

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

35

FACULTAD DE CIENCIAS

"FILOGEOGRAFÍA DE *Lampornis amethystinus*
SWAINSON (AVES: TROCHILIDAE)".

TESIS CON
FALIA DE ORIGEN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
MARÍA NANDADEVI / CORTÉS RODRÍGUEZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION DISCONTINUA



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Filogeografía de Lampornis amethystinus Swainson (Aves: Trochilidae)"

realizado por María Nandadevi Cortés Rodríguez

con número de cuenta 9852748-5 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

Blanca Estela Hernández Baños

Propietario

Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza

Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza

Propietario

Dr. Luis Enrique Equiarte Fruns

Suplente

Dr. Luis Medrano González

Suplente

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Gerardo Pérez Ponce de León

FACULTAD DE CIENCIAS
 U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
 DE BIOLOGÍA

Este trabajo se desarrolló en el Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, como parte de las actividades del taller "Faunística, Sistemática y Biogeografía de vertebrados terrestres e insectos de México", a cargo de los Dres. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza y Jorge Enrique Llorente Bousquets.

Para la realización de diferentes actividades relacionadas con este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT (1-32871-N y R-27961), DGAPA (IN-208700 e IN 214200), PROBETEL (Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación), Fundación TELMEX y de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

**A Dios,
por darme la oportunidad de vivir**

**A mi mamá linda,
por haberme traído al mundo con mucho amor**

**A mi papá,
por enseñarme a ser fuerte**

**A mi hermanita Edelweiss,
por todos los momentos que hemos compartido juntas**

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración de muchas personas, quienes me ayudaron o apoyaron de una forma u otra, de antemano, quisiera disculparme si es que he olvidado mencionar a alguna.

Quisiera agradecerles muy especialmente a mis papás Olga Margarita y Antonio Ramón por todo el amor y cariño que me han brindado, por ayudarme en las buenas y en las malas y por enseñarme que todo es posible en la vida con un poco de esfuerzo y que nunca hay que darse por vencido para perseguir y defender los sueños e ideales. Gracias por ser mi gran apoyo. Los quiero mucho.

A mi hermanita Edel (Lobita) quién desde su llegada trajo a mi vida muchas alegrías y momentos inolvidables, por ser mi compañera de juegos y por que es mucho más que mi compañera de recamara, es mi gran amiga. Te quiero mucho.

A Hodory, Chispa, Boing, Mayo, Valesa y a los periquitos.

A toda mi familia, en especial a mis tías Martha y Fanny no tengo palabras para agradecerles el gran cariño que me han brindado. A mis abuelitas Monis y Pachis, desde niña han sido muy importantes para mí, a mi abuelita Mary que aunque no llegue a tratarla mucho su ejemplo ha sido muy grande y a mi abuelito Ramón por que desde donde están me llenan de bendiciones y me animan a ser mejor, a todos ellos, gracias, los quiero mucho.

Muy en especial a mi asesora Dra. Blanca E. Hernández B. por haber sido tan importante en mi formación académica y por que desde que comencé a trabajar con ella me dio todo su apoyo y confianza. Pero sobre todo por ser una gran amiga, por su paciencia y por sus enseñanzas.

Al Dr. Adolfo Navarro, por que gracias a él comencé a trabajar en el Museo acercándome al mundo de las aves, por que me ha orientado y alentado desde el inicio de la carrera. A Claudia y María Fernanda que también me ayudaron.

A mi amiga de toda la vida Paulina, con quien he compartido muchas cosas y a quién le tengo un gran cariño. A todas mis amigas y compañeras de la prepa.

A mis amigos del Museo César, Erick, Magaly, Martha, Adolfo "Don Fofó", Fer "nandito", Elsita, Gordillo, Gaby (Motmot), Iván, Isabel, Luis Antonio, Chente, Lety, Samuel y a Octavio, uno de mis mejores amigos que siempre me ha apoyado. A todos mis compañeros del Taller y del Museo.

A mis amigos de la carrera Harry, Mirza, Zacil, Laurita, Yoshi, Vania, Gaby, Irene, Bernardo, Perla, Adriana "Clementina", Arturo, Andrés, Julieta, Mariana, Ricardo, Paco, Pepe, mi prometido Chava, Karla (mi hija), Claus y Carlos (mis primos) con ustedes he pasado momentos inolvidables y muy divertidos.

A mi gran amiga (e hija) Pera-Perón por TODO, en poco tiempo te has convertido en alguien muy especial.

A todas las moleculitas por haberme ayudado en todo momento no solo en el trabajo en el laboratorio sino también por su apoyo.

A Ericka Aguirre por su paciencia y ayuda para realizar los análisis filogeográficos

A los doctores Luis Eguiarte, Luis Medrano y Gerardo Pérez, por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

A todos los colectores del Museo y de otras instituciones.

A los curadores y encargados de las colecciones por permitirme la utilización de tejidos para la realización de este trabajo: Dra. Patricia Escalante Pliego (Colección Nacional de Aves, Instituto de Biología UNAM), Dr. John Bates y Dr. David Willard (Field Museum of Natural History de Chicago), Dr. A. Townsend Peterson y Dr. Mark Robbins (Museum of Natural History de la Universidad de Kansas) y Dr. John Klicka (Barrick Museum of Natural History, Nevada).

A la M. en C. Laura Márquez (IBUNAM) y al Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros (Instituto de Ecología A. C.) por su valiosa ayuda al permitir la secuenciación de los 85 individuos utilizados en este trabajo.

A DGAPA por haber apoyado el proyecto "Estudios Sistemáticos de aves mexicanas: Variación Geográfica y Sistemática Molecular" y haber hecho posible el acondicionamiento y mantenimiento del laboratorio de Sistemática Molecular del Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera".

A PROBETEL por haberme apoyado durante la realización de mi tesis.

A Fundación TELMEX por haberme apoyado durante todo el tiempo en que cursé la licenciatura.

RESUMEN

Lampornis amethystinus (colibrí garganta amatista) es una especie politépica compuesta por siete subespecies. Es residente en ambas vertientes mexicanas hasta El Salvador y Honduras. Cada subespecie presenta variaciones en la tonalidad de la garganta y un marcado sobrelapamiento en sus áreas de distribución. En este trabajo se examinó la filogeografía de *L. amethystinus* por medio de análisis de distancia, máxima verosimilitud, parsimonia y cladogramas anidados de la segunda fracción del gen mitocondrial ND2 (354pb) para 73 individuos, siendo 107 pb filogenéticamente informativos. Se identificaron un total de 28 haplotipos, 16 de los cuales pertenecen a *L. amethystinus*, 11 al resto de colibríes y 1 al grupo externo. La filogeografía de esta especie muestra dos agrupaciones, la del Centro de México y la de Chiapas-Centroamérica. Al interior de cada uno de los grupos existe una moderada diferenciación génica así como en la especie en su totalidad. La separación de estos dos grupos es debido a un proceso de fragmentación alopátrica provocada por la formación del Istmo de Tehuantepec.

ABSTRACT

Lampornis amethystinus (amethyst-throated hummingbird) is a polytypic species composed of 7 subspecies. It is resident on both Mexican slopes to El Salvador and Central Honduras. Each subspecies has variations on their throat color, and their distributional areas overlaps. In this project the phylogeography of *Lampornis amethystinus* (amethyst-throated hummingbird) was examined through distance, maximum likelihood, parsimony and nested clade analyses of the second fraction of the mitochondrial gene ND2 (354pb) for 73 individuals, from the total base pairs 107 were parsimony informative. A total of 28 haplotypes were identified, 16 were for *L. amethystinus* and 12 for the outgroups. The phylogeography of this species shows two groups, one corresponds to those individuals whose distribution is in the Center of Mexico and the other one to those individuals of Chiapas and Central America. Inside each group and in the total species distribution exists a moderate genetic differentiation. The separation of these two groups was consequence of the formation of the Isthmus of Tehuantepec.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	6
Aspectos generales del género <i>Lampornis</i>	9
<i>Lampornis amethystinus</i>	10
Distribución y Hábitat.....	10
Descripción.....	10
Aspectos Biológicos.....	12
SITUACIÓN TAXONÓMICA DE <i>Lampornis amethystinus</i>	13
Subespecies reconocidas.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
MÉTODOS.....	18
EJEMPLARES EXAMINADOS.....	18
TRABAJO DE LABORATORIO.....	19
ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	22
RESULTADOS.....	24
COMPOSICIÓN NUCLEOTÍDICA.....	24
ANÁLISIS DE DISTANCIA.....	25
Neighbor-Joining.....	28
Evolución Mínima.....	28
ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD.....	31
ANÁLISIS DE PARSIMONIA.....	33
ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS.....	36
DISCUSIÓN.....	41
Análisis de distancia y parsimonia.....	41
Consideraciones Filogeográficas.....	44
CONCLUSIONES.....	48
PERSPECTIVAS.....	50
LITERATURA CITADA.....	51
ANEXO 1.....	57
ANEXO 2.....	60

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1. Mapa predictivo de la distribución de <i>Lampornis amethystinus</i>	11
Figura 2. Mapa de las localidades donde se colectó <i>Lampornis amethystinus</i>	19
Figura 3. Fenograma de Neighbor-Joining	29
Figura 4. Fenograma de Mínima Evolución	30
Figura 5. Árbol consenso de Máxima Verosimilitud	32
Figura 6. Árbol de Máxima Verosimilitud con opción de forzamiento de reloj molecular.....	32
Figura 7. Árbol de parsimonia con Branch and Bound.....	34
Figura 8. Árbol del análisis de "Bootstrap"	37
Figura 9. Mapa de distribución de los haplotipos.....	41
Figura 10. Red de haplotipos	39
Figura 11. Clados anidados	40

TABLAS Y CUADROS

Cuadro 1. Categorías o patrones filogeográficos	4
Tabla 2. Aportaciones al conocimiento de <i>L. amethystinus</i>	15
Tabla 2 Continuación. Aportaciones al conocimiento de <i>L. amethystinus</i>	16
Tabla 3. Haplotipos identificados dentro de <i>L. amethystinus</i>	26
Tabla 4. Matriz de distancia	27
Tabla 5. Diversidad Nucleotídica	38
Tabla 6. Frecuencias relativas para cada estado muestreado	40

INTRODUCCIÓN

La estructura genética poblacional de una especie es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la biogeografía histórica de los linajes genéticos (Wenink 1996). Debido a lo anterior, el examinar las variaciones entre las poblaciones puede revelar sus asociaciones históricas y los procesos de reestructuración genética que pueden conducir a la especiación (Kirchman *et al.* 2000). Bajo este supuesto, los estudios de variación geográfica han revelado los mecanismos históricos y ecológicos, así como los patrones fenotípicos y distribucionales para muchas especies de aves (Kirchman *et al.* 2000), por lo que entender estos patrones de variación geográfica es el primer paso para inferir los procesos evolutivos en poblaciones naturales (Zink y Remsen 1996).

Los estudios modernos de variación geográfica enfatizan el uso de técnicas moleculares en la búsqueda de patrones de variación genética (Zink 1996) y son de importancia fundamental para entender los procesos evolutivos y como consecuencia, ha crecido el interés por la documentación de la geografía de estas variaciones genéticas (Lewontin 1974, Zink 1996, 1997). La filogeografía es la rama de la biogeografía que trata de los principios y procesos que rigen las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos o filogenéticos, especialmente aquellas cercanamente relacionadas (Avice 1998a). Esta disciplina tiene que ver con los componentes históricos y filogenéticos de las distribuciones espaciales de linajes de genes cuyo análisis e interpretación requiere de datos provenientes de disciplinas como la genética molecular y de poblaciones, la etología, la demografía, la sistemática filogenética, la paleontología, la geología y la geografía histórica, lo que hace a la filogeografía una disciplina integrativa que se encuentra en el cruce entre la macroevolución y la microevolución (Avice 2000).

Los candidatos primordiales para acumular diferencias genéticas son las poblaciones históricamente aisladas debido a que pudieron haber tenido un mayor potencial de exposición a presiones de selección divergentes sin la influencia homogenizadora del flujo génico (Avice 2000). Mientras que el flujo génico retarda la divergencia genética de las poblaciones, el aislamiento geográfico, la deriva génica, la filopatría, las altas tasas de mutación y posiblemente la selección de adaptaciones locales, contribuyen a una estructura filogeográfica intraespecífica pronunciada en las especies animales (Avice *et al.* 1987).

A diferencia de los primeros análisis de genética de poblaciones realizados con aloenzimas (electroforesis de proteínas) en los cuales su utilización reveló poca o ninguna diferenciación genética intraespecífica (Zink *et al.* 1991 y Avice 2000), los análisis realizados mediante la utilización del DNA mitocondrial proporcionaron los primeros datos accesibles en "genealogías de genes" a nivel intraespecífico, forjando un puente empírico y conceptual entre la genética de poblaciones (microevolución) y la filogenética tradicional (macroevolución: Avice 1994). En los árboles de genes, el DNA mitocondrial presentó un 95% de probabilidad de igualar la historia evolutiva de una especie, a diferencia del DNA nuclear que presentó un 65%; con base en estos datos, serían necesarios muchos árboles de genes nucleares para tener confianza basándose en un solo árbol de haplotipos mitocondriales (Moore 1995, 1997 y Hoelzer 1997).

La estructura del DNA mitocondrial ha sido una de las razones principales para que se haya utilizado en gran cantidad de estudios. Con pocas excepciones, el DNA mitocondrial animal es una molécula circular de 15 a 20 kilobases de largo y está compuesto por 37 genes que codifican 22 tRNAs, 13 proteínas específicas involucradas en el transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa. 2 rRNAs y una región control que inicia la replicación y la transcripción (Avice 1994). El arreglo de sus genes es generalmente estable aunque existen diferencias en el orden de los genes entre algunas taxas, por ejemplo, en aves se ha visto que el este arreglo es idéntico entre los diferentes órdenes (Desjardins y Morains 1990).

Avise 1994, González 1997). Se ha visto que evoluciona más rápido que el DNA nuclear y que presenta un mayor número de transiciones sobre las transversiones, también es posible calcular un "reloj molecular" con aproximadamente el 2% de divergencia entre pares de secuencias por millón de años (Avise 1994, Avise 2000). Es fácil de purificar y de caracterizar debido a que es pequeño y carece de intrones así como de secuencias repetitivas; aunado a que posee un alto número de copias y a que se encuentra muy enrollado dentro de la célula, lo cual permite su separación del DNA nuclear, que es lineal (Wilson, 1985; Quinn, 1997).

Otras de las ventajas de la utilización del DNA mitocondrial es que al ser de herencia materna, una vez que una variación se establece en la hembra, todos los descendientes la poseen y por lo tanto, ese patrón hereditario es clonal a lo largo del linaje materno y no existe evidencia de que se pueda recombinar con otras moléculas de DNA mitocondrial diferentes o que se mezcle horizontalmente lo que hace que mediante su utilización se pueda reconstruir la historia evolutiva de un taxón (Willson 1985, Quinn 1997).

Ciertamente, un éxito empírico de los análisis filogeográficos basados en DNA mitocondrial han sido las descripciones cada vez mejores de las distribuciones geográficas, relaciones filogenéticas y distancias genéticas entre linajes evolutivos de animales, llevando como consecuencia, a un mejor entendimiento de la biogeografía regional y áreas de endemismo (Bermingham y Moritz 1998). Avise (1987) observó que los factores biogeográficos históricos, los factores ecológicos y la conducta de los organismos han jugado un papel muy importante al moldear la estructura genética de varias especies extintas; a la síntesis de esos factores los llamó patrones filogeográficos. Estos patrones se agrupan en cinco categorías (Cuadro 1) y cada uno de ellas refleja los diferentes aspectos espaciales y de escala de la estructura genealógica de las poblaciones (Avise 2000).

Cuadro 1. Categorías o patrones filogeográficos en que Avise (2000) agrupó los aspectos espaciales y de escala de la estructura genealógica de las poblaciones

Categoría 1:	Presencia de grupos de haplotipos limitados espacialmente y separados por mutaciones relativamente grandes. Saltos genéticos prominentes distinguen profundos linajes alopátricos en un árbol de genes.
Categoría 2:	Se caracteriza por pronunciados saltos filogenéticos entre algunas ramas en un árbol de genes. Linajes principales se distribuyen sobre un área extensa, se refiere a linajes simpátricos muy separados. Presentan un alto flujo génico.
Categoría 3	La mayoría de todos los haplotipos están cercanamente relacionados geográficamente. Flujo génico contemporáneo bajo en relación con el tamaño poblacional, ha permitido linajes seleccionados y deriva génica para promover divergencia genética entre las poblaciones que han estado en contacto histórico reciente. Se trata de linajes alopátricos pero con separaciones evolutivas poco profundas.
Categoría 4	Patrón esperado para especies con alto flujo génico y que tienen un tamaño efectivo modesto o pequeño y cuyas poblaciones no han sido separadas por barreras ecológicas a largo plazo, comprende linajes simpátricos con conexiones evolutivas recientes.
Categoría 5	Es un patrón intermedio entre las categorías 3 y 4, trata de linajes de distribución variada pero también con separaciones evolutivas poco profundas.

