), *Handbook of the birds of the World, Vol 7, Jacamars to woodpeckers*. Lynx Editions, Barcelona.

Wolf, P. G & Soltis, P. S. 1992. Estimates of gene flow among populations, geographic races, and species in the *Ipomopsis aggregata* complex. *Genetics Society of America*, 130:639-647.

Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics*, 6:111-178.

Zarza, E., Reynoso, V. H and Emerson, B. c. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA Phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 17:3259-3275.

Zelenkov N, V. 2007. The structure and probable mechanism of evolutionary formation of the foot in piciform birds (Aves: Piciformes) *Paleontology Journal*, 41:290-297.

Zink, R. M. 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to study evolution in the North American arid lands. *Integrative Comparative Biology*, 42:953-959.

## **Apéndice 1.-** Protocolo de extracción de DNA.

1. Cortar 25mg de tejido en pedazos pequeños y colocarlos en un tubo de 1.5 ml para microcentrifuga. Para colas de roedores utilice una rata o dos ratones y corte 0.4-0.6 cm de la cola. Añada 180  $\mu$ l de Buffer ATL.

2. Añadir 20  $\mu$ l de proteinasa K. Mezclar dando vortex e incubar a 56°C, hasta que quede completamente lisado el tejido. De vortex ocasionalmente durante la incubación o colóquelo en un termomixer, en un baño de agua agitándolo o en una plataforma giratoria.

La lisis se completa usualmente de 1- 3 horas para colas de roedores, 6-8horas. Las muestras pueden ser dejadas toda la noche para el proceso de lisis.

3. De vortex por 15s. Añada 200  $\mu$ l de Buffer AL a la muestra. Mezcle mediante el vortex. Entonces agregue 200  $\mu$ l de Etanol (96-100%). y mezcle.

Alternativamente, puede hacer una mezcla de Buffer AL y Etanol.

4. Pipetee la mezcla en una columna minispin DNeasy de 2ml de colecta. Centrifugue a  $>_{}$ 6000 x g (8000rpm) por un minuto. Descarte el filtrado y tubo de colecta.

5. Coloque el spin en un Nuevo tubo de colecta de 2 ml. añada 500  $\mu$ l de Buffer AW1. Centrifugue por un minuto a  $>$ 6000 x g. descarte el filtrado y tubo de colecta.

6. Coloque el spin en un Nuevo tubo de colecta de 2ml. añada 500  $\mu$ l de Buffer AW2. Centrifugue por 3 minutos a 20, 000 x g (14, 000 rpm). Descarte el fluido y tubo de colecta.

Remueva cuidadosamente el spin del tubo de colecta cuidando que no entre en contacto con el fluido del interior.

7. Transfiera el spin a un Nuevo tubo de 1.5 ml o un tubo de microcentrifuga de 2ml, y añada 200  $\mu$ l de Buffer AE para elución. Incube por un minuto a temperatura ambiental. Centrifugue por un minuto a  $>$ 6000 x g.

Recomendación: Repetir este paso para una máxima producción.

Especie	País	Estado	Localidad	Catálogo	Coordenadas	Clave
<i>*P. fumigatus</i>	México	Campeche	Nuevo Becal "El Chorro" 7 km al N.	MOL11-36	+18.59-89.257	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Campeche	Nuevo Becal "El Chorro" 7 km al N.	MOL11-35	+18.59-89.257	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Campeche	Nuevo Becal 4 km al N.	MOL11-12	+18.59-89.27	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Campeche	24 km S de Silvituc.	2086	+18.14-90.12	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Campeche	Calakmul El Arroyo 6 km Silvituc.	B1938	+18.59-90.256	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Campeche	24 km S de Silvituc.	1938	+18.14-90.12	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Campeche	Calakmul El Arroyo 6 km Silvituc.	GES342	+18.59-90.256	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Chiapas	Porción norte de la Omega, Monumento Natural Yaxchilán.	YACH061	+16.90-90.97	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Oaxaca	San Isidro La Gringa, a 1 km SE de San Francisco La Paz.	CHIMA141	+17.06-94.11	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Oaxaca	San Isidro La Gringa, a 1 km SE de San Francisco La Paz.	CHIMA142	+17.06-94.11	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Oaxaca	San Isidro La Gringa, a 1 km SE de San Francisco La Paz.	CHIMA545	+17.06-94.11	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Veracruz	El Haya, Instituto de Ecología.	INECOL24	+19.51-96.94	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Puebla	Salto Chico, camino a Presa Necaxa.	IALL158	+20.21-97.99	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Hidalgo	Hueyapa.	BMM869	+21.09-98.59	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Hidalgo	9 km al NO de la carretera Tehuetlan-Huatzalingo.	HGO-SLP176	+21.07-98.95	MC
<i>*P. fumigatus</i>	México	Hidalgo	El Coyol, 1 km al.	HUAS136	+21.06-98.67	MC
<i>-P. fumigatus</i>	Perú	Provincia de Pruno	San Juan del Oro.	21419	+14.231-69.194	MC
<i>*P. villosus</i>	México	Oaxaca	Yucunino, Cerro Piedra Larga.	OMVP462	¿?	MC
<i>*P. villosus</i>	México	Guerrero	Carrizal de Bravo	GMS892	¿?	MC
<i>*P. villosus</i>	México	Durango	Mexiquillo, 1 km SE de la ciudad.	SIN170	+23.72-105.67	MC
<i>*P. jardinii</i>	México	Edo. De México	Km 14 de la carretera Ocuilan-Cuernavaca.	FD97	+18.97-99.29	MC
<i>*P. jardinii</i>	México	Edo. De México	Km 14 de la carretera Ocuilan-Cuernavaca.	FD196	+18.97-99.29	MC
<i>*P. jardinii</i>	México	Edo. De México	Km 14 de la carretera Ocuilan-Cuernavaca.	FD197	+18.97-99.29	MC
<i>*P. jardinii</i>	México	Oaxaca	Terracería del Aguacate a San Sebastián Jilotepec.	OMVP460	+16.60-95.8	MC
<i>*P. jardinii</i>	México	Oaxaca	Terracería del Aguacate a San Sebastián Jilotepec.	OMVP447	+16.60-95.8	MC
<i>*P. arizonae</i>	México	Sinaloa	La Laguna, km E Lobreras.	BMM483	+23.48-105.83	MC
<i>*Pl. aeruginosus</i>	México	Hidalgo	El Coyol, 1 km al E.	SLA019	+21.07-98.95	MC
<i>*Pl. aeruginosus</i>	México	Tamaulipas	Zona Arqueológica El Sabinito, 5 km NW de El Sabinito.	CONACYT1127	+23.66-98.4	MC
<i>*Pl. auricularis</i>	México	Oaxaca	Yucunino, cerca de Santa Ana El Progreso, Putla.	OMVP678	+16.82-97.88	MC
<i>*M. aurifrons</i>	México	Yucatán	Sabanas de Tzekel, 6 km SE de Chubumá Puerto.	B586	+21.18-89.81	MC