Avise (2000) resumió algunos de los trabajos filogeográficos que se han realizado para especies de vertebrados así los de algunas especies de invertebrados. En el caso de las aves, mucho de lo que sabemos acerca de la variación genética y geográfica se basa en aves de la zona templada de Norte América (Zink 1996, Kirchner 2000). Se han descrito patrones filogeográficos para especies como el Ganso de Canadá (*Branta canadensis*; Van Wagner y Baker 1990), Gorrión de ceja blanca (*Spizella passerina*; Zink y Dittmann 1993a), Gorrión cantor (*Melospiza melodia*; Zink y Dittman 1993b), Gorrión rascador (*Passerella iliaca*; Zink 1994) y Tordo sargento (*Agelaius phoeniceus*; Ball et al. 1998) entre otros.

Tomando lo anterior en cuenta, el colibrí garganta amatista (*Lampornis amethystinus*), es un buen candidato para estudiar estos patrones filogeográficos, ya que es una especie politípica cuyas subespecies (siete) presentan variaciones en la tonalidad de la garganta (desde rosa hasta morado) y un marcado solapamiento entre sus áreas de distribución. Habita en los bosques de pino-encino, mesófilos de montaña y bosques de niebla desde Tamaulipas hasta Honduras a una altitud máxima de 3400 msnm. Como se ha visto en algunos estudios (Flores-Villela *et al.* 1994, Harris 2000) las regiones montañosas de América presentan una gran biodiversidad tanto en la diversidad de especies como en el número de endemismos y *Lampornis amethystinus* al no contar con ningún estudio de variación geográfica ni genética, por la cantidad de subespecies y por la distribución que presenta es una especie en la cual se puede realizar un análisis de este tipo, para tratar de establecer si existe un patrón filogeográfico que nos ayude a entender parte de la historia evolutiva de este complejo.

ANTECEDENTES

Debido a que México presenta una rica biota florística y faunística, ha sido considerado como un país megadiverso. A esto contribuyen la heterogeneidad climática, la accidentada topografía y los procesos geológicos que han ocurrido. Estos factores geológicos y ecológicos son los que han influido principalmente para que nuestro país sea considerado como un importante centro de diversidad y evolución para muchos grupos taxonómicos, presentando además un alto grado de endemismos en organismos como cactus, encinos, serpientes colúbridas, iguanas y murciélagos. Desde que Griscom (1950) analizó el origen y la diversidad de las aves de México, se han realizado otros trabajos cuyo propósito ha sido la explicación de la diversidad de su avifauna. De la gran diversidad de aves en México (1200 especies) aproximadamente el 20% son endémicas (250 especies; Ramammoorthy *et al.* 1993, Navarro y Benítez 1997, Escalante *et al.* 2000).

Dentro de la avifauna nacional se incluye un grupo notable por su tamaño y colorido; los colibríes o chupamirtos (Torres-Chávez y Navarro 2000). Son endémicos del Continente Americano (desde Alaska hasta Tierra del Fuego), pertenecen a la segunda familia más diversa del continente (después de los mosqueros) y a la cuarta de todo el mundo (Ornelas 1996). Aún cuando existen aproximadamente 350 especies distribuidas en una gran variedad de hábitats (selvas húmedas, secas, bosques de coníferas, desiertos y zonas de alta montaña). La mayor riqueza se encuentra en países tropicales siendo Ecuador (163 especies) y Colombia (135 especies) las que mayor número presentan mientras que en México se estiman más de 60, 24 las cuales son endémicas y algunas están restringidas a zonas muy pequeñas del territorio (Torres-Chávez y Navarro 2000). Bleiweiss (1998a) estudio la fauna de los Andes así como de otras regiones de América para tratar de obtener el sitio de origen de los colibríes, no pudo determinar el origen geográfico de este tipo de faunas de colibríes debido a

que son de origen polifilético, sin embargo, pudo concluir que divergieron desde Suramérica hasta Norteamérica justo antes de que ocurriera el cierre del Istmo de Panamá, en el Plioceno tardío.

Estas aves han llamado la atención tanto de científicos como de aficionados no solo por su belleza, sino por que son los animales endotérmicos más pequeños (Johnsgard 1997). Poseen el mayor rendimiento energético, debido a que dan 200 aleteos por segundo al cortejar y 80 en vuelo normal. Se desplazan a una velocidad de 50 a 65 Km/h, su corazón late 1260 veces por minuto, el color de su plumaje es iridiscente, el tamaño de su cerebro es de los más grandes entre las aves y son las únicas aves capaces de entrar en torpidez (estado en el cual se reduce la temperatura del cuerpo de 40° a 19°C y por lo tanto el metabolismo). La forma en la que se alimentan del néctar de las flores comprende una de las principales radiaciones adaptativas dentro del grupo de las aves (Navarro y Benítez 1995, Ornelas 1996).

Pertencen al orden Apodiformes en el cual se incluyen aproximadamente 428 especies agrupadas en 3 familias: Apodidae (vencejos con 92 especies), Hemiprocnidae (vencejos crestados con cuatro) y Trochilidae (colibríes con 350 especies; del Hoyo *et al.* 2001). Sibley y Ahlquist (1990) establecieron el superorden Apodimorphae, el cual contiene dos órdenes: Apodiformes (incluye las familias Apodidae y Hemiprocnidae) y Trochiliformes (incluye la familia Trochilidae que a su vez incluye a las subfamilias Phaethornithinae y Trochilinae). Las relaciones del orden Apodiformes con otros órdenes como Strigiformes (búhos y lechuzas) y Caprimulgiformes (chotacabras) han sido cuestionadas. Bleiweiss (1998c) mediante análisis de "gaps" de fósiles provenientes del Terciario estableció que estos tres grupos divergieron de un ancestro común en el Paleoceno (hace 61.5 millones de años). Aún cuando las relaciones entre vencejos y colibríes no se han esclarecido del todo, análisis realizados mediante hibridación DNA-DNA (Sibley y Ahlquist 1990) llevan a la hipótesis de que

probablemente vencejos y colibríes divergieron en el Mioceno (hace 55 millones de años; Bleiweiss 1998c).

Las primeras clasificaciones que se hicieron para los colibríes ponían atención principalmente en las diferencias entre los colibríes ermitaños y los no ermitaños agrupándolos en las subfamilias Phaethornithinae y Trochilinae respectivamente (Gould 1861, Ridgway 1911). Originalmente estos fueron diferenciados superficialmente por el plumaje y similitudes en su alimentación (Bleiweiss *et al.* 1997). Esta suposición está apoyada por varios estudios anatómicos y moleculares, los cuales han sustentado la monofilia de cada una de las subfamilias (Zusi y Bentz 1982, Gill y Gerwin 1989 Sibley y Ahlquist 1990, Bleiweiss 1991, Bleiweiss *et al.* 1994, Bleiweiss *et al.* 1997). Se piensa que ambas subfamilias divergieron a partir de un ancestro común en el Mioceno temprano (hace 17.8 millones de años aproximadamente; Bleiweiss 1998a).

Las relaciones genéricas y los límites de especies para una gran cantidad de colibríes están pobremente entendidos, debido a que muchas de las clasificaciones están basadas en estudios realizados en el siglo XIX (Gould 1861, Elliot 1879, Boucard 1895, Ridgway 1911 citados en Hernández-Baños 1998, del Hoyo *et al.* 2001). Basándose en información conductual, merística y morfológica se han establecido divisiones taxonómicas o linajes de colibríes entre los cuales se encuentran los hermitaños, mangos, coquetas, esmeraldas, gemas, brillantes, clado de los Andes y abejas (Bleiweiss 1998c, del Hoyo 1999). Ahora se sabe que dichos caracteres están influenciados principalmente por la conducta social y alimentaria, por lo que pudieran ser adaptativos, esto es, existe similitud en los caracteres encontrados en diferentes especies debido a evolución convergente, paralelismo o reversión por lo que éstos caracteres no proporcionan información acerca de la filogenia del grupo (Johnsgard 1983, Bleiweiss *et al.* 1994).

Los colibríes proveen un importante modelo para la investigación de las causas de variación en las tasas de evolución molecular, ya que representan el extremo dentro de los vertebrados para ciertos factores demográficos y fisiológicos (Rand 1994). Comparados con otras aves, los colibríes pudieran mostrar una rápida tasa de evolución molecular debido a sus características generales, a sus cortos tiempos generacionales, a su gran riqueza y a las altas tasas metabólicas que presentan (Sibley y Ahlquist 1990, Bleiweiss 1991, Rand 1994, Bleiweiss 1998b). Asimismo, los datos obtenidos mediante análisis de distancia basados en hibridación DNA-DNA sugieren que los colibríes están evolucionando más rápido que otras aves no paseriformes (Bleiweiss *et al.* 1994).

Aspectos generales del género *Lampornis*

El género *Lampornis* Swainson, 1827 pertenece al linaje propuesto como "Gemas" dentro del cual se incluyen géneros como *Lamprolaima*, *Microchera*, *Anthocephala* y *Basilinna*. Bleiweiss (1998c) propuso como época de divergencia entre este linaje y el linaje que incluye a las "Abejas" (géneros *Calothorax*, *Archilocus*, *Atthis* y *Selasporus*) el Mioceno, hace aproximadamente 5.96 millones de años. Su distribución va desde el sur de Arizona en los Estados Unidos de Norteamérica hasta Panamá, en altitudes que van desde los 300 msnm hasta los 3500 msnm. El género incluye alrededor de siete especies; *L. amethystinus*, *L. clemenciae*, *L. viridipallens*, *L. sybillae*, *L. hemileucus*, *L. calolaema*, *L. castaneiventris* (AOU 1998) aunque el número varía de acuerdo con el autor. Son colibríes grandes (tamaño entre 12 y 12.5 cm), con pico negro, deprimido, ancho en la parte basa y más grande que la cabeza, poseen una línea postocular blanca, parte dorsal verde y los sexos son dimórficos; el macho adulto tiene la garganta iridiscente con coloraciones que van desde el verde hasta el púrpura o rosa y las hembras tienen garganta grisácea. Habitan en bosques de pino-encino y bosques mesófilo de montaña. No presentan movimientos migratorios longitudinales sino altitudinales como en el caso de *L. castaneiventris* y *L. hemileucus* quienes en invierno descienden hasta los 300 msnm (Johnsgard 1983, del Hoyo *et al.* 1999).

Lampornis amethystinus

Distribución y Hábitat

El colibrí garganta amatista (*L. amethystinus* Swainson 1827), es una especie residente en el sur de Nayarit, Jalisco, sureste de San Luis Potosí y sur de Tamaulipas; al sur a lo largo de las tierras altas del sur de México, Guatemala y El Salvador hasta el centro de Honduras (Figura 1) (AOU 1998). Habita en los bosques de pino-encino y mesófilo de montaña en altitudes que van de los 900 a los 3400 msnm, en zonas subtropicales y de baja temperatura (Howell y Webb 1995).

Descripción

Machos: Presentan corona verde oscuro, auriculares verde grisáceo, una línea postocular blanca que contrasta con ellos, parte dorsal verde metálico a bronce, rabadilla verde olivo metálico, plumas del pileo usualmente oscuras en la parte central, cobertoras superiores de la cola son negruzcas en su parte distal con un brillo azul-grisáceo; la garganta presenta coloración muy variable va desde rosa claro a morado iridiscente, barbilla grisácea con un poco de canela, el resto de las partes inferiores grises, flancos verde-bronce metálico a bronce; partes bajas gris oscuro con verde pálido; cobertoras inferiores de la cola café-gris oscuro, con márgenes gris claro a blanco (Howell y Webb 1995, del Hoyo *et al* 2001).

Hembras: Presentan el pileo bronce pálido, barbilla y garganta canela pálido, flancos verde metálico o bronce pálido, puntas de las rectrices laterales gris pálido y mejor definidas (Howell y Webb 1995, del Hoyo *et al* 2001).

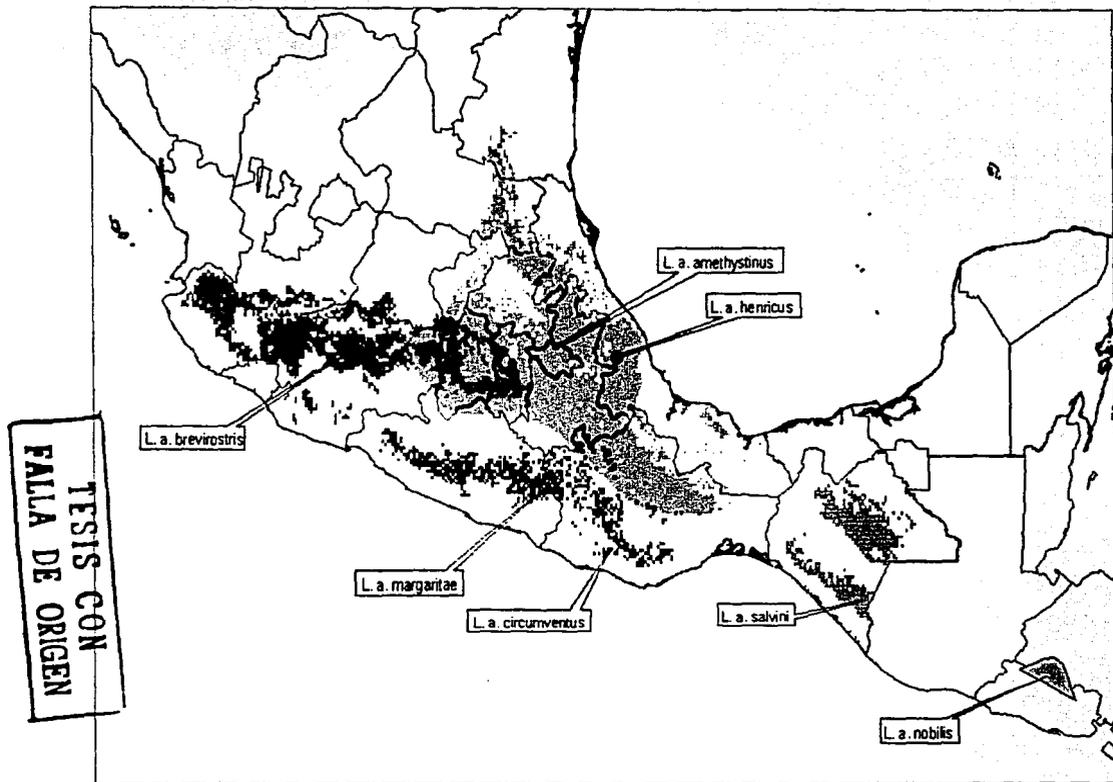


Figura 1. Mapa de la distribución potencial de las siete subespecies pertenecientes al complejo *Lampornis amethystinus* elaborado con el método predictivo GARP (Genetic Algorithm for Rule-set Prediction).

Juveniles: Parecidos a la hembra pero con la garganta oscura, usualmente con terminación color canela tenue; los machos inmaduros generalmente tienen unas plumas rosas en la garganta (Howell y Webb 1995).

Mide entre 11.5-12.5 cm de longitud; alas, 65-75 mm; cola, 39-45; cúlmen, 20-23 mm; peso, 5.0-7.8 gr; pico color negro decurvado, mandíbula café oscuro, iris negro, patas café oscuro, uñas y dedos negros. (Ridgway 1911).

Aspectos Biológicos

• Alimentación y Conducta

No se ha detectado territorialidad en *L. amethystinus* en cuanto a sus recursos alimenticios, sin embargo, debido a su gran tamaño, es capaz de ingresar en el territorio de *Atthis heloisa* y de *Hylocharis leucotis* persiguiéndolos hacia mejores áreas para forrajear. Cuando ingresa al territorio alimentario de *L. clemenciae* o de *Eugenes fulgens* generalmente es ahuyentado del área (Lyon 1976). Las plantas que visita con mayor frecuencia en praderas dentro del bosque de pino son: *Penstemon kunthii* (Scropholariaceae), que florece en el verano, *Rigidella orthantha* (Iridaceae) de la que se alimenta cuando la primera comienza a declinar, *Ipomea herediflora* (Convolvulaceae) y *Crusea coccinea* (Rubiaceae: Johnsgard 1997, Ornelas *et al.* 2002). Wagner (1946) observó que en el bosque mesófilo de montaña se alimenta de plantas como *Salvia nervata*, *S. cannaberrina* (Lamiaceae) y hierbas como *Centropogon affinis* (Campanulaceae) y *Fuchsia minutiflora* (Onagraceae). No se ha observado que realice movimientos migratorios latitudinales (Johnsgard 1997, Ornelas *et al.* 2002).