<i>*M. aurifrons</i>	México	Veracruz	Ticuahutipan, km? Xico.	SLA004	+19.43-96.8	MC
<i>/V. kirkii</i>	Guyana	¿?	¿?	DQ479179.1NCBI	¿?	VKG
<i>/P. pubescens</i>	E.U.A	¿?	¿?	DQ479171 NCBI	¿?	PPEU
<i>/P. mixtus</i>	Paraguay	¿?	¿?	DQ188177 NCBI	¿?	PMP
<i>/V. cassini</i>	Guyana	¿?	¿?	JQ445930.1 NCBI	¿?	VCG1
<i>/V. cassini</i>	Guyana	¿?	¿?	JQ445928.1 NCBI	¿?	VCG2
<i>/V. affinis</i>	Guyana	¿?	¿?	JQ445924.1 NCBI	¿?	VAG1
<i>/V. affinis</i>	Guyana	¿?	¿?	JQ445923.1 NCBI	¿?	VAG2
<i>/V. nigriceps</i>	Bolivia	¿?	¿?	DQ361287.1NCBI	¿?	VNB

**Apéndice 2.** Lista de especies utilizadas en este estudio, \* = (MZFC) Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias UNAM, -= (NHMUK) Natural History Museum University of Kansas, /=Obtenidas de GENBANK NCBI; Clave= referencia en este estudio (MC=misma que el catálogo), VKG, PPEU, PMP, VCG1, VCG2, VAG1, VAG2, VNB = Asignadas de esta forma para su fácil manejo, ¿?=dato desconocido.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 21419Perú	*																
2 1938	0.04827	*															
3 MOL36	0.04827	0.00000	*														
4 MOL12	0.04827	0.00000	0.00000	*													
5 YACH061	0.04827	0.00000	0.00000	0.00000	*												
6 MOL35	0.04827	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	*											
7 CHIMA141	0.04827	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	*										
8 B1938	0.04827	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	*									
9 2086	0.04827	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	*								
10 GES342	0.04827	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	*							
11 CHIMA142	0.04977	0.00452	0.00452	0.00452	0.00452	0.00452	0.00452	0.00452	0.00452	0.00452	*						
12 CHIMA545	0.04525	0.00302	0.00302	0.00302	0.00302	0.00302	0.00302	0.00302	0.00302	0.00302	0.00302	*					
13 INECOL24	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.04072	0.03922	*				
14 HUAS136	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.04072	0.03922	0.00000	*			
15 HGO-SLP176	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.04072	0.03922	0.00000	0.00000	*		
16 IALL158	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.04072	0.03922	0.00000	0.00000	0.00000	*	
17 BMM869	0.03017	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.03922	0.04072	0.03922	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	*

**Apéndice 3.-** Matriz de distancias genéticas de Nei. Las áreas incluidas en los polígonos indican los grupos encontrados de acuerdo con los valores más bajos de divergencia. En amarillo el grupo sur de México (PSM) subespecie *P. f. sanguinolentus*, y en verde el grupo de la parte central de México (PCM) *P. f. oleaguineus*.