• Reproducción

Son territoriales, la época de reproducción presenta dos picos a lo largo del año y estos abarcan de octubre a diciembre y de mayo a junio (Howell y Webb 1995). Skutch (1967) observó que cuando cortejan, los machos cantan durante los últimos meses del año emitiendo la misma tonada de 75 a 85 veces por minuto durante muchas horas sin ninguna variación aparente, también observó que este

periodo de canto corresponde al florecimiento de *S. nervata*. Ornelas *et al.* (2002) estudiaron las vocalizaciones de *L. amethystinus* durante su época reproductiva en el oeste de México identificando cuatro tipos de llamados: (1) llamado territorial, (2) llamado de alimentación, (3) llamado de despliegue y (4) canto, estas cuatro son vocalizaciones muy complejas, debido a las interacciones que presenta y a la necesidad de comunicarse intra e interespecíficamente. Los nidos que construye tienen forma de taza y son hechos a partir de musgo decorado con líquen y adherido a ramitas colgantes en arbustos o árboles jóvenes a una altura de 1.2 a 2.4 metros sobre el suelo. Pone dos huevos que incuba la hembra (Johnsgard 1997).

Situación taxonómica de *Lampornis amethystinus*

Desde la descripción de *L. a. amethystinus* por Swainson en 1827, se han descrito siete subespecies debido a que presentan variaciones en la tonalidad de la garganta, aunque también varían en tamaño y algunas otras tonalidades en la coloración de su cuerpo. Algunas de estas subespecies, presentan un solapamiento en su área de distribución como es el caso de *L. a. amethystinus* y *L. a. brevisrostris* (en los estados de México, Michoacán y Distrito Federal), *L. a. amethystinus* y *L. a. margaritae* (en los estados de Oaxaca y Guerrero), *L. a. margaritae* y *L. a. circumventus* (en Oaxaca), *L. a. henricus* y *L. a. amethystinus* (en Veracruz). Se han registrado individuos pertenecientes a dos subespecies en la misma localidad, como es el caso de *L. a. amethystinus* y *L. a. margaritae*, ejemplares colectados por Mario del Toro Avilés en Omiltemi, Guerrero (Berlioz 1938). Muchas de estas descripciones se hicieron basándose en caracteres morfológicos que los autores consideraban como suficiente para establecer nuevas especies o subespecies, tal es el caso de *L. a. circumventus* (Phillips 1966) descrita con base en dos individuos colectados y *L. a. henricus* (Lesson y DeLattre 1836) que presenta una situación similar. También muchos de los individuos de poblaciones aisladas se describieron como subespecies nuevas

como es el caso de *L. a. circumventus* (Phillips 1966) de la Sierra de Miahuatlán y *L. a. henricus* (Lesson y DeLattre 1836) de Coatepec, Veracruz. Estas diferencias en cuanto a la coloración y distribución del complejo *Lampornis amethystinus*, aunado a que algunos de los ejemplares colectados presentan dudas sobre la subespecie a la que pertenecen, son lo que han generado problemas para el entendimiento de la historia evolutiva del grupo. En la tabla 2 se muestran las contribuciones de varios autores al entendimiento del complejo *L. amethystinus*

Subespecies descritas

- ***Lampornis amethystinus amethystinus* Swainson 1827**

Lampornis amethystinus Swainson, Philos. Mag. (n.s.), 1, June 1827, p. 442 (Temascaltepec and Real del Monte, México)

Se encuentran en el este de México desde los 1800 msnm y hasta los 2900 msnm desde San Luis Potosí y sur de Tamaulipas; hacia el sur hasta el este de Oaxaca, en los estados de Hidalgo, Puebla, sur y este del Estado de México, Distrito Federal, Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz.

- ***Lampornis amethystinus margaritae* (Salvin y Godman), 1897**

Delatiria margaritae Salvin and Godman, Ibis, 1889, p. 239. (Omitlteme, 8000 feet, Guerrero, México)

Endémico de la Sierra Madre del Sur (Guerrero y oeste de Oaxaca), desde los 1800 msnm hasta los 3500 msnm, en bosques de pino-encino, encino y mesófilo de montaña así como en los bordes de los bosques

- ***Lampornis amethystinus salvini* (Ridgway) 1908**

Delatiria henrica salvini Ridgway, Proc. Biol. Soc. Wash., 21, 1908, p. 195, no. 14. (Calderas, 7000-8000 feet, Volcán de Fuego, Guatemala.)

En el extremo sur de Chiapas (Volcán Tacaná, Cerro Malé, San Cristóbal de las Casas; México) en tierras altas de Guatemala y El Salvador. Desde los 900 msnm hasta los 3050 msnm, en bosques de encinos.

- ***Lampornis amethystinus brevisrostris* (Ridgway), 1908**

Delatiria henrica brevisrostris Ridgway, Proc. Biol. Soc. Wash., 21, 1908, p. 195, no 15. (San Sebastian, Jalisco, México)

Confinada a la mitad oeste de la provincia Eje Neovolcánico Transversal, desde Nayarit, Colima y al este hasta la porción noreste del Estado de México, en Jalisco y Michoacán (Zitácuaro). Hasta los 3500 msnm, en bosque tropical subcaducifolio y bosque mesófilo de montaña.

- ***Lampornis amethystinus circumventus* (Phillips), 1966**

Colibri amethystinus circumventus Phillips, Bulletin B.O.C. Vol. 86, 1966, p. 103-104

Endémico de la Sierra de Miahuatlán (Km 183 de la carretera a Puerto Escondido), Oaxaca. Desde los 1700 msnm.

- ***Lampornis amethystinus henricus* (Lesson y De Lattre), 1839**

Ornismyia henrica Lesson and Delattre, Rev. Zool., 1839, 17 (Coátepec, near Jalapa, Vera Cruz, México).

Endémico del Este de México (Coatepec, cerca de Jalapa, Veracruz).

- ***Lampornis amethystinus nobilis* Griscom, 1932**

Lampornis amethystinus nobilis Griscom, Proc. New England, Zool. Cl., 13, 1932, p. 58. (Montaña Vasquez, 6500 feet, Dist. Of Achaga, Honduras.)

Tierras altas de Honduras en la región de Alto Cantoral. Desde los 1500 msnm.

Tabla 2. Aportaciones de varios autores al conocimiento del complejo *Lampornis amethystinus*.

Autor y Año	Aportaciones
Swainson (1827)	Hace la descripción de <i>L. a. amethystinus</i> .
Ridgway (1911)	Describe a <i>L. a. brevirostris</i> . Considera a <i>L. a. margaritae</i> como especie, la llama <i>Lampornis margaritae</i> . Reconoce a tres subespecies <i>L. a. salvini</i> , <i>L. a. amethystinus</i> , <i>L. a. brevirostris</i> .
Griscom (1937)	Hace una revisión de ejemplares de <i>L. a. amethystinus</i> , <i>L. a. margaritae</i> , <i>L. a. salvini</i> , <i>L. a. brevirostris</i> , <i>L. a. nobilis</i> Propone que <i>Lampornis pringlei</i> debería incluirse dentro de <i>L. a. margaritae</i> ya que muchos de los especímenes colectados y etiquetados como <i>L. pringlei</i> concuerdan con las descripciones de <i>L. a. margaritae</i> por lo que esta podría ser solo una variación individual extrema en la coloración de <i>L. a. margaritae</i> . Debido a que 2 machos provenientes de Tancitaro (Michoacán) presentan la garganta color azul-violeta, típicamente asociado con <i>L. a. margaritae</i> sugiere que <i>L. a. brevirostris</i> también debería incluirse dentro de <i>L. a. margaritae</i> .
Berlioz (1938)	Propone la separación de <i>L. a. amethystinus</i> y de <i>L. a. margaritae</i> debido principalmente a que ambas coexisten en la misma localidad (Omitemi, Guerrero). Como ninguna de las dos (<i>L. a. margaritae</i> y <i>L. a. amethystinus</i>) se parece a <i>L. a. brevirostris</i> no duda que su existencia sea cuestionable. <i>L. a. nobilis</i> y <i>L. a. salvini</i> de Guatemala-Chiapas son similares por lo que podrían pertenecer a la misma subespecie.

Tabla 2 Continuación. Aportaciones de varios autores al conocimiento del complejo *Lampornis amethystinus*.

Blake (1942)	No aprueba la conservación de <i>L. a. brevisrostris</i> , ya que carece de un carácter diagnóstico estable.
Blake (1950)	Pone énfasis en la coloración azul-púrpura de <i>L. a. margaritae</i> característica de <i>Lampornis pringlei</i> Nelson.
Phillips (1966)	<i>L. a. brevisrostris</i> debería tratarse como ssp. de <i>L. a. amethystinus</i> y no tienen nada que ver con <i>L. a. margaritae</i> . Acepta a <i>L. a. henricus</i> como una subespecie válida.
Binford (1989)	<i>L. a. margaritae</i> podría ser una especie separada debido a que ha sido colectada en Cerro Verde (Oaxaca), localidad que se encuentra cerca de la localidad tipo del ejemplar de garganta rosa <i>L. a. amethystinus</i> . <i>L. a. circumventus</i> debería tratarse como sinónimo de <i>L. a. amethystinus</i> por que las diferencias no son muy marcadas.
AOU (1998)	Propone que <i>L. a. margaritae</i> debería de tratarse de una especie, separada de <i>L. a. amethystinus</i> debido a que en las poblaciones que se distribuyen irregularmente desde Michoacán hasta Oaxaca los machos tienen la garganta de color azuloso (<i>L. margaritae</i>) en lugar de que sea de color rosa (<i>L. amethystinus</i>).
Navarro y Peterson (en prep.)	Proponen la separación de <i>L. a. margaritae</i> estableciéndola como una especie. <i>L. amethystinus</i> (incluye a <i>L. a. brevisrostris</i> y <i>L. a. salvini</i>) la Sierra Madre del Sur, en Guerrero y Oaxaca y tiene la garganta de color rosa. <i>L. margaritae</i> (incluye a <i>L. a. circumventus</i>) se encuentra en los estados de México, Tamaulipas hasta el norte de Oaxaca, y por el eje neovolcánico y tiene la garganta de color azul-violeta.

OBJETIVO GENERAL

1. Determinar el patrón filogeográfico de las poblaciones de *Lampornis amethystinus* mediante la secuenciación parcial del gen mitocondrial ND2 (subunidad 2 de la NADH deshidrogenasa).

OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Determinar las distancias genéticas entre los haplotipos de *Lampornis amethystinus*.
- b. Establecer las relaciones filogenéticas entre las diferentes subespecies.
- c. Discutir la eficiencia del ND2 como marcador molecular para estudios de filogenia y filogeografía en los colibríes.

MÉTODOS

EJEMPLARES EXAMINADOS

Para la realización de este trabajo se utilizaron muestras de tejido (músculo, corazón e hígado) de 73 individuos pertenecientes a 5 subespecies del complejo *Lampornis amethystinus* provenientes de 27 localidades de México y Centroamérica (Anexo 1). Las muestras de tejido examinadas se obtuvieron de la Colección de Tejidos del Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" de la Facultad de Ciencias y del Instituto de Biología ambos pertenecientes a la Universidad Nacional Autónoma de México, del Field Museum of Natural History de Chicago, del Museum of Natural History de la Universidad de Kansas, y del Barrick Museum of Natural History de Nevada. Debido a que la muestra colectada en El Salvador pertenece a una localidad en la frontera con Honduras (y único sitio en donde se encuentran las tierras altas de Honduras) fue considerada como *L. a. nobilis*. No fue posible la obtención de tejidos de *L. a. circumventus* y *L. a. henricus*. Las 27 localidades y el número de individuos por localidad incluidos dentro de este proyecto se muestran en la Figura 3.

Como grupo externo se utilizó al Vencejo Cuellicastaño (*Cypseloides rutilus*), sin embargo también se utilizaron muestras de 11 especies de colibríes dentro del grupo interno: *L. clemenciae*, *L. viridipallens*, *Eugenes fulgens*, *Cyananthus latirostris*, *Hylocharis leucotis*, *Amazilia beryllina*, *Campylopterus curvipennis*, *Eupherusa eximia*, *Heliomaster longirostris*, *Lamprolaima rhami* y *Phaethornis superciliosus*. Los ejemplares pertenecientes al Museo de Zoología, los del Field Museum de Chicago y los de la Universidad de Kansas fueron colectados entre 1988 y 2001 por personal del Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera".

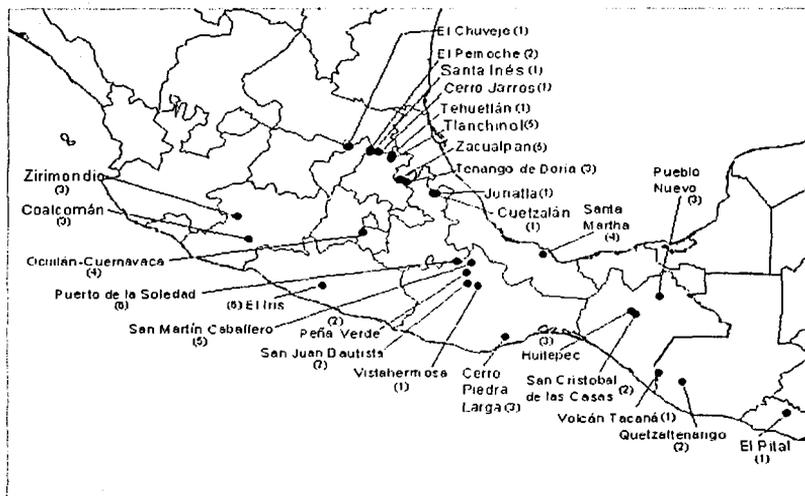


Figura 2. Mapa de las localidades donde fueron colectados los individuos pertenecientes al complejo *Lampornis amethystinus* incluidos dentro del presente proyecto. Los números entre paréntesis indican el número de individuos colectados en cada localidad.

TRABAJO DE LABORATORIO

Una vez obtenidas las muestras de tejido, cada una se colocó en 1ml de solución de lisis (50ml Tris HCL 2M pH=8, 200ml EDTA 0.5M pH=8, 2ml NaCl 5M, 25ml de SDS 20%, agua destilada). Esta solución rompe las membranas celulares para que la extracción se realice satisfactoriamente.

- **Extracción de DNA**

La extracción de DNA se realizó mediante las técnicas de Chelex 5% (Walsh *et al* 1991) y el kit de extracción DNeasy de Quiagen (siguiendo las especificaciones del fabricante). El Chelex 5% es una resina que los metales pesados y los iones divalentes previniendo la unión de los iones de magnesio y el recorte de

hebras de DNA a altas temperaturas por los metales pesados. Para realizar la extracción se colocaron 350 μ L de Chelex 5% (previamente diluido en agua destilada) en cada uno de los criotubos y a cada uno se les colocó un pequeña muestra de tejido, este se maceró y se calentó a 97°C por 10 minutos (se repite esta operación). Concluido ese tiempo se colocaron en la centrífuga durante 5 segundos a 14000 rpm, y se almacenaron a -20°C.

- **Amplificación de DNA**

Se realizó la técnica de amplificación de DNA por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo el siguiente protocolo; en un criotubo de 0.2 μ L previamente etiquetado se colocaron 25 μ L de agua ultrapura estéril, 5 μ L de Buffer de reacción 10X (KCl mM, Tris-HCl pH 8.3 100mM, gelatina 10 μ g/ml), 5 μ L de Deoxinucleótidos 10X (dATP, dCTP, dTTP, dGTP 2mM c/u), 5 μ L del primer L5215 (5'-TATCGGGCCCARACCCCGAAAAT-3'; Cracraft y K. Helm-Bychowsky 1983), 5 μ L del primer H5578 (5'-CCTTGAAGCACRRRCGGGAATCAGA-3'; Hackett 1996), 4 μ L de MgCl₂ 20X (1.5 mM), 0.4 μ L de Amplificasa (5 Unidades/ μ L) y finalmente 2 μ L de DNA. La amplificación se realizó en el termociclador (Gene Amp PCR System 9700 de Applied Biosystems) con el siguiente programa: 30 ciclos que incluyeron, desnaturalización a 95°C por un minuto; alineamiento a 48°C por 2 minutos y extensión de los primers a 72°C por 3 minutos seguidos por una extensión final de 10 minutos a 72°C). Todos los reactivos, exceptuando los primers fueron fabricados por la Facultad de Veterinaria de la UNAM.

Todas las secuencias de los primers se leen en dirección 5' a 3', los números correspondientes a cada primer se refieren a la base 3' de los primers referentes a la secuencia completa de DNA mitocondrial del gallo doméstico (*Gallus gallus*; Desjardins y Morains 1990). Los primers fueron fabricados por

Operon. Las R's en la secuencia de los primers indican que en ese sitio puede encontrarse una Adenina o una Guanina.

Una vez concluida la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos para corroborar que esta fuera exitosa. El gel de agarosa se realizó colocando 50 μ L de Buffer TBE 1X (Tris, ácido bórico y EDTA), 0.5gr de agarosa y 5 μ L de bromuro de etidio (1mg/ml); se carga da uno de los pocillos del gel con 5 μ L de producto de PCR y 2 μ L del colorante azul de bromofenol 5X; posteriormente se le aplicaron 105 voltios por 30min, concluido este tiempo, el gel se observó en la cámara de rayos UV, se le sacó una foto y se almacenaron a -20°C.

- **Purificación**

La purificación de los productos de PCR (eliminación del exceso de primers, polimerasa y dNTP's) se realizó mediante la utilización de dos técnicas, una con el kit de purificación de DNA de Quiquick de Quiagen y el kit de purificación Gene Clean III de Biolab (para cada uno de los kit's se siguieron las especificaciones de los fabricantes).

- **Secuenciación**

La secuenciación involucra básicamente una amplificación de los productos obtenidos en la purificación de PCR, la purificación de esta amplificación, la resuspensión de la muestra y su secuenciación. Todas las muestras se secuenciaron en una dirección, utilizando el primer L5215. Las muestras se llevaron a secuenciar al Instituto de Biología de la UNAM (secuenciador modelo 310 de Applied Biosystems) y al Instituto de Ecología A. C. en Jalapa (secuenciador automático Perkin Elmer Abi 373).

ANÁLISIS DE SECUENCIAS

Las secuencias se limpiaron y alinearon manualmente utilizando el programa Chromas 1.45 (McCarthy 1996). Una vez alineadas se introdujeron en un documento de texto y se abrieron en el programa ClustalX (Thompson *et al.* 1997) en el que se alinearon nuevamente y se convirtieron a los formatos necesarios para poderlas introducir en los programas siguientes.

Una vez convertidas al formato específico, las secuencias se introdujeron al programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.* 2001) para obtener la matriz de distancias utilizando el modelo de 2 parámetros de Kimura debido a que asume que la tasa de transiciones y la tasa de transversiones no son iguales (Li y Graur 1991). Mediante la matriz de distancia fue posible establecer en cuantos haplotipos se agruparon todas las secuencias. Se realizaron análisis de distancia con el algoritmo de 2 parámetros de Kimura para los métodos de Neighbour-Joining (NJ) y Mínima Evolución (ME) éste último con la opción de Pairwise Deletion ya que ignora únicamente los "espacios" en las secuencias comparadas (Nei *et al.* 2002). El análisis de "bootstrap" se realizó con 1000 réplicas.

El análisis de parsimonia se realizó utilizando únicamente los sitios filogenéticamente informativos y con la opción de Branch and Bound. Se realizó análisis de "bootstrap" con 1000 réplicas. El análisis de máxima verosimilitud se realizó mediante la opción de búsqueda heurística, se evaluó el estadístico de "bootstrap" con 100 réplicas. Se asumió la existencia de un reloj molecular por lo que fue necesaria una segunda búsqueda mediante la opción de forzamiento de reloj molecular. Estos análisis se realizaron mediante la utilización del programa PAUP 4.0 (Swofford 1999).

Para obtener la diversidad nucleotídica (π) se agruparon los haplotipos por estados. La estimación del índice de diferenciación global (F_{ST}), y de la diversidad nucleotídica se realizaron utilizando el programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.* 2000).

Para poder explorar la historia filogeográfica de la diversidad de haplotipos se construyó el árbol de haplotipos y se obtuvo utilizando el programa TCS ver 1.13 (Clement *et al.* 2000) el cual utiliza algoritmos estadísticos de parsimonia para estimar el número máximo de diferencias entre haplotipos como resultado de sustituciones simples con un 95% de confianza estadística dando como resultado una red de haplotipos interconectados entre sí así como una gráfica de estas relaciones (Posada y Crandall 2001). Posteriormente se construyeron los cladogramas anidados basándose en la gráfica y en la red de haplotipos obtenidas. Estos cladogramas anidados permiten analizar la distribución espacial de las variaciones geográficas (Templeton *et al.* 1998). Se utilizaron las coordenadas de cada una de las localidades para poder introducir los datos al programa Geodis (Posada *et al.* 2000) donde se calculan la distancia del clado (D_c) y la distancia del clado anidado (D_n), estas distancias miden como se distribuye el clado geográficamente contra otros cladogramas del mismo nivel de categoría anidada. Los resultados obtenidos con este programa, así como con las tablas elaboradas por Templeton (1995) permitirán establecer las posibles causas de la distribución de los haplotipos.

RESULTADOS

COMPOSICIÓN NUCLEOTÍDICA

Se obtuvo la secuencia parcial del gen mitocondrial ND2 con un total de 354 pares de bases. El total de pares de bases para dicho gen es de 1041. De todos los individuos secuenciados se identificaron 28 haplotipos diferenciados entre sí, de los cuales, 16 corresponden al complejo *Lampornis amethystinus*, 11 a los demás colibríes y uno al vencejo (Anexo 2). Para los 354 pares de bases de los haplotipos obtenidos se obtuvieron 193 sitios conservados, 161 variables que corresponden al 45% del total. De esto último 107 son sitios filogenéticamente informativos (66%) y los 54 sitios restantes son no informativos, haciendo un total de 247 sitios no informativos.

En cuanto a las frecuencias de pares de bases, se observa que en promedio 319 son pares idénticos; mientras que se encontraron 24 transiciones y 9 tranversiones, en una proporción de 2.8:1. La composición nucleotídica observada es la siguiente: 24.8% corresponden a timina, 32% de citosina, 30.2% de adenina y el 13.1% corresponde a guanina. Estas concentraciones corresponden a lo esperado para genes mitocondriales en otros vertebrados (concentración de GC entre 40 y 45%), debido a que estos organismos no han divergido lo suficiente uno del otro como para permitir la acumulación de diferencias considerables en la concentración de estos nucleótidos, a diferencia de las bacterias en donde estas concentraciones son aproximadamente de entre el 25% y el 75% (Li y Graur 1991).

ANÁLISIS DE DISTANCIA

Los métodos de distancia se basan en la idea de que al conocer la distancia evolutiva actual entre los miembros de un grupo filogenético es posible la reconstrucción de la historia evolutiva de ese grupo (Page 1998). En la matriz de distancia obtenida mediante el algoritmo de sustitución nucleotídica 2 parámetros de Kimura (Tabla 4) los 85 individuos secuenciados se agruparon en 28 haplotipos, que se refieren a los variantes individuales. De estos haplotipos, 16 corresponden a los 73 individuos del complejo *L. amethystinus*. De estos, 10 corresponden a los individuos que se encuentran en el Centro de México en los estados de Guerrero, Oaxaca, Michoacán, Hidalgo, Morelos, Puebla, Querétaro y Veracruz, los 6 haplotipos restantes se distribuyen en el sur de México en el estado de Chiapas y en Centroamérica en Guatemala y El Salvador (Tabla 3).

Entre los 16 haplotipos las distancias no fueron tan grandes ya que dentro del grupo *L. amethystinus* la mayor fue de 0.0231 (entre los haplotipos BMM 571, MT 357, OMVP 1540, ZAC 03) mientras que la menor fue de 0.0028 (entre los haplotipos FD 120, BMM 024, OMVP 954, CONA 763, PEP 2278 y entre S_4889, BMM 072, BMM 844, JK 076). Como era de suponerse, las distancias entre los distintos grupos externos contra el grupo *Lampornis amethystinus* fueron aumentando, desde 0.0692 para *Lampornis viridipallens* (BMM 024) hasta 0.2015 para *Phaethornis superciliosus* (BMM 051) y 0.2945 para el vencejo (BMM 051).

Tabla 3. Haplotipos de DNA mitocondrial para las localidades de *Lampornis amethystinus*. Los números en paréntesis se refieren al número de individuos que presentan ese haplotipo.

	No.	HAPLOTIPO	Estados y localidades a los que pertenece cada haplotipo
Centro de México	1	FD120 (19)	Guerrero (El Iris) Oaxaca (Cerro Piedra Larga, San Martín Caballero) Morelos (Ocuilán-Cuernavaca) Michoacán (Zirimondio, Coalcomán) Querétaro (El Pemoche, Santa Inés) Hidalgo (Tlanchinol, Cerro Jarros) Veracruz (Zacualpan).
	2	BMM 024 (2)	Guerrero (El Iris)
	3	OMVP 975 (1)	Oaxaca (Peña Verde)
	4	CONA 763 (13)	Oaxaca (San Martín Caballero, Puerto de la Soledad) Querétaro (El Chuveje) Hidalgo (Tlanchinol, Tenango de Doria) Veracruz (Santa Martha, Zacualpan)
	5	PEP 2278 (12)	Oaxaca (San Martín Caballero, Puerto de la Soledad) Querétaro (El Chuveje) Hidalgo (Tlanchinol, Tenango de Doria) Veracruz (Santa Martha, Zacualpan)
	6	MT 357 (1)	Oaxaca (Vistahermosa)
	7	CONA 1540 (1)	Hidalgo (Tenango de Doria)
	8	ZAC 03 (1)	Veracruz (Zacualpan)
	9	BMM 091 (1)	Hidalgo (Tlanchinol)
	10	OMVP 795 (1)	Oaxaca (San Juan Bautista)
Chiapas- Centroamérica	11	BMM 571 (1)	Chiapas (Pueblo Nuevo)
	12	BMM 072 (6)	Chiapas (Pueblo Nuevo, Huilepec, San Cristóbal de las)
	13	BMM 844 (1)	Chiapas (Volcán Tacaná)
	14	BMM 051(1)	Chiapas (Huilepec)
	15	JK 076 (2)	Guatemala (Quetzaltenango)
	16	S 4889 (1)	El Salvador (El Pital)

Tabla 4. Matriz de distancias obtenida para los 16 haplotipos identificados dentro del complejo *Lampornis amethystinus*, para los 11 colibríes y para el grupo externo. Elaborada utilizando el algoritmo de 2 parámetros de Kimura.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1 C. rutilius																												
2 P. superciliosus	0.238																											
3 FD120	0.278	0.192																										
4 BMM024	0.274	0.196	0.007																									
5 OMVP954	0.293	0.196	0.012	0.005																								
6 CONA763	0.293	0.196	0.002	0.005	0.005																							
7 PEP2278	0.293	0.196	0.002	0.005	0.005	0.005																						
8 MT357	0.293	0.196	0.005	0.004	0.004	0.004	0.004																					
9 CONA1540	0.293	0.192	0.005	0.008	0.008	0.008	0.008	0.014																				
10 ZAC03	0.278	0.196	0.005	0.008	0.008	0.008	0.008	0.014	0.014																			
11 BMM091	0.293	0.193	0.002	0.005	0.005	0.005	0.004	0.004	0.004																			
12 OMVP795	0.273	0.193	0.002	0.005	0.005	0.005	0.004	0.004	0.004	0.005																		
13 BMM571	0.278	0.192	0.012	0.014	0.020	0.020	0.020	0.023	0.023	0.023	0.023																	
14 BMM072	0.287	0.192	0.014	0.008	0.014	0.014	0.014	0.017	0.017	0.017	0.014	0.014	0.005															
15 BMM644	0.284	0.204	0.004	0.005	0.011	0.011	0.011	0.014	0.014	0.014	0.011	0.011	0.005															
16 BMM051	0.284	0.204	0.013	0.014	0.020	0.020	0.020	0.023	0.023	0.023	0.020	0.020	0.005	0.005	0.011													
17 JK076	0.287	0.202	0.014	0.008	0.014	0.014	0.014	0.017	0.017	0.014	0.014	0.014	0.005	0.005	0.011													
18 S. 4889	0.293	0.196	0.004	0.005	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.011	0.011	0.004	0.004	0.008	0.008												
19 L. clemenciae	0.278	0.193	0.004	0.004	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.011	0.011	0.004	0.004	0.008	0.008	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005							
20 L. viridipallens	0.275	0.197	0.012	0.009	0.017	0.017	0.017	0.019	0.019	0.019	0.017	0.017	0.012	0.012	0.017	0.017	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.009						
21 A. beryllina	0.259	0.195	0.153	0.145	0.153	0.153	0.153	0.156	0.156	0.156	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.142	0.143						
22 C. curvipennis	0.257	0.194	0.163	0.156	0.163	0.163	0.163	0.166	0.166	0.166	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.152	0.153						
23 E. eximia	0.260	0.187	0.154	0.152	0.160	0.160	0.160	0.164	0.164	0.164	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150	0.150						
24 H. longirostris	0.302	0.197	0.132	0.136	0.132	0.132	0.132	0.135	0.135	0.135	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133
25 L. rhama	0.272	0.141	0.130	0.133	0.137	0.129	0.126	0.130	0.130	0.130	0.130	0.129	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133
26 H. leucotis	0.288	0.172	0.142	0.139	0.140	0.139	0.140	0.142	0.142	0.142	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139
27 E. fulgens	0.314	0.207	0.131	0.127	0.136	0.127	0.127	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128	0.128
28 C. latirostris	0.274	0.194	0.173	0.163	0.163	0.171	0.171	0.171	0.171	0.171	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163	0.163

Análisis de Neighbor Joining (NJ)

En este método propuesto por Saitou y Nei (1987) se identifica a los pares de vecinos que minimizan el total de la longitud del árbol. En el fenograma obtenido con este método (Figura 3) se observa la separación del vencejo (*C. rutilus*) con el resto de los colibríes, ubicándolo en la base. Se observa también la separación de las dos subfamilias de colibríes Phaethornithinae y Trochilinae, con "bootstrap" de 80%. Dentro de la subfamilia Trochilinae se observan varias agrupaciones, en la base se encuentra *C. curvipennis* seguido por el grupo formado por *C. latirostris*, *H. leucotis* y *E. eximia* unidos con *A. beryllina*, *L. rhami* y el grupo formado por *H. longirostris* y *E. fulgens*. Estos colibríes se separan de los integrantes del género *Lampornis*, quienes forman un grupo consistente apoyado por el valor de probabilidad de "bootstrap" de 93%, colocando a *L. viridipallens* como la especie más parecida a *L. amethystinus*.

El grupo *L. amethystinus* esta apoyado por el 99% de "bootstrap". Dentro de esta especie se observa la separación de tres grupos, uno formado por todos los haplotipos que se distribuyen en el Centro de México ("bootstrap" de 57%), otro formado por el haplotipo BMM 024 donde se incluye a tres individuos de El Iris, Guerrero ("bootstrap" de 58) y otro en donde se encuentran los individuos pertenecientes a Chiapas y a Centroamérica ("bootstrap" de 67%).

Análisis de Evolución Mínima

En este método se muestra el menor valor de la suma de las ramas como un estimado del árbol correcto (Nei y Kumar 2000). En el fenograma obtenido (Figura 4) se observa una topología muy parecida a la encontrada con el análisis de NJ. Se encontró a *P. superciliosus* en la base de los colibríes y por encima del vencejo, ésta rama esta fuertemente apoyada por "bootstrap" de 85% separando

de éste modo a las dos subfamilias de colibríes. Los integrantes de la subfamilia Trochilinae tienen en la base al grupo formado por *C. latirostris* y *C. curvipennis* seguido por el grupo formado por *E. eximia* e *H. leucotis*. Se observa nuevamente el grupo formador por *H. longirostris* y *E. fulgens* y unido a este se encuentran *A. beryllina* y *L. rhami*. El grupo formado por los integrantes del género *Lampornis* se apoya por "bootstrap" de 86%, presentando *L. viridiapllens* la distancia mas corta con *L. amethystinus*. Al igual que en NJ el grupo de *L. amethystinus* se apoya por el 99% de "bootstrap" y se observan los mismos grupos, el del Centro de México ("bootstrap" de 60%), el de Guerrero ("bootstrap" de 59%) y el de Chiapas, Guatemala y El Salvador ("bootstrap" de 70%), Guatemala y El Salvador ("bootstrap" de 70%).

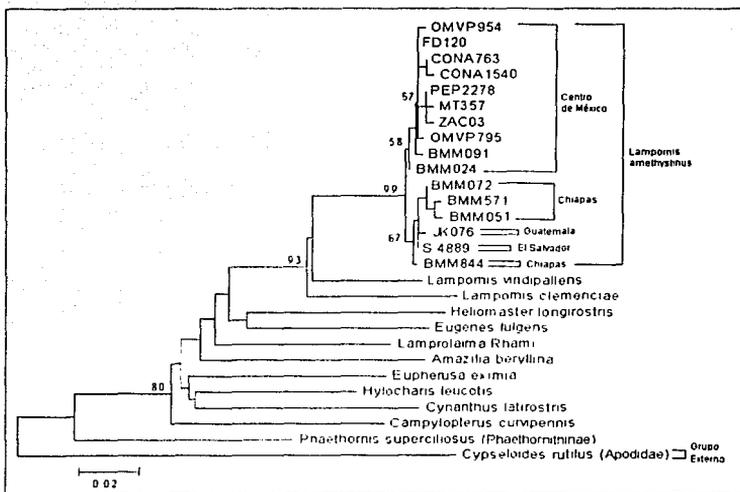


Figura 3. Fenograma obtenido mediante la utilización del método de Neighbor Joining (NJ) con el algoritmo de 2 parámetros de Kimura para los 16 haplotipos del complejo *Lampornis amethystinus* los 11 colibríes y el grupo externo. Se muestran únicamente los valores de "bootstrap" superiores a 50%.

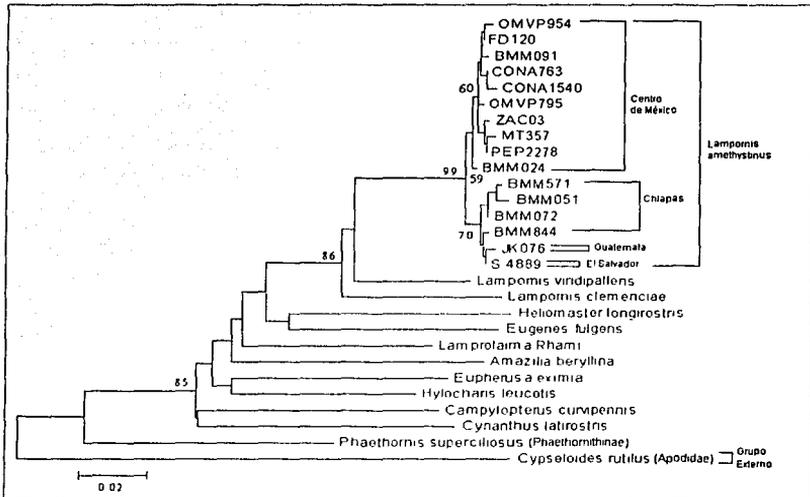


Figura 4. Fenograma obtenido mediante la utilización del método de Mínima Evolución (ME) con la opción de Pairwise Deletion y el algoritmo de 2 parámetros de Kimura para los 16 haplotipos del complejo *Lampornis amethystinus*, los 11 colibríes y el grupo externo. Se muestran únicamente los valores de "bootstrap" superiores a 50%.

ANÁLISIS DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

Este método evalúa una hipótesis acerca de la historia evolutiva en términos de la probabilidad de que un modelo propuesto del proceso evolutivo y la historia hipotética daría origen a los datos observados además, este análisis es considerado como el más poderoso para la reconstrucción filogenética (Hillis *et al* 1996, Page 1998).

Debido a que este análisis requiere de mucho tiempo de cómputo la búsqueda se realizó únicamente utilizando los haplotipos de *L. amethystinus* y el grupo externo. El logaritmo natural de verosimilitud obtenido en la primer búsqueda fue de -860.85 obteniéndose 3 árboles iguales en longitud por lo que se realizó un árbol consenso de mayoría (Figura 5). En la segunda búsqueda el logaritmo natural de verosimilitud fue de -869.36 (Figura 6). Estos valores no son muy diferentes entre sí, por lo que se puede asumir que existe un reloj molecular para *L. amethystinus*.

En ambos árboles se observa la separación de los grupos del Centro de México y de Chiapas-Centroamérica, sin embargo en el árbol en donde se forzó el reloj molecular, existe otro grupo formado por los individuos de El Iris (Guerrero). Al interior de cada uno de los grupos, la topología no es idéntica. En los individuos de Chiapas-Centroamérica se observa la formación de una rama en donde se incluyen los haplotipos BMM844, JK076 y S4889 (Volcán Tacaná, Guatemala y El Salvador, respectivamente) y una rama con los individuos de Chiapas.

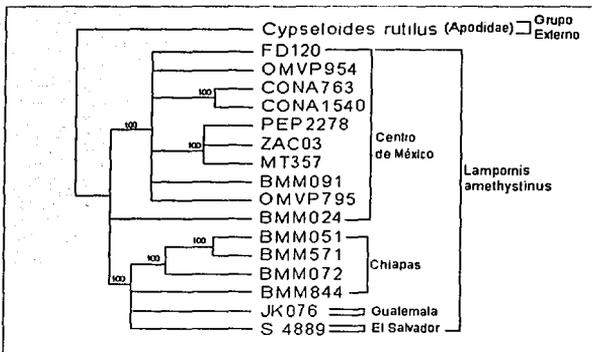


Figura 5. Árbol consenso de mayoría para los 3 árboles de Máxima verosimilitud obtenidos para los 16 haplotipos del complejo *Lampornis amethystinus* y el grupo externo con un valor de logaritmo natural de verosimilitud de -860.85.

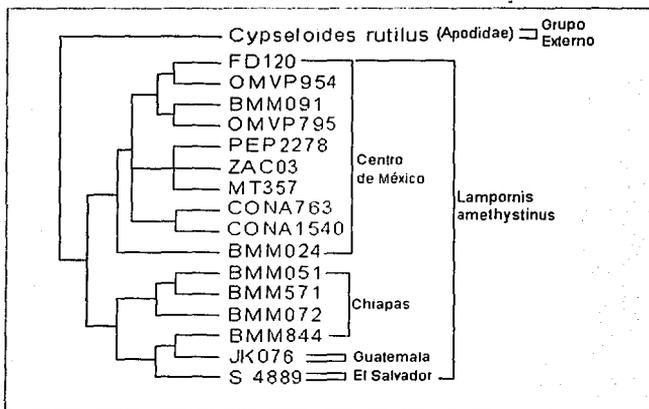


Figura 6. Árbol de Máxima verosimilitud obtenido con la opción de forzamiento de Reloj molecular para los 16 haplotipos del complejo *Lampornis amethystinus* y el grupo externo con un valor de logaritmo natural de verosimilitud de -869.36.

ANÁLISIS DE PARSIMONIA

En los métodos de parsimonia se escoge el árbol en el que se requiera del menor número de cambios evolutivos (Page 1998) Mediante las búsquedas heurística y branch and bound se obtuvo un solo árbol más parsimonioso de 300 pasos de longitud con una topología idéntica (Figura 7). Ambos árboles presentaron el mismo índice de consistencia (0.49) y el mismo Índice de retención (0.59). En los dos árboles *P. superciliosus* aparece solo formando un grupo aparte (como era de esperarse, ya que es el único integrante de la subfamilia Phaethornithinae). En lo que respecta a los haplotipos de la subfamilia Trochilinae se forman dos clados, uno en la base formado por *C. latirostris*, *C. curvipennis* e *H. leucotis*, otro formado por *H. longirostris*, *E. fulgens* y *L. rhami* y con *A. beryllina* y *E. eximia* en la base de este último. *L. amethystinus* presenta a *L. clemenciae* como posible grupo hermano ya que sin que se realice el análisis de "bootstrap" es el que se encuentra más cercano a él. Se observa la formación de tres grupos, uno formado por todos los individuos del Centro de México, otro formado por los de Guerrero (BMM 024) y otro formado por los individuos de Chiapas y Centroamérica.

En el análisis de "bootstrap" con 1000 réplicas (Figura 8) la separación de las dos subfamilias *Trochilinae* y *Phaethornithinae* esta apoyada por el 87% de "bootstrap". La mayoría de las ramas para los integrantes de la subfamilia Trochilinae (utilizados como grupos externos) se colapsaron y formaron una politomía basal, a excepción de la rama formada por *E. fulgens* y *H. longirostris* (56% de "bootstrap"). El género *Lampornis* se apoya por el 88% de "bootstrap", aunque las relaciones entre *L. clemenciae* y *L. viridipallens* no se esclarecen bien debido a que forman una politomía en la base del género. La rama de *L. amethystinus* esta apoyado por el 100% de "bootstrap". El grupo del Centro de México esta apoyado por el 54% de "bootstrap" mientras que el grupo de Chiapas y Centroamérica está apoyado por el 62% de "bootstrap". El único grupo que no está apoyado por "bootstrap" (cuando el grupo interno se asume como

monofilético) es el de Guerrero ya que forma una politomía entre los dos grupos, esto no ocurre cuando el grupo interno no se asume como monofilético y esta apoyado por 55% de "bootstrap".

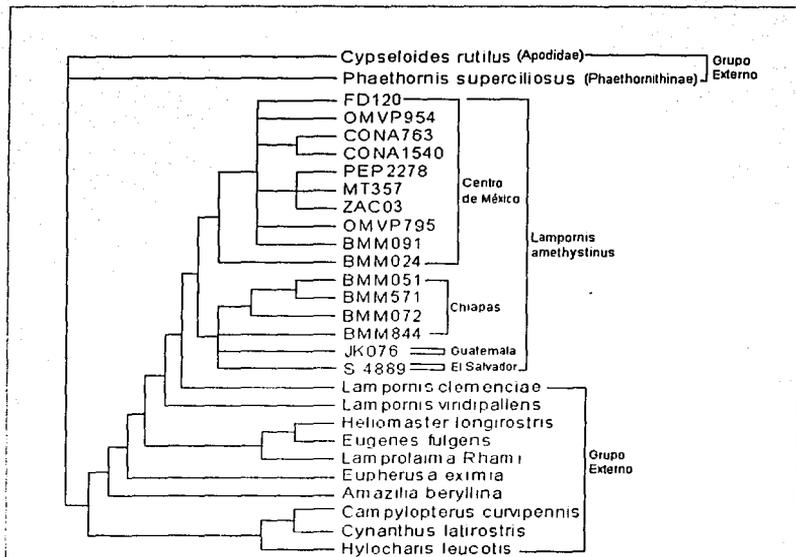


Figura 7. Árbol de parsimonia obtenido mediante la utilización de la búsqueda de Branch and Bound para los 16 haplotipos del complejo *Lampornis amethystinus*, 10 colibríes y el grupo externo.

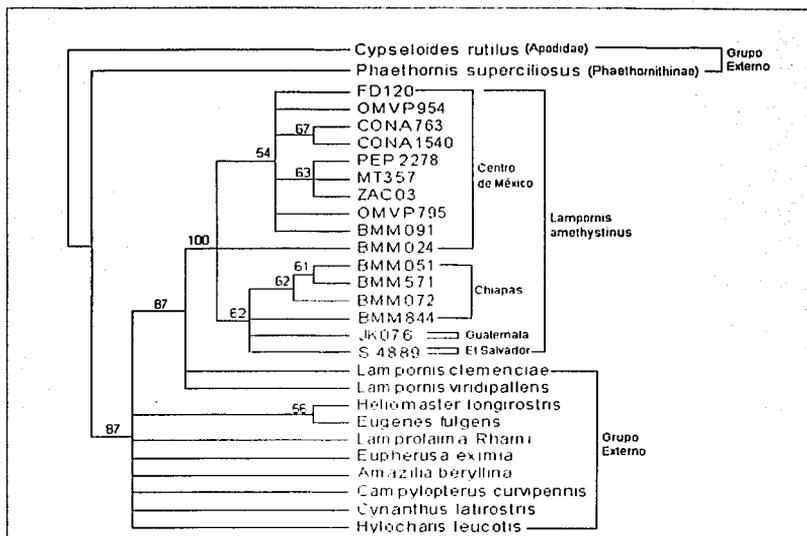


Figura 8. Análisis de "Bootstrap" realizado con 1000 réplicas para los 16 haplotipos del complejo *Lampornis amethystinus* y los 11 para el grupo externo. Se muestran únicamente los valores de "bootstrap" superiores a 50%.

ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS

Debido a que los haplotipos presentan una distribución muy variada se elaboró un mapa (Figura 8) en el cual se muestra que en algunas poblaciones se presentaron varios haplotipos, mientras que en otras poblaciones todos los individuos presentaron el mismo haplotipo.

La diversidad nucleotídica (π) para cada uno de los estados muestra valores muy pequeños (Tabla 5), el valor más alto fue de 0.003966 para los individuos de Hidalgo mientras que los valores más bajos fueron de cero para aquellos estados en donde todos los individuos presentaron el mismo haplotipo.

Tabla 5. Diversidad nucleotídica obtenida por estados para los individuos del complejo *Lampornis amethystinus*.

	ESTADO	Diversidad Nucleotídica (π)
CENTRO DE MEXICO	GUERRERO	0.001695
	OAXACA	0.003555
	MICHOACÁN	0
	MORELOS	0
	PUEBLA	0
	QUERÉTARO	0.002825
	HIDALGO	0.003966
	VERACRUZ	0.002668
CHIAPAS Y CENTROAMÉRICA	CHIAPAS	0.003640
	GUATEMALA	0
	EL SALVADOR	0

Las frecuencias relativas de cada uno de los haplotipos por estado (Tabla 6) muestran valores de cero para aquellos estados en los que no se distribuyó el haplotipo y valores de uno para aquellos estados en donde todos los individuos tuvieron el mismo haplotipo. El índice de diferenciación global obtenido o F_{ST} fue de 0.11414. El grupo del Centro de México presentó un índice de diferenciación de 0.08851 mientras que el de Chiapas-Centroamérica de 0.1397.

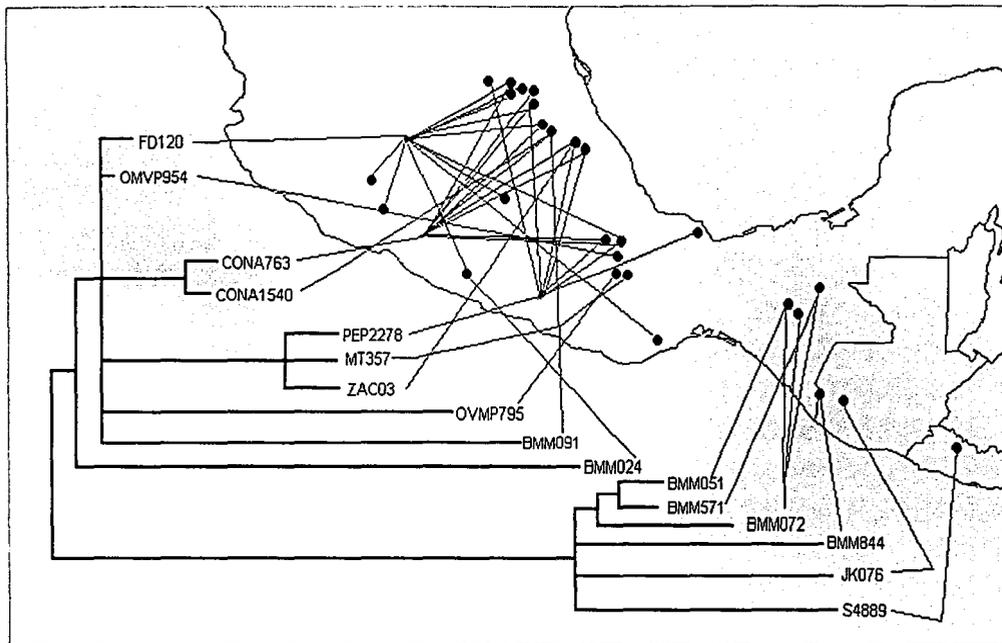


Figura 9. Mapa de distribución de los 16 haplotipos identificados en el complejo *Lampornis amethystinus* en relación con la topología obtenida mediante el análisis de parsimonia realizado en PAUP.

Tabla 6. Frecuencias relativas de los 16 haplotipos obtenidos al secuenciar los 73 individuos del complejo *Lampornis amethystinus* para cada uno de los estados.

Haplotipo/Estado	GRO	OAX	MICH	MOR	PUE	QRO	HGO	VER	CHIA	GUAT	SALV
FD 120	0.5	0.263	1	1	0	0.5	0.2	0.222	0	0	0
BMM 24	0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OMVP 954	0	0.105	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CONA 763	0	0.368	0	0	1	0.25	0.3	0.111	0	0	0
PEP 2278	0	0.158	0	0	0	0.25	0.3	0.556	0	0	0
MT 357	0	0.052	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OMVP 795	0	0.052	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BMM 091	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0
CONA 1540	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0	0	0
ZAC 03	0	0	0	0	0	0	0	0.111	0	0	0
BMM 571	0	0	0	0	0	0	0	0	0.111	0	0
BMM 844	0	0	0	0	0	0	0	0	0.111	0	0
BMM 072	0	0	0	0	0	0	0	0	0.667	0	0
BMM 051	0	0	0	0	0	0	0	0	0.111	0	0
JK 076	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
S 4889	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
No. de individuos	6	19	7	4	2	4	10	9	9	2	1

La figura 9 muestra la red de haplotipos obtenida, ésta se utilizó para la construcción de los cladogramas anidados (Figura 10), donde se obtuvieron siete cladogramas de primer nivel, dos cladogramas de segundo nivel y uno de tercer nivel. En los cladogramas de primer nivel se encuentran los haplotipos separados por una mutación y cuando estos están separados de otros cladogramas por una mutación, son los cladogramas de segundo nivel y así, sucesivamente. Uno de los cladogramas de segundo nivel está formado por cuatro cladogramas de primer nivel, en donde se encuentran los individuos que integran el grupo del Centro de México y el otro está formado por tres cladogramas de primer nivel donde se encuentran los individuos del grupo de Chiapas-Centroamérica. El haplotipo FD120 debido a que es el haplotipo que presenta una distribución muy amplia es el que presenta la mayor probabilidad para considerarse como el grupo externo y se correlaciona con la edad de los haplotipos. Los ceros indican estados de haplotipos que son intermediarios necesarios entre los haplotipos observados pero que no se encuentran en las muestras.

Como puede observarse en la figura 10, las relaciones al interior del clado nos muestran que FD120 es el haplotipo que se encuentra relacionado con todos los demás haplotipos del Centro de México. Existe una relación clara de los haplotipos pertenecientes al clado 2-1 con los del 2-2 y estos se encuentran unidos por un haplotipo inexistente o faltante que se encuentra relacionado con BMM 024.

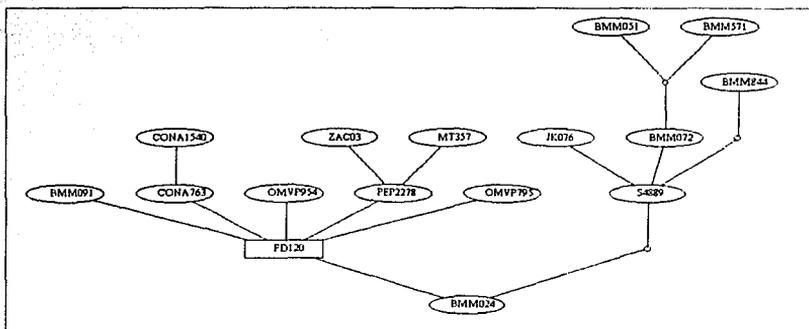


Figura 10. Red de haplotipos en donde se indica el máximo número de pasos que conectan parsimoniosamente cada uno de los haplotipos. Cada línea representa un cambio mutacional sencillo. Los círculos indican estados de haplotipos que son intermediarios necesarios entre los haplotipos observados pero que no se encuentran en las muestras.

Utilizando la clave de inferencias elaborada por Templeton (1995) para analizar los clados anidados se puede diferenciar entre tres patrones: flujo génico restringido, expansión del rango de distribución y fragmentación. Los resultados obtenidos muestran que para los clados 2-1 y 2-2 no fue posible discriminar entre alguno de los patrones arriba mencionados. Para el clado anidado 3-1 se llegó a la siguiente cadena de inferencias: 1,2,3,5,15,16 NO, dando como resultado un evento de fragmentación alopátrica como el causante de la disyunción de las poblaciones del *Lampornis amethystinus* y que derivó en la formación de dos subpoblaciones, la del Centro de México y de Chiapas-Centroamérica.

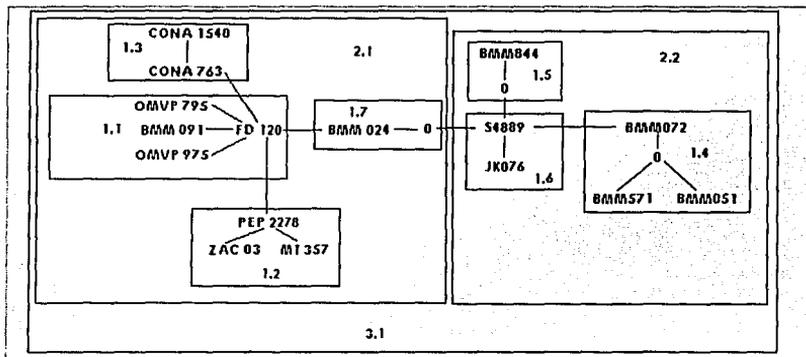


Figura 11. Juego de cladogramas y de asociaciones anidadas diseñadas para los haplotipos de DNA mitocondrial identificados para *L. amethystinus*, donde los ceros indican haplotipos intermedios que no se encontraron en el análisis. Cada línea representa un cambio mutacional sencillo que interconecta dos haplotipos con una probabilidad mayor de 95%.

DISCUSIÓN

Análisis de distancia y filogenéticos

Uno de los genes mitocondriales que evoluciona más rápido y que proporciona la mayor información en estudios filogenéticos de aves paseriformes y no paseriformes, es el gen ND2 (Johnson *et al* 1997, Omland *et al* 1999, Cicero *et al* 2001, Johnson *et al* 2002). En el presente trabajo el número de haplotipos (genotipos de DNA; Avise 1994) identificados al secuenciar la primera mitad del gen mitocondrial ND2 para el complejo *Lampornis amethystinus* (17) es relativamente bajo comparado con el total de individuos secuenciados (73) y con lo observado en otros estudios de colibríes (género *Metallura*; García-Moreno *et al* 1999). Como puede observarse en la Tabla 3, muchos de estos haplotipos se encuentran en varios individuos de la misma población y también se incluye a individuos de otras poblaciones en el mismo haplotipo.

Las distancias obtenidas mediante la utilización del modelo de sustitución nucleotídica de dos parámetros de Kimura no fueron en general tan grandes. Estas distancias son similares a las encontradas por Hackett (género *Ramphocelus* en 1996) y por García-Moreno *et al* (Género *Metallura* en 1999) utilizando el mismo modelo de sustitución nucleotídica. En los fenogramas obtenidos mediante los dos métodos de distancia (Neighbor-Joining Figura 3 y Minimum Evolution Figura 4) se establecen dos agrupaciones principales para los individuos del complejo *L. amethystinus*, el del Centro de México y el de Chiapas-Centroamérica, estos grupos están apoyados por valores altos de "bootstrap" (58% y 70% respectivamente).

Como se pudo observar en los resultados, los datos obtenidos en el presente trabajo son consistentes, ya que aparte de los porcentajes obtenidos con

el análisis de "bootstrap", la topología de los fenogramas y árboles elaborados con los métodos de distancia, parsimonia y máxima verosimilitud son similares. Cada uno de métodos arriba mencionados, se utilizaron para observar qué tanto variaba la topología de los haplotipos al construir un fenograma y un árbol filogenético. En estos tres análisis se separan los grupos del Centro de México de los de Chiapas-Centroamérica, aún cuando las relaciones dentro de cada uno de ellos no están bien definidas.

Cabe señalar que en los tres métodos, los diferentes haplotipos identificados para el complejo *L. amethystinus* nos permite establecer que el haplotipo BMM 024 que incluye a tres individuos del *L. a. margaritae* del Iris, Guerrero se encuentra en posición basal. Esto puede deberse a que la distancia que presenta es lo suficientemente grande para separarlo del resto de los individuos del Centro de México. En el haplotipo FD120 se incluye a los siete individuos de *L. a. brevisrostris*, tres de *L. a. margaritae* y 15 de *L. a. amethystinus*, por lo que podría ser que el grupo del Centro de México este formado por dos grupos, uno donde se incluya a todos los haplotipos de *L. a. amethystinus*, *L. a. brevisrostris* y algunos *L. a. margaritae* y otro grupo en donde se encuentre únicamente haplotipos de *L. a. margaritae*. Lo anterior sugiere que estos grupos pudieron haber aparecido hace relativamente poco tiempo.

Como se observa en las Figuras 5 y 6 (análisis de máxima verosimilitud sin y con enforzamiento del reloj molecular) la topología es muy similar a la observada en los análisis de distancia y de parsimonia, ya que al igual que en esos se observa la separación de los grupos de Centro de México y de Chiapas-Centroamérica. El haplotipo BMM 024 también se encuentra en posición basal a los haplotipos del Centro de México así como las relaciones entre los haplotipos BMM 051, BMM 072 y BMM 571 (*L. a. salvini* de Chiapas). Sin embargo, los haplotipos S4889 y JK076 se encuentran más relacionados con BMM 844 del Volcán Tacaná que con los demás individuos de Chiapas. Debido a lo anterior, es

muy probable, que exista un reloj molecular para el complejo *L. amethystinus* ya que al forzar este reloj, la topología obtenida fue muy similar y esto nos hace suponer que los cambios genéticos que ha sufrido esta especie no han sido tan bruscos y que se han mantenido constantes a lo largo del tiempo.

Un hecho sobresaliente en cuanto a la filogenia y límites de especie dentro del complejo *L. amethystinus* es lo que concierne a los siete individuos pertenecientes a la subespecie *L. a. brevirostris*, cuya distribución se da en los estados de Jalisco, Nayarit, Michoacán, Colima y Estado de México (Figura 1). Estos individuos comparten, junto con varios de los individuos de *L. a. amethystinus* y dos individuos de *L. a. margaritae*, el haplotipo FD 120, siendo éste el que se encuentra presente en el mayor número de localidades y estados. El que ninguno de los individuos pertenecientes a *L. a. brevirostris* se separe genéticamente del resto de *L. a. amethystinus*, es de gran relevancia, ya que autores como Blake (1942), Phillips (1966) y Navarro y Peterson (en rev.) han señalado que debido a que carece de un carácter diagnóstico estable, debería de incluirse dentro de *L. a. amethystinus* y no debería de conservarse como subespecie. Al parecer *L. a. brevirostris* presenta un alto flujo génico con las poblaciones de *L. a. amethystinus* (subespecie que presenta la distribución más amplia). Así también, se rechaza su inclusión dentro de *L. a. margaritae*, como lo había mencionado Griscom (1937), ya que aunque su haplotipo sea el mismo que el de dos de los individuos de *L. a. margaritae*, ninguno de los individuos de *L. a. brevirostris* se incluyeron dentro del haplotipo BMM 024, al cual pertenecen tres de los individuos de *L. a. margaritae*.

Ninguno de los individuos de *L. a. salvini* (BMM 051, BMM 844, JK 076 BMM 072 y BMM 571) se incluyeron dentro del haplotipo de *L. a. nobilis* (S 4889) y viceversa y en los análisis de distancia se separan quedando S4889 en posición basal al grupo Chiapas-Centroamérica. En el análisis de parsimonia no ocurre esto, ya que se forma una politomía entre los haplotipos BMM 844, JK 046 y

S4889 por lo que podría tratarse de la misma subespecie como lo había señalado Berlioz (1938). La separación genética de los individuos de Chiapas-Centroamérica de los del Centro de México no apoya la propuesta de Navarro y Peterson (en rev.) quienes incluyen a *L. a. salvini* como una subespecie de *L. amethystinus*.

Johnsgard (1997) y del Hoyo (1999) establecieron a *L. clemenciae* como el posible grupo hermano de *L. amethystinus*, en este trabajo aún cuando no se contó con cinco de las especies pertenecientes al género *Lampornis*, fue posible identificar a *L. clemenciae* como la especie hermana de *L. amethystinus*. Ya que aunque en los fenogramas de distancia se observa que el grupo más cercano a *L. amethystinus* es *L. viridipallens*, en los análisis de parsimonia *L. clemenciae* es la especie más cercana. La relación no esta apoyada con el análisis de "bootstrap" debido a la formación de una politomía entre *L. clemenciae* y *L. viridipallens*.

CONSIDERACIONES FILOGEOGRÁFICAS

La búsqueda de las variaciones entre poblaciones puede revelar sus asociaciones históricas y los procesos de reestructuración génica que puede llevar a la especiación (Wright 1931). Para el complejo *L. amethystinus* el índice de diferenciación calculado para cada una de las dos agrupaciones principales encontradas; Centro de México (0.08851) y Chiapas-Centroamérica (0.1397) son bajos ya que al seguir la guía de interpretación elaborada por Wright (1978) podemos establecer que en ambos casos existe una moderada diferenciación génica. El índice de diferenciación global (0.11414) también indica una diferenciación génica moderada, estos valores son similares a los obtenidos en trabajos realizados con especies de aves como *Melospiza melodia* (Zink y Dittman 1993b), *Quiscalus quiscula* (Zink et al. 1991) y *Agelaius phoeniceus* (Ball et al. 1988), especies que presentan una distribución geográfica moderadamente grande y cuyos haplotipos presentan una diferenciación genética moderada.

Templeton *et al.* (1995) consideran tres factores principales que pueden causar asociaciones espacio/temporal significativas en la variación haplotípica las cuales son flujo génico restringido, expansión y fragmentación del hábitat. Como se explicó en los resultados, en el mapa de distribución de los haplotipos (Figura 8) así como en el de distribución de la especie, se observa que existe un área en la cuál no se distribuye la especie, dando como resultado, la separación de los individuos de *L. amethystinus* del Centro de México y de los de Chiapas-Centroamérica. Se puede afirmar que no existe flujo génico entre estos dos grupos debido a un evento de fragmentación alopatrica. Una fuerte barrera geográfica entre las poblaciones del Centro de México y las de Chiapas-Centroamérica fue el surgimiento del Istmo de Tehuantepec.

El Istmo de Tehuantepec es una región fisiográfica en Oaxaca que colinda al norte con el Golfo de México, al este con la Sierra Madre de Chiapas, al oeste la Sierra de Chaopan y al sur con el Golfo de Tehuantepec (Binford 1989). Debido a que presenta una altitud general de 91 msnm se ha definido como una barrera geográfica importante y de evolución para las poblaciones montañosas norteñas y sureñas (Hernández-Baños *et al* 1995). La influencia que ha tenido el Istmo de Tehuantepec en la distribución de algunas aves se observa en especies de colibríes como *Lamprolaima rhami*, *Colibri Thalassinus*, *Eugenes fulgens* entre otras (Binford 1989, Howell y Webb 1995) y en otras especies de aves como *Chlorospingus ophthalmicus* (Sánchez-González 2002), *Streptoprocne zonaris*, *Lepidocolaptes affinis*, *Turdus infuscatus* por citar algunas (Binford 1989, Howell y Webb 1995). La influencia que ha tenido el Istmo de Tehuantepec en las poblaciones del complejo *L. amethystinus* del Centro de México y de Chiapas-Centroamérica ha sido muy significativa, ya que permitió la acumulación de diferencias genéticas debido a su aislamiento geográfico.

En los haplotipos del Centro de México no se encontró una barrera geográfica que separara los individuos del este y oeste, ya que aún cuando el

altiplano mexicano se encuentra entre la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental dividiéndolas, se identificaron individuos que comparten el mismo haplotipo en ambas sierras. Lo anterior pudiera deberse a la posible existencia de flujo génico entre los individuos o que se trate de haplotipos ancestrales como se observó en la red de haplotipos (Figura 9). El alto flujo génico que presentan los individuos de *L. amethystinus* pudiera indicar que esta unidad es relativamente nueva y aunque no se cuente con una fecha aproximada de divergencia del género, Bleiweiss (1998c) estimó que el linaje de las Gemas, al cual pertenece *L. amethystinus* divergió hace 5.96 millones de años aproximadamente. Esto pudiera explicar por qué aunque existe una marcada diferenciación morfológica no existe todavía una evidente diferenciación genética al interior de los individuos del Centro de México y de Chiapas-Guatemala.

El complejo *L. amethystinus* se encuentra dentro de la categoría filogeográfica IV, de acuerdo a las cinco establecidas por Avise (2000), debido a que los valores de diferenciación genética obtenidos para las poblaciones del Centro de México así como para las de Chiapas-Centroamérica presentan una diferenciación genética moderada, lo que indica que presenta linajes simpátricos con conexiones evolutivas recientes. Templeton (1995) señaló que cuando una población se expande o coloniza una nueva área geográfica, puede establecerse homogeneidad genética en el área recién colonizada que no refleje los patrones actuales de flujo génico. Aunque los valores de F_{ST} no son estimadores del flujo génico actual que presentan las poblaciones (Templeton 1995) y aún cuando los haplotipos identificados se encuentran geográficamente cercanos (Figura 8) y comparten ancestría, sería erróneo suponer que los valores de F_{ST} impliquen la existencia de flujo génico, ya que otra explicación posible es el reciente tiempo de divergencia de las diferentes poblaciones que componen este complejo. Este patrón filogenético (Categoría IV) es similar al obtenido para especies de aves como *Tympanuchus* (Ellsworth *et al.* 1994), *Quiscalus quiscula* (Zink *et al.* 1991) y *Agelaius phoeniceus* (Ball *et al.* 1988), *Spizella passerina* (Zink y Dittmann 1993a).

en los cuales se refleja el aislamiento por distancia o fragmentación poblacional reciente en lugar de separaciones vicariantes a largo plazo.

Los valores de la diversidad nucleotídica (π) que mide el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos o más secuencias (Nei y Kumar 2000) muestran que aunque existen cambios en las secuencias de los haplotipos por estado, estas no son muy grandes, ya que el valor mayor fue de 0.003966 para el estado de Hidalgo.

Aún cuando en el presente trabajo no se calculó el tiempo de divergencia para el género, (Bleiweiss 1998c) estimó que el linaje de las gemas donde se incluyen los géneros *Lamprolaima*, *Eugenes*, *Heliomaster* y *Lampornis* divergió junto con el linaje de las abejas (géneros *Atthis*, *Calothorax*, *Selasphorus* y *Archilocus*) hace 5.8 millones de años en el Mioceno medio. Durante esta época se formaron grandes orogénias debido a la gran actividad tectónica y volcánica, así como cambios climáticos globales en América.

CONCLUSIONES

Este estudio, en donde se secuenció la primera fracción del gen mitocondrial ND2 se observa que la distribución del complejo *L. amethystinus* ha sufrido un evento de fragmentación alopátrica debido a la formación del Istmo de Tehuantepec. Éste, ha actuado como barrera geográfica y ha separado las poblaciones del Centro de México y las de Chiapas-Centroamérica. Los resultados anteriores y la existencia de una diferenciación genética global de 0.11414 permite establecer que este complejo presenta un patrón filogeográfico categoría IV (Avice 2000). Esta especie, es muy reciente, ya que el estimado para origen del género es de 6 millones de años, aproximadamente (Bleiweiss 1998c).

Este gen ha demostrado ser muy útil en las reconstrucciones filogenéticas de especies paseriformes y no paseriformes, en este trabajo no mostró una gran variabilidad y no se definieron bien muchos de los límites de especies. Las distancias genéticas no fueron muy grandes y eso derivó en la identificación de 16 haplotipos para el complejo *L. amethystinus*, sin embargo, el total de haplotipos obtenidos es bajo en comparación con el número de individuos secuenciados (85). De las siete subespecies, *L. a. salvini* y *L. a. nobilis* muestran una historia evolutiva semejante y separada del grupo formado por *L. a. amethystinus*, *L. a. brevisrostris* y *L. a. margaritae* pertenecientes al Centro de México por lo que deberían de considerarse como una unidad de historia independiente de *L. a. amethystinus*.

Con lo que respecta a *L. a. margaritae* no es posible establecer su separación genética del resto de los individuos de *L. amethystinus* ya que aunque tres de los individuos pertenecientes a esta subespecie presentan un haplotipo único y este en muchos de los árboles tanto de distancia como de parsimonia se separa de los haplotipos de *L. a. amethystinus* quedando en posición basal, dos

de los individuos se encuentran dentro del haplotipo FD 120 en donde se encuentran 15 individuos de *L. a. amethystinus* y siete de *L. a. brevisrostris*.

PERSPECTIVAS

Para poder comprender mejor la evolución de la especie sería necesario secuenciar otros genes que nos proporcionen más información, éstos podrían ser el Citocromo *b* y la segunda mitad del ND2.

También es necesario incluir un mayor número de poblaciones de las subespecies ya secuenciadas (específicamente de *L. a. margaritae*), así como también el de obtener muestras de tejido para las subespecies restantes (*L. a. henricus* y *L. a. circumventus*).

Con base en los datos publicados por Bleiweiss (1998c) y los obtenido en el presente trabajo, tratar de establecer el tiempo de divergencia aproximado para el género, así como para la especie y dentro de la especie el tiempo de divergencia de las dos unidades de históricas que se reconocieron en este estudio (Centro de México y Chiapas-Centroamérica).

LITERATURA CITADA

- AOU (American Ornithologists' Union). 1998. Check-list of North American Birds. 7th Ed. Washington, D.C. AOU.
- Avise, J. C., 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, USA.
- Avise, J. C., 1998a. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular ecology* 7:371-379
- Avise, J. C., 1998b. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular ecology* 7:767-769.
- Avise, J. C., 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, MA, USA.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, Jr, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews Ecology and Systematics*. 18:489-522.
- Ball, R. M., Jr., F. C. James, S. Freeman, E. Bermingham, and J. C. Avise. 1998. Phylogeographic population structure of red-winged blackbirds assessed by mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85:1558-1562.
- Barrowclough, G. F., R. J. Gutiérrez, J. G. Groth, 1985. Phylogeography of spotted owl (*Strix occidentalis*) populations based on mitochondrial DNA sequences: gene flow, genetic structure and a novel biogeography pattern. *Evolution*. 53(13): 919-931.
- Berlioz, J., 1938. Notes critiques sur des Trochilidés. *L'Oiseau* No. 1.
- Bermingham, E. Y C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Evolution* 7: 367-369.
- Binford, L.C. 1989. A distributional Survey of the birds of the Mexican state of Oaxaca. *Ornithological Monographs* No. 43.
- Blake, E. R. y H. C. Hanson. 1942. Notes on a collection of birds from Michoacán, México. *Field Museum of Natural History*, XXII (9):513-535.
- Blake, E. R. 1950. Report on a collection of birds from Guerrero, Mexico. *Fieldiana Zoology*. Vol 31, No. 39.
- Bleiweiss, R. 1991. Ecological causes of clade diversity in hummingbirds: A neontological perspective on the generation of diversity. In: Ross RM, Allmon WD, eds. *Causes of Evolution: A Paleontological Perspective*. Chicago: Chicago University Press, 354-380.
- Bleiweiss, R., 1998a. Origin of hummingbird Faunas. *Biological Journal of the Linnean Society* 65:77-92
- Bleiweiss, R., 1998b. Relative-Rate tests and biological causes of molecular evolution in hummingbirds. *Molecular Biology and Evolution* 15(5): 481-491.
- Bleiweiss, R., 1998c. Tempo and Mode of hummingbird Evolution. *Biological Journal of the Linnean Society* 65:63-76

- Bleiweiss, R., J. A. W. Kirsck y J. A. Matheus. 1994. DNA-DNA Hybridization evidence for subfamily structure among Hummingbirds. *The Auk* 111(1): 8-19.
- Bleiweiss, R., J. A. W. Kirsck y J. A. Matheus. 1997. DNA Hybridization Evidence for the Principal Lineages of Hummingbirds (Aves: Trochilidae). *Molecular Biology and Evolution* 14(3):325-343.
- Cicero, C. y N. K. Johnson. 2001. Higher-Level Phylogeny of the New World Vireos (Aves: Vireonidae). Based on sequences of multiple Mitochondrial DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 20, No. 1, pp. 22-44.
- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandal. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Cracraft, J. y K. Helm-Bychowsky. 1993. Recovering Phylogenetic Signal from DNA sequences: Relationships within the Corvine Assemblage (Class Aves) as Inferred from Complete Sequences of the Mitochondrial DNA Cytochrome-b Gene. *Molecular Biology and Evolution* 10(6): 1196-1214
- del Hoyo, J., Elliot, A. & Sargatal, J. (eds.) 1999. Handbook of the birds of the world. Vol.5. Barn-owls to Hummingbirds. Lynx Editions, Barcelona.
- Desjardins, P. y R. Morains, 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. *Journal of Molecular Biology* 212:599-634.
- Dimche, D. E., S. V. Drovetski y D. P. Mindell. 2002. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 24:203-215.
- Escalante, P., A. Navarro y T. Peterson. 1998. Un análisis geográfico, ecológico e histórico de la diversidad de aves terrestres de México. en: Diversidad Biológica de México. Orígenes y distribución. T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Flores-Villela, O. y P. Gerez. 1994. Biodiversidad y conservación en México: vertebrados, vegetación y uso de suelo. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Nacional Autónoma de México*. México D. F., México.
- Friedman, H., L. Griscom y R. T. Moore. 1950. Distributional Check list of Birds of Mexico. *Pacif. Coast Avif.* No. 29.
- Garcia-Moreno, J., P. Arctander y J. Fjelsa. 1999. Strong diversification at the treeline among *Metallura* hummingbirds. *The Auk* 116 (3): 702-711.
- Garcia-Moreno, J. y J. Fjelsa. 1999. Re-evaluation of the species limits in the genus *Atlapetes* based on MIDNA sequence data. *Ibis* 141:199-207.
- García-Moreno, J., J. Ohlson y J. Fjelsa. 2001. MitDNA sequences support Monophyly of *Hemispingus* Tanager. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol 20, No. 3, pp. 424-435.
- González, D. (1997). El uso de secuencias génicas para estudios taxonómicos. *Boletín de la Sociedad Botánica*. México 60: 137-157.
- Gould, J. 1861 (reimpreso en 1947). A monograph of the Trochilidae of the family of hummingbirds. Vols. 1-5. Taylor y francis, Londres.
- Griscom, L., 1932. New Birds from Honduras and Mexico. *Proceedings of the New England Zoological Club*, 13:55-62.
- Griscom, L., 1937. A collection of birds from Omiltemi, Guerrero. *The Auk*, 54:193-195.

- Hackett, J.S. 1996. Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5: 368–382.
- Harris, D., D.S. Rogers, J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia:Muridae) based on Cytochrome *b* sequence data. *Molecular Ecology* 9:2129-2135.
- Hernández-Baños, B. E., A. T. Peterson, A. Navarro y P. Escalante-Pliego. 1995. Bird faunas of the humid montane of Mesoamerica: biogeographic patterns and priorities for conservation. *Bird Conservation International*. 5: 251-277.
- Hernández-Baños, B. E. 1998. Filogenia del género *Eupherusa* Gould (Aves: Trochilidae). Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Hoelzer, G. A. 1997. Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-Gene trees versus Nuclear-Gene trees revisited. *Evolution*. 51(2), pp. 622-626.
- Honey-Escandón, M. B. I. 2002. Filogeografía de las poblaciones del carpintero arlequín *Melanerpes formicivorus* (Aves: Picidae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Howell, S. N. G. y S. Webb. 1995. A Guide to the Birds of Mexico. Oxford University Press.
- Ibáñez-Hernández, P. G. 2000. Variación geográfica de las poblaciones del Turco Real (*Momotus momota*), Momotidae, Aves. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Kirchman, J. J., L. A. Whittingham y F. H. Sheldon. 2000. Relations among Cave Swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparison of Microsatellite and Cytochrome *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol 14, No. 1, pp. 107-121.
- Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen y M. Nei (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software 2.1, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
- James, F. C. 1970. Geographic size variation in birds and its relationships to climate. *Ecology* 51: 365-390.
- Johnsgard, P. A. 1983. The Hummingbirds of North America. Smithsonian Institute Press. Washington. D. C.
- Johnsgard, P. A. 1997. The Hummingbirds of North America. 2nd. edition. Smithsonian Institute Press. Washington. D. C.
- Johnson, K. P. y M. D. Sorenson. 1998. Comparing Molecular Evolution in Two Mitochondrial Protein Coding Genes (Cytochrome *b* and ND2) in the Dabbling Ducks (Tribe: Anatini). *Molecular Phylogenetics And Evolution* Vol. 10, No. 1, pp. 82–94.
- Johnson, K. P y C. Cicero. 2002. The role of ecologic diversification in sibling speciation of *Empidonax* flycatchers (Tyrannidae): multigene evidence from mtDNA. *Molecular Ecology* 11:2065–2081.
- Lewontin, R. C., 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia Univ. Press. New York.
- Li, W-H. y D. Graur. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates. MA. USA.

- Lovette, I. J., E. Bermingham y R. E. Rickless. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and the conservation of the Endangered Lesser Antillean *Icterus* Orioles. *Conservation Biology*. Vol 13, No. 5, pp. 1088-1096.
- Lyon, D. L. 1976. A montane hummingbird territorial system in Oaxaca, México. *Wilson Bulletin*. 88:280-299
- McCarthy, C. 1996. Chromas Versión 1.45. Computer program distributed by the Griffith University, Australia.
- McKiltrick, M. C. y R. M. Zink. 1988. Species concepts in Ornithology. *The Condor*. 90:1.
- Moore, S. M. 1995. Inferring phylogenies from $_{MT}DNA$ variation: Mitochondrial-Gene trees versus Nuclear-Gene trees. *Evolution*. 49(4), pp. 718-726.
- Moore, S. M. 1997. Mitochondrial-Gene trees versus Nuclear-Gene trees, a reply to Hoelzer. *Evolution*. 5(12), pp. 627-629.
- Navarro, A. y H. Benítez. 1995. El dominio del Aire. *La ciencia desde México (138)*. Fondo de Cultura Económica. México.
- Navarro, A. y A. T. Peterson. (en prep). An alternative Species taxonomy of the Birds of Mexico.
- Nei, M. y S. Kumar. 2001. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press. NY. USA.
- Omland, K., S. M. Lanyon y S. J. Fritz. 1999. A molecular Phylogeny of the New World Orioles (*Icterus*): The importance of dense taxon sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 12, No. 2, pp. 224-239.
- Ornelas, R. J. F. 1984. Contribución al conocimiento de la Familia Trochilidae en la República Mexicana. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Ornelas, R. J. F. 1996. Origen y Evolución de los Colibríes. *Ciencias*. 42: 38-47. México.
- Ornelas, R. J. F., C. Gonzáles y J. Uribe. 2002. Complex Vocalizations and Aerial Displays of the Amethyst-throated Hummingbird (*Lampornis amethystinus*) *The Auk* 119(4):1141-1149.
- Page, R. D. M. y E. G. Holmes. 1999. Molecular Evolution: A phylogenetic Approach. Blackwell Science. MA. USA.
- Peters, J. L. 1945. Check-list of birds of the world. Cambridge. Harvard University Press. Boston. E. U. A.
- Phillips, A. R., 1966. Further systematic notes on Mexican birds. *Bulletin B.O.C.* 86:103-104.
- Posada, D, K. A. Crandall y A. R. Templeton. 2000. GeoDis: A program for the Cladistic Nested Analysis of the Geographical Distribution of Genetic Haplotypes. *Molecular Ecology* 9(4):487-488.
- Quinn, T. W. 1997. Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome. en: *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Mindell (editor). Academic Press. San Diego. Pp. 3-23.

- Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa. (Eds). 1988. Biological Diversity of México: Origins and Distribution. Oxford University Press. New York.
- Rand, D. M., 1994 Thermal habit, metabolic rate and the evolution of mitochondrial DNA. *Trends in Ecology and Evolution*. 9:125-130.
- Ridgway, R. 1911. The birds of North and Middle America. U.S. National Museum Bulletin Part V.
- Sánchez-González, L. A. 2002. Variación geográfica y límites de especies en las poblaciones de *Chlorospingus ophthalmicus* (Aves:Thraupidae) de mesoamérica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schaal, B. A. y K. M Olsen. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 97, No. 13, pp. 7024-7029.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2002. Arlequin Ver 2.000 A software for population genetics data analysis. Geneva, Switzerland.
- Sibley, C. G. y J. E. Ahlquist. 1990. Phylogeny and Classification of birds: a study in molecular evolution. Yale University Press. E.U.A.
- Skutch, A. F. 1967. Life histories of Central American highlands birds. *Nuttall Ornithol. Soc. Publ.* 7:1-213.
- Swofford, D. L. 1999. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony, Versión 4.0 Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Templeton, A. R., E. Routman y C. A. Phillips. 1995. Separating Population Structure from population history: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplolípines in the Tiger Salamander *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140:769-782.
- Templeton, A. R. 1998. Nested Clade Analysis of Phylogeographic data: Testing Hypotheses about gene flow and populations history. *Molecular Ecology*. 7:381-397.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 24:4876-4882.
- Torres-Chávez, M. G. y A. Navarro. 2000. Los colibríes de México, brillo de la Biodiversidad. *Biodiversitas*. 5:24.
- Van Wagner, C. E. y A. J. Baker. 1990. Associations between mitochondrial DNA and morphological evolution in Canada Geese. *Journal of Molecular Evolution*. 31:373-382.
- Wagner, H. O. 1946. Food and feeding habitats of mexican hummingbirds. *Wilson Bull.* 57:69-93.
- Walsh, S. P., D. A. Metzger y R. Higuchi. 1991. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing for forensic material. *BioTechniques* 10:506-513.
- Wenink, P. W., A. J. Baker, H. Rosen y M. G. J. Tilanus. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of holarctic breeding (*Calidris alpina*). *Evolution*. 50(1): 318-330.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllensten, K. M. Helm-Bychowski, R. G. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage y M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*. 26: 375-400.

- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* 16:97-159.
- Wright, S. 1978. The Relation of Livestock Breeding to Theories of Evolution. *Journal of Animal Science* 46: 1192.
- Zink, R. M. 1994. The geography of mitochondrial DNA variation, population structure, hybridization, and species limits in the fox sparrow (*Passerella iliaca*). *Evolution* 48:96-111.
- Zink, R. M. 1996. Comparative phylogeography of North American birds. *Evolution*. 50: 308-317.
- Zink, R. M. 1997. Phylogeographic studies of North American Birds. en. *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Mindell (editor). Academic Press. San Diego. Pp. 301-324.
- Zink, R. M., S. Rootes y D. L. Dittmann. 1991. Mitochondrial DNA variation, population structure, and evolution of the Common grackle (*Quiscalus quiscula*). *Condor* 93:318-329.
- Zink, R. M. y D. L. Dittman. 1993a. Population structure and gene flow in the chipping sparrow and a hypothesis for evolution in the genus *Spizella*. *Wilson Bulletin*. 105:399-413.
- Zink, R. M. y D. L. Dittman. 1993b. Gene flow, refugia and evolution of geographic variation in the song sparrow (*Melospiza melodia*). *Evolution* 47:717-729.
- Zink, R. M. y Remsen, J. V., Jr. 1986. Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds, 1-69. In Johnson (ed.) *Current Ornithology*, Vol 4. Plenum Press, New York.
- Zusi, R. L. y G. D. Bentz. 1982. Variation of a muscle in hummingbirds and swifts and its systematic implications. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 95:412-420.

ANEXO 1. Números de catálogo y localidades para cada uno de los 65 individuos pertenecientes al complejo *Lampornis amethystinus* utilizados, así como de los colibríes y el vencejo utilizados como grupo externo en este proyecto.

No.	Taxón	Subespecie	Catálogo	Localidad	Estado
1	<i>L. amethystinus</i>	<i>margaritae</i>	BMM 003	El Iris	Guerrero
2	<i>L. amethystinus</i>	<i>margaritae</i>	BMM 018	El Iris	Guerrero
3	<i>L. amethystinus</i>	<i>margaritae</i>	BMM 017	El Iris	Guerrero
4	<i>L. amethystinus</i>	<i>margaritae</i>	BMM 032	El Iris	Guerrero
5	<i>L. amethystinus</i>	<i>margaritae</i>	BMM 024	El Iris	Guerrero
6	<i>L. amethystinus</i>	<i>margaritae</i>	BMM 044	El Iris	Guerrero
7	<i>L. amethystinus</i>	<i>brevirostris</i>	BMM 193	Zirimondio	Michoacán
8	<i>L. amethystinus</i>	<i>brevirostris</i>	BMM 178	Zirimondio	Michoacán
9	<i>L. amethystinus</i>	<i>brevirostris</i>	D_6169	Zirimondio	Michoacán
10	<i>L. amethystinus</i>	<i>brevirostris</i>	D_9708	Coalcomán	Michoacán
11	<i>L. amethystinus</i>	<i>brevirostris</i>	D_9407	Coalcomán	Michoacán
12	<i>L. amethystinus</i>	<i>brevirostris</i>	D_8792	Coalcomán	Michoacán
13	<i>L. amethystinus</i>	<i>brevirostris</i>	D_8769	Coalcomán	Michoacán
14	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	BMM 357	Ocuilan-Cuerna	Edo. Mex.
15	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	FD 120	Ocuilan-Cuerna	Edo. Mex.
16	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	FD 184	Ocuilan-Cuerna	Edo. Mex.
17	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	FD 129	Ocuilan-Cuerna	Edo. Mex.
18	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	BEHB 120	Tlanchinol	Hidalgo
19	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	BMM 521	Tlanchinol	Hidalgo
20	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	BMM 856	Tehuettlan-Huatzalingo	Hidalgo
21	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	HGO-SLP 24	Cerro Jarros	Hidalgo
22	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	BMM 098	Tlanchinol	Hidalgo
23	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	BMM 091	Tlanchinol	Hidalgo
24	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	BMM 090	Tlanchinol	Hidalgo
25	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	Conacyt 1524	Tenango de Doria	Hidalgo
26	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	Conacyt 1540	Tenango de Doria	Hidalgo
27	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	Conacyt 1538	Tenango de Doria	Hidalgo
28	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 399	Cerro Piedra Larga	Oaxaca
29	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 456	Cerro Piedra Larga	Oaxaca
30	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 392	Cerro Piedra Larga	Oaxaca
31	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 954	Peña Verde	Oaxaca
32	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 975	Peña Verde	Oaxaca
33	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 776	San Juan Bautista Atlallahuaca	Oaxaca
34	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 795	San Juan Bautista Atlallahuaca	Oaxaca
35	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 1100	San Martín Caballero	Oaxaca
36	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 1092	San Martín Caballero	Oaxaca
37	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 1038	San Martín Caballero	Oaxaca
38	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 1043	San Martín Caballero	Oaxaca
39	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	OMVP 1022	San Martín Caballero	Oaxaca
40	<i>L. amethystinus</i>	<i>amethystinus</i>	Conacyt 763	Puerto Soledad	Oaxaca

ANEXO 1 Continuación. Números de catálogo y localidades para cada uno de los 65 individuos pertenecientes al complejo *Lampornis amethystinus* utilizados, así como de los colibríes y el vencejo utilizado como grupo externo en este proyecto.

41	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Conacyt 769	Puerto Soledad	Oaxaca
42	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Conacyt 774	Puerto Soledad	Oaxaca
43	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Conacyt 779	Puerto Soledad	Oaxaca
44	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	OMVP 056	Puerto Soledad	Oaxaca
45	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	BMM630	Puerto Soledad	Oaxaca
46	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	MT 357	Viñahermosa	Oaxaca
47	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	PUE 74	Cuetzalán	Puebla
48	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	PUE 152	Jonatla	Puebla
49	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	QRO 497	El Chuveje	Querétaro
50	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	QRO 119	Santa Inés	Querétaro
51	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	QRO 0292	El Pemoche	Querétaro
52	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	QRO 277	El Pemoche	Querétaro
53	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Zac 03	Zacualpan	Veracruz
54	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Zac 16	Zacualpan	Veracruz
55	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Zac 23	Zacualpan	Veracruz
56	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Zac 28	Zacualpan	Veracruz
57	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	Zac 31	Zacualpan	Veracruz
58	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	PEP 2279	Sierra de Santa Martha	Veracruz
59	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	PEP 2290	Sierra de Santa Martha	Veracruz
60	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	PEP 2292	Sierra de Santa Martha	Veracruz
61	<i>L. amethystinus</i>	amethystinus	PEP 2278	Sierra de Santa Martha	Veracruz
62	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 571	6 Km NE de Pueblo Nuevo	Chiapas
63	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 594	6 Km NE de Pueblo Nuevo	Chiapas
64	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 595	6 Km NE de Pueblo Nuevo	Chiapas
65	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 844	Volcán Tacaná	Chiapas
66	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 051	Huitepec	Chiapas
67	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 057	Huitepec	Chiapas
68	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 058	Huitepec	Chiapas
69	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 072	San Cristóbal de las Casas	Chiapas
70	<i>L. amethystinus</i>	salvini	BMM 075	San Cristóbal de las Casas	Chiapas
71	<i>L. amethystinus</i>	salvini	JK-02-079	Quetzaltenango, Sta. María de Jesús	Guatemala
72	<i>L. amethystinus</i>	salvini	JK-02-076	Quetzaltenango, Sta. María de Jesús	Guatemala
73	<i>L. amethystinus</i>	nobilis	S_4889	Cerro El Pital, dpto. Chalatenango	El Salvador
74	<i>L. clomenciae</i>	clomenciae	FD 165	Km 20 de la carr. Ocuilan-Cuerna	Edo. Mex.
75	<i>L. viridipallens</i>	viridipallens	BMM 821	Volcán Tacaná	Chiapas
76	<i>Lampornis rhami</i>	rhami	Conacyt 762	Puerto Soledad	Oaxaca
77	<i>Amazilia beryllina</i>	beryllina	BMM 265	San Gabriel Mixtepec,	Oaxaca
78	<i>Campylopterus curvipennis</i>	excollens	MEX 080	Sierra de Santa Martha	Veracruz
79	<i>Euphorusa eximia</i>	eximia	BMM 013	El Iris	Guerrero
80	<i>Hylocharis leucotis</i>	leucotis	BMM 338	Ocuilan-Cuerna	Edo. Mex.
81	<i>Eugenes fulgens</i>	fulgens	MEX 407	Cerro Zempoaltepetl	Oaxaca

ANEXO 1 Continuación. Números de catálogo y localidades para cada uno de los 65 individuos pertenecientes al complejo *Lampornis amethystinus* utilizados, así como de los colibríes y el vencejo utilizado como grupo externo en este proyecto.

82	<i>Heliomaster longirostris</i>	<i>polidiceps</i>	BMM 308	Miahuatlán	
83	<i>Cynanthus latirostris</i>	<i>latirostris</i>	QRO246	La Florida	Querétaro
84	<i>Phaethornis superciliosus</i>	<i>mexicanus</i>	BMM 038	El Iris	Guerrero
85	<i>Cypseloides rutilus</i>		Conacyt 742		

ANEXO 2 Secuencias del gen mitocondrial ND2 obtenidas para los 16 haplotipos de *Lampornis amethystinus*, los 11 colibríes y el grupo externo.

C. rutilus	ATGAACCCCT	ACGCCAGACT	AATGTTGACC	ATATGCCTTA	TCCTGGGAAC	AACCTCTGA-A	ATCTCT--GA	ACCA-TGAAT	AATGACCTGA
P. superciliosusT.A.A.	...G.A.A.C.T.	...T.A.A.T.C.A.....	...C.T.C.CAAGC.T.....	G..AG.....	
FD120T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
BMM024T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
OMVP954T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
CONA763T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
PEP2278T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
MT357T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
CONA1540T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
ZAC03T.A.A.T.	...C.A.C.CT.A.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
BMM091T.A.A.T.	...C.A.C-CT	...C.A.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
OMVP795T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
BMM571T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA...C.	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGC.	...T.C...G.	GTCAg.....	
BMM072T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA...C.	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
BMM844T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
BMM051TGA.T.	...C.A.C.CTTA...C.	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
JK076T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
S_4889T.A.A.T.	...C.A.C.CTTA.....	...G.A.....	...C.A.C.CT	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
L. clemenciaeT.A.A.T.	...C.A.C.TATA.....	CG..A.....	...C.A.C.CT	GCT..GAGC.T...G.	TTCAg.....	
L. viridipallensT.A.A.T.	...C.A.C.T.T	...GA.....	A..A.....	...C.A.C.CC	GCT..AAGT.	...T.C...G.	GTCAg.....	
A. beryllinaT.....	...A.....	...C.A.C.CTTA...C.	...G.A.....	...G.C.A.C.CCAGC.	...T.C...G.	TCAG.....
C. curvipennisG.....	...T.A.A.....	...C.A.C.T..	...C.A.....	...G.....	...C.A.C.CCAGC.	G...T.....	TCCG.....
E. eximiaT.....	...T.A.....	...C...CT..	...A...A.	A..A..G..	T..A.C.CC	...T..AAGT.	...C.....	TCCG...G
H. longirostrisT.....	...C.T.A.A.T.	...C.A.C.T..	...A...AT	...G.A..G..	...C.A.C.CC	...T..AAGT.	G...C...G.	TCAG.....
L. RhamiT.....	...A.T.....	...C.A.C.TGT	...A...A.	A..A...A.	...C.A.C.CCAAGC.	...T...G.	GTCAg.....
H. leucotisT.....	...T.A...G.	...C.A.C.T..	...A...C.	...G.A..G..	...C.A.C.CC	...T..AAGC.	G...T.....	TC-G.....
E. fulgensT.T.T.	...T.TCA.A.	...C...-G-T	...A...C.	...GT.A.....	...C.A.C.CC	...T..AAGT.	G...C..GG.	TCCG.....
C. latirostrisT.....	...T.A.A.T.	...C.A.C...T	...A...AG	...AT.A.....	...GCA.C.CCAGC.	G...C...G.	TCAG.....
C. rutilus	ACCGGTCTAG	AGATTAACAC	CCTAGC-ATC	ATCCCCCTTA	TITCAAACA	TCACCATCCA	CGAGCCATTG	AAGCTGCCAT	TAAATATTTT
P. superciliosus	..T.C.T.C.....C.....GT.	C.....C.....C.....A..A..C.....	C...C.C	
FD120	G...A.T.	A..C.....C.....	T...A.....	T..GTC	C.....C.CA..A..C.....	C.....C	
BMM024	G...A.T.	A..C.....C.....	T...A.....	T..GTC	C.....C.CA..A..C.....	C.....C	
OMVP954	G...A.T.	A..C.....C.....	T...A.....	T..GTC	C.....C.CA..A..C.....	C.....C	
CONA763	G...A.T.	A..C.....C.....	T...A.....	T..GTC	C.....C.CA..A..C.....	C.....C	
PEP2278	G...A.T.	A..C.....C.....	T...A.....	T..GTC	C.....C.CA..A..C.....	C.....C	
MT357	G...A.T.	A..C.....C.....	T...A.....	T..GTC	C.....C.CA..A..C.....	C.....C	

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

A. beryllina ..C.TC....CG.T.CT.C TA.C..G... T..T..G... ..T...C.AAC A.....T.. C.....
 C. curvipennis ..TG....TG.T.C.C TA.TT.A.T ..T.....T.....CAC A.....G....C.....T
 E. eximia ..T.TC....TG.T.CT.C CA.C..G... ..T.....T..C. C.....CAT A.....C.....C..
 H. longirostris ..C.TC....TG.T.CT.C TA....A... ..T.....T..C. C..T..CAT A.....C.....C.....G.
 L. Rhami ..T.TC....TG.T.CT.C CA.CT.A..C ..T.....T.T..C. ..T..CAC A.....G.....C.....G.
 H. leucotis ..T.TC....TG.T.CT.C CA.C..A... T..T.....T..C.T..CAC A.....G....C.T..G...-
 E. fulgens ..TATG....TG.T.C.C CA.CT.G... ..T.....T.T..C.CAC A.....C.....G.
 C. latirostris ..T.TC..G. TG.T.CT.C CA.C..A...GT.....T..C.CAC A.....G....C.....T

C. rutilus CACCCTATC- CATGGCTCT ACTAACAACA GCAATTGCAA TAAAATTGG ACTAGTGCCA TTCCATTCT GATTCCAGA AGTG
 P. superciliosusA.CAT ..C.CCTTA.. CT.....C.....A..C.....A.....C.....
 FD120C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 BMM024C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 OMVP954C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 CONA763C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 PEP2278C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..A..C.....
 MT357C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..A..C.....
 CONA1540C.CAT T..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 ZAC03C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..A..C.....
 BMM091C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 OMVP795C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 BMM571C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....C.....
 BMM072C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....C.....
 BMM844C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....
 BMM051C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....C.....
 JK076C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....C.....
 S_4889C.CAT ..CCCTA.. ..C.....C.....C..C.T..C.....C.....
 L. clemeciaeC.CAT ..CCCTA.. ..C.....A.....C.....C.....
 L. viridipallensC.CAT ..CCCTA.. G....CG.....C.....C.....C.....
 A. beryllinaAT ..CCATG. T.....T.....C.....CT...A..C.....C.....
 C. curvipennisC.CAT ..CCCTC.. ..C.T.....T..C..G.....C.....C.....
 E. eximiaCGCAT ..CCTTA.. ..C.C...C.....A.....A.....C.....
 H. longirostris T.....A.CAT ..CATTA.. ..G.C.....C.....C.....A..C.....
 L. RhamiC.CAT ..CTTAT.. ..T.C.....C.....C.....A..C.....
 H. leucotis --T..C--T ---TTA.. ..C.G...G.C.....C.....CT...C.....
 E. fulgensC.CAT ..CCCTA.. T..C.G...G.C.....C.....A..-
 C. latirostrisA.CAT ..CACTG.. ..C.....C.....C.....CT.....C.....

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN