



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Filogenia y variación dentro del complejo
Hylocharis leucotis Vieillot, 1818
(Aves: Trochilidae)
utilizando secuencias de DNA

TESIS

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

P R E S E N T A

LUZ ESTELA ZAMUDIO BELTRÁN

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/586/10

ASUNTO: Oficio de Jurado

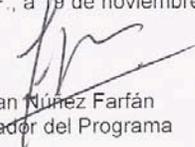
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de octubre de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA) del (la) alumno (a) ZAMUDIO BELTRÁN LUZ ESTELA con número de cuenta 509015165 con la tesis titulada "Filogenia y variación dentro del complejo *Hylocharis leucotis* Vieillot, 1818 (Aves: Trochilidae) utilizando secuencias de DNA", realizada bajo la dirección del (la) DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS:

Presidente: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Vocal: DRA. GABRIELA PARRA OLEA
Secretario: DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS
Suplente: DR. JOSÉ MARTÍN GARCÍA VARELA
Suplente: DR. ADRIÁN NIETO MONTES DE OCA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de noviembre de 2010.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa



JNF/DCRV/ASR/ipp

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo 2009-1 a 2010-2.

Al financiamiento otorgado por el PAPIIT-UNAM para el proyecto No. IN-202509 a cargo de la Dra. Blanca Estela Hernández Baños.

A la Dirección General de Asuntos al Personal Académico (DGAPA) por su autorización para el otorgamiento de la beca financiada por el proyecto PAPIIT-UNAM No. IN-202509 durante el periodo de agosto-2010 a diciembre-2010.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos económicos otorgados para la realización de una estancia en el Marjorie Barrick Museum of Natural History (University of Nevada, UNLV) y para la asistencia al 25th International Ornithological Congress (IOC) 2010.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Blanca Estela Hernández Baños, Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, Dr. Adrián Nieto Montes de Oca, por su participación, evaluaciones y comentarios a lo largo de la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dra. Gabriela Parra Olea y Dr. Martín García Varela por sus correcciones y comentarios.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Blanca E. Hernández Baños por haber confiado en mí desde el primer momento y haberme aceptado como su alumna. Por todo el apoyo académico y personal que me brindó a lo largo de este periodo, sin el cual no hubiera logrado tantas cosas... MUCHAS GRACIAS!!!

Al Dr. Luis E. Eguiarte Fruns porque siempre me dió ánimos para seguir y sus comentarios y correcciones para la realización de este trabajo fueron muy valiosos e importantes.

Al Dr. Adrián Nieto Montes de Oca porque siempre me exigió más en cada revisión, lo cual agradezco infinitamente.

A la Dra. Gabriela Parra Olea, por su confianza y porque sus correcciones fueron pieza clave en la versión final de esta tesis.

Al Dr. Martín García Varela por su paciencia, disponibilidad y comentarios al trabajo.

A John Klicka por su colaboración, préstamo de muestras y su apoyo durante mi estancia en el Marjorie Barrick Museum of Natural History (UNLV).

A Mark Robbins y A. Townsend Peterson por el préstamo de muestras de tejido de la colección ornitológica de The Natural History Museum & Biodiversity Research Center, University of Kansas.

Al Dr. Adolfo Navarro Sigüenza, jefe y curador de la colección de ornitología del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” por sus observaciones, críticas, ánimos y por compartir su conocimiento con todos quienes trabajamos dentro del museo.

A todos los colectores de los ejemplares empleados en este proyecto.

A Laura Márquez por su ayuda en el trabajo de secuenciación.

A mis profesores durante mis estudios de maestría: Dra. Dení C. Rodríguez, Dra. Blanca E. Hernández, Dra. Margarita Villegas, Dra. Martha J. Martínez, Dr. Fernando Cervantes, Dr. Fernando Chiang, Dr. Guillermo Salgado, Dr. Arturo C. Becerra, Dr. León Martínez, Dra. Katherine Renton, Dr. Jorge E. Schondube, Dr. Ian McGregor, Dr. Luis E. Eguiarte, Biól. Germán Bonilla.

A Brian Tilston Smith por toda su ayuda, paciencia y apoyo durante mi estancia en la Universidad de Nevada, Las Vegas (UNLV).

A Gaby Deras por haberme hecho buenos y valiosos comentarios sobre un primer escrito del proyecto.

A César Muñoz por haber dedicado tu tiempo en revisar, hacer correcciones y comentarios a un primer borrador de esta tesis, además de tu paciencia al haberme explicado cada observación detalladamente.

A Nandadevi Cortés por tu apoyo y ayuda al aclararme algunas dudas que tuve a lo largo de mis estudios de maestría.

A Alejandro Gordillo porque siempre me brindaste tu ayuda sin necesidad de solicitarla, por tu actitud siempre positiva, por tu amistad y confianza.

A mis amigos de “La Trinchera” (Anahí, Paty, Marisol, Alfredo, Jorge y Samuel) por todos los momentos divertidos que tuvimos desde el inicio de la maestría, por todas las escapadas cada fin de semestre para el recuento de daños y por todo su apoyo.

Gracias a mis amigos: Marisol Sánchez, por todas las pláticas académicas y no académicas, siempre escuchando y logrando que ciertos momentos fueran menos estresantes, recordándome siempre que: sí se puede!. A Enrique Arbeláez por tu ayuda, críticas, apoyo y por compartir tus conocimientos cuando lo necesité. A Mauricio Montaña por tus consejos, amistad y por las preguntas académicas que siempre me ponían en aprietos cuando las hacías, pero que siempre me ayudaron a mejorar. A Alfredo Barrera por el apoyo, críticas y comentarios durante este periodo.

A los personajes de la “pajarera” y anexos: Adolfo, Alfredo, Anahí, Anuar, Blanca, César, Cirene, Darcy, Deborah, Daniela, Enrique, Erick, Fanny, Gaby, Gala, Gordillé, Héctor, Laila, Livia, Marco, Marisol, Mauricio, Máximo, Melisa, Nanda, Roxana, Sussette. Porque al verlos trabajar tanto me motivan y por los momentos divertidos, pasteles, reuniones y pláticas que siempre sirven para tomar pequeños respiros y seguir echándole ganas.

A todas las personas que no menciono pero que directa o indirectamente fueron las piezas para que este rompecabezas llamado: “Posgrado-Proyecto-Tesis”, pudiera ser armado en su totalidad.

A Anuar! (revisor anónimo). Me faltarían hojas para agradecerte tantas cosas, pero tendré que resumirlas en un párrafo. Desde que llegué al museo siempre tuviste la disposición de ayudarme y que me sintiera cómoda. Gracias por tu confianza, tus consejos, tu tiempo, tu honestidad, tus “flyagaric trips” de la ciencia, tu apoyo incondicional, tu objetividad y madurez. Admiro tu capacidad y tu inteligencia, siempre compartiendo tu conocimiento. Definitivamente sin toda tu ayuda este camino hubiera sido muy complicado...GRACIAS POR TODO!!!!

A ti que siempre estás cuando lo necesito, siempre sonriendo y con brillo en los ojos, escuchándome y acompañándome siempre... tú sabes quién eres!

Y por último, pero no por esto menos importante, quisiera agradecer al motor de mi vida que es mi FAMILIA, son mi prioridad...LOS AMO!.

**A mi PADRE:
amigo, jefe,
maestro y héroe de mi vida.**

**A mi MADRE:
mi guía y ejemplo,
siempre presente en mi pensamiento.**

**A mis HERMANAS:
mis ídolos y confidentes.**

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I: Género <i>Hylocharis</i> (Aves: Trochilidae), reevaluación taxonómica.	3
• INTRODUCCIÓN	3
• OBJETIVOS	11
• MATERIALES Y MÉTODOS	12
• RESULTADOS	15
• DISCUSIÓN	26
• CONCLUSIONES	30
CAPÍTULO II: Variación genética dentro del complejo <i>Hylocharis leucotis</i> (Aves: Trochilidae).	31
• INTRODUCCIÓN	31
• OBJETIVOS	38
• MATERIALES Y MÉTODOS	39
• RESULTADOS	43
• DISCUSIÓN	58
• CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64
APÉNDICE I: Reconstrucciones filogenéticas, capítulo I.	70
APÉNDICE II: Muestras y localidades, capítulo II.	79
APÉNDICE III: Estrategias de partición, capítulo II.	82

FIGURAS: CAPÍTULO I

- Figura 1.** Topología obtenida a partir de un análisis de hibridización de ADN, para 26 especies de colibríes, en la cual se observan los principales grupos dentro de la familia Trochilidae (tomado de Bleiweiss *et al.* 1997). 5
- Figura 2.** Reconstrucción filogenética para la familia Trochilidae, basado en un análisis de particiones, resultado de un consenso bayesiano (tomado de McGuire *et al.* 2007). 7
- Figura 3.** Género *Hylocharis*. Ocho especies reconocidas por el AOU (1998). Se presentan los machos de cada especie. Ilustraciones tomadas de Del Hoyo *et al.* (1999). 8
- Figura 4.** Principales grupos identificados en la reconstrucción filogenética de inferencia bayesiana para el grupo de datos de genes concatenados (ND2, C-mos y AK5) de 41 especies de la familia Trochilidae. 16
- Figura 5.** Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de genes concatenados (ND2, C-mos, AK5) , resultado de un consenso bayesiano. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de probabilidad posterior mayores a 0.95. 17
- Figura 6.** Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima parsimonia con genes concatenados (ND2, C-mos, AK5) , resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50. 18
- Figura 7.** Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima verosimilitud con genes concatenados (ND2, C-mos, AK5) , resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50. 19
- Figura 8.** Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el gen C-mos, en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma). 22
- Figura 9.** Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el gen AK5, en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma). 23
- Figura 10.** Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el gen ND2, en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma). 24
- Figura 11.** Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el grupo de datos de genes concatenados (ND2, AK5, C-mos), en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma). 25

FIGURAS: CAPÍTULO II

- Figura 12.** Distribución geográfica de *Hylocharis leucotis* (colibrí de orejas blancas). Creado a partir de la base de datos de NatureServe (www.natureserve.org), distribución propuesta por Howell y Webb (1995). 35
- Figura 13.** Mapa con la distribución geográfica de la especie *H. leucotis*. Se señalan con líneas punteadas los límites geográficos que separan a las tres subespecies propuestas (Schuchmann 1999). Se muestran las imágenes de cada una de las subespecies correspondientes a cada región geográfica: I) *H. l. borealis*, II) *H. l. leucotis* y III) *H. l. pygmaea* (ilustraciones de las subespecies tomadas de Del Hoyo *et al.* 1999). 36
- Figura 14.** *Hylocharis leucotis*: dimorfismo sexual y características morfológicas de la especie (ilustraciones tomadas de Del Hoyo *et al.* 1999). 37
- Figura 15.** Distribución geográfica de la especie *Hylocharis leucotis* (línea amarilla). En color rojo se indican los puntos muestreados, nombre de identificación de cada localidad y número de muestras para cada una (n). SMOccChi: Sierra Madre Occidental, Chihuahua. SMOccDgo: Sierra Madre Occidental, Dgo. SMOccJal: Sierra Madre Occidental, Jalisco. ENTMich: Eje Neovolcánico Transversal, Michoacán. ENTMor: Eje Neovolcánico Transversal, Morelos. SMOOrNL: Sierra Madre Oriental, Nuevo León. SMSGro: Sierra Madre del Sur, Guerrero. MOax: Montañas de Oaxaca. SNChis: Sierra Norte de Chiapas. MGtm: Montañas de Guatemala. MSalv: Montañas de El Salvador. 40
- Figura 16.** Red de haplotipos de *H. leucotis*. El tamaño de los círculos es proporcional a las frecuencias. (* Haplotipos correspondientes a la localidad de las montañas de El Salvador). En círculos grises se muestran los haplotipos compartidos entre dos o más localidades. 44
- Figura 17.** Distribución de los haplotipos de la especie *H. leucotis*, a lo largo de su distribución geográfica. 46
- Figura 18.** Reconstrucción filogenética para 62 haplotipos de la especie *H. leucotis*, con base en un análisis de máxima parsimonia con genes concatenados (ND2 y ATPasa 6, 8), resultado de un consenso de mayoría. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50. En color rojo se señala el clado correspondiente al grupo hermano (*H. xantusii*) y en negro se señala al grupo externo (*H. eliciae*). 48
- Figura 19.** **Figura 19.** Topología obtenida a partir del método de inferencia bayesiana. Se presentan los valores de soporte en los nodos: probabilidades posteriores mayores a 0.90. En color rojo se señala el clado correspondiente al grupo hermano (*H. xantusii*) y en negro se señala al grupo externo (*H. eliciae*). Grupo B: haplotipos de las poblaciones de las montañas de El Salvador relacionados con haplotipos de la Sierra Norte de Chiapas y las montañas de Guatemala. Grupo A: resto de haplotipos. 51
- Figura 20.** Curvas mismatch para cada población muestreada y para la especie *Hylocharis leucotis* (En azul están representadas las curvas de diferencias observadas y en líneas negras punteadas las curvas estimadas bajo el modelo de expansión demográfica), $D=D$ de Tajima, $D<0$ indica expansión poblacional, $HRI=H$ arpending's Raggedness Index, $p<0.05$ significativo=la población no presenta expansión demográfica. 57

TABLAS: CAPÍTULO I

Tabla 1.	Lista de especies consideradas en este estudio. En el caso de las secuencias que se obtuvieron por medio de la base de datos del genbank, se indican los números de acceso. Con un símbolo (√) se indican las especies y los genes que fueron secuenciados en este estudio y con otro símbolo (×) se indican las especies y los genes para los cuales no se obtuvieron muestras.	13
Tabla 2.	Número de pares de bases (pb) para cada gen, sitios conservados (SC), sitios variables (SV), sitios informativos (SI), modelo evolutivo (ME) y frecuencias nucleotídicas estimadas (adenina=A, citocina=C, guanina=G, timina=T).	16
Tabla 3.	Valores de smoothing (valor de penalización) para cada grupo de datos en el análisis de verosimilitud penalizada (PL).	21
Tabla 4.	Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el gen nuclear C-mos. El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años.	22
Tabla 5.	Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el gen nuclear AK5. El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años.	23
Tabla 6.	Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el gen mitocondrial ND2. El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años.	24
Tabla 7.	Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el grupo de datos concatenados (ND2, C-mos, AK5), El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años	25

TABLAS: CAPÍTULO II

Tabla 8.	Haplotipos compartidos entre dos o mas poblaciones (ID: nombre asignado a cada muestra).	45
Tabla 9.	Valores de las medias armónicas, obtenidas a partir de los análisis de inferencia bayesiana, para cada estrategia de partición.	49
Tabla 10.	Estimados de las comparaciones entre las estrategias de partición (factor bayes B_{10}), con base en los estimados de las medias armónicas. Se resalta en gris las celdas correspondientes a la estrategia D, con los valores más altos entre las comparaciones.	49
Tabla 11.	Valores de diversidad haplotípica, nucleotídica y número de haplotipos de cada población muestreada (<i>H. leucotis</i>).	52
Tabla 12.	Diferencias pareadas entre las poblaciones. Sobre la diagonal se muestran las diferencias pareadas entre poblaciones ($PiXY$). Los elementos en la diagonal representan las diferencias dentro de cada población (PiX). Debajo de la diagonal están los valores corregidos de estas diferencias ($(PiXY - (PiX + PiY)/2)$).	53
Tabla 13.	Valores obtenidos a partir del análisis de varianza molecular (AMOVA).	54
Tabla 14.	Valores de F_{st} entre poblaciones. En celdas grises se resaltan los valores significativos, $P < 0.05$.	55
Tabla 15.	Pruebas de neutralidad. $**P < 0.05$, valores significativos.	56

RESUMEN

El género *Hylocharis*, el cual incluye ocho especies, ha sido estudiado recientemente y los resultados indican que es un género parafilético. Dentro de las propuestas taxonómicas, una de ellas considera ubicar al colibrí de orejas blancas (*Hylocharis leucotis*) y al colibrí de xantus (*Hylocharis xantusii*) bajo el nombre del género *Basilinna*. Se propone una hipótesis sobre las relaciones filogenéticas dentro del género *Hylocharis*, utilizando secuencias del gen mitocondrial ND2 (537 pb) y de los genes nucleares C-mos (572 pb) y AK5 (535 pb), incluyendo seis de las ocho especies del género *Hylocharis*. Se llevaron a cabo los análisis filogenéticos bajo los criterios de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI), para el grupo de secuencias concatenadas y para cada gen. Los resultados confirman la parafilia del género *Hylocharis*. Se proponen algunos cambios taxonómicos, de los cuales el más evidente fue el de considerar la propuesta del género *Basilinna*, conformado por las especies *H. leucotis* e *H. xantusii*. Así mismo se abordó la variación genética del colibrí de orejas blancas, *H. leucotis*, el cual habita bosques de pino, pino-encino y bosques siempre verdes, entre los 1200 y 3500 msnm y ha sido dividido en tres subespecies: *H. l. borealis* (N de México), *H. l. leucotis* (tierras altas C y S de México y Guatemala) e *H. l. pygmaea* (tierras altas de El Salvador, Honduras y Nicaragua). Estas tres subespecies difieren en tamaño y en patrones de coloración. Se presenta un estudio de variación genética utilizando secuencias de los genes mitocondriales ND2, ATPasa 6 y 8 (total: 1533 pb), de 108 ejemplares de la especie *H. leucotis*, obtenidos a lo largo de su distribución geográfica para inferir la historia poblacional, analizando la variación genética dentro y entre las poblaciones. Se identifican dos linajes mitocondriales, uno representado por los individuos de las tierras altas de México y Guatemala y el otro representado por los individuos de las tierras altas de El Salvador. Con la finalidad de presentar los resultados con más claridad, el presente trabajo se dividió en dos capítulos. El capítulo I, referente al estudio de las relaciones filogenéticas del género *Hylocharis*, titulado: “Género *Hylocharis* (Aves: Trochilidae), reevaluación taxonómica” y el capítulo II, referente al estudio de la variación genética de *H. leucotis*, titulado: “Variación genética dentro del complejo *Hylocharis leucotis* (Aves: Trochilidae)”.

ABSTRACT

The hummingbird genus *Hylocharis* include eight species and recent studies indicate that the genus is paraphyletic. One of the taxonomic proposals suggests that the white-eared hummingbird (*Hylocharis leucotis*) and xantus hummingbird (*Hylocharis xantusii*) must be consider under *Basilinna* genus. We propose an hypothesis about the phylogenetic relationships among the *Hylocharis* genus, using mitochondrial sequences of ND2 (537 bp) and nuclear sequences of C-mos (572 bp) and AK5 (535 bp) genes, including six of the eight species of the genus. We performed phylogenetic analysis under the maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and bayesian inference (BI) criterias, with combined sequences and separated genes. The results confirm the *Hylocharis* genus paraphyly. We proposed some taxonomic changes, the most evident was the fact of considering the *Basilinna* genus proposal that include *H. leucotis* and *H. xantusii*. Likewise we examined the genetic variation of the white-eared hummingbird, *H. leucotis*, that inhabits pine, oaks-pine and pine-evergreen forests, at 1200 to 3500 meters above sea level. Are recognized three subspecies: *H. l. l. borealis* (N Mexico), *H. l. leucotis* (highlands of C and S Mexico and Guatemala) and *H. l. pygmaea* (highlands of El Salvador, Honduras and Nicaragua). These three subspecies differ in size and color patterns. Here we present a genetic variation study using the mitochondrial genes: ND2, ATPase 6 and 8 (1533 bp), from 108 specimens obtained across its geographic range to infer population history, analyzing the genetic variation within and between populations. Two distinct mitochondrial lineages were observed, one represented by the individuals from the highlands of Mexico and Guatemala and the other one represented by the individuals from the highlands of El Salvador. To present this study with more clarity we divided it in two chapters. The chapter I, about the phylogenetic relationships among the *Hylocharis* genus, named: “*Hylocharis* genus (Aves: Trochilidae), taxonomic reevaluation” and the chapter II, about the genetic variation of *H. leucotis*, named: “Genetic variation within the complex *Hylocharis leucotis* (Aves: Trochilidae)”.

CAPÍTULO I

Género *Hylocharis* (Aves: Trochilidae), reevaluación taxonómica.

INTRODUCCIÓN

La familia de los colibríes es un grupo que ha llamado la atención debido a sus características tan particulares que lo hacen un modelo de estudio de gran interés. Éste grupo de aves característico de la avifauna nacional, constituye uno de los que cuentan con un mayor índice de especialización en todo el mundo, viven exclusivamente en América y presentan un gran polimorfismo en cuanto a su apariencia externa, pudiendo resultar su colorido, forma y tamaño sumamente variados, encontrándose en ambientes que van desde selvas húmedas a bosques templados, zonas costeras y desiertos, aunque algunas especies habitan solo áreas geográficas muy específicas y limitadas (Torres-Chávez *et al.* 2000).

Estas aves forman un grupo monofilético, dentro de la familia Trochilidae, la cual representa la segunda familia más grande de aves en América (solo después de la familia Tyrannidae) con aproximadamente 331 especies descritas en aproximadamente 104 géneros (Johnsgard 1983, Gill y Gerwin 1989, Gerwin y Zink 1989, Bleiweiss *et al.* 1997, Dickinson 2003).

Las clasificaciones actuales y originales de los colibríes se basan, sobre todo en características morfológicas externas, como el pico y el plumaje (Gould 1861, Elliot 1879, Boucard 1895, Hartert 1900, Ridgway 1911, Simon 1921, Peters 1945). En muchas de estas clasificaciones, además de los caracteres morfológicos, se han incluido caracteres conductuales, sobre todo de forrajeo (Feinsinger y Colwell 1978).

En un primer estudio empleando técnicas de hibridización de ADN (Bleiweiss *et al.* 1997) para 26 especies de colibríes, cubriendo el rango geográfico que ocupa la familia, se lograron identificar los principales linajes dentro del grupo, dividiéndolo en dos subfamilias: Hermits –ermitaños- y Nonhermits –no ermitaños-, como ya lo habían hecho

anteriormente Gould (1861) y Ridgway (1911), con base en caracteres morfológicos. Además definieron en su totalidad siete clados mayores: hermits –ermitaños-, mangoes –mangos-, coquettes –coquetas-, brilliants –brillantes-, emeralds –esmeraldas-, mountain gems –gemas de las montañas- y bees –abejas- (Figura 1). Con este estudio se logró obtener un primer marco de referencia para las relaciones filogenéticas dentro de la familia Trochilidae utilizando caracteres moleculares.

En un estudio posterior (Bleiweiss 1998) se empleó la topología reconstruida anteriormente (Bleiweiss *et al.* 1997) estableciéndose una escala de tiempo para la radiación de la familia Trochilidae, con estimaciones de distancias genéticas y datos del registro fósil. Se describieron los principales eventos y fechas aproximadas de los tiempos de divergencia para la familia, encontrando la primera radiación entre los dos grupos principales (ermitaños y no-ermitaños) durante el mioceno temprano (hace 17 Millones de años –Ma- aproximadamente). Se proponen algunas hipótesis sobre la historia evolutiva de la familia y los procesos que dieron lugar a la diversificación del grupo. Se propone que para los colibríes existentes, una de las principales causas de diversificación, durante el mioceno temprano, fue probablemente la habilidad ecológica generalista de la subfamilia de los no-ermitaños, para radiar en las áreas montanas Andinas y cadenas montañosas próximas.

Posteriormente se publicó un estudio sobre la morfología y los mecanismos de vuelo de la familia Trochilidae (Altshuler *et al.* 2004) en el que se incluyó un análisis filogenético multilocus para 43 especies de colibríes y en el que se encontraron los mismos siete clados previamente descritos, agrupados en dos subfamilias. Se realizaron varias comparaciones entre diferentes comunidades de colibríes a través de un gradiente altitudinal, sugieren que las estrategias de forrajeo y las interacciones competitivas dentro y entre especies varían a través del gradiente altitudinal, correlacionado con los costos de energía del vuelo, el tamaño corporal y la forma de las alas. Se asocia esta variación de la masa corporal y las diferentes formas y tamaños de las alas con las colonizaciones en las diferentes áreas montanas.

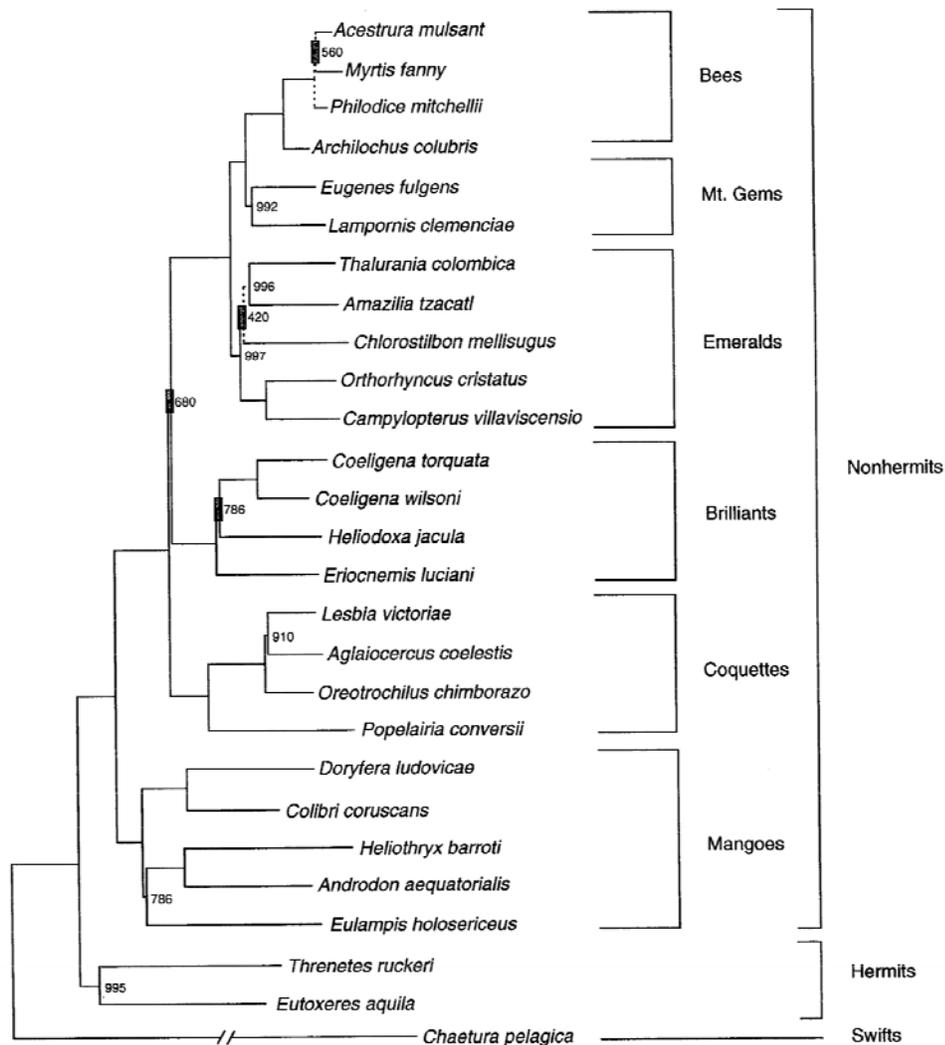


Figura 1. Topología obtenida a partir de un análisis de hibridización de ADN, para 26 especies de colibríes, en la cual se observan los principales grupos dentro de la familia Trochilidae (tomado de Bleiweiss *et al.* 1997).

En una revisión taxonómica del género *Lampornis* (García-Moreno *et al.* 2006), se llevó a cabo una reconstrucción filogenética para 100 especies de colibríes, mediante un análisis con un gen nuclear (AK5) y un gen mitocondrial (ND2). Se esclarecieron las relaciones filogenéticas para el género *Lampornis*, hasta ese momento conformado por siete especies. Se concluyó que la especie *Lampornis hemileucus* debería ser considerada dentro del género *Oreopyra* y no dentro del género *Lampornis*. Además se discute el hecho de no haber encontrado relación filogenética cercana entre el género *Lampornis* y dos especies del género *Hylocharis*: *Hylocharis leucotis* e *Hylocharis xantusii*, éstas dos últimas formando un grupo monofilético relacionado con el género *Chlorostilbon*, distantes de otra especie del género *Hylocharis*, incluida en el análisis (*Hylocharis cyanus*).

El estudio más reciente y completo sobre las relaciones filogenéticas de la familia Trochilidae es el realizado por McGuire *et al.* (2007) en el cual se presenta una filogenia más robusta, con 151 especies de colibríes y 12 taxones como grupo externo, empleando dos marcadores nucleares (AK1 –AK5-, Bfib), tRNAs y dos genes mitocondriales (ND2 y ND4). En este estudio se identifican dos clados mayores adicionales a los siete clados propuestos con anterioridad. Estos grupos son: “topazas” (topazes) y “*Patagona*”, éste último con la especie *Patagona gigas* como su único representante (Figura 2). Sugieren que el grupo de las “topazas” es el grupo hermano del resto de colibríes, sin embargo sus arreglos filogenéticos para este grupo en particular, no obtuvieron buenos valores de soporte para validar ésta hipótesis, aún así sugieren que el grupo “topazas” representa otra rama primaria dentro de la familia Trochilidae. Con respecto al grupo de las “esmeraldas”, se observó el arreglo filogenético, resultando algunos géneros parafiléticos, como por ejemplo, el caso del género *Amazilia* e *Hylocharis*.

A pesar del esclarecimiento de las relaciones filogenéticas de esta gran familia (Trochilidae), son pocas las modificaciones taxonómicas que se han hecho a nivel genérico y específico, enfocándose éstos arreglos taxonómicos a las jerarquías mayores (Bleiweiss *et al.* 1997, Altshuler *et al.* 2004, McGuire *et al.* 2007).

El género *Hylocharis* (Boie 1831), está ubicado en el grupo de las “esmeraldas”, para el cual se reconocen ocho especies de acuerdo a la American Ornithologist’ Union (AOU 1998): *H. grayi*, *H. eliciae*, *H. leucotis*, *H. xantusii*, *H. sapphirina*, *H. cyanus*, *H. chrysura* e *H. humboldtii* (Figura 3), las cuales tienen una distribución geográfica que va desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina (Schuchmann 1999). Este género es tema de discusión, ya que algunos autores no reconocen estas ocho especies (Howell y Webb 1995, Schuchmann 1999). Como especie tipo descrita para el género *Hylocharis* se designó a la especie *H. sapphirina* (Boie 1831).

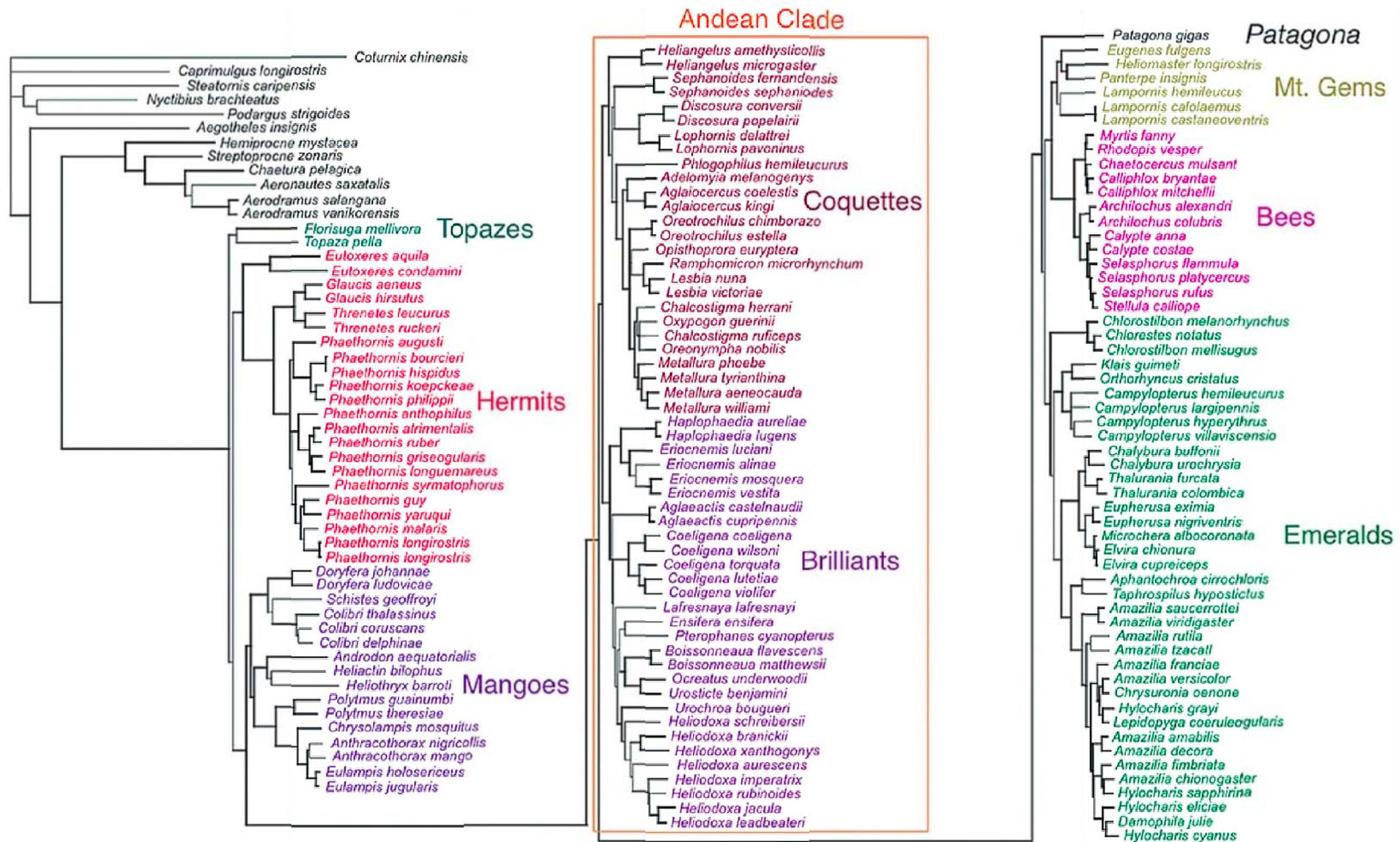
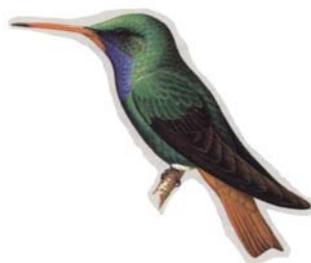


Figura 2. Reconstrucción filogenética para la familia Trochilidae, basado en un análisis de particiones, resultado de un consenso bayesiano (tomado de McGuire *et al.* 2007).



Hylocharis eliciae



Hylocharis sapphirina



Hylocharis cyanus



Hylocharis chrysura



Hylocharis grayi



Hylocharis humboldtii



Hylocharis xantusii



Hylocharis leucotis

Figura 3. Género *Hylocharis*. Ocho especies reconocidas por el AOU (1998). Se presentan los machos de cada especie. Ilustraciones tomadas de Del Hoyo *et al.* (1999).

Ridgway (1911), en el estudio de aves de Norte y Centro América, describe a la especie *H. eliciae*, como único representante del género con dicho rango de distribución, en el norte y/o centro de América. Además describe al género *Basilinna*, propuesto por Boie (1831), como género similar a *Hylocharis*, pero con las alas relativamente más largas, patrones de coloración distintos, presentando una mancha post-ocular blanca en ambos lados de la cabeza, una mancha auricular negra, en los machos y una mancha oscura, en las hembras. En el género *Basilinna*, ubica solo a dos especies: *Basilinna leucotis* y *Basilinna xantusii*, siendo *B. leucotis* el tipo para la descripción de dicho género.

Friedman *et al.* (1950), en una lista de la distribución de aves de México, ubica a tres especies, con distribución mexicana, en el género *Hylocharis*: *H. xantusii*, *H. leucotis* e *H. eliciae*. Su descripción se limita a sus rangos de distribución geográfica y al reconocimiento de subespecies.

Johnsgard (1983), en su descripción de los colibríes de Norte América, agrupa a 10 especies dentro del género *Cynanthus* (*C. sapphirina*, *C. cyanus*, *C. pyropygia*, *C. chrysura*, *C. eliciae*, *C. xantusii*, *C. leucotis*, *C. sordidus*, *C. latirostris*, *C. grayi*), para el cual señala algunas modificaciones, propuestas por autores seguidos de los estudios de Peters (1945) y Morony *et al.* (1975). La primera modificación es incluir en el género *Hylocharis* a las especies: *H. sapphirina*, *H. cyanus*, *H. pyropygia*, *H. chrysura* e *H. eliciae*. La segunda modificación establece que en el género *Basilinna* se ubiquen a las especies: *B. leucotis* y *B. xantusii*, además de ubicar en el género *Cynanthus* a las especies: *C. sordidus* y *C. latirostris* y por último, para el género *Eucephala* se incluye sólo a la especie *E. grayi*.

Howell y Webb (1995), en la guía de aves de México, Norte y Centro América, ubica en el género *Hylocharis* a la especie *H. eliciae* y en el género *Basilinna* agrupa a *B. leucotis* y *B. xantusii*. Su descripción se centra en las características morfológicas de cada especie, su hábitat y especies semejantes en sus patrones de coloración. En el caso de la especie *H. eliciae*, indica que la especie con mayor semejanza morfológica, en México y el norte y centro de América, es *Amazilia tzacatl*. Para *B. leucotis*, señala a tres especies como sus similares en morfología: *Cynanthus latirostris*, *Lampornis viridipallens* y *Lampornis sybillae*. Para la especie *B. xantusii* no se señala ninguna especie con características morfológicas similares a parte de su grupo hermano, *B. leucotis*.

Schuchmann (1999), en su revisión de la familia Trochilidae para el catálogo de las aves del mundo (Del Hoyo *et al.* 1999), agrupa a cinco especies en el género *Hylocharis* (*H. eliciae*, *H. sapphirina*, *H. cyanus*, *H. chrysura* e *H. grayi*). Reconoce al género *Basilinna*, el cual se conforma por dos especies: *B. leucotis* y *B. xantusii*. De acuerdo a las características morfológicas, se relaciona al género *Hylocharis* con mayor cercanía a los géneros: *Chrysuronia*, *Leucochloris*, *Polytmus* y *Leucippus*, todos con distribuciones en Suramérica, excepto *H. eliciae*, con distribución en el sur de México, Centroamérica y el extremo noroeste de Colombia. Por otro lado, al género *Basilinna* lo relaciona, con más cercanía, a los géneros: *Lampornis*, *Lamprolaima*, *Adelomyia*, *Phlogophilus* y *Clytolaema*, con distribuciones geográficas en las tierras altas de México, Centroamérica y Suramérica.

En el estudio sobre la diversificación del género *Lampornis* (García-Moreno *et al.* 2006), se plantea una hipótesis filogenética, en la cual se incluyen a tres representantes del género *Hylocharis* (*H. cyanus*, *H. xantusii* e *H. leucotis*). La topología obtenida no sugiere relación directa entre el género *Hylocharis* y el género *Lampornis*, propuesta anteriormente por Schuchmann (1999) con base en características morfológicas, además de que proponen que las especies *H. xantusii* e *H. leucotis* no sean consideradas en el género *Hylocharis*, sino retomar la propuesta original del género *Basilinna* (Boie 1831) para estas dos especies.

En el estudio de McGuire *et al.* (2007) se incluyeron cuatro de las ocho especies que conforman al género *Hylocharis* (*H. grayi*, *H. sapphirina*, *H. eliciae* e *H. cyanus*). Las relaciones indican que el género *Hylocharis* es un grupo parafilético, relacionándose con los géneros: *Amazilia*, *Chrysuronia*, *Damophila* y *Lepidopyga*. En un trabajo posterior McGuire *et al.* (2008) se propone, en cuanto al arreglo taxonómico, que el clado en el que está presente *H. sapphirina* (tipo del género *Hylocharis*) junto con algunos representantes del género *Amazilia* tendría prioridad nomenclatural, sin embargo sugiere que en un futuro se pueda sinonimizar al género *Amazilia* con algún otro. Señala como irresponsable el hecho de transferir los géneros *Amazilia*, *Damophila*, *Chrysuronia* y *Lepidopyga* al género *Hylocharis*, sin evidencia de estudios más completos en cuanto al número de especies analizadas filogenéticamente.

OBJETIVOS

Objetivo general

- ◆ Analizar las relaciones filogenéticas para el género *Hylocharis*, mediante un análisis con secuencias de ADN mitocondrial (ND2) y nuclear (AK1 y C-mos), incluyendo seis de los ocho representantes del género *Hylocharis*, con el fin de poner a prueba la monofilia de dicho género.

Objetivos particulares

- ◆ Proponer arreglos taxonómicos, en caso de rechazar la hipótesis de monofilia para el género *Hylocharis*.
- ◆ Calcular los tiempos de divergencia para los grupos encontrados en las reconstrucciones filogenéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Se obtuvieron tejidos de hígado, corazón y/o músculo, de especies representantes de algunos grupos identificados en la familia Trochilidae: “esmeraldas” (4 muestras), “gemas de las montañas” (5 muestras) y “abejas” (6 muestras). Se utilizaron 62 secuencias obtenidas de la base de datos del genbank (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). Como grupos externos se incluyeron dos representantes del grupo de las “coquetas” y dos representantes del grupo de las “brillantes” (McGuire *et al.* 2007, tabla 1).

Protocolos de laboratorio

Se extrajo el ADN de 19 tejidos, correspondientes a especies de la familia Trochilidae, siguiendo el protocolo para el kit de extracción QiagenDNeasy (www.qiagen.com). Se amplificó y secuenció un fragmento de la subunidad 2 del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa (ND2: 537 pares de bases, pb). Para la amplificación del gen ND2 se emplearon los primers L5219: CCCATACCCCGAAAATGATG y H6313: CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC (Sorenson *et al.* 1999). Se amplificó y secuenció el fragmento completo del intrón 5 del gen Adenilato Kinasa (AK5: 535 pb), los primers empleados para su amplificación fueron AK5b+:ATTGACGGCTACCCTCGCGAGGTG AK6c-: CACCCGCCCGCTGGTCTCTCC, AK5bext: ATTGACGGCTACCCTCGCGAGGTGAAACAG y AK6cext: CACCCGCCCGCTGGTCTCTCTCG (Shapiro y Dumbacher 2001, McGuire *et al.* 2007). El tercer gen que se amplificó y secuenció fue el fragmento del gen nuclear codificante para proteína C-mos (572 pb), los primers empleados en la amplificación de éste gen fueron F944: GCCTGGTGCTCCATCGACTGG, F1192: CCTCGGCACTATCATCATGGA, R1341: GCCCTGTGAGTGAAGAAAGGC y R1550: GCAAATGAGTAGATGTCTGCT (Cooper y Penny 1997). Los productos amplificados fueron purificados con placas del kit de purificación Millipore, adicionando agua y filtrando al vacío.

La reacción de secuenciación fue realizada con el reactivo BigDye Terminator (Applied Biosystems) y sus productos fueron purificados a través de la filtración en columnas con el reactivo Sephadex G50. Los productos fueron leídos en un secuenciador automático ABI prism 377. Todos los genes fueron secuenciados en las direcciones 5'-3' y viceversa.

Tabla 1. Lista de especies consideradas en este estudio. En el caso de las secuencias que se obtuvieron por medio de la base de datos del genbank, se indican los números de acceso. Con un símbolo (√) se indican las especies y los genes que fueron secuenciados en este estudio y con otro símbolo (×) se indican las especies y los genes para los cuales no se obtuvieron muestras.

Clados principales	Especies	ND2 (537 pb)	C-mos (572 pb)	AK5 (535 pb)
Grupo Externo (Brillantes)	<i>Aglaeactis cupripennis</i>	AY830459	√	AY830535
	<i>Urosticte benjamini</i>	AY830529	√	AY830604
Coquetas	<i>Adelomyia melanogenys</i>	AY830457	√	AY830533
	<i>Metallura tyrianthina</i>	AY830502	√	AY830577
Patagona	<i>Patagona gigas</i>	AY830510	×	AY830585
Gemas de las Montañas	<i>Eugenes fulgens</i>	AY830481	DQ223957	AY830556
	<i>Heliomaster constantii</i>	√	√	√
	<i>Lampornis amethystinus</i>	√	DQ223947	√
	<i>Lampornis cinereicauda</i>	√	DQ223951	√
	<i>Lampornis hemileucus</i>	√	DQ223952	√
	<i>Lamprolaima rhami</i>	√	DQ223955	√
Abejas	<i>Archilochus colubris</i>	AY830465	×	AY830541
	<i>Atthis heloisa</i>	√	√	√
	<i>Calypte anna</i>	EU042532	√	EU042450
	<i>Calypte costae</i>	EU042533	√	EU042451
	<i>Doricha eliza</i>	√	√	√
	<i>Selasphorus platycercus</i>	AY830522	×	AY830597
	<i>Selasphorus rufus</i>	EU042590	√	EU042505
Esmeraldas	<i>Selasphorus sasin</i>	√	√	√
	<i>Amazilia amabilis</i>	EU042518	×	EU042436
	<i>Amazilia beryllina</i>	√	√	√
	<i>Amazilia candida</i>	√	√	√
	<i>Amazilia chionogaster</i>	AY830462	×	AY830538
	<i>Amazilia decora</i>	EU042519	×	EU042437
	<i>Amazilia fimbriata</i>	EU042520	×	EU042438
	<i>Amazilia franciae</i>	EU042521	×	EU042439
	<i>Amazilia rutila</i>	EU042522	×	EU042440
	<i>Amazilia saucerrottei</i>	EU042523	×	EU042441
	<i>Amazilia tzacatl</i>	EU042524	×	EU042442
	<i>Amazilia versicolor</i>	EU042525	×	EU042443
	<i>Amazilia viridigaster</i>	EU042526	×	EU042444
	<i>Campylopterus largipennis</i>	AY830467	×	AY830543
	<i>Campylopterus villaviscensio</i>	AY830468	×	AY830544
	<i>Elvira cupreiceps</i>	AY830481	×	AY830553
	<i>Hylocharis cyanus</i>	EU042561	√	EU042477
	<i>Hylocharis eliciae</i>	EU042562	×	EU042478
	<i>Hylocharis grayi</i>	EU042563	×	×
	<i>Hylocharis leucotis</i>	√	DQ223956	√
<i>Hylocharis sapphirina</i>	EU042564	×	EU042479	
<i>Hylocharis xantusii</i>	√	√	√	
<i>Klais guimeti</i>	AY830495	×	AY830570	
TOTAL	41 especies	41	21	40

Análisis de los datos

Las secuencias fueron editadas con ayuda del programa Sequencer 4.8 (Gene codes corporation 2007) y fueron alineadas con el programa computacional Clustal X (Thompson *et al.* 1997). Los alineamientos múltiples para cada gen fueron analizados independientemente y en conjunto (genes concatenados). Se llevaron a cabo los análisis filogenéticos, a partir de los cuatro grupos de datos conformados (ND2, C-mos, AK5 y genes concatenados).

Las reconstrucciones filogenéticas se obtuvieron mediante los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) e inferencia bayesiana (BI). Para los análisis de MP y ML se empleó el programa PAUP*4 (Swofford 2002). Para la reconstrucción mediante el método de MP, se realizó una búsqueda heurística, eligiendo un árbol de inicio vía “stepwise addition” en el cual la adición de secuencias fue al azar por medio del método: tree-bisection-reconnection (TBR). El apoyo de clados se obtuvo con 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein 1985), en el caso de los análisis de MP y ML. Por medio del criterio de información de Akaike (AIC: Akaike 1973) implementado en el programa ModelTest3.8 (Posada y Crandall 1998) se evaluaron los parámetros del modelo evolutivo que explicara mejor cada grupo de datos.

Las aproximaciones de BI se llevaron a cabo implementando el programa Mr.Bayesv3.0 (Huelsenbeck y Ronquist 2002). Para cada reconstrucción, en el análisis de Cadenas de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC), se emplearon cuatro cadenas, una fría y dos calientes, durante diez millones de generaciones, muestreando cada 250 generaciones. El número de árboles a descartar (burnin) fue del 25% en todos los casos.

En la estimación de tiempos de divergencia, se empleó la prueba de Likelihood Ratio Test (LRT), para identificar si las reconstrucciones obtenidas a partir de los análisis de BI, se ajustaban a un modelo de reloj molecular. Posteriormente se corrigieron las tasas de heterogeneidad entre linajes a través de un análisis de verosimilitud penalizada (penalized likelihood, PL) estimando el valor de “smoothing” o valor de penalización (valor para suavizar dicha tasa de heterogeneidad) implementando el programa r8s1.71

(Sanderson 2002, 2003). La técnica de PL ajusta los datos a partir del valor de penalización, además de poder fijar un punto de calibración, para lo cual se consideró el dato de 12 millones de años (Ma) de edad aproximada (11.67-12.27 Ma) para la representación de la divergencia entre el clado de las “brillantes” y las “coquetas” (grupos andinos) basados en el estudio de Bleiweiss (1998), en el cual se establece una escala temporal para la radiación de la familia Trochilidae, mediante un análisis de distancias genéticas y calibraciones hechas a partir del registro fósil. Se estimaron los tiempos del ancestro común más reciente (MRCA) para los nodos elegidos, en cada reconstrucción filogenética mediante los análisis de inferencia bayesiana (genes por separado: ND2, C-mos, AK5 y genes concatenados).

RESULTADOS

Los estimados de los parámetros de frecuencias nucleotídicas, sitios conservados, sitios variables e informativos, así como el modelo evolutivo elegido para cada grupo de datos, se muestra en la tabla 2. El gen con mayor proporción de sitios variables e informativos fue ND2, mientras que el gen nuclear C-mos obtuvo la proporción de sitios informativos más baja. La frecuencia nucleotídica para los grupos de datos, de mayor proporción, fue citocina, excepto en el caso del grupo de datos para el gen C-mos, el cual presentó mayor frecuencia de guanina.

Los principales grupos que se identificaron para las 41 especies empleadas en este trabajo, de acuerdo a la reconstrucción de inferencia bayesiana para los genes concatenados fueron: “brillantes” (grupo externo), “coquetas”, “*Patagona*”, “gemas de las montañas”, “abejas” y “esmeraldas” (Figura 4).

Las topologías obtenidas a partir de los análisis de MP, ML y BI de cada gen se presentan anexos en el Apéndice I. La reconstrucción filogenética de BI para el grupo de datos de genes concatenados se muestra en la figura 5. Se observa que el género *Hylocharis* no representa un grupo monofilético, así mismo se presenta el mismo caso en las reconstrucciones filogenéticas mediante los métodos de MP y ML (Figura 6 y 7 respectivamente).

Tabla 2. Número de pares de bases (pb) para cada gen, sitios conservados (SC), sitios variables (SV), sitios informativos (SI), modelo evolutivo (ME) y frecuencias nucleotídicas estimadas (adenina=A, citocina=C, guanina=G, timina=T).

Gen	pb	SC %(pb)	SV %(pb)	SI %(pb)	ME	Frecuencias nucleotídicas			
						A	C	G	T
ND2	537	50.65 (272)	49.35 (265)	41.53 (223)	TVM+I+G	0.31	0.33	0.12	0.24
C-mos	572	88.46 (506)	11.54 (66)	5.77 (33)	TrN+I+G	0.24	0.28	0.30	0.18
AK5	535	75.70 (405)	24.30 (130)	12.71 (68)	TrN+I+G	0.20	0.32	0.28	0.20
concatenados	1650	72.06 (1189)	27.94 (461)	19.64 (324)	TVM+I+G	0.22	0.31	0.25	0.22

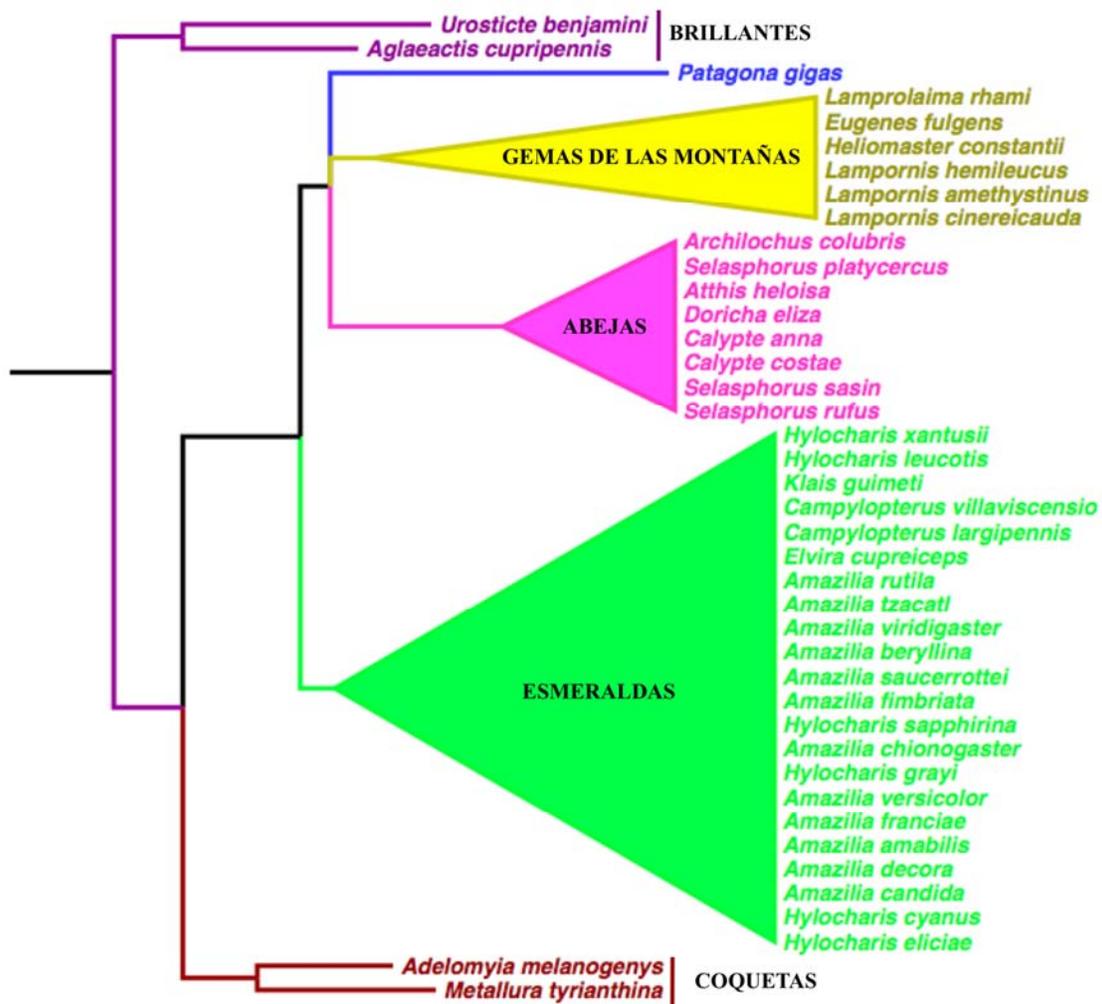


Figura 4. Principales grupos identificados en la reconstrucción filogenética de inferencia bayesiana para el grupo de datos de genes concatenados (ND2, C-mos y AK5) de 41 especies de la familia Trochilidae.

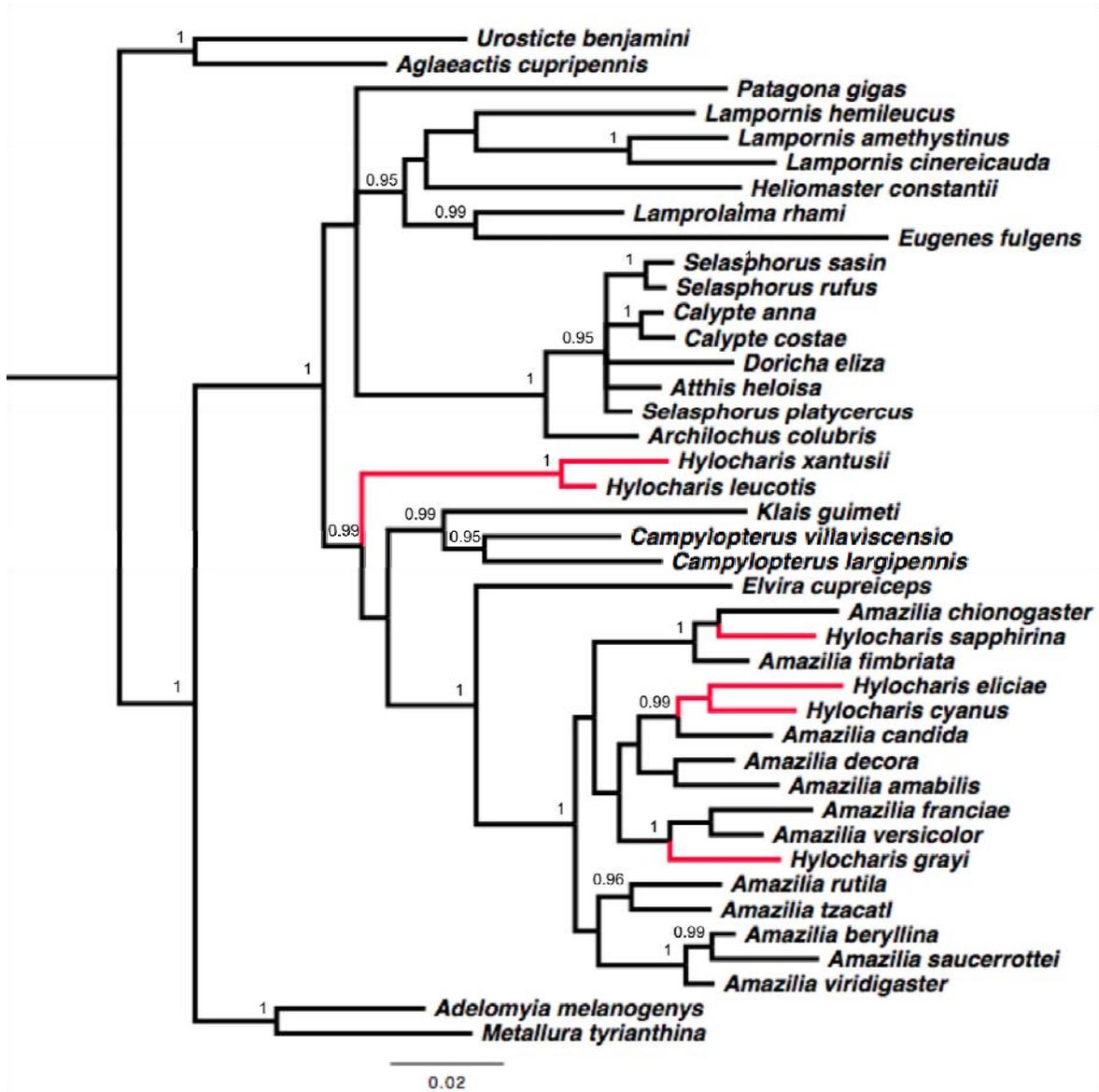


Figura 5. Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de genes concatenados (ND2, C-mos, AK5) , resultado de un consenso bayesiano. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de probabilidad posterior mayores a 0.95.

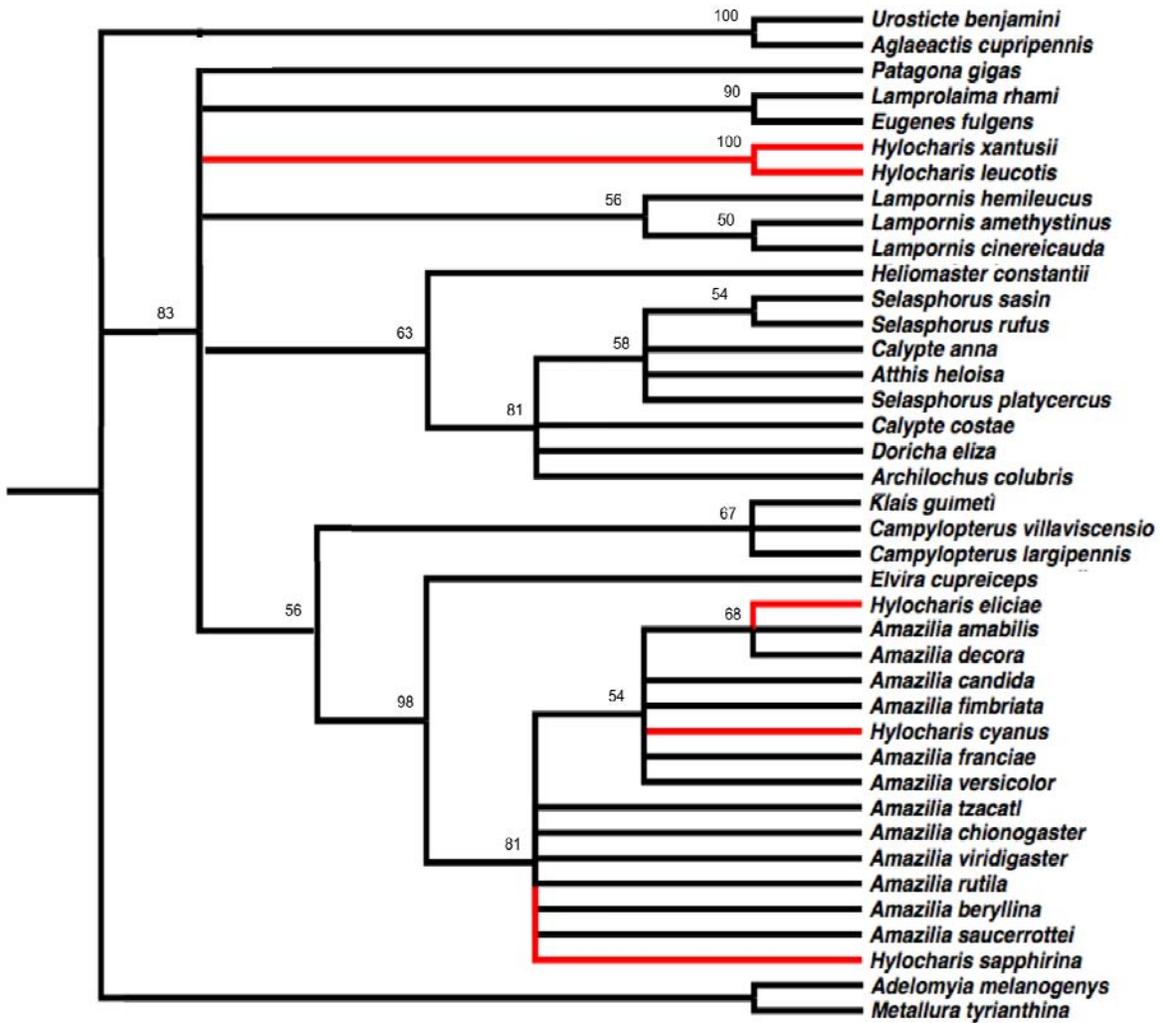


Figura 6. Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima parsimonia con genes concatenados (ND2, C-mos, AK5) , resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

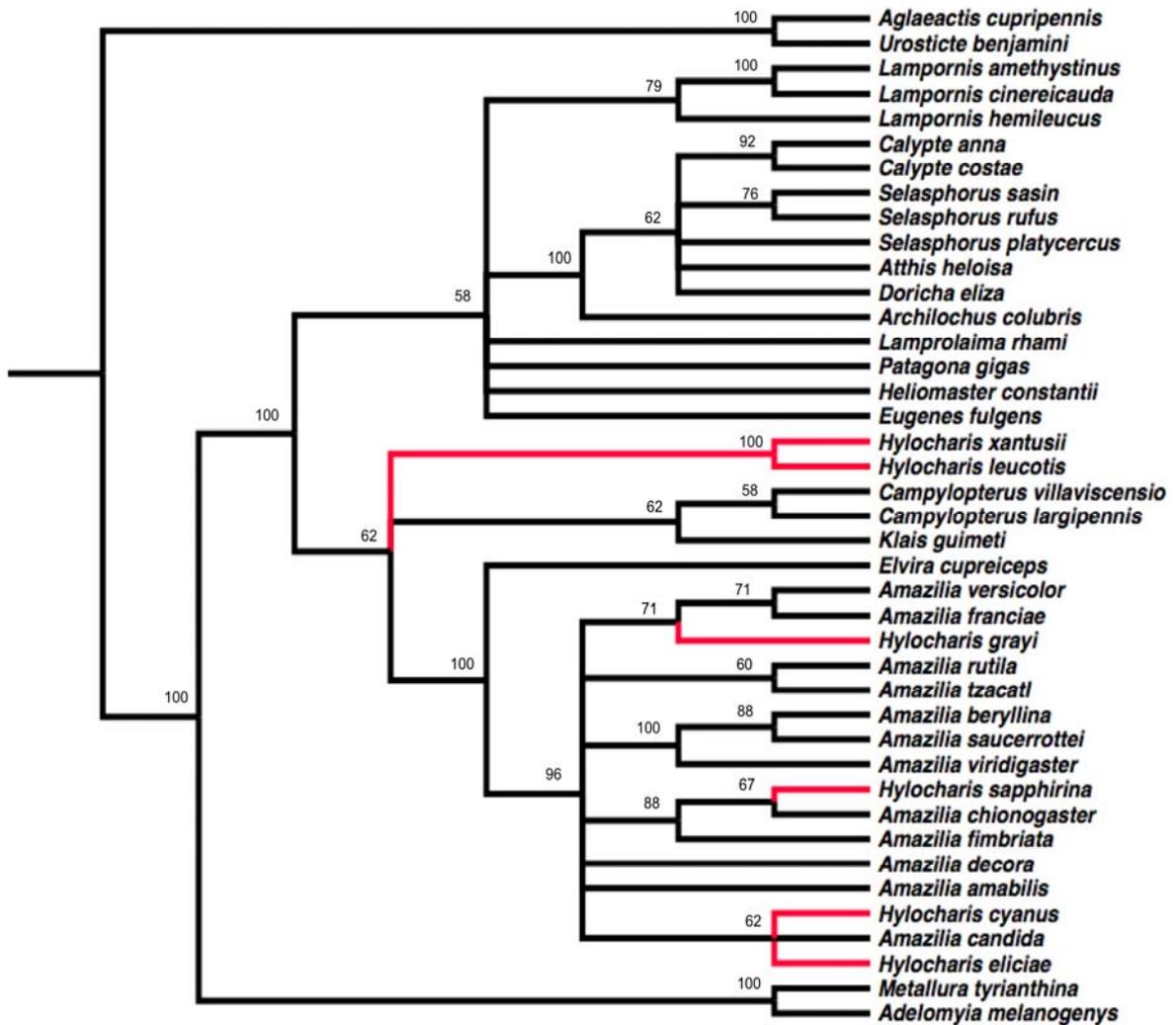


Figura 7. Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima verosimilitud con genes concatenados (ND2, C-mos, AK5) , resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

La reconstrucción filogenética con menor resolución en cuanto a grupos formados, se presentó en el resultado de máxima parsimonia. Se observan los grupos externos, conformados por las especies del grupo de las “brillantes” (*Agleactis cupripennis* y *Urostice benjamini*), además de las dos especies representantes del grupo de las “coquetas” (*Adelomyia melanogenys* y *Metallura tyrianthina*). Sin embargo, dentro del grupo interno (“gemas de las montañas”, “abejas” y “esmeraldas”) los grupos no están bien definidos. En el caso de las “gemas de las montañas”, la especie *Heliomaster constantii* se relaciona con el grupo de las “abejas” y no con el resto de especies de este grupo (género *Lampornis*, *Lamprolaima rhami* y *Eugenes fulgens*). En el grupo de las “abejas” se observa que los géneros *Selasphorus* y *Calypte* no presentan monofilia, además de encontrar el mismo caso en el grupo de las “esmeraldas” para los géneros *Amazilia* e *Hylocharis*. Referente al género *Hylocharis*, resalta el grupo formado por las especies *H. leucotis* e *H. xantusii*, presente en todas las reconstrucciones filogenéticas, sin embargo en el caso de la reconstrucción de máxima parsimonia, no se agruparon estas dos especies junto con el grupo de las esmeraldas, al cual corresponden.

Para la reconstrucción filogenética mediante máxima verosimilitud, se encontraron además del grupo externo (“brillantes”) y grupo de las “coquetas”, dos principales clados, uno de los cuales agrupó a las especies de las “abejas” y las “gemas de las montañas”. En éste último grupo no se lograron resolver con claridad sus relaciones, ya que las especies *Eugenes fulgens*, *Lamprolaima rhami* y *Heliomaster constantii* formaron una politomía junto con el grupo conformado por el género *Lampornis* y el grupo conformado por las especies representantes de las “abejas”. En el grupo de las “esmeraldas” se observó de nuevo a los géneros *Amazilia* e *Hylocharis*, como parafiléticos, siendo el clado más basal de las “esmeraldas”, el conformado por las especies *H. leucotis* e *H. xantusii*.

La reconstrucción filogenética mediante el criterio de inferencia bayesiana, mostró un resultado más claro, en cuanto a interpretación de las relaciones filogenéticas en cada grupo. Sin embargo, también se hallaron algunas incongruencias. El género *Amazilia* e *Hylocharis*, en el grupo de las “esmeraldas”, representan al igual que en las reconstrucciones anteriores, grupos parafiléticos.

Los géneros *Hylocharis* y *Amazilia*, presentan las mismas relaciones filogenéticas, tanto en el análisis de máxima verosimilitud como en el análisis de inferencia bayesiana. Se relaciona la especie *H. eliciae* e *H. cyanus* con la especie *A. candida*, así mismo, se relaciona a la especie *H. sapphirina* con las especies *A. chionogaster* y *A. fimbriata* y por último se relaciona a la especie *H. grayi* con las especies *A. versicolor* y *A. franciae*. En ambos casos, los clados obtienen altos valores de bootstrap (>50, Felsenstein 1985) y altos valores de probabilidad posterior (>0.95, Huelsenbeck y Ronquist 2002).

Con base en las reconstrucciones filogenéticas, bajo el criterio de inferencia bayesiana, para las correcciones de tasas de heterogeneidad en el análisis de verosimilitud penalizada (PL), se obtuvieron los valores de “smoothing” (valor de penalización) para cada grupo de datos (Tabla 3). La estimación de los tiempos de ancestro común más reciente (MRCA) se calcularon para ciertos grupos indicados en cada reconstrucción filogenética (Figuras 8-11, Tablas 4-7).

Tabla 3. Valores de smoothing (valor de penalización) para cada grupo de datos en el análisis de verosimilitud penalizada (PL).

Gen	Valor de smoothing (λ)
ND2	0.63
C-mos	4.0
AK5	2.5
Concatenados	1.0

Tabla 4. Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el gen nuclear C-mos. El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años.

Nodos	Ancestro común más reciente (mrca)	Ma
Punto de calibración (PC)	Brillantes	12.0
1	Coquetas vs gemas de las montañas, abejas y esmeraldas	8.77
2	Coquetas	5.84
3	Género <i>Lampornis</i> (Gemas de las Montañas)	3.21
4	<i>L. cinereicauda</i> vs <i>L. amethystinus</i>	2.17
5	Abejas	1.59
6	<i>Hylocharis</i> vs <i>H. leucotis</i> e <i>H. xantusii</i>	5.10
7	<i>H. leucotis</i> e <i>H. xantusii</i>	2.27

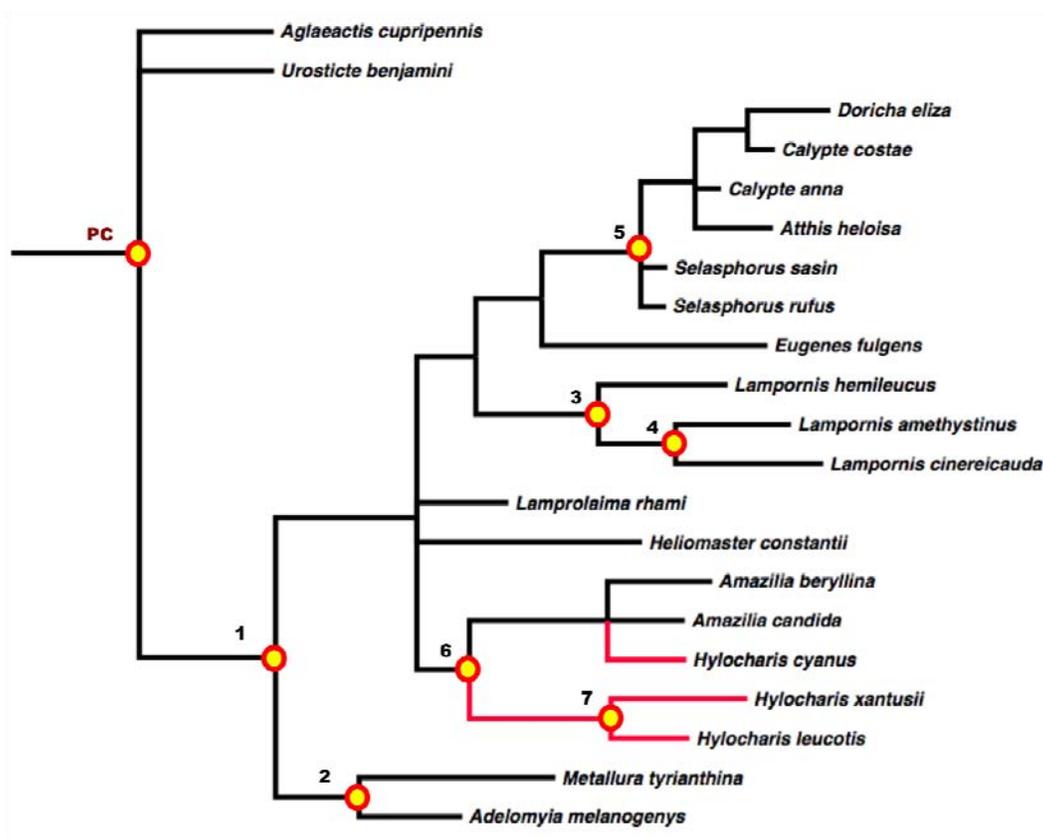


Figura 8. Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el gen C-mos, en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma).

Tabla 5. Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el gen nuclear AK5. El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años.

Nodos	Ancestro común más reciente (mrca)	Ma
Punto de calibración (PC)	Brillantes	12.0
1	<i>Patagona</i> vs abejas	5.03
2	<i>H. leucotis</i> e <i>H. xantusii</i>	2.28
3	Gemas de las montañas	4.39
4	<i>L. cinereicauda</i> vs <i>L. amethystinus</i>	1.95
5	Esmeraldas	5.51
6	<i>Hylocharis</i> vs <i>Amazilia</i>	2.09
7	Coquetas	4.57

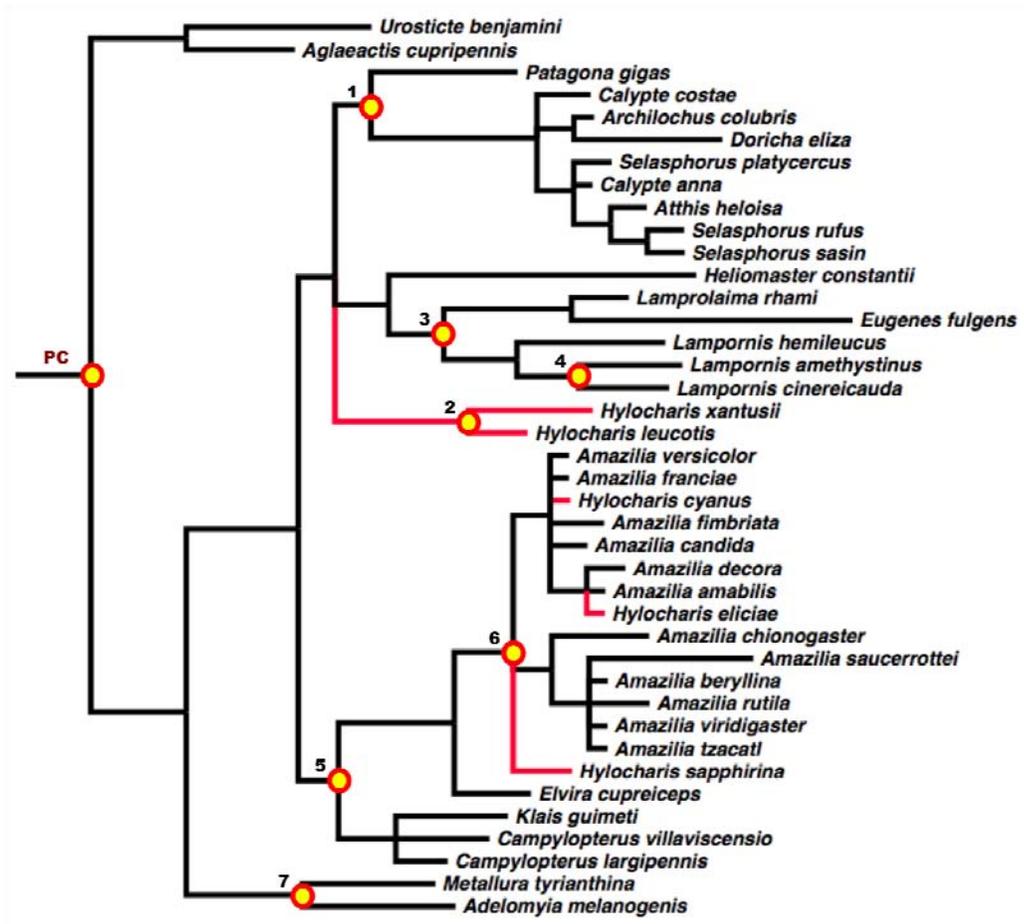


Figura 9. Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el gen AK5, en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma).

Tabla 6. Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el gen mitocondrial ND2. El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años.

Nodos	Ancestro común más reciente (mrca)	Ma
Punto de calibración (PC)	Brillantes	12.0
1	<i>Patagona</i> vs gemas de las montañas y abejas	7.60
2	Gemas de las montañas vs abejas	6.69
3	<i>L. cinereicauda</i> vs <i>L. amethystinus</i>	1.76
4	Abejas	3.22
5	<i>H. leucotis</i> e <i>H. xantusii</i>	1.23
6	Esmeraldas	7.55
7	Coquetas vs gemas de las montañas, abejas y esmeraldas	10.34
8	<i>Hylocharis</i> vs <i>Amazilia</i>	5.07
9	<i>H. grayi</i> vs <i>H. eliciae</i> , <i>H. sapphirina</i> e <i>H. cyanus</i>	4.38

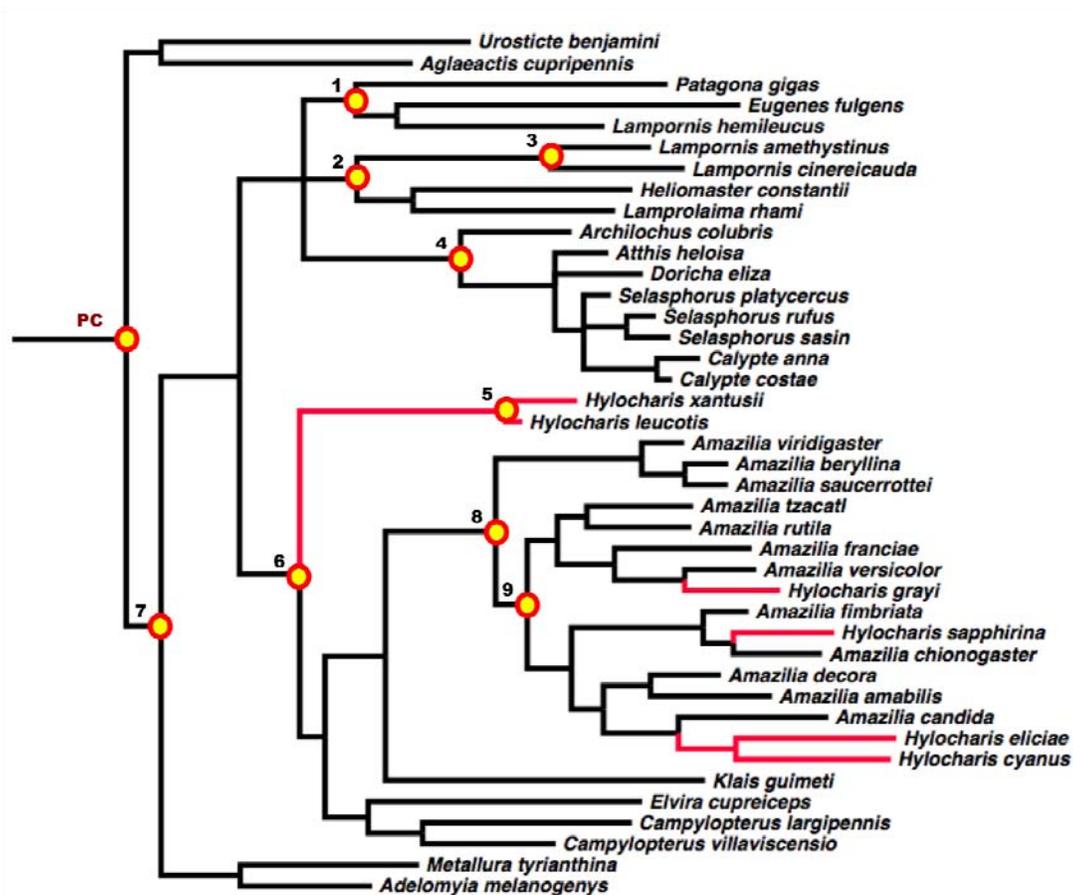


Figura 10. Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el gen ND2, en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma).

Tabla 7. Tiempos de divergencia estimados en la reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana, para el grupo de datos concatenados (ND2, C-mos, AK5). El número de nodos corresponde a aquellos especificados en la topología. Ma=millones de años.

Nodos	Ancestro común más reciente (mrca)	Ma
Punto de calibración (PC)	Brillantes	12.0
1	Coquetas vs gemas de las montañas, abejas y esmeraldas	9.33
2	<i>Patagona</i> vs gemas de las montañas y abejas	6.97
3	Gemas de las montañas	5.82
4	Gemas de las montañas vs abejas	6.48
5	<i>L. cinereicauda</i> vs <i>L. amethystinus</i>	2.13
6	Abejas	2.54
7	Esmeraldas	6.81
8	<i>H. leucotis</i> e <i>H. xantusii</i>	1.74
9	<i>Hylocharis</i> vs <i>Amazilia</i>	3.59
10	<i>H. sapphirina</i> vs <i>H. grayi</i> , <i>H. eliciae</i> e <i>H. cyanus</i>	3.34
11	<i>H. grayi</i> vs <i>H. eliciae</i> e <i>H. cyanus</i>	2.98
12	Coquetas	6.07

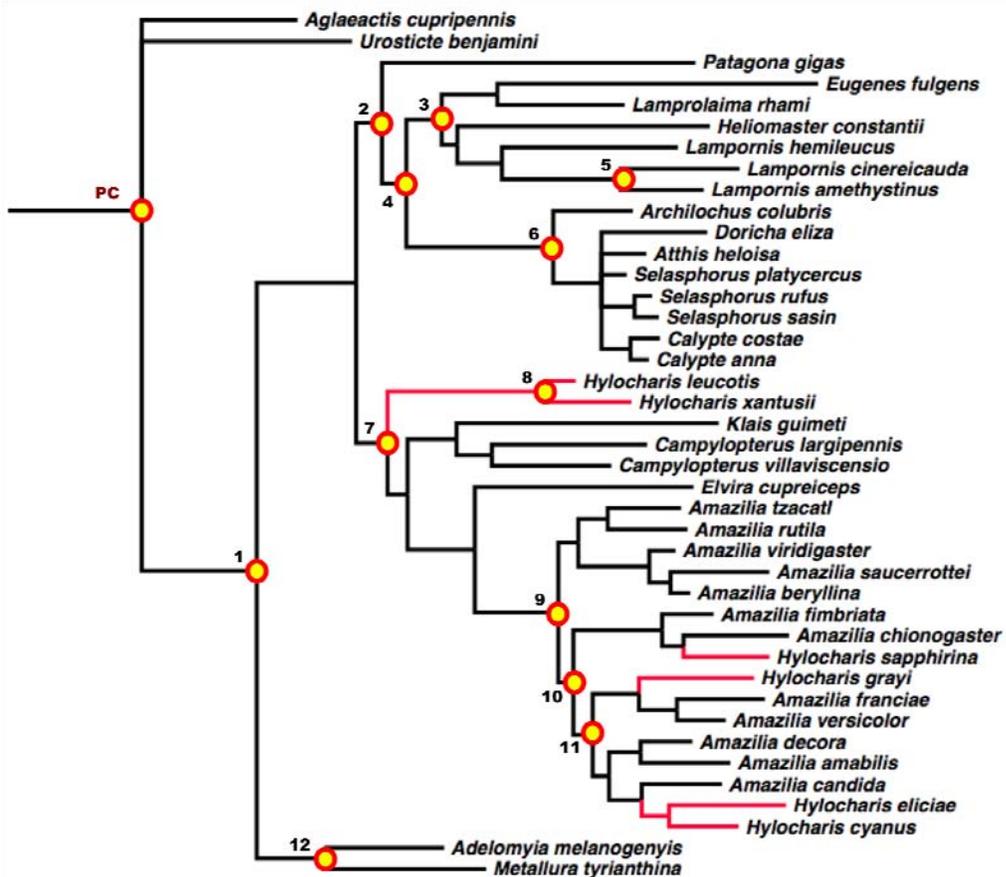


Figura 11. Reconstrucción filogenética con el método de inferencia bayesiana para el grupo de datos de genes concatenados (ND2, AK5, C-mos), en el que se resaltan los nodos numerados, para los cuales se obtuvieron los estimados de tiempos de divergencia. PC, corresponde al punto de calibración que se fijó en el análisis (12 Ma).

El tiempo de divergencia para el grupo de las “coquetas” contra el grupo de las “gemas de las montañas”, “abejas” y “esmeraldas” fue alrededor de 10.34~8.77 Ma. Para el grupo de las “abejas” la edad estimada fue alrededor de 3.22~1.59 Ma. La estimación para el clado de las “coquetas” fue alrededor de 6.07~4.57 Ma, y la edad para el clado conformado por las especies *L. cinereicauda* vs *L. amethystinus* fue calculado entre 2.17~1.76 Ma. Para la edad del grupo *H. leucotis* e *H. xantusii* el estimado fue alrededor de 2.28~1.23 Ma. El grupo de las “esmeraldas” obtuvo un estimado de ancestro común más reciente alrededor de 7.55~5.10 Ma. Se llevaron a cabo los cálculos de tiempos de divergencia para cada grupo de datos, con el fin de obtener intervalos en los estimados de los tiempos, ya que éste análisis implementado en el programa computacional r8s1.71 (Sanderson 2002, 2003) no indica intervalos de confianza, sino que muestra un solo valor para grupo señalado. El aumento en el intervalo de edades obtenidas en general, puede ser el resultado de las diferencias en el número de taxones empleados para cada reconstrucción (C-mos: 21 taxones, AK5: 40 taxones, ND2: 41 taxones y concatenados: 41 taxones), a las diferencias en las tasas de evolución para cada gen y entre los distintos grupos identificados en la familia Trochilidae, además cabe señalar que los estimados de tiempos de divergencia corresponden a intervalos de edades mínimas. Sin embargo los resultados obtenidos a partir del cálculo de ancestro común más reciente, pueden ser de utilidad para una aproximación en la descripción de posibles eventos de especiación.

DISCUSIÓN

Se presentó evidencia molecular para la reevaluación del género *Hylocharis*, mediante un análisis con tres marcadores moleculares de evolución independiente (ND2, C-mos, AK5). Se evaluaron las relaciones filogenéticas de éste género, con seis de las ocho especies reconocidas por el AOU (1998). Los resultados apoyan la propuesta de Boie (1831), quien reconoce al género *Basilinna*, hipótesis apoyada posteriormente por Ridgway (1911) y recientemente por Howell y Webb (1995), Schuchmann (1999) y García-Moreno *et al.* (2006), representado por el grupo monofilético conformado por las especies *H. leucotis* e *H. xantusii*. Los altos valores de bootstrap en el análisis de parsimonia y verosimilitud, en conjunto con las altas probabilidades posteriores de la inferencia bayesiana apoyan la

monofilia de *H. leucotis* e *H. xantusii*, para lo cual existe la alternativa de un arreglo taxonómico, referente a la propuesta del considerar a estas dos especies en el género *Basilinna*. Una de las principales características morfológicas que se consideró, para la definición de este género (Boie 1831), fue la mancha blanca que presentan estas dos especies en la parte posterior ocular, la cual no está presente en las especies restantes del género *Hylocharis*. Se describe al género *Basilinna* como similar al género *Hylocharis*, pero con diferencias en las longitudes alares y con marcadas diferencias en sus patrones de coloración (Ridgway 1911). Sin embargo, el hecho de definir a un género, como el caso de *Basilinna*, tomando sólo en cuenta caracteres morfológicos, como la mancha postocular blanca, puede resultar ambiguo, si se toma en cuenta que ciertas características morfológicas pueden estar reflejando presiones de selección o resultados de convergencias en especies alejadas filogenéticamente, es por esto que se da énfasis en los análisis con caracteres alternativos, en este caso, caracteres moleculares.

Sin embargo, se observan algunas incongruencias en relación al resto de los géneros representantes del grupo de las “esmeraldas”. Los géneros *Hylocharis* y *Amazilia* no representan grupos monofiléticos, como ya se había encontrado en estudios anteriores (Altshuler *et al.* 2004, McGuire *et al.* 2007). El género *Selasphorus* y *Calypte*, presentan en la mayoría de las reconstrucciones filogenéticas, parafilia. Se presentan nuevos problemas a resolver desde el enfoque taxonómico de este grupo, principalmente en el grupo de las “esmeraldas”.

El grupo conformado por las especies *Amazilia chionogaster*, *Amazilia fimbriata* e *Hylocharis sapphirina* tendrían prioridad nomenclatural para conservar el nombre del género *Hylocharis*, ya que la especie tipo de éste género es *H. sapphirina* (Boie 1831). En el caso de *Amazilia*, el grupo con prioridad nomenclatural sería el que incluya a la especie *Amazilia rutia*, siendo esta la especie tipo para la designación del género (Lesson, 1843).

En el caso del grupo de las “abejas”, las agrupaciones no son tan claras para los géneros *Calypte* y *Selasphorus*, ya que la topología no es congruente en la mayoría de las reconstrucciones filogenéticas, en su mayoría se presenta una politomía en las relaciones filogenéticas en éste grupo.

Dentro del grupo de las “esmeraldas”, se distingue el clado conformado por las especies: *Hylocharis cyanus*, *Hylocharis eliciae*, *Amazilia candida*, *Amazilia amabilis* y *Amazilia decora*, para el cual se podría considerar retomar la propuesta de incluir a estas especies dentro del género *Trochilus* (Linnaeus 1758), género monotípico conformado por la especie *Trochilus polytmus*.

Con respecto a la estimación de tiempos de divergencia, se pueden apoyar varias hipótesis para la familia Trochilidae. En el caso de la divergencia del grupo monofilético: *H. leucotis* e *H. xantussi* (2.28~1.23 Ma, estimado de edades mínimas), podría explicarse como el resultado de un proceso de vicarianza debido a la separación de la península de Baja California del bloque de masa continental hace unos 5.5 Ma aproximadamente, dando paso a la inserción del mar de Cortés (Riddle *et al.* 2000). Las poblaciones sufrieron una separación, las cuales lograron su aislamiento después de periodos de especiación, dando lugar a la monofilia de éste grupo.

Los géneros representantes del grupo de las “gemas de las montañas”: *Lampornis* y *Eugenes*, con un origen durante el plioceno tardío, al igual que el género *Archilochus*, representante del grupo de las “abejas” (Bleiweiss 1998), resultaron en estimados que corroboran lo anterior. En el caso del grupo de las “gemas de las montañas” el tiempo de divergencia calculado fue alrededor de 5.82 Ma y para el grupo de las “abejas” fue entre 3.22 y 1.59 Ma, por lo que se sugiere que en éste periodo diversificó el grupo de las “gemas de montañas”, sobre todo en centro y Norteamérica. La reconstrucción filogenética obtenida muestra concordancia con las áreas de distribución de los principales grupos, retomando la idea de la posible radiación de la familia en Suramérica. Las “brillantes” y “coquetas” con distribuciones principalmente en el sur del continente, el grupo de las “gemas de las montañas” con distribuciones en centro y Norteamérica, el grupo de las “abejas” en su mayoría con presencia en Norteamérica y el grupo de las “esmeraldas” en el norte, el centro y en el sur del continente. Algunas especies con distribuciones mesoamericanas (p.e., *H. leucotis*, *E. fulgens*, *A. heloisa*) lograron diversificarse después de algunos eventos de actividad volcánica, durante el periodo en el cual se formaron dos importantes arcos volcánicos: la Sierra Madre Occidental y la faja volcánica Trans-Mexicana, ésta con gran actividad durante el Mioceno tardío (11~7 Ma, Ferrari *et al.* 2000).

La gran vagilidad que presenta esta familia es una ventaja que se vió reflejada por la poca influencia que tuvo el levantamiento de Panamá en las múltiples invasiones desde el sur al centro y norte del continente, sobre todo de las especies norteamericanas con movimientos migratorios de largas distancias (p.e., *Archilochus colubris*). Los cambios climáticos, eventos oceánicos, procesos biogeográficos y ecológicos como producto de estos eventos tectónicos a gran escala (Coates y Obando, 1996) fueron factores cruciales en la diversificación de varios géneros (p.e. *Lampornis*, García-Moreno *et al.* 2008).

La especie *Adelomyia melanogenys*, representante del grupo de las “coquetas”, con distribución en Suramérica, presenta un patrón de distribución geográfica peculiar a lo largo de los Andes ecuatorianos, se propone que debido a un evento de actividad tectónica se produjo la separación de una cadena montañosa en las dos cordilleras mayores durante el Mioceno tardío (5.5 Ma, Cháves *et al.* 2007). De acuerdo a los datos obtenidos en éste estudio, la divergencia del clado de las “coquetas”, también representado por la especie *Metallura tyrianthina* (6.07~4.57 Ma), concuerda con la hipótesis descrita referente a la actividad volcánica en Suramérica.

Es importante tomar en cuenta que el presente estudio incluye solo seis de las ocho especies pertenecientes al género *Hylocharis*, por lo que las propuestas taxonómicas que se han hecho deberán considerarse posteriormente cuando se logren obtener muestras de las dos especies para las cuales no se pudieron obtener muestras (*Hylocharis chrysur* e *Hylocharis humboldii*). Sin embargo, esto no resta importancia al hecho de corroborar la parafilia del género *Hylocharis* y *Amazilia*, reconocer la monofilia del grupo conformado por *H. leucotis* e *H. xantusii* e incorporar once especies, la mayoría presentan con distribución mexicana, en el presente estudio (“gemas de las montañas”: *Heliomaster constantii*, *Lampornis amethystinus*, *Lampornis cinereicauda*, *Lamprolaima rhami*, “abejas”: *Atthis heloisa*, *Doricha eliza*, *Selasphorus sasin*, “esmeraldas”: *Amazilia beryllina*, *Amazilia candida*, *Hylocharis leucotis*, *Hylocharis xantusii*), las cuales no se habían tomado en cuenta en la reconstrucción filogenética más completa hasta el momento, de la familia Trochilidae (McGuire *et al.* 2007).

CONCLUSIONES

- El género *Hylocharis* representa un grupo parafilético, al igual que los géneros: *Amazilia*, *Selasphorus* y *Calypte*.
- Se propone retomar al género *Basilinna*, e incluir a las especies *H. leucotis* e *H. xansutii*, como aquellas que conformen a dicho género, esto apoyado por los altos valores de soporte, obtenidos en todas las reconstrucciones filogenéticas en el presente estudio.
- Los tiempos de divergencia estimados, apoyan ciertas hipótesis sobre los posibles eventos que han dado origen a la gran diversidad de especies en la familia Trochilidae.
- El clado en el que se agrupan a las especies *Hylocharis sapphirina* y *Amazilia rutila*, tendrán prioridad nomenclatural, al ser éstas las especies tipo en la definición de los géneros a los cuales pertenecen.
- Se promueve el uso de caracteres moleculares en el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas para la familia Trochilidae, ya que las clasificaciones actuales, hechas con base en características morfológicas, pudieran fallar en la representación de grupos naturales, debido a las ambigüedades que representan los caracteres morfológicos.
- Se recomienda hacer un esfuerzo en la búsqueda de las muestras faltantes en el estudio, correspondientes al género *Hylocharis* (*H. chrysurus* e *H. humboldtii*) para definir los cambios taxonómicos definitivos.

CAPÍTULO II

Variación genética dentro del complejo ***Hylocharis leucotis* (Aves: Trochilidae)**

INTRODUCCIÓN

La variación geográfica, se manifiesta con la diferenciación fenotípica y genotípica entre las poblaciones, con relación a su distribución geográfica (Hillis *et al.* 1996, Weir 1996, Futuyma 1998). La estructuración geográfica de una especie, puede llegar a ser muy simple (p.e., en el caso de contar con altos niveles de flujo genético) o puede ser muy compleja (p.e., en ambientes con fuerte actividad volcánica), logrando de ésta forma describir los eventos históricos que han dado lugar a dicha variación (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009). En ocasiones puede no existir evidencia de variación en la morfología, por lo que éste hecho enfatiza la importancia de incluir caracteres alternativos para esclarecer las relaciones filogenéticas, de los cuales una alternativa es el uso de caracteres moleculares, empleados en el presente estudio (genes mitocondriales), la cual ha ido en ascenso por ser una herramienta de gran utilidad para revelar los patrones de variación genética relacionados con la distribución geográfica, la taxonomía y la evolución de las especies (Ibañez-Hernández 2000). El uso adecuado de caracteres moleculares puede ser de gran ayuda en el análisis de los componentes históricos y la distribución espacial de linajes de genes dentro y entre especies estrechamente relacionadas (Avice 2000).

Particularmente los marcadores mitocondriales han sido empleados con mayor frecuencia para estudios de variación genética, debido a las características que los diferencian de los marcadores nucleares como: acumulación de sustituciones y mutaciones 10 veces más rápida que el ADN nuclear (Allen y Omland 2003), su genoma es haploide, se replica independientemente, son heredados por vía materna, no presentan recombinación y no son objeto de transferencia horizontal de genes (Bermingham y Moritz 1998, Avice 2000).

La riqueza de información que proporciona el ADN mitocondrial, con el objetivo de explicar los patrones de variación individual a nivel de población, es de gran utilidad al incorporar análisis de genética de poblaciones, teniendo como resultados estudios más robustos sobre los procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes, su dinámica poblacional y los eventos de especiación (Zink 1997, Avise *et al.* 1987, Avise 2000). Sin embargo se deben considerar las limitaciones que implica el uso exclusivo de ADN mitocondrial, como es el caso de la introgresión mitocondrial entre especies relacionadas o poblaciones conespecíficas, diferentes tasas de evolución en diferentes sitios del genoma, presiones de selección en genes específicos, entre otros (Ballard y Whitlock 2004).

Los estudios filogeográficos, enfocados a estudiar los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos, han sido ampliamente usados en el estudio de vertebrados en México y mesoamérica (p.e., anfibios, reptiles, mamíferos y aves), principalmente con el objetivo del reconocimiento y establecimiento de los límites entre las especies, con implicaciones taxonómicas y aplicaciones en la biología de la conservación y manejo de especies (Avise *et al.* 1987, Avise 2000, Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009).

Los patrones filogeográficos encontrados en poblaciones de aves montañas con distribución mesoamericana, presentan en su mayoría, niveles altos de estructuración genética, mostrando por ejemplo, separación de las poblaciones al este y oeste de México (Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental) y al este y oeste del Istmo de Tehuantepec (*Melanerpes formicivorus*: Benítez-Díaz 1993, *Aulacorhynchus*: Navarro *et al.* 2001, Puebla-Olivares *et al.* 2008, *Chlorospingus ophthalmicus*: García-Moreno *et al.* 2004, Bonaccorso *et al.* 2008, *Lampornis*: García-Moreno *et al.* 2006, *Buarremon*: Cadena *et al.* 2007, Milá *et al.* 2007, Navarro-Sigüenza *et al.* 2008, *Cyanolyca*: Bonaccorso 2009, *Campylorhynchus rufinucha*: Vázquez-Miranda *et al.* 2009, *Lepidocolaptes affinis*: Arbeláez-Cortés *et al.* 2010).

Patrones filogeográficos similares se han encontrado en otros grupos de vertebrados en México. El caso del género *Habromys* (Rodentia) en mamíferos, en el cual se presentan dos casos en los que se propone la separación de estas especies en dos linajes independientes para cada una, correspondientes a los grupos presentes en la Sierra Madre Oriental y la Sierra Mazateca en Oaxaca (*Habromys simulatus*), y el caso de la especie *Habromys lophurus* con linajes independientes correspondientes a las tierras altas de Chiapas y Guatemala separados de las tierras altas de El Salvador (León-Paniagua *et. al.* 2006), así como otros estudios que presentan patrones filogeográficos con altos niveles de estructuración geográfica (Rodentia: Sullivan *et al.* 2000, *Glaucomys*: Kerhoulas y Arbogast 2010). En el grupo de los reptiles y anfibios, algunos estudios revelan niveles altos de concordancia entre linajes y su distribución geográfica (*Hyla arenicolor*: Barber 1999, *Bufo*: Mulcahy *et al.* 2006, *Ctenosaura*: Zarza *et al.* 2008, *Crotalus triseriatus*: Bryson *et al.* 2010; Castoe *et al.* 2009, Daza *et al.* 2010), sugiriendo que las tierras altas de México y mesoamérica, podrían ser el hábitat de una mayor diversidad de especies hasta ahora reconocidas.

La filogeografía, como herramienta para estudios taxonómicos, puede ser empleada en la descripción y reconocimiento de entidades evolutivas, al definir los límites entre especies y/o poblaciones, por ejemplo en el caso de las especies para las cuales se han definido o propuesto varias subespecies (presente estudio: *Hylocharis leucotis*) que representen la variación geográfica de las poblaciones con base en características morfológicas, ecológicas, conductuales o aislamiento poblacional (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009).

Hylocharis leucotis

La especie *Hylocharis leucotis*, conocida como colibrí de orejas blancas, tiene una distribución geográfica que comprende el sur de Arizona, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, hacia el sur a través de las tierras altas de México, Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua (Howell y Webb 1995, AOU 1998, ver figura 12). En México ésta especie generalmente se encuentra en la zona templada entre los 1200 y 3500 msnm, en bosques de pino-encino, bosques de encino, bosques de pino siempre verdes y en zonas abiertas, se alimenta del néctar de distintas variedades de flores y extrae insectos de éstas o los captura en vuelo (Howell y Webb 1995, Schuchmman 1999). En el Valle de

México, existen variaciones en la época de reproducción, dependiendo de la temperatura y de la lluvia, sobre todo, la época de reproducción generalmente ocurre durante los meses de verano desde junio hasta septiembre, cuando las lluvias se presentan con mayor frecuencia y los insectos alcanzan su máxima reproducción, aunque en otros lugares esto ocurre en diferentes temporadas del año, por ejemplo durante la primavera en Colima y durante el invierno en las montañas altas de Guatemala (Johnsgard 1983).

La especie *H. leucotis* perteneciente a la familia Trochilidae y subfamilia Trochilinae, ha sido objeto de varias propuestas taxonómicas y del reconocimiento de algunas subespecies. A continuación se presenta un listado de algunas propuestas taxonómicas:

Ridgway (1911)

- Género *Basilinna* (*B. xantusii* y *B. leucotis*).
- *Basilinna leucotis*, subespecies: *B. l. leucotis* y *B. l. pygmaea*.

Skutch (1940)

- *Hylocharis leucotis*, razas: *H. l. pygmaea*, *H. l. leucotis* e *H. l. borealis*.

Peters (1945)

- Género *Hylocharis*, subgénero *Basilinna* (*H. leucotis* e *H. xantusii*).
- *Hylocharis leucotis*, subespecies: *H. l. borealis*, *H. l. leucotis* e *H. l. pygmaea*.

Friedman *et. al* (1950)

- Género *Hylocharis* (*H. xantusii*, *H. leucotis* e *H. eliciae*).
- *Hylocharis leucotis*, subespecies: *H. l. borealis* e *H. l. leucotis*.

Mayr and Short (1970) y Johnsgard (1983)

- Género *Cyananthus*, superespecies: *Basilinna xantusii* y *B. leucotis*. Congenéricos con *Cyananthus* e *Hylocharis*.
- *Cyananthus leucotis*, razas: *C. l. borealis*, *C. l. leucotis*, *C. l. pygmaea*.

Howell y Webb (1995)

- Género *Basilinna*: *B. xantusii* y *B. leucotis*.

AOU, American Ornithologists' Union (1998)

- Género *Hylocharis*: *H. grayi*, *H. eliciae*, *H. xantusii*, *H. leucotis*, *H. sapphirina*, *H. humboldtii*, *H. cyanus* e *H. chrysura*.
- Apoya la hipótesis de Mayr and Short (1970), consideran a *H. leucotis* e *H. xantusii* una superespecie.

Schuchmann (1999)

- Género *Basilinna*: *B. xantusii* y *B. leucotis*.
- *Basilinna leucotis*, subespecies: *B. l. borealis*, *B. l. leucotis* y *B. l. pygmaea*.

Con referencia en la propuesta de Schuchmann (1999), se reconocen tres subespecies y se describen sus rangos de distribución geográfica (Figura 12):

- *H. l. leucotis* (Vieillot 1818), con distribución geográfica en las tierras altas del centro y sur de México hasta las montañas de Guatemala.
- *H. l. borealis* (Griscom 1929), distribuida en el norte de México (Sonora, Chihuahua, Tamaulipas), rara al suroeste de los Estados Unidos (al sureste de Arizona). Con base en las características morfológicas correspondientes a *H.l.leucotis*, ésta subespecie es de mayor tamaño, presenta menor colorido verde y las partes bajas del cuerpo son más grisáceas.
- *H. l. pygmaea* (Simon y Hellmayr 1908), con distribución geográfica en las tierras altas de El Salvador, Honduras y Nicaragua. Esta subespecie es de menor tamaño, la garganta verde más pequeña, partes bajas blancas con un ligero verde moteado y cola verdosa, en relación a *H. l. leucotis*.

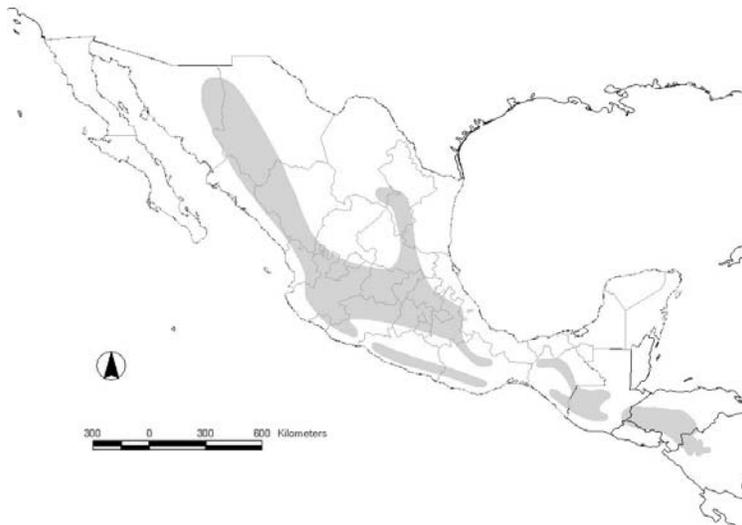


Figura 12. Distribución geográfica de *Hylocharis leucotis* (colibrí de orejas blancas). Creado a partir de la base de datos de NatureServe (www.natureserve.org), distribución propuesta por Howell y Webb (1995).

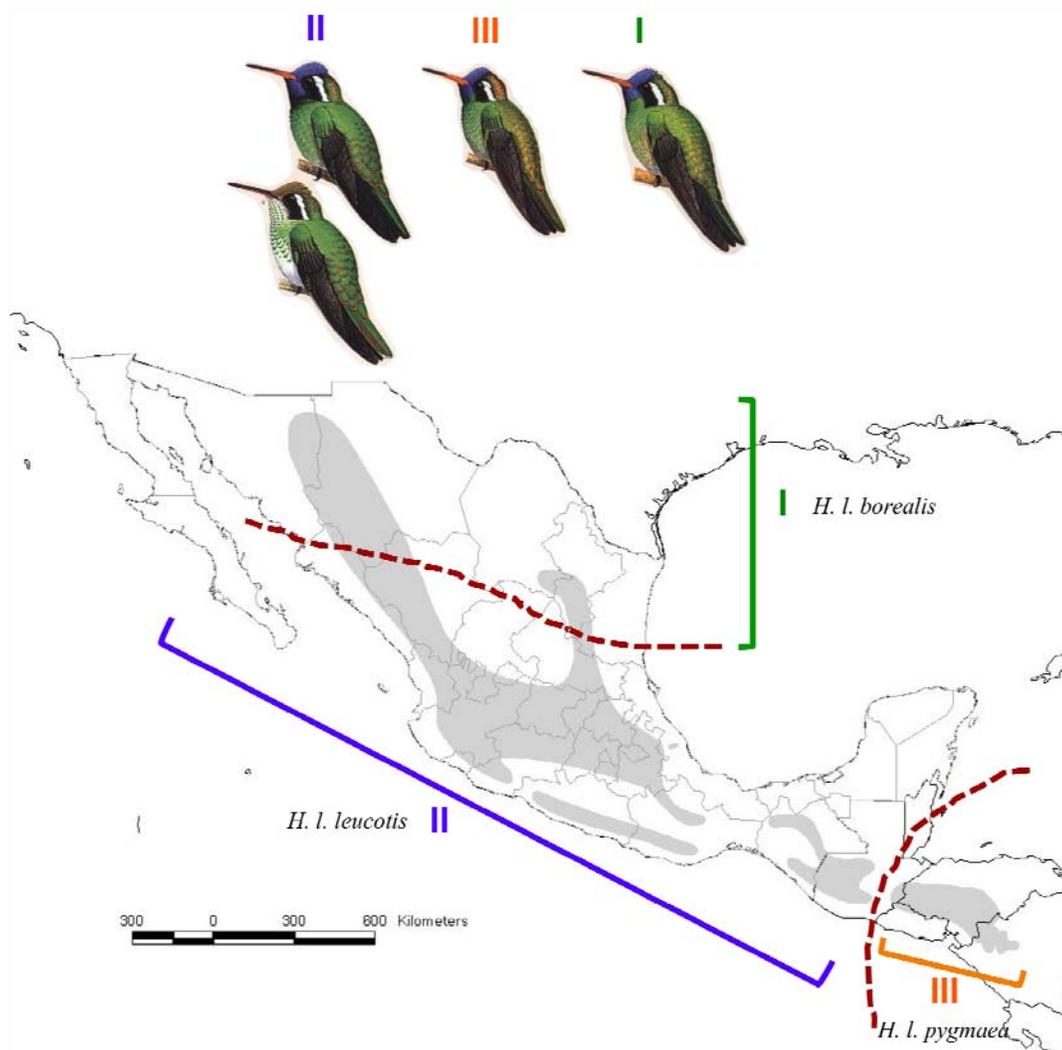


Figura 13. Mapa con la distribución geográfica de la especie *H. l. leucotis*. Se señalan con líneas punteadas los límites geográficos que separan a las tres subespecies propuestas (Schuchmann 1999). Se muestran las imágenes de cada una de las subespecies correspondientes a cada región geográfica: I) *H. l. borealis*, II) *H. l. leucotis* y III) *H. l. pygmaea* (ilustraciones de las subespecies tomadas de Del Hoyo *et al.* 1999).

Las características morfológicas (refiriéndose a *H. l. leucotis*) que presenta esta especie, muestran un claro dimorfismo sexual, los machos tienen el pico recto, rojo brillante tanto en la base de la maxila como en la base de la mandíbula, la punta del pico es negra, la corona es violeta iridiscente, presenta una franja postocular blanca, los auriculares son negruzcos, el resto de la parte dorsal verde iridiscente, la garganta es violeta brillante, el pecho y los flancos son de color verde moteado, partes bajas de color gris. En el caso de las hembras, la corona es de color grisácea a café, la garganta blanca con moteado verde, parte dorsal verde iridiscente, con la franja postocular blanca y los auriculares negros, en ambos sexos las alas son negruzcas (Johnsgard 1983, ver figura 14).

El hecho de que algunos autores reconozcan diferentes grupos para la especie *H. leucotis*, se debe en gran medida a las diferencias en sus características morfológicas antes mencionadas, (Rigway 1911, Schumann 1999) y no a su distribución geográfica. Aunque para el AOU (1998) éstas diferencias no son evidencia suficiente para considerarlas como entidades independientes, reconociendo a *H. leucotis* como una sola especie. Es por esto que en el presente trabajo se pretende analizar la variación genética de *H. leucotis*, empleando caracteres moleculares, con el fin de determinar los patrones filogeográficos de la especie y sus relaciones filogenéticas.

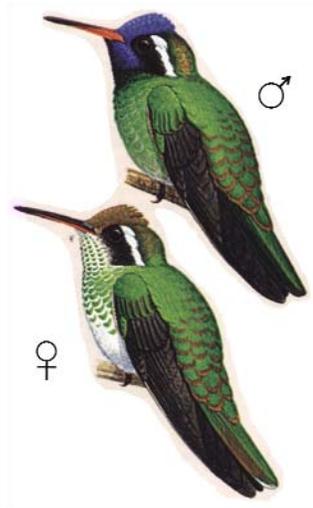


Figura 14. *Hylocharis leucotis*: dimorfismo sexual y características morfológicas de la especie (ilustraciones tomadas de Del Hoyo *et al.* 1999).

OBJETIVOS

Objetivo general

- ◆ Analizar y describir los patrones filogeográficos de la especie *Hylocharis leucotis*, a lo largo de su rango de distribución geográfica, mediante un estudio con caracteres moleculares (ADN mitocondrial: ND2, ATPasa 6 y 8).

Objetivos particulares

- ◆ Generar una hipótesis filogenética para la especie *Hylocharis leucotis*.
- ◆ Analizar la variación genética dentro y entre las poblaciones.
- ◆ Analizar la historia demográfica de sus poblaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Se obtuvieron muestras de tejido (hígado, corazón, músculo) correspondientes a 108 individuos de la especie *H. leucotis* y 8 individuos de *H. xantusii* (grupo hermano, García-Moreno *et al.* 2006), obtenidos de la colección de tejidos del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias (MZFC) UNAM, de la colección de tejidos del Museo Marjorie Barrik de Historia Natural (UNLV) y del Museo de Historia Natural de la Universidad de Kansas (Figura 15, ver Apéndice II: muestras y localidades). Para enraizar el árbol (grupo externo) se utilizaron dos ejemplares de la colección de MZFC pertenecientes a la especie *H. eliciae*, así como una secuencia obtenida de la base de datos del genbank (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) con número de acceso EU042562 (*H. eliciae*).

Protocolos de laboratorio

Se llevó a cabo la extracción de DNA siguiendo el protocolo del kit de extracción QiagenDNeasy (www.qiagen.com), de 108 tejidos de *H. leucotis*, ocho tejidos de *H.xantusii* y dos tejidos de *H. eliciae*. Se amplificó y secuenció la subunidad 2 del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa (ND2: 828 pb). Para la amplificación del gen ND2 se emplearon los primers L5219: CCCATACCCCGAAAATGATG y H6313: CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC (Sorenson *et al.* 1999), con temperatura de unión de 54°C. Se amplificaron y secuenciaron las subunidades 6 y 8 del gen mitocondrial ATPasa (705 pb), con temperatura de unión de 58°C, los primers empleados para su amplificación fueron CO2GQL (L8929): GGACAATGCTCAGAAATCTGCGG y CO3HMH (H9947): CATGGGCTGGGGTCRACTATGTG (Eberhard y Bermingham 2004). Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1% con adición de bromuro de etidio. Se llevó a cabo la purificación con ayuda del kit de placas Millipore, adicionando agua y filtrando al vacío.

Las reacciones de secuenciación fueron realizadas con el protocolo del reactivo BigDye Terminator (Applied Biosystems) y sus productos fueron purificados a través de la filtración en columnas con el reactivo sephadex G50. Los productos fueron leídos en un secuenciador automático ABI prism 377. Los genes fueron secuenciados en las direcciones 5'-3' y viceversa.

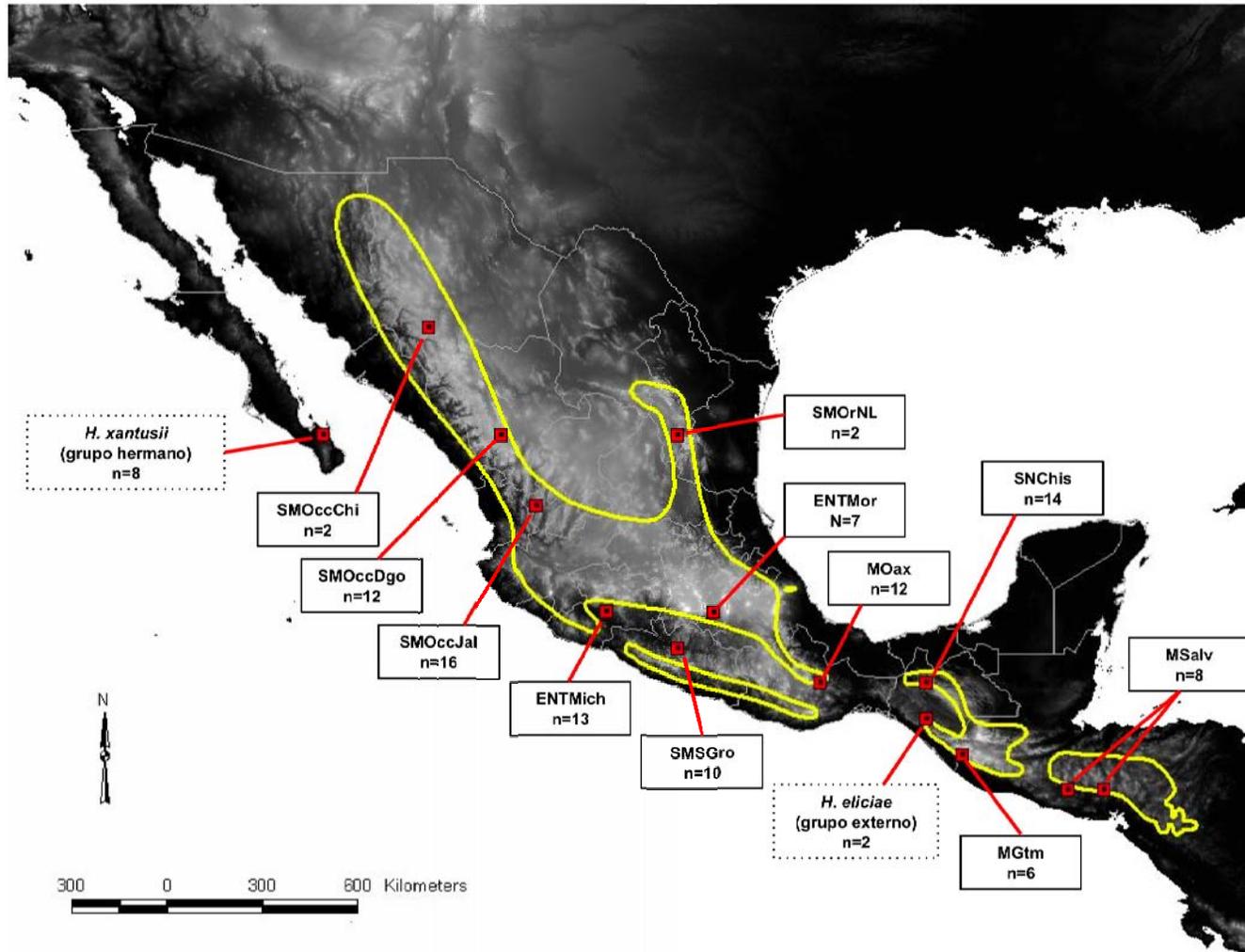


Figura 15. Distribución geográfica de la especie *Hylocharis leucotis* (línea amarilla). En color rojo se indican los puntos muestreados, nombre de identificación de cada localidad y número de muestras para cada una (n). SMOccChi: Sierra Madre Occidental, Chihuahua. SMOccDgo: Sierra Madre Occidental, Dgo. SMOccJal: Sierra Madre Occidental, Jalisco. ENTMich: Eje Neovolcánico Transversal, Michoacán. ENTMor: Eje Neovolcánico Transversal, Morelos. SMOrNL: Sierra Madre Oriental, Nuevo León. MSGro: Sierra Madre del Sur, Guerrero. MOax: Montañas de Oaxaca. SNChis: Sierra Norte de Chiapas. MGtm: Montañas de Guatemala. MSalv: Montañas de El Salvador.

Análisis de los datos

Las secuencias se editaron y alinearon con ayuda del programa Sequencher 4.8 (Gene codes corporation 2007). Se editó el alineamiento con ayuda del programa MacClade 4.06 (Maddison y Madisson 2003). Se crearon grupos de datos correspondientes a cada gen por separado (ATPasa 6 y 8: 705 pb, ND2: 828 pb), otro grupo de datos para las secuencias de ambos genes concatenados (1533 bp) y grupos de datos para cada una de las posiciones de los genes por separado y combinados. Por medio del programa MEGA 4.1 (Tamura *et al.* 2007) se obtuvieron los estimados de los sitios conservados, sitios variables y los sitios informativos.

Se realizaron reconstrucciones filogenéticas bajo los criterios de máxima parsimonia (MP) e inferencia bayesiana (BI). Para el análisis de MP, se empleó el programa computacional PAUP*4 (Swofford 2002). Se realizó una búsqueda heurística, eligiendo un árbol de inicio vía “stepwise addition” en el cual la adición de secuencias fue al azar por medio del método: tree-bisection-reconnection (TBR). El apoyo de clados se obtuvo con 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein 1985).

Para la reconstrucción filogenética bajo el criterio de BI se realizó un análisis de datos particionados. Se probaron cuatro estrategias de arreglos de genes: A) genes combinados, B) ATP+ND2, C) genes combinados por codones y D) ATPasas (por codones) + ND2 (por codones). Se obtuvieron los valores del factor Bayes (B_{10}), con los cuales se eligió la mejor de estas estrategias para la reconstrucción filogenética (Apéndice III: estrategias de partición). Al comparar dos modelos evolutivos se puede calcular el factor Bayes, a partir de los valores de las medias armónicas (Newton y Raftery 1994) obtenidos a partir del análisis de inferencia bayesiana. El cálculo del factor bayes (B_{10}) se obtiene como resultado de comparar cada estrategia contra el resto, y se elige la estrategia con el valor más alto del factor Bayes. El llevar a cabo análisis filogenéticos probando alternativas en las estrategias de partición, es una herramienta que se emplea cuando se tienen grupos de datos múltiples (más de un gen), ya que se ha probado su utilidad al inferir relaciones filogenéticas (Nylander *et al.* 2004).

Por medio del criterio de información de Akaike (AIC: Akaike 1973), implementado en el programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008), se llevó a cabo la selección

del modelo evolutivo que mejor explicara cada grupo de datos. Para el análisis de inferencia bayesiana se empleó el programa computacional Mr.Bayesv3.0 (Huelsenbeck y Ronquist 2002). Para cada reconstrucción en el análisis de Cadenas de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC) se emplearon cuatro cadenas, una fría y dos calientes, durante seis millones de generaciones, muestreando cada 250 generaciones. El número de árboles a descartar (burnin) se determinó con ayuda del programa Tracer v1.5.0 (Rambaut y Drummond 2009), el cual fue de a 4000, eliminando los datos correspondientes al primer millón de generaciones, en todos los casos.

Se construyó una red de haplotipos Median Joining utilizando el programa computacional Network 4.5.1.0 (Bandelt *et al.* 1999) para las secuencias de la especie *H. leucotis* exclusivamente, mediante la cual se logró identificar el número de haplotipos presentes y sus frecuencias.

Se obtuvieron los valores de diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica (π) y diversidad de sitios segregantes (parámetro poblacional: θ) para cada población (SMOccChi: Sierra Madre Occidental, Chihuahua. SMOccDgo: Sierra Madre Occidental, Dgo. SMOccJal: Sierra Madre Occidental, Jalisco. ENTMich: Eje Neovolcánico Transversal, Michoacán. ENTMor: Eje Neovolcánico Transversal, Morelos. SMOrNL: Sierra Madre Oriental, Nuevo León. SMSGro: Sierra Madre del Sur, Guerrero. MOax: Montañas de Oaxaca. SNChis: Sierra Norte de Chiapas. MGtm: Montañas de Guatemala. MSalv: Montañas de El Salvador) con ayuda del programa DnaSP v5 (Librado y Rozas 2009).

Se llevó a cabo un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) con el fin de observar la estructura poblacional, para lo cual se implementó el programa computacional Arlequín v.3.1 (Schneider *et al.* 2000, Excoffier *et al.* 2005) con 16000 iteraciones para la obtención de valores de significancia. El análisis de varianza molecular, AMOVA, estima índices de estructura genética entre y dentro de poblaciones o grupos, mediante la información obtenida a partir de el número y frecuencia de haplotipos muestreados (Excoffier *et al.* 1992).

Para el cálculo de diferencias pareadas entre poblaciones (Nei's pairwise, Nei 1987) y el cálculo de valores de F_{ST} (Wright 1931), se implementó el programa Arlequín v.3.1 (Schneider *et al.* 2000, Excoffier *et al.* 2005). Las estimaciones de diferencias pareadas y los valores de F_{ST} , son medidas de la variación entre y/o dentro de las poblaciones. El número de iteraciones fue de 16000 para la obtención de los valores de significancia.

Para el análisis de la dinámica histórica de las poblaciones, se llevaron a cabo los análisis de cálculo de valores estimados demográficos (curvas mismatch) y cálculos de las pruebas de neutralidad: D de Tajima (1989), F_u (F_u 's FS test, Fu and Li's test, Fu 1997), implementados en el programa Arlequín v.3.1 (Schneider *et al.* 2000, Excoffier *et al.* 2005) con 16000 iteraciones en la obtención de los niveles de significancia. El análisis de curvas mismatch describe las diferencias pareadas entre haplotipos, en el cual se comparan curvas de distribución empíricas y estimadas bajo un modelo de expansión, para las cuales se sugiere que una población está en expansión reciente si las curvas observadas no se desvían de una distribución unimodal (Slatkin y Hudson 1991, Rogers y Harpending 1992), para lo cual se emplea el estadístico del índice Harpending's ragedness (Harpending, 1994). De esta forma se puede obtener una aproximación acerca de la historia demográfica en cada grupo o población. En el caso de la prueba D de Tajima (1989), se comparan los parámetros poblacionales de sitios segregantes y el promedio de las diferencias pareadas entre los haplotipos muestreados, bajo el modelo de sitios infinitos, ésta comparación arroja resultados que pueden ser interpretados como poblaciones con fluctuaciones demográficas (expansión, cuellos de botella) o poblaciones bajo presiones de selección (Tajima 1989). Las pruebas de F_u (1997) se basan en la probabilidad de observar cierto número de alelos muestreados condicionado al número de diferencias pareadas observadas, tanto las pruebas de neutralidad como las estimaciones de curvas mismatch son complementarias.

RESULTADOS

Se obtuvo una matriz de 1533 pb para 108 individuos de la especie *H. leucotis*, 8 individuos de *H. xantusii* y 3 individuos de *H. eliciae*. El porcentaje de sitios conservados fue de 81.6%, mientras que para los sitios variables fue del 18.39% y un 10.30% correspondiente a los sitios informativos. Se identificaron en total 62 haplotipos, de los cuales solo cuatro pertenecen a haplotipos compartidos entre dos o más poblaciones (H1, H2, H3, H8, figura 16, tabla 8), para lo cual se tiene que 58 de los 62 haplotipos son únicos.

Tabla 8. Identificación de los haplotipos compartidos entre dos o más poblaciones (id: nombre asignado a cada muestra).

Haplotipo(H)	IDs (población: id muestra)
H1	ENTMich: mm427, mm345, mm381. MOax: br1148, mt322, br1147, mt321. SMSGro: amt31, amt145. SMOCCChi: chi85. ENTMor: jk4802, gm1502, jal: jk3321, jk3324, jk3216, jk3322. SNChis: behb22, behb24, behb36, behb33, behb7. MGtm: jk2169, jk2137, ga2383. SMOCCDgo: ial229, ial231, ial206, ial210, ial207, ial202.
H2	ENTMich: mm408. SMSGro: jk4138. ENTMor: gm1501, gm1460. SMOCCJal: jk3202, jk3353, jk3203. SMOCCDgo: ial212.
H3	MSalv: 8178, 4938. MGtm: jk2131, jk2128, jk2125.
H8	SMOCCJal: jk3356. SMOCCDgo: ial201.

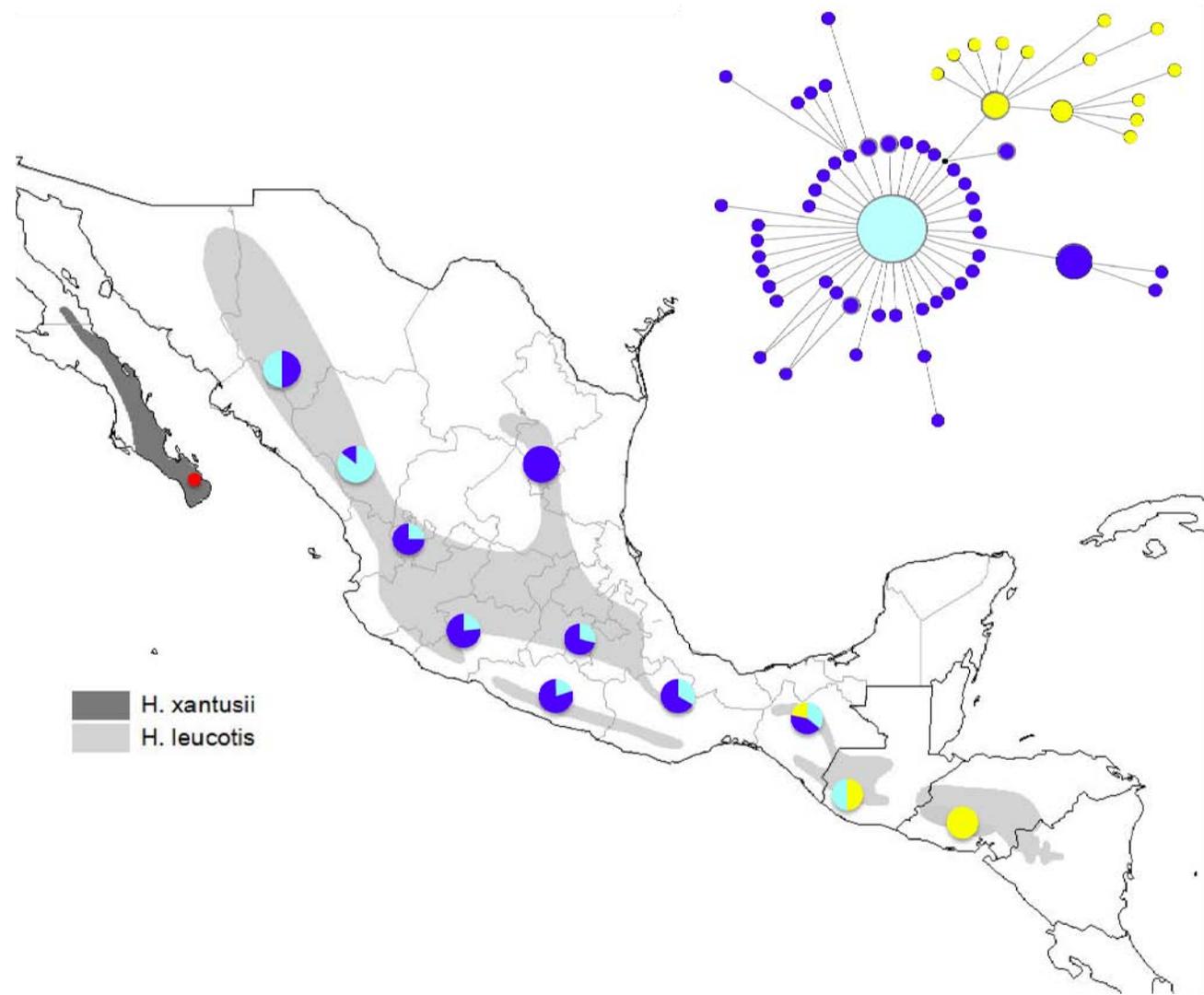


Figura 17. Distribución de los haplotipos de la especie *H. leucotis*, a lo largo de su distribución geográfica.

El consenso de mayoría, resultado del análisis filogenético bajo el criterio de máxima parsimonia y los valores de apoyo de “bootstrap”, se muestran en la figura 18. La topología obtenida presenta valores de apoyo mayores a 50, sin embargo el grupo interno (*H. leucotis*) se caracteriza por la falta de resolución, presentándose una politomía. Sin embargo dentro de dicha politomía, existen ciertos haplotipos que se agrupan, tal es el caso de los haplotipos H55, H54, H53, H52, H4 y los haplotipos H59 y H56, todos correspondientes a la población de las montañas de El Salvador, junto con el grupo formado por dos haplotipos de la Sierra Norte de Chiapas (H43 y H6). Se presenta también el grupo formado por los haplotipos H50 (SMOccJal), H49 (MSGro), H48 (MOax), H47 (ENTMich) y H46 (MOax), el grupo de los haplotipos H18 (ENTMor), H17 (ENTMor) y H2 (haplotipo compartido en cinco poblaciones: ENTMich, MSGro, ENTMor, SMOccJal, SMOccDgo) y por último el grupo conformado por los haplotipos H27 y H26, correspondientes a las poblaciones de la Sierra Madre Occidental en Chihuahua y al Eje Neovolcánico Transversal en Michoacán, respectivamente. Todas estas agrupaciones, aunque son parte de la politomía que presenta el grupo interno, tienen valores de apoyo altos (>50, Felsenstein 1985).

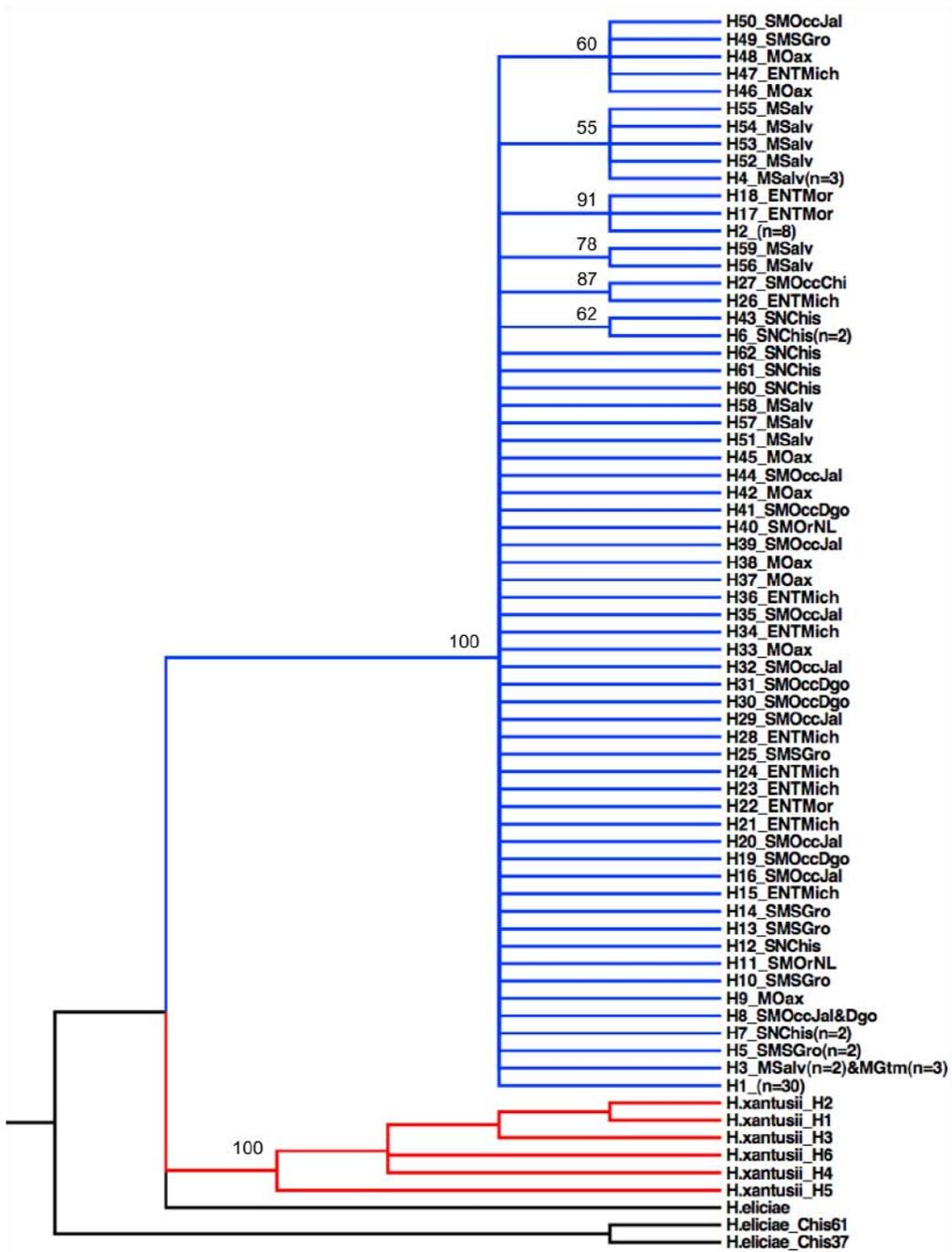


Figura 18. Reconstrucción filogenética para 62 haplotipos de la especie *H. leucotis*, con base en un análisis de máxima parsimonia con genes concatenados (ND2 y ATPasa 6, 8), resultado de un consenso de mayoría. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50. En color rojo se señala el clado correspondiente al grupo hermano (*H. xantusii*) y en negro se señala al grupo externo (*H. eliciae*).

Para el análisis de estrategias de partición, en la reconstrucción filogenética bajo el criterio inferencia bayesiana, se obtuvieron los valores de medias armónicas para cada grupo de datos (Tabla 9). Se realizó el cálculo del factor bayes (B_{10}) y se obtuvo el valor de comparar una estrategia contra otra para cada combinación posible (Tabla 10). A partir de estos resultados logramos definir que la estrategia de partición que se ajustaba mejor a nuestros datos fue la estrategia D (por codones para cada gen por separado).

Tabla 9. Valores de las medias armónicas, obtenidas a partir de los análisis de inferencia bayesiana, para cada estrategia de partición.

Estrategia de partición	Media armónica
A (genes combinados)	-3937.50
B (ATP+ND2)	-4322.33
C (genes combinados por codones)	-4254.41
D (ATP por codones+ND2 por codones)	-3803.00

Tabla 10. Estimados de las comparaciones entre las estrategias de partición (factor bayes B_{10}), con base en los estimados de las medias armónicas. Se resalta en gris las celdas correspondientes a la estrategia D, con los valores más altos entre las comparaciones.

Estrategias	D	C	B	A
A	269	-633.82	-769.66	-
B	1038.66	135.84	-	-
C	902.82	-	-	-
D	-	-	-	-

Una vez definida la estrategia de partición, se obtuvo la topología bajo el criterio de inferencia bayesiana, con el fin de dilucidar las relaciones filogenéticas en la especie *H.leucotis* (Figura 19). Esta topología concuerda con la red de haplotipos encontrada, ya que se observan las mismas agrupaciones, ahora apoyadas con elevados valores de probabilidades posteriores ($p>0.90$). Todos los haplotipos de la población de las montañas de El Salvador se agrupan en un solo clado (grupo B, ver Figura 19), relacionados con algunos haplotipos de la Sierra Norte de Chiapas (H60, H61 y H62) y un haplotipo de las montañas de Guatemala (H3), el haplotipo hermano de este grupo corresponde al H5, perteneciente a la población de la Sierra Madre del Sur en Guerrero.

Se observan las mismas agrupaciones que la topología obtenida mediante el criterio de máxima parsimonia, con altos valores de probabilidad posterior. Sin embargo, al igual que el resultado de máxima parsimonia, estos grupos se caracterizan por la falta de resolución al ser parte de una politomía. Cabe señalar que tres haplotipos correspondientes a las poblaciones de la Sierra Madre Occidental en Jalisco (H32) y a la Sierra Madre Occidental en Durango (H31 y H30) se ubican por fuera de la politomía, sin embargo este fenómeno sólo se presenta en la topología resultado del análisis filogenético empleando la estrategia de partición “D” (genes por separado y por codones, ver topologías en Apéndice III) y obteniendo un valor de probabilidad posterior muy bajo ($pp=0.56$), es por esto que se consideraron solo dos grupos, uno correspondiente a los haplotipos de las poblaciones de las montañas de El Salvador relacionados con haplotipos de la Sierra Norte de Chiapas y las montañas de Guatemala (grupo B: $pp=0.95$) y el grupo conformado por el resto de los haplotipos (grupo A: politomía, ver figura 19).

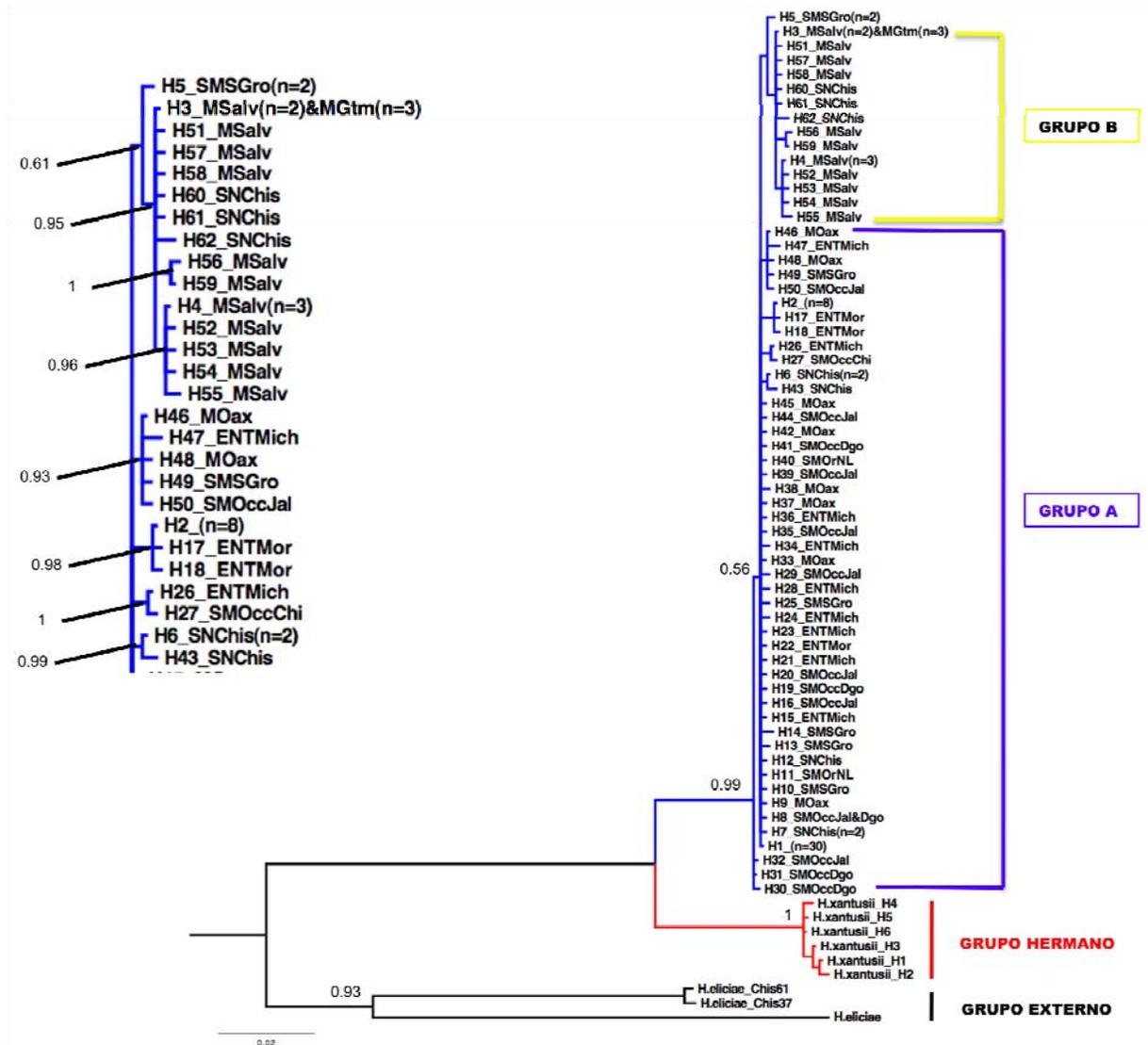


Figura 19. Topología obtenida a partir del método de inferencia bayesiana. Se presentan los valores de soporte en los nodos: probabilidades posteriores mayores a 0.90. En color rojo se señala el clado correspondiente al grupo hermano (*H. xantusii*) y en negro se señala al grupo externo (*H. eliciae*). Grupo B: haplotipos de las poblaciones de las montañas de El Salvador relacionados con haplotipos de la Sierra Norte de Chiapas y las montañas de Guatemala. Grupo A: resto de haplotipos.

Los valores de diversidad nucleotídica y haplotípica de cada población muestreada se presentan en la Tabla 11. La población que presenta mayor diversidad haplotípica es la del Eje Neovolcánico Transversal en Michoacán (0.96154) y la que presenta menor diversidad es la población de las montañas de Guatemala (0.600). En cuanto a la diversidad nucleotídica la población de la Sierra Madre del Sur en Guerrero obtuvo el valor más alto ($\pi = 0.00216$) a diferencia de la población de las montañas de Guatemala, de nuevo con el valor mas bajo ($\pi = 0.00078$). Estos datos indican que el número de haplotipos por población muestreada es elevado. En el caso de las poblaciones de Chihuahua y Nuevo León, no se tomaron en cuenta debido a que el número de muestras para estas localidades es muy bajo. En general, la diversidad nucleotídica en los grupos presenta valores bajos de variación genética.

La divergencia entre y dentro de las poblaciones muestreadas es baja, lo cual se puede observar en los resultados obtenidos a partir del cálculo de diferencias pareadas (Tabla 12). De estos resultados se puede hacer énfasis de las poblaciones más divergentes, como es el caso de las poblaciones de las montañas de El Salvador y el Eje Neovolcánico Transversal en Morelos, las cuales muestran los valores más altos de diferenciación (6.03636). Por el contrario, las poblaciones que presentan menor divergencia entre ellas son las montañas de Guatemala y las montañas de Oaxaca. Los valores de diferencias dentro de cada población concuerdan con los altos niveles de diversidad haplotípica antes mencionada.

Tabla 11. Valores de diversidad haplotípica, nucleotídica y número de haplotipos de cada población muestreada (*H. leucotis*).

Grupos (ID)	no.muestras (n)	no.haplotipos (H)	Diversidad haplotípica	θ	π
SMOccChi	2	2	1	0.00196	0.00196
SMOrNL	2	2	1	0.00130	0.00130
SMOccDgo	12	7	0.77273	0.00151	0.00094
SMOccJal	16	11	0.92500	0.00295	0.00161
ENTMich	13	11	0.96154	0.00399	0.00191
ENTMor	7	5	0.90476	0.00160	0.00168
SMSGro	10	8	0.95556	0.00346	0.00216
MOax	12	9	0.90909	0.00194	0.00107
SNChis	14	8	0.86813	0.00246	0.00163
MGtm	6	2	0.60000	0.00057	0.00078
MSalv	14	11	0.95604	0.00246	0.00153

Tabla 12. Diferencias pareadas entre las poblaciones. Sobre la diagonal se muestran las diferencias pareadas entre poblaciones (PiXY). Los elementos en la diagonal representan las diferencias dentro de cada población (PiX). Debajo de la diagonal están los valores corregidos de estas diferencias (PiXY-(PiX+PiY)/2).

	SMOccChi	SMOrNL	SMOccDgo	SMOccJal	ENTMich	ENTMor	SMSGro	MOax	SNChis	MGtm	MSalv
SMOccChi	3.00000	0.00000	0.09524	0.00000	-0.18182	0.90000	0.00000	0.02778	0.25000	0.00000	2.21818
SMOrNL	2.50000	2.00000	0.09524	0.00000	0.00000	0.90000	0.00000	0.02778	0.25000	0.00000	2.21818
SMOccDgo	2.78571	2.28571	2.38095	-0.08658	0.01732	0.48095	-0.01190	0.12302	0.34524	0.09524	2.31342
SMOccJal	2.86364	2.36364	2.46753	2.72727	-0.06612	0.57273	-0.09091	-0.03283	0.25000	0.00000	2.16860
ENTMich	3.04545	2.72727	2.93506	3.02479	3.45455	0.57273	-0.09091	-0.01263	0.25000	0.00000	2.21818
ENTMor	3.90000	3.40000	3.17143	3.43636	3.80000	3.00000	0.45000	0.92778	1.15000	0.90000	3.11818
SMSGro	3.37500	2.87500	3.05357	3.14773	3.51136	3.82500	3.75000	-0.02778	0.15625	-0.12500	1.95682
MOax	2.61111	2.11111	2.39683	2.41414	2.79798	3.51111	2.93056	2.16667	0.27778	0.02778	2.22576
SNChis	3.62500	3.12500	3.41071	3.48864	3.85227	4.52500	3.90625	3.23611	3.75000	-0.50000	0.96818
MGtm	2.50000	2.00000	2.28571	2.36364	2.72727	3.40000	2.75000	2.11111	2.37500	2.00000	0.21818
MSalv	5.13636	4.63636	4.92208	4.95041	5.36364	6.03636	5.25000	4.72727	4.26136	2.63636	2.83636

El análisis de varianza poblacional a partir de datos moleculares (AMOVA) prueba de manera jerárquica los niveles de diversidad genética entre y dentro de las poblaciones, evaluando la cantidad de estructura genética poblacional (Excoffier *et al.* 1992). En la Tabla 13 se presentan los valores de esta prueba. Siguiendo con los resultados de los análisis genéticos, se observa de nuevo que la explicación de valores altos en la variación genética, se está presentando en mayor grado dentro de las poblaciones (81.96%) y no entre ellas (18.04%), lo cual podría deberse a altos niveles de flujo genético entre las poblaciones. Cabe señalar que los resultados obtenidos para el estadístico Fst (Tabla 14), corroboran lo antes mencionado, ya que se obtienen valores que tienden a cero, esto quiere decir que hay poca variación genética entre las poblaciones. El estadístico Fst es un parámetro que sirve para definir cierta estructuración genética entre las poblaciones, en el caso de obtener valores cercanos a uno se puede inferir que el grado de estructuración o diferenciación es alto, por el contrario, cuando el valor de Fst se aproxima a cero se dice que las poblaciones tienen poca estructuración genética (Wright 1931). La población que presenta los valores más altos del estadístico Fst, es la de las montañas de El Salvador comparada con el resto de poblaciones muestreadas, esto es indicio de que entre éstas poblaciones el flujo genético es bajo. Nuevamente la población de El Salvador contra la población de Morelos obtuvo el valor más alto de diferenciación genética (0.52035).

Tabla 13. Valores obtenidos a partir del análisis de varianza molecular (AMOVA).

Fuente de Variación	d.f. (grados de libertad)	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	10	36.915	0.32737	18.04
Dentro de las poblaciones	65	96.650	1.48693	81.96
Total	75	133.566	1.81430	
Indice de fijación Fst =0.18044				
Valor de P<0.05				

Tabla 14. Valores de Fst entre poblaciones. En celdas grises se resaltan los valores significativos, P<0.05.

	SMOccChi	SMOrNL	SMOccDgo	SMOccJal	ENTMich	ENTMor	SMSGro	MOax	SNChis	MGtm	MSalv
SMOccChi											
SMOrNL	0.00000										
SMOccDgo	0.08234	0.00746									
SMOccJal	0.02163	-0.06494	-0.03844								
ENTMich	-0.09049	-0.10827	-0.00405	-0.02186							
ENTMor	0.23077	0.20455	0.15993	0.17345	0.14110						
SMSGro	-0.04523	-0.11674	-0.00810	-0.02355	-0.02452	0.10761					
MOax	0.08424	-0.00385	0.05310	-0.01591	0.00923	-0.28365	-0.00555				
SNChis	0.02449	-0.03492	0.09625	0.07857	0.06664	0.24351	0.04000	0.09061			
MGtm	0.00000	0.00000	0.00746	-0.06494	-0.10827	0.20455	-0.16270	-0.00385	-0.32649		
MSalv	0.44158	0.42396	0.46328	0.43806	0.41356	0.52035	0.38052	0.46636	0.23460	0.01130	

Para el análisis de la historia demográfica de las poblaciones, se llevaron a cabo las pruebas de neutralidad D de Tajima y pruebas de F_u (Tabla 15). Las poblaciones de la Sierra Madre Occidental en Chihuahua y la Sierra Madre Oriental en Nuevo León no se tomaron en cuenta para estos análisis por el reducido número de muestras con que se cuenta por localidad. Los valores negativos de la prueba D de Tajima muestran niveles bajos de polimorfismos explicados por eventos de expansión demográfica (Tajima 1989). En el caso de la prueba de F_u (D^* , F^* , F_s), la cual se basa en el número de mutaciones ancestrales, recientes y en la comparación de alelos en una muestra, arroja valores que indican al igual que la prueba D de Tajima, expansión demográfica para la mayoría de las poblaciones muestreadas favorecidas por un exceso de polimorfismos. En el caso de la población muestreada en Morelos no se presenta evidencia de expansión demográfica.

Las gráficas de distribución mismatch bajo el modelo de expansión están representadas en su mayoría por curvas unimodales (Figura 20). En esta prueba se hace un conteo del número de diferencias entre cada par de secuencias y con los valores obtenidos se contruyen histogramas para comparar las diferencias observadas y las estimadas bajo dicho modelo de expansión. Las poblaciones que no se tomaron en cuenta para este análisis fueron las de Chihuahua, Nuevo León y Guatemala, por falta de datos para la construcción de los histogramas. Se confirma que en el caso de la población de Morelos no hay evidencia de expansión demográfica, lo cual se puede ver en la curva bimodal de diferencias estimadas contra las observadas, sin embargo el estadístico “Harpending’s Raggedness Index” sugiere expansión al obtener un valor no significativo.

Tabla 15. Pruebas de neutralidad. ** $P < 0.05$, valores significativos.

Poblaciones (ID)	Pruebas de Neutralidad			
	Tajima’s D	Fu and Li’s D^*	Fu and Li’s F^*	Estadístico Fu’s F_s
SMOccDgo	-1.48 ($P > 0.10$)	-1.32 ($P > 0.10$)	-1.54 ($P > 0.10$)	-5.14 ($P < 0.05$) **
SMOccJal	-1.77 ($0.10 > P > 0.05$)	-2.24 ($0.10 > P > 0.05$)	-2.43 ($0.10 > P > 0.05$)	-10.35 ($P < 0.05$) **
ENTMich	-2.22 ($P < 0.01$) **	-2.88 ($P < 0.02$) **	-3.09 ($P < 0.02$) **	-8.95 ($P < 0.05$) **
ENTMor	0.25 ($P > 0.10$)	-0.07 ($P > 0.10$)	0.00 ($P > 0.10$)	-2.23 ($P < 0.05$) **
SMSGro	-1.72 ($0.10 > P > 0.05$)	-1.83 ($0.10 > P > 0.05$)	-2.03 ($0.10 > P > 0.05$)	-4.82 ($P < 0.05$) **
MOax	-1.83 ($P < 0.05$) **	-2.06 ($0.10 > P > 0.05$)	-2.27 ($0.10 > P > 0.05$)	-8.45 ($P < 0.05$) **
SNChis	-1.34 ($P > 0.10$)	-1.41 ($P > 0.10$)	-1.60 ($P > 0.10$)	-4.82 ($P < 0.05$) **
MGtm	1.75 ($P > 0.10$)	1.27 ($P > 0.10$)	1.43 ($P > 0.10$)	0.69 ($P > 0.05$)
MSalv	-1.50 ($P > 0.10$)	-1.77 ($P > 0.10$)	-1.94 ($P > 0.10$)	-10.11 ($P < 0.05$) **

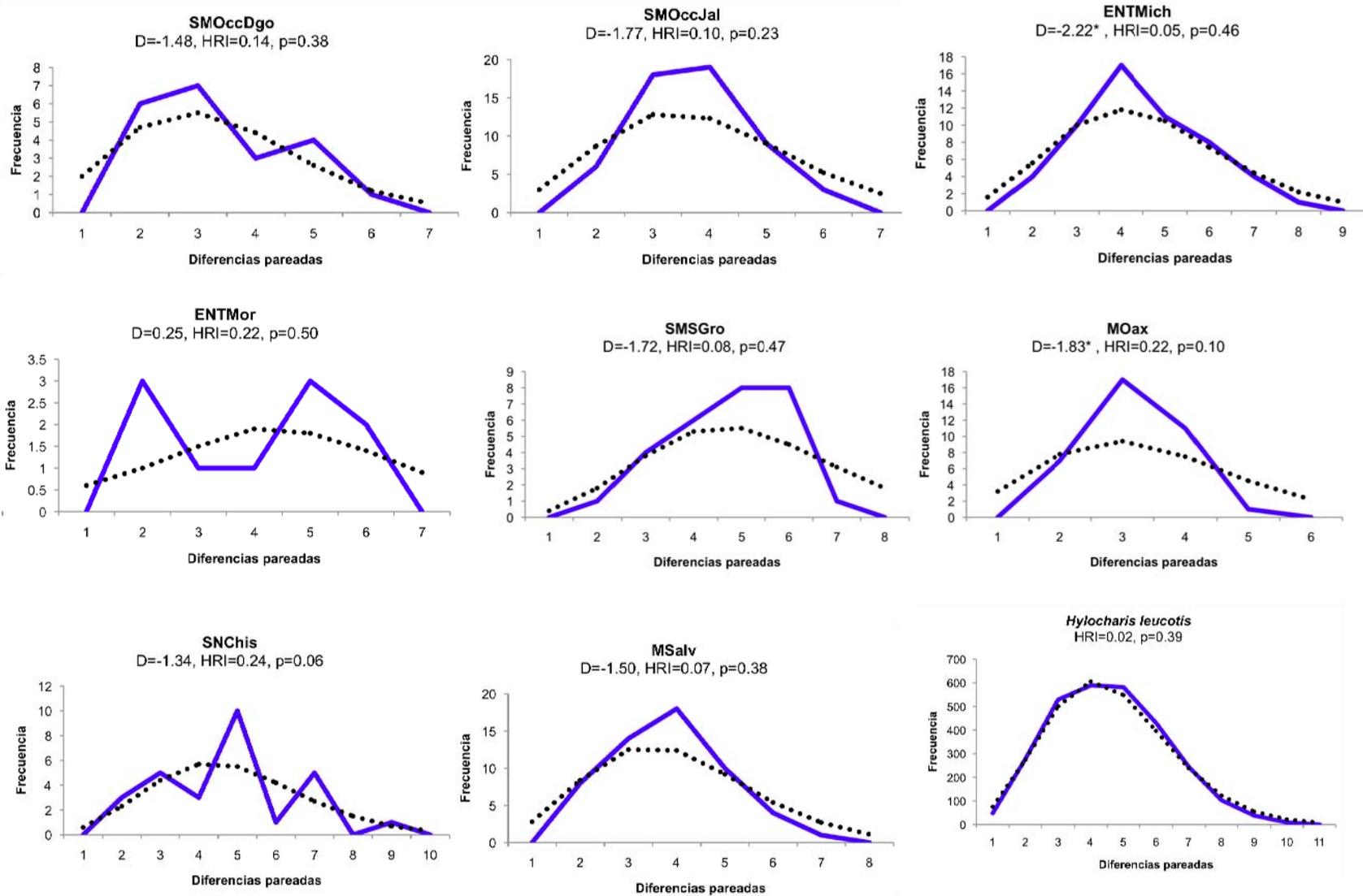


Figura 20: Curvas mismatch para cada población muestreada y para la especie *Hylocharis leucotis* (En azul están representadas las curvas de diferencias observadas y en líneas negras punteadas las curvas estimadas bajo el modelo de expansión demográfica), $D=D$ de Tajima, $D < 0$ indica expansión poblacional, HRI =Harpending's Raggedness Index, $p < 0.05$ significativo=la población no presenta expansión demográfica.

DISCUSIÓN

Se evaluó la variación genética dentro y entre las poblaciones de la especie *H. leucotis*, además de analizar los patrones filogeográficos de la especie a lo largo de su rango de distribución geográfica, mediante un estudio con caracteres moleculares (ADN mitocondrial).

En la red de haplotipos se puede observar la falta de estructuración genética para la especie *H. leucotis*, presentándose en general un patrón de continuidad y ausencia de separación geográfica (Avice *et al.* 1987), con excepción del grupo de El Salvador, el cual tanto en la red de haplotipos, como en los análisis filogenéticos bajo el criterio de inferencia bayesiana, agrupa a todos los individuos muestreados en esa zona. Sin embargo esta agrupación no es única, sino que se relaciona con algunos haplotipos de la Sierra Norte de Chiapas y las montañas de Guatemala.

Este tipo de patrón filogeográfico (de continuidad y ausencia de separación geográfica) se presenta cuando las poblaciones están interconectadas a través de flujo genético, debido a la ausencia de barreras geográficas que hayan mantenido aisladas a las poblaciones, o también cuando se ha interrumpido el flujo genético y el tiempo transcurrido no ha sido suficiente para aislar genéticamente a dichas poblaciones (Avice *et al.* 1987).

Este patrón de continuidad, se ha presentado en algunas aves, en las que sus poblaciones aparentan ser una sola unidad evolutiva, o bien parecen tener un origen reciente con poblaciones en expansión (p.e. Baker *et al.* 2003, Cortés-Rodríguez *et al.* 2008). Los valores obtenidos a partir de las pruebas de neutralidad revelan, para la mayoría de las poblaciones muestreadas, exceptuando la población de Morelos, eventos de expansión demográfica. Las curvas mismatch corroboran ésta hipótesis de historia demográfica.

El gran número de haplotipos encontrados, la presencia del haplotipo con mayor frecuencia (H1) en nueve de las once localidades muestreadas (excepto en El Salvador y Nuevo León) y la poca evidencia de linajes independientes, podrían estar indicando altos niveles de flujo genético. A pesar del reducido número de muestras representantes de la subespecie *H. leucotis borealis* (dos muestras de la Sierra Madre Occidental en Chihuahua

y dos muestras de la Sierra Madre Oriental en Nuevo León), no se observó ningún tipo de separación de los haplotipos correspondientes a estas poblaciones en las reconstrucciones filogenéticas. Por el contrario, estos haplotipos tenían relación directa con el haplotipo de mayor frecuencia (H1), a diferencia de la separación de los haplotipos de las poblaciones de El Salvador, correspondientes a la subespecie propuesta para ésta región: *H. l. pygmaea*.

El estudio filogeográfico de la especie *Lampornis amethystinus* (Cortés-Rodríguez *et al.* 2008), es un ejemplo en el cual se presentan niveles bajos de variación genética entre las poblaciones (6.5%), sin embargo existe una marcada diferenciación entre los haplotipos que se encuentran distribuidos al este y al oeste del Istmo de Tehuantepec, considerándolo como una barrera geográfica que aísla a estas poblaciones. En el presente estudio, no hay evidencia de que el Istmo de Tehuantepec esté actuando como una barrera geográfica, en la distribución de los haplotipos encontrados para la especie *H. leucotis*. Cabe señalar que la tendencia en estudios filogeográficos de aves montañas presenta éste patrón de diferenciación en ambos lados del Istmo, por lo que nuestros resultados presentan una historia diferente en ese sentido. El hecho de que en éste estudio el Istmo no haya tenido influencia en la variación genética y distribución de los haplotipos de *H. leucotis*, se ve reflejado en la evidencia de expansión demográfica y niveles altos de flujo genético, a diferencia de los estudios filogeográficos que describen al Istmo de Tehuantepec como barrera geográfica importante en el aislamiento de poblaciones (Barber y Klicka 2010).

En los análisis de reconstrucción filogenética se obtuvieron valores de apoyo más altos en el caso de los clados mayores (grupo hermano y grupo externo). Sin embargo, en las reconstrucciones de inferencia bayesiana, que se realizaron para probar la mejor estrategia de partición, se conservaron los mismos grupos en la politomía obtenida para el grupo interno (*H. leucotis*), en todos los casos con valores altos de probabilidad posterior.

Se definieron así los dos grupos principales para este estudio: grupo A y grupo B. El primero correspondiente a los haplotipos distribuidos a lo largo del rango de distribución geográfica de la especie llegando hasta las montañas de Guatemala y el segundo que corresponde a los haplotipos de las poblaciones de las montañas de El Salvador, compartidos con haplotipos de Guatemala y Chiapas. En el caso de la topología obtenida bajo el criterio de máxima parsimonia, no se lograron identificar estos dos grupos, una

explicación a esto podría ser el hecho de que las reconstrucciones filogenéticas bajo el criterio de máxima parsimonia, no consideran cambios intermedios o graduales de un nucleótido a otro, sino que busca reconstruir las topologías de la forma más sencilla, considerando sólo un paso para cada mutación (un sólo cambio entre un nucleótido y otro), a diferencia del criterio de inferencia bayesiana, el cual considera todos los posibles cambios en cada posición nucleotídica, para las mutaciones que se presenten (Page y Holmes 1998). Es por esto que en general, la resolución en las topologías obtenidas bajo el criterio de inferencia bayesiana es mayor, obteniendo el resultado de la presencia de dos grupos principales, el cual fue corroborado por la red de haplotipos, en la que se presentan las mismas agrupaciones.

A diferencia de otros estudios en aves, en los que el marcador mitocondrial ND2 es de gran ayuda para dilucidar los patrones filogeográficos con una alta resolución (p.e., 21.6% de sitios informativos: García-Deras *et al.* 2008), en este estudio no obtuvo valores altos en la proporción de sitios informativos, siendo el gen de la ATPasa 6 y 8, el marcador molecular que aportó mayor cantidad de sitios informativos, comparados con los identificados para el gen ND2 (total=10.30% de sitios informativos). Esto se pudo observar al obtener primeramente una red de haplotipos con el gen ND2, en la cual no se observaron agrupaciones, como el caso del grupo conformado por los haplotipos de las montañas de El Salvador, el cual se obtuvo una vez que se incorporaron en el análisis, las secuencias del gen ATPasa 6 y 8. Aún así la señal filogenética fue baja, lo cual podría influir en los resultados, al obtener árboles de genes poco precisos, a pesar de la rápida tasa de evolución en el ADN mitocondrial, lo cual en casos de divergencia reciente, puede resultar poco informativo en las reconstrucciones filogenéticas (Funk y Omland 2003).

Los haplotipos presentes en la zona de las montañas de El Salvador, representan uno de los grupos principales identificados en éste estudio (Grupo B), dicha población se encuentra alejada de las poblaciones más cercanas muestreadas (montañas de Guatemala y Sierra Norte de Chiapas), sin embargo la reconstrucción filogenética muestra que el grupo A y el grupo B, con respecto a su distribución geográfica, representan filogrupos parafiléticos, para lo cual hay varias alternativas al tratar de explicar este hecho.

En la zona geográfica correspondiente a las montañas de Guatemala y El Salvador, se ubica el Valle del Río Motagua, el cual podría estar participando como barrera geográfica, limitando el intercambio genético entre estas poblaciones (p.e., Puebla-Olivares 2008). Otra explicación alternativa es que la población correspondiente a la Sierra Norte de Chiapas y las montañas de Guatemala, podría representar una zona de contacto entre los dos filogrupos, compartiendo de esta forma algunos haplotipos. Otra causa de la parafilia en los filogrupos encontrados, podría estar explicada bajo el concepto del “sorteo incompleto de linajes, ILS”, el cual representa un momento del proceso evolutivo, en el cual la variación entre dos linajes (filogrupos y/o especies) aún refleja la variación de su ancestro común más reciente (ILS, Funk y Omland 2003). Después de cierto tiempo, cuando actúa la deriva génica y cuando algunas variables demográficas se modifican, el sorteo de linajes se completa, logrando entonces que los filogrupos hermanos presenten monofilia (Joseph y Omland 2009). Diferenciar estos procesos (ILS y zonas de contacto), suele ser complicado, sobre todo cuando se presenta evidencia que apoye ambas hipótesis, para lo cual se recomiendan análisis más rigurosos, como el aumentar el número de genes y emplear métodos basados en coalescencia (Lee y Edwards 2008).

Se estima que cuando se habla de expansiones recientes, se hace referencia a aquellas que ocurrieron durante el periodo del Pleistoceno, en respuesta a las fluctuaciones climáticas que predominaron durante varios años (Joseph y Omland 2009). De acuerdo a los estimados de tiempo de divergencia (ver Capítulo I), el periodo calculado para la divergencia del clado conformado por las especies *H. leucotis* e *H. xantusii* es de 1.23~2.28 millones de años, lo cual hace suponer que durante el Pleistoceno, debido a los cambios climáticos en los ambientes montañosos, se pudieran establecer varios refugios, que reflejan los altos niveles de diversidad haplotípica y los grupos formados dentro de la politomía, como es el caso de algunos haplotipos en las poblaciones de: Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.

La interpretación de los resultados en un estudio filogeográfico pueden influir directamente en el campo de la taxonomía y la biología de la conservación (Joseph y Omland 2009). La evidencia que se presenta en este estudio, corresponde a un patrón de recién expansión, identificando dos filogrupos, los cuales están en vías de completar su sorteo ancestral de polimorfismos, es decir en vías de especiación.

Las diferencias morfológicas que presenta la especie a lo largo de su distribución geográfica, las cuales fueron una de las características que se tomaron en cuenta al proponer tres subespecies, podrían ser el resultado de la adaptación a las condiciones ambientales específicas de las zonas geográficas en que habitan estas poblaciones (Brown y Gibson 1983), tomando en cuenta esta variación morfológica y los resultados obtenidos con base en el análisis de ADN mitocondrial, se propone que para la especie *H. leucotis*, sean reconocidos dos filogrupos, a lo largo de la distribución geográfica de la especie: uno correspondiente a las poblaciones del sur de los Estados Unidos, las tierras altas de México, Sierra Madre del Sur, Sierra Norte de Chiapas y montañas de Guatemala, y el segundo correspondiente a las poblaciones de Centroamérica (El Salvador, Honduras y Nicaragua). Este segundo grupo conservando el nombre de la subespecie *H. l. pygmaea*, con fines de diferenciar la variación geográfica morfológica (Simon y Hellmayr 1908) y genética (presente estudio), resultado de la evolución.

Los análisis de estructuración genética no revelan altos índices de diferenciación geográfica, por lo que aunado a los altos niveles de flujo genético que parece existir entre las poblaciones y la variación genética, en su mayoría explicada dentro de las poblaciones y no entre ellas, se puede inferir que la especie *H. leucotis* representa una sola unidad evolutiva, a pesar de haberse definido dos filogrupos intraespecíficos (correspondientes a las subespecies: *H. l. leucotis* e *H. l. pygmaea*).

CONCLUSIONES

- El colibrí de orejas blancas, *Hylocharis leucotis*, es una especie que presenta un patrón filogeográfico de continuidad y ausencia geográfica, poco convencional en aves montanas.
- Se diferencian dos filogrupos para la especie, correspondientes a dos de las tres subespecies propuestas (*H. l. leucotis* e *H. l. pygmaea*).
- Existe evidencia para las poblaciones muestreadas, excepto la población correspondiente al Eje Neovolcánico Transversal en Morelos, de expansión demográfica reciente.
- Los haplotipos compartidos en la región de Chiapas y Guatemala, podrían ser el resultado de una zona de contacto o de un sorteo incompleto de linajes.
- La posible barrera geográfica que pudiera estar limitando el intercambio genético entre las poblaciones de Chiapas y Guatemala con las poblaciones de El Salvador, es el Valle del Río Motagua en Guatemala.
- Las fluctuaciones climáticas durante el periodo del Pleistoceno pudieron modificar y contribuir en gran medida, a la actual distribución geográfica de la especie.
- Se recomienda el uso del gen ATPasa para estudios de variación genética a nivel poblacional, a diferencia del gen ND2, el cual se recomienda para estudios filogenéticos interespecíficos.
- A pesar de la claridad en los resultados obtenidos con respecto a la historia demográfica de la especie, se recomienda enfocarse al estudio de la zona de contacto en Chiapas y Guatemala, con el fin de esclarecer el proceso que se presenta en estas poblaciones, utilizando grupos de datos múltiples e inferencias con base en métodos de coalescencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. 2nd international Symposium on Information Theory (B.N. Petrov and F. Czaki, eds), pp. 267-281. Budapest: Akademiai Kiadó.
- Allen, E. S., and Omland, K. E. 2003. Novel intron phylogeny supports plumage convergence in orioles (*Icterus*). *Auk* 120: 961-970.
- Altshuler, D. L., Dudley, R. and McGuire, J. A. 2004. Resolution of a paradox: Hummingbird flight at high elevation does not come without a cost. *PNAS*. 101(51): 17731-17736.
- AOU (American Ornithologists Union). 1998. Check-list of North American Birds. 10th. Ed. Washington, D.C.
- Arbeláez-Cortés, E., Nyári, A. S., Navarro-Sigüenza, A. G. 2010. The differential effect of lowlands on the phylogeographic pattern of a Mesoamerican montane species (*Lepidocolaptes affinis*, Aves: Furnariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, M. A. Harvard University Press.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, Jr, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb, N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Baker, J. M., López-Medrano, E., Navarro-Sigüenza, A. G., Rojas-Soto, O. R. and Omland, K. E. 2003. Recent Speciation in the Orchard Oriole Group: Divergence of *Icterus spurius spurius* and *Icterus spurius fuertesi*. *The Auk*, 120(3): 848-859.
- Ballard, J., and Whitlock, M. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13: 729-744.
- Bandelt, H. J., Foster, P., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- Barber, P. H. 1999. Phylogeography of the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*, 8: 547-562.
- Barber, B. R. and Klicka, J. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proc. R. Soc. B*. In Press.
- Benítez-Díaz, H. 1993. Geographic variation in coloration and morphology of the Acorn Woodpecker. *The Condor*, 95: 63-71.
- Bermingham, E. and C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*, 7:367-369.
- Bleiweiss, R, J.A.W. Kirsch y J.C. Matheus. 1997. DNA hybridization evidence for the principal lineages of hummingbirds (Aves: Trochilidae). *Mol. Biol. Evol.*, 14: 325-343.
- Bleiweiss, R. 1998. Tempo and mode of hummingbird evolution. *Biological Journal of the Linnean Society*, 65: 63-76.
- Bleiweiss, R. 1998. Origin of hummingbird faunas. *Biological Journal of the Linnean Society*, 65: 77-97.
- Boie. 1831. *Isis*, 546.

- Bonaccorso, E. 2009. Historical biogeography and speciation in the Neotropical highlands: Molecular phylogenetics of the jay genus *Cyanolyca*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50: 618-632.
- Bonaccorso, E., Navarro-Sigüenza, Sánchez-González, L. A., Townsend, A. P., García-Moreno, J. 2008. Genetic differentiation of the *Chlorospingus ophthalmicus* complex in Mexico and Central America. *J. Avian Biol.* 39: 311-321.
- Boucard, A. 1895. Genera of hummingbirds. Londo, Pardy and Son.
- Brown, J. H. and Gibson, A. C. 1983. *Biogeography*. The C. V. Mosby Co. Saint Louis, Missouri.
- Bryson, R. W., Murphy, R. W., Lathrop, A., Lazcano-Villareal, D. 2010. Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *J. Biogeogr.* 2010.
- Cadena, C. D., Klicka, J., Ricklefs, R. E. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: Molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush-finches (Aves, Emberizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 993-1016.
- Castoe, T. A., Daza, J. M., Smith, E. N., Sasa, M. M., Kuch, U., Campbell, J. A., Chippindale, P. T., Parkinson, C. L. 2009. Comparative phylogeography of piperids suggests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. *J. Biogeogr.*, 36: 88-103.
- Cháves, J. A., Pollinger, J. P., Smith, T. B., LeBuhn, G. 2007. The role of geography and ecology in zapping the phylogeography of the speckled hummingbird (*Adelomyia melanogenys*) in Ecuador. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 795-807.
- Coates, A.G., Obando, J. A. 1996. The geologic evolution of the Central American Isthmus. In: In Jackson, J.B.C, Budd, A.F., Coates, A.G. (Eds.), *Evolution and Environment in Tropical America*. University of Chicago Press, pp. 21–55.
- Cooper, A., Penny, D., 1997. Mass survival of birds across the Cretaceous-Tertiary boundary: molecular evidence. *Science* 275, 1109–1113.
- Cortés-Rodríguez, N., Hernández-Baños, B. E., Navarro-Sigüenza, A. G. and Omland, K. E. 2008. Geographic Variation and Genetic Structure in the Streak-Backed Oriole: Low Mitochondrial DNA Differentiation Reveals Recent Divergence. *The Condor*, 110(4): 729-739.
- Daza, J. M., Castoe, T. A., Parkinson, C. L. 2010. Using regional comparative phylogeographic data from snake lineages to infer historical processes in Middle America. *Ecography*, 33: 343-354.
- Domínguez-Domínguez, O. y Vázquez-Domínguez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and conservation*, 32.1:59-70.
- Dickinson, E. 2003. *The Howard & Moore complete checklist of the birds of the world*, 3rd edition. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Eberhard, J.R., Bermingham, E., 2004. Phylogeny and biogeography of the Amazona ochrocephala (Aves: Psittacidae) complex. *Auk* 121, 318-332.
- Elliot, D.G. 1879. A classification and synopsis of the Trochilidae. *Smithsonian contributions to knowledge* 317. Washington, D.C. 277 pp.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. and Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes. Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Feinsinger, P. y R.K. Colwell. 1978. Community organization among Neotropical nectar-feeding birds. *Am. Zool.*, 18: 779-795.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
- Ferrari, L., Conticelli, S., Vaggelli, G., Petrone, C. M., Manetti, P. 2000. Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics*, 318: 161-185.
- Friedman, H., Griscom, L. and Moore, R. T. 1950. Distributional Check-List of the Birds of Mexico. Part I. Pacific Coast Avifauna (29). pp: 1-202.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics Society of America* 147(2): 915-925.
- Futuyma, D. J. 1998. *Evolutionary biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- García-Deras, G. M, Cortés-Rodríguez, N., Honey, M., Navarro-Sigüenza, A.G., García-Moreno, J. and Hernández-Baños, B. E. 2008. Phylogenetic relationships within the genus *Cyananthus* (Aves: Trochilidae), with emphasis on *C. doubledayi*. *Zootaxa*, 1742: 61-68.
- García-Moreno, J., Navarro-Sigüenza, A. G., Townsend, A. P., Sánchez-González, L. A. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 186-196.
- García-Moreno, J., N. Cortés, G.M. García-Deras y B.E. Hernández-Baños. 2006. Local origin and diversification among *Lampornis* hummingbirds: A Mesoamerican taxon. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 38: 488-498.
- Gene codes corporation. 2007. Sequencer 4.8. Tutorial for Windows and Macintosh.
- Gerwin, J.A. y R.M. Zink. 1989. Phylogenetic patterns in the genus *Heliodoxa* (Aves: Trochilidae): an allozymic perspective. *Willson Bull.*, 101: 525-705.
- Gill, F.B. and J.A. Gerwin. 1989. Protein relationships among hermit hummingbirds. *Proc. Acad. Of Nat. Sci. Phil.* 141:409-421.
- Gould, J. 1861. A monograph of the Trochilidae or Family of Hummingbirds. Vol. I-V.
- Griscom, L. 1929. Studies from de Dwight collection of Guatemalan birds. *Amer. Mus. Novit.* 379: 1-13.
- Hartert, E.J. 1900. Exhibition of hybrid hummingbirds. *Bull. Brit. Ornith. Club* 10:39-40.
- Howell, N.G. y S. Webb. 1995. A guide to the birds of México and Norther Central America. Oxford Univ. Press.
- Hillis, D. M., Mable, B. K. and Moritz, C. 1996. Applications of molecular systematics and the future of the field. In: Hillis, D. M., Mable, B. K., and Moritz, C., Editors, 1996. *Molecular Systematics* (second ed.), Sinauer, Sunderland, MA, pp. 515-543.
- Huelsenbeck, J. P. and Ronquist, F. 2002. Mr. Bayes, a program for the Bayesian inference of phylogeny. v.2.0b. Available at: <http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes/>.

- Ibáñez-Hernández, P.G. 2000. Variación geográfica de las poblaciones del turco real (*Momotus momota*), Momotidae, Aves. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Johnsgard, P. A. 1983. The Hummingbirds of North America. Smithsonian Institute Press. Washington. D. C.
- Joseph, L., and Omland, K. E. 2009. Phylogeography: its development and impact in Australo-Papuan ornithology with special reference to paraphyly in Australian birds. *Emu*, 109: 1-23.
- Kerhoulas, N. J., Arbogast, B. S. 2010. Molecular systematics and Pleistocene biogeography of Mesoamerican flying squirrels. *Journal of Mammalogy*, 91(3): 654-667.
- Lee, J. Y., and Edwards, S. V. 2008. Divergence across Australia's Carpentarian barrier: statistical phylogeography of the Red-backed Fairy Wren (*Malurus melanocephalus*). *Evolution*, 62:3117-3134.
- León-Paniagua, L., Navarro-Sigüenza, A. G., Hernández-Baños, B. E., Morales, J. C. 2006. Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 653-664.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25, 11:1451-1452.
- Linnaeus. 1758. *Syst. Nat.*, ed. 10, 1, p. 119.
- Maddison, D. P. and Maddison, W. P. 2003. MacClade 4, Release Version 4.06. <http://macclade.org>.
- McGuire, Jimmy A., Witt, Christopher C., Altshuler, Douglas L., Remsen, J.V. 2007. Phylogenetic Systematics and Biogeography of Hummingbirds: Bayesian and Maximum Likelihood Analyses of Partitioned Data and Selection of an Appropriate Partitioning Strategy. *Systematic Biology* 56:5:837-856.
- McGuire, J. A., Christopher C. W., J. V. Remsen Jr, R. Duddley, Douglas L. Altshuler. 2008. *Journal of Ornithology*.
- Milá, B., Smith, T. B., Wayne, R. K. 2007. Speciation and rapid phenotypic differentiation in the yellow-rumped warbler *Dendroica coronata* complex. *Molecular Ecology*, 16: 159-173.
- Morony, J. J. Jr., W. J. Bock y J. Ferrand Jr. 1975. Reference List of the Birds of the World. American Museum of Natural History, New York.
- Mulcahy, D. G., Morrill, B. H., Mendelson, J. R. 2006. Historical biogeography of lowland species of toads (*Bufo*) across the Trans-Mexian Neovolcanic Belt and the Isthmus of Tehuantepec. *J. Biogeogr.*, 33: 1889-1904.
- Navarro, A. G. S., Townsend, A. P., López-Medrano, E., Benítez-Díaz, H. 2001. Species limits in Mesoamerican *Aulacorhynchus* toucanets. *Wilson Bull.*, 113(4): 363-372.
- Navarro-Sigüenza, A. G., Townsend A. P., Arpad N., García-Deras, G. M., García-Moreno, J. 2008. Phylogeography of the *Buarremon* brush-finch complex (Aves, Emberizidae) in Mesoamerica.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Newton, M. A. and Raftery, A. E. 1994. Approximate Bayesian inference by the weighted likelihood bootstrap. *Journal of the Royal Statistical Society, series B*, 56:3-48.
- Nylander, J. A. A., Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., Nieves-Aldrey, J. L. 2004. Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. *Syst. Biol.* 53(1): 47-67.

- Page, R. D. M. and Holmes, E. C. 1998. Inferring Molecular Phylogeny. In, *Molecular Evolution, a phylogenetic approach*. Blackwell Science Ltd. USA.
- Peters, J.L. 1945. Check-list of birds of the world. Vol. 5. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- Posada, D. and Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the model of DNA Substitution. *Bioinformatics*. 14, 9:817-818.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Puebla-Olivares, F., Bonaccorso, E., Espinosa de los Monteros, A., Omland, K. E., Llorente-Bousquets, J. E., Townsend, A. P., Navarro-Sigüenza, A. G. 2008. Speciation in the emerald toucanet (*Aulacorhynchus prasinus*) complex. *The Auk*, 125(1):39-50.
- Rambaut, A. and Drummond, A. J. 2009. MCMC Trace Analysis Tool. Version v1.5.0. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Riddle, B. R., Hafner, D. J., Alexander, L. F., Jaeger, J. R. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *PNAS*, 97:26, 14438-14443.
- Ridgway, R. 1911. The birds of North and Middle America. *Bull. U.S. Nat. Mus.*, 50 (pt. 5): xxii-1-859.
- Rogers, A. R., and Harpending, H. C. 1992. Population growth make waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9(3): 552-569.
- Sanderson, M.J. 2002. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergent times: a penalized likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 101-109.
- Sanderson, M.J. 2003. R8s: Inferring absolute rates of molecular evolution and divergent times in the absence of molecular clock. *Bioinformatic*:19:301-302.
- Schuchmann, K. L. 1999. Family Trochilidae (Hummingbirds) pp. 468-535. En: *Handbook of the Birds of the World. Vol. 5. Barn-owls to Hummingbirds*. (Del Hoyo, E. A. Elliot and J. Sargatal, eds). Lynx Editions, Barcelona.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. 2000. Arlequin: a software for population genetics data analysis. User manual ver 2.000. Ver. 2.000. Geneva: Genetics and Biometry Lab. Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Shapiro L. H., and J. P. Dumbacher. 2001. Adenylate kinase intron 5: A new nuclear locus for avian systematics. *Auk* 118:248–255.
- Simon, E. 1921. *Histoire Naturelle des Trochilidés (Synopsis et Catalogue)*. Encyclopedia Roret, L. Mulo, París.
- Simon, E. and Hellmayr, C. E. 1908. Notes critiques sur quelques Trochilidae. *Novit. Zool.* 15: 1-12.
- Slatkin, M. And Hudson, R. R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Skutch, A. F. 1940. *Hylocharis leucotis leucotis*, Habits. In: Cleveland, B. A., Editor. *Life Histories of North American Cuckoos, Goatsuckers, Hummingbirds and their Allies*. Smithsonian Institution, United States National Museum. Bulletin 176. Washington. pp. 452-465.
- Sorenson, M. D., J. C. Ast, D. E. Dimcheff, T. Yuri, and D. P. Mindell. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet.*

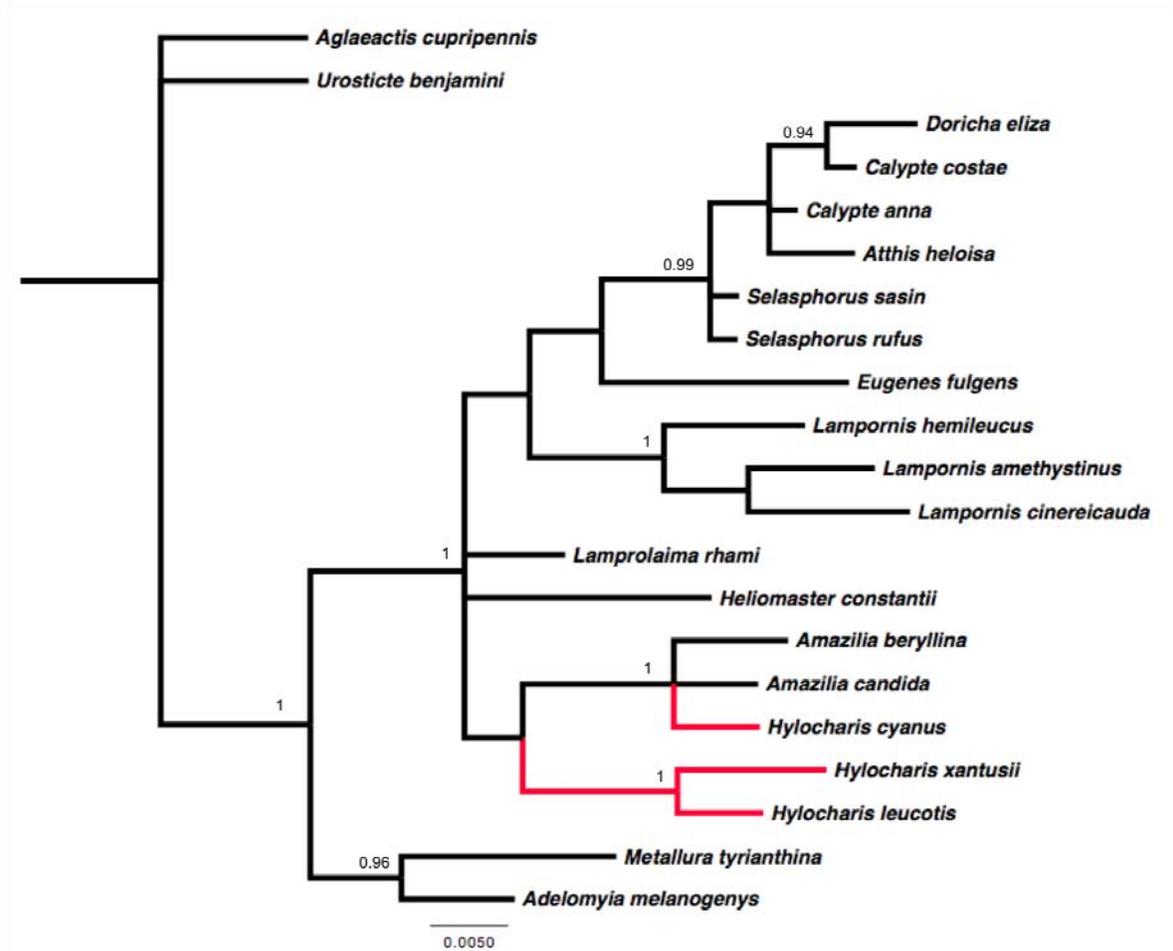
Evol. 12:105–114.

- Sullivan, J., Arellano, E., Rogers, D. S. 2000. Comparative phylogeography of Mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist*, 115(6):755-768.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn, Sinauer, Sunderland, MA.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24,8:1596-1599.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 24:4876-4882.
- Torres-Chávez, Miriam G., Navarro-Sigüenza, A. G. 2000. Los colibríes de México, brillo de la biodiversidad. *BioDIVERSITAS* 5: 28: 1-6.
- Vázquez-Miranda, H., Navarro-Sigüenza, A. G., Omland, K. E. 2009. Phylogeography of the rufous-naped wren (*Campylorhynchus rufinucha*): speciation and hybridization in Mesoamerica. *The Auk* (0):1-12.
- Vieillot, 1818, *Nouv. Dict. Hist. Nat.* (nouv. éd) 24: 101.
- Weir, B. S. 1996. Intraspecific differentiation. In: Hillis, D. M., Mable, B. K., and Moritz, C., Editors, 1996. *Molecular Systematics* (second ed.), Sinauer, Sunderland, MA, pp. 385-390.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159.
- Zarza, E., Reynoso, V. H., Emerson, B. C. 2008. Diversification in the northern neotropics : mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 17 : 3259-3275.
- Zink, R. M. 1997. Phylogeographic Studies of North American Birds. In : Mindell, D. P., Editor. *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego. pp. 301-324.

APÉNDICE I

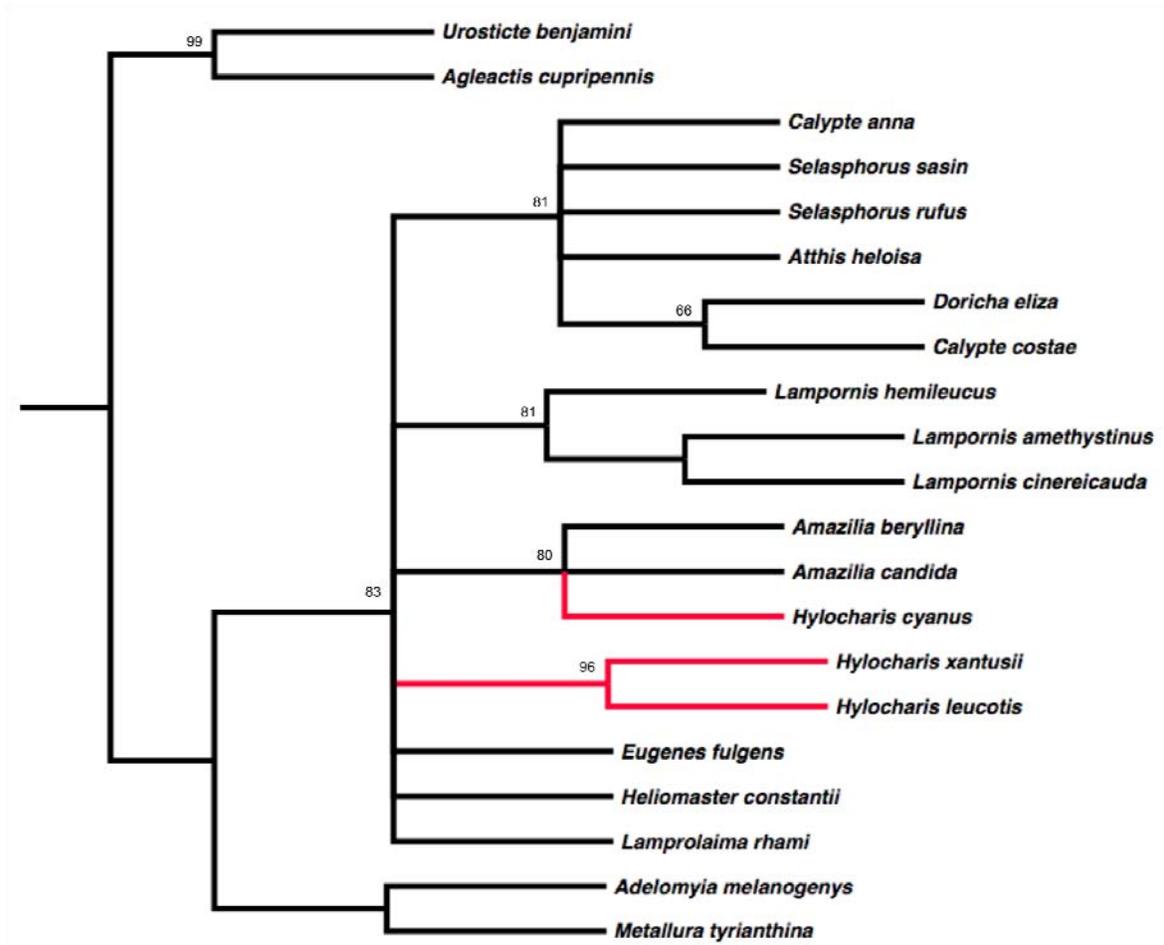
RECONSTRUCCIONES FILOGENÉTICAS: CAPÍTULO I.

C-MOS: INFERENCIA BAYESIANA



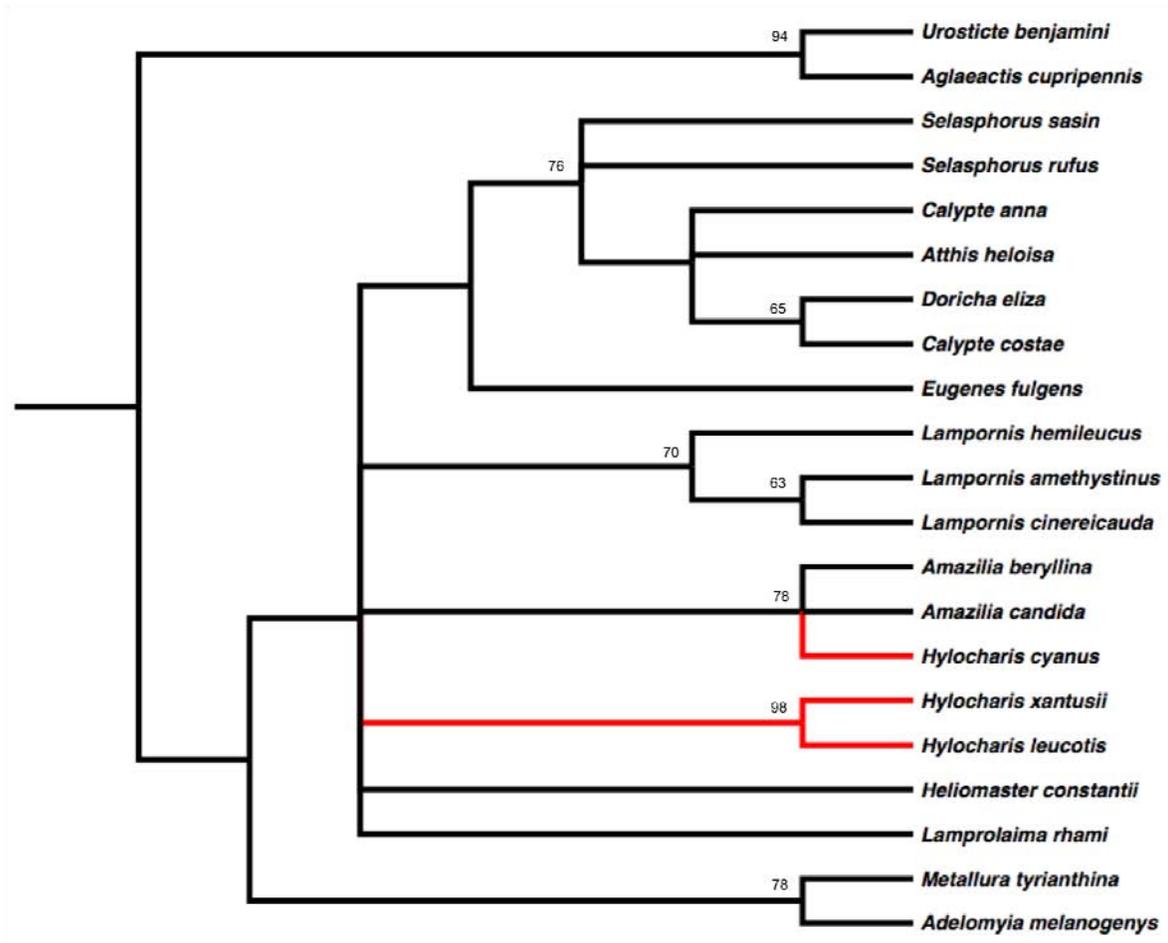
Reconstrucción filogenética para 21 especies de colibríes, con base en un análisis del gen nuclear C-mos, resultado de un consenso bayesiano. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de probabilidad posterior mayores a 0.94.

C-MOS: MÁXIMA PARSIMONIA



Reconstrucción filogenética para 21 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima parsimonia para el gen nuclear C-mos, resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

C-MOS: MÁXIMA VEROSIMILITUD



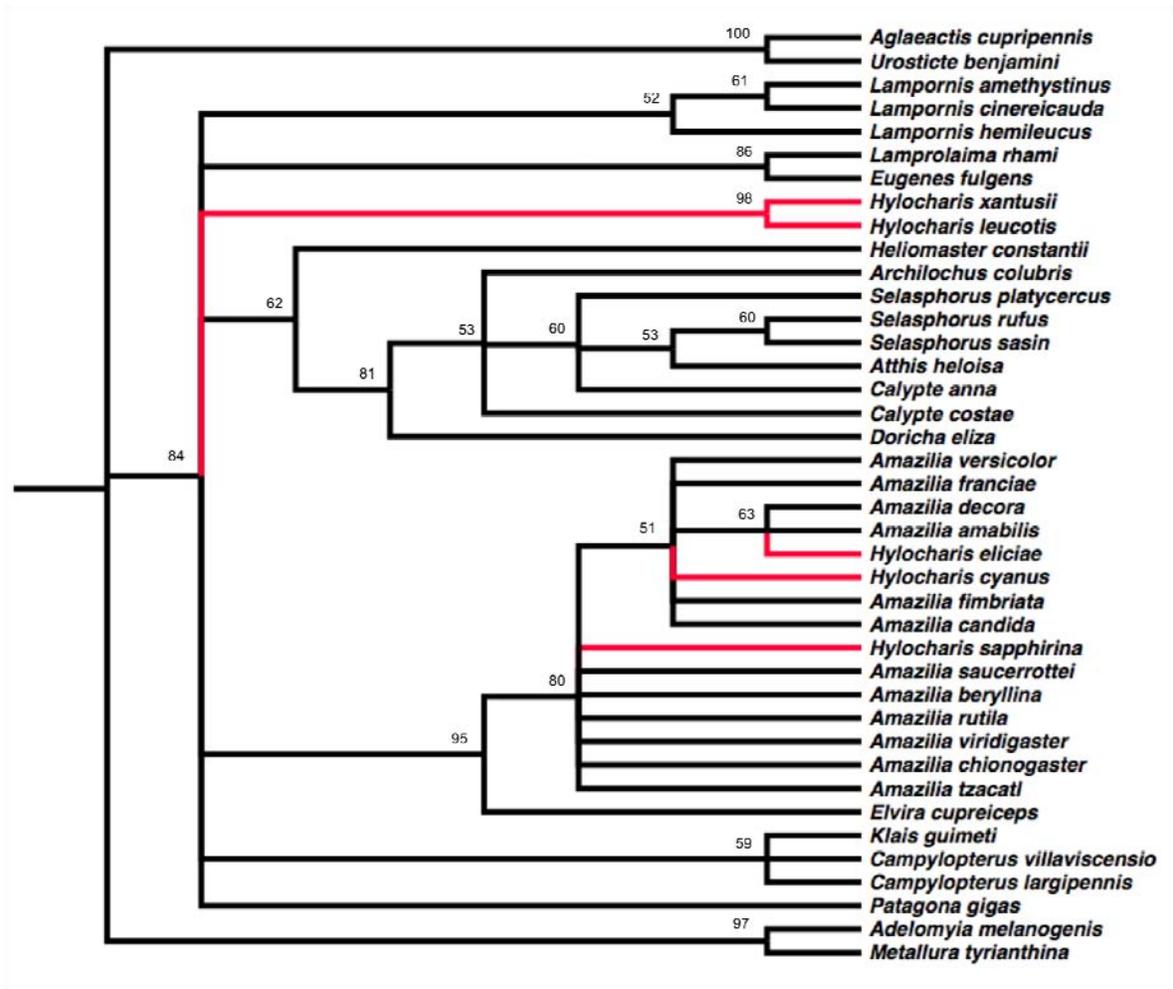
Reconstrucción filogenética para 21 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima verosimilitud para el gen nuclear C-mos, resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

AK5: INFERENCIA BAYESIANA



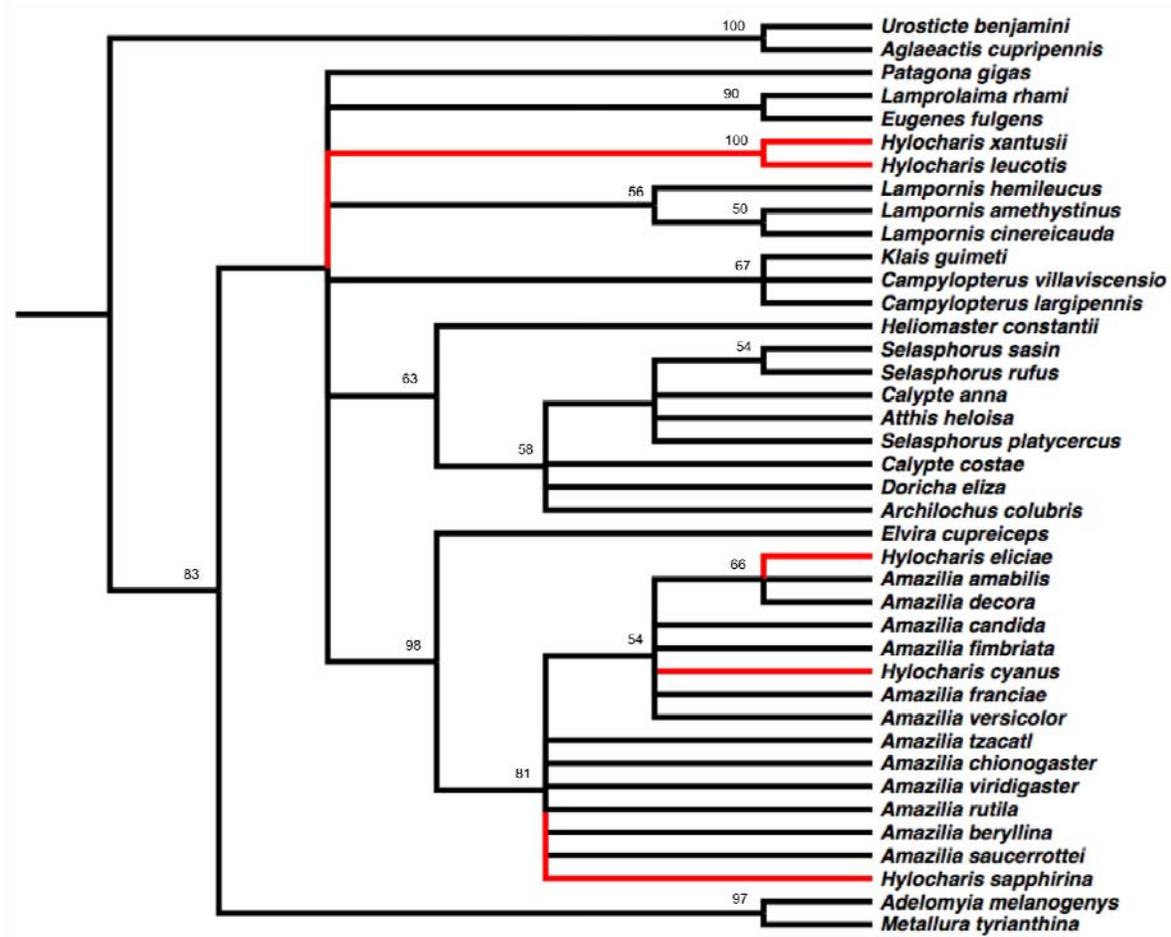
Reconstrucción filogenética para 40 especies de colibríes, con base en un análisis del gen nuclear AK5, resultado de un consenso bayesiano. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de probabilidad posterior mayores a 0.91.

AK5: MÁXIMA PARSIMONIA



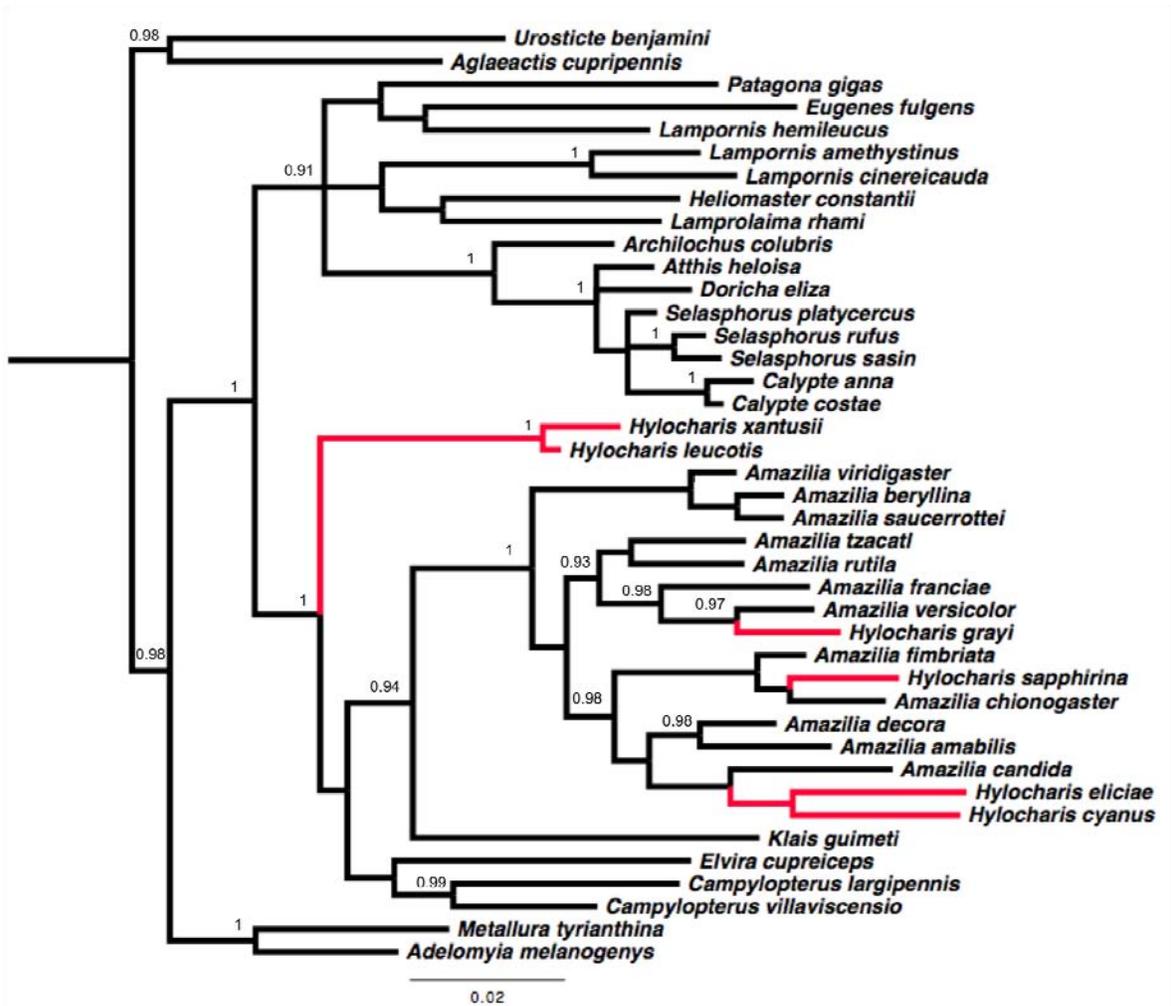
Reconstrucción filogenética para 40 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima parsimonia para el gen nuclear AK5, resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

AK5: MÁXIMA VEROSIMILITUD



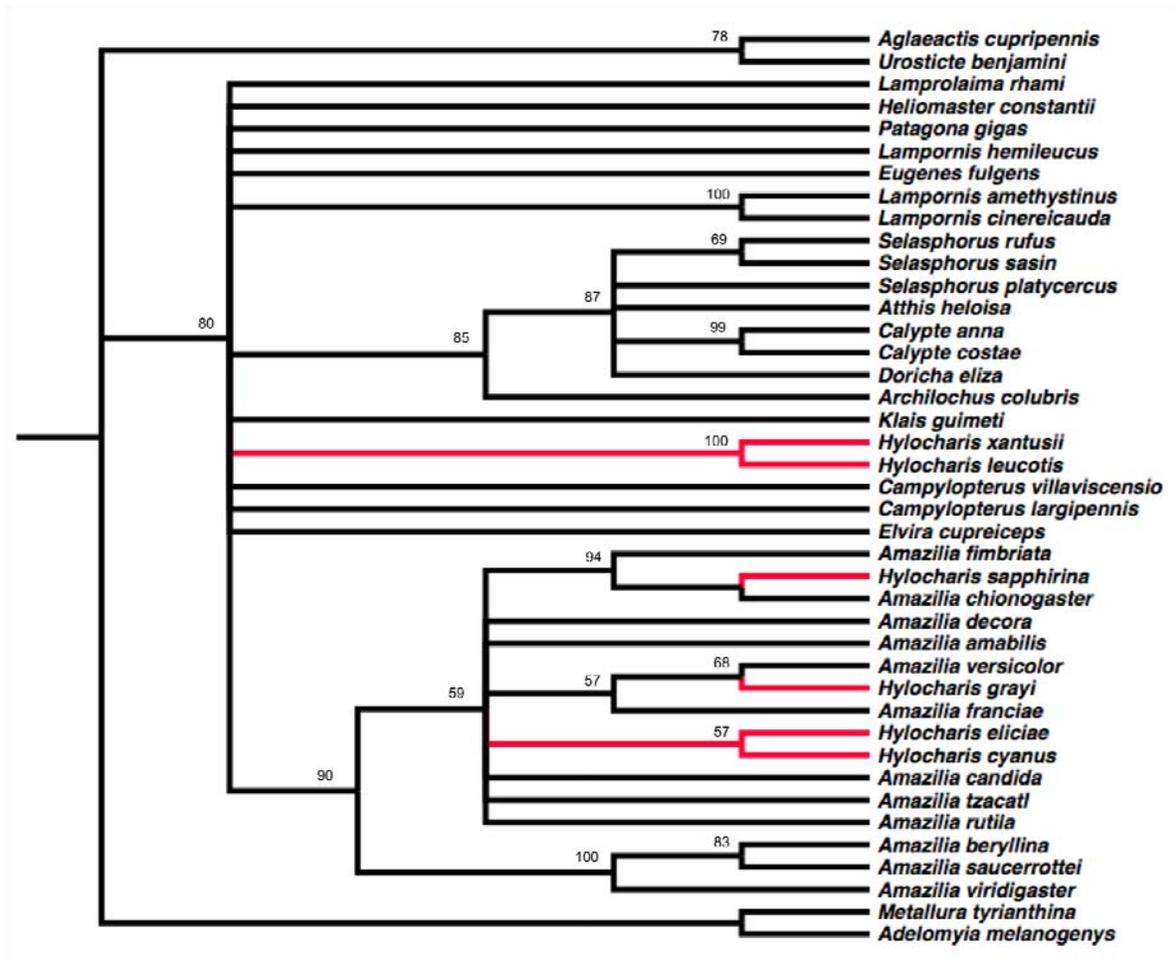
Reconstrucción filogenética para 40 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima verosimilitud para el gen nuclear AK5, resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

ND2: INFERENCIA BAYESIANA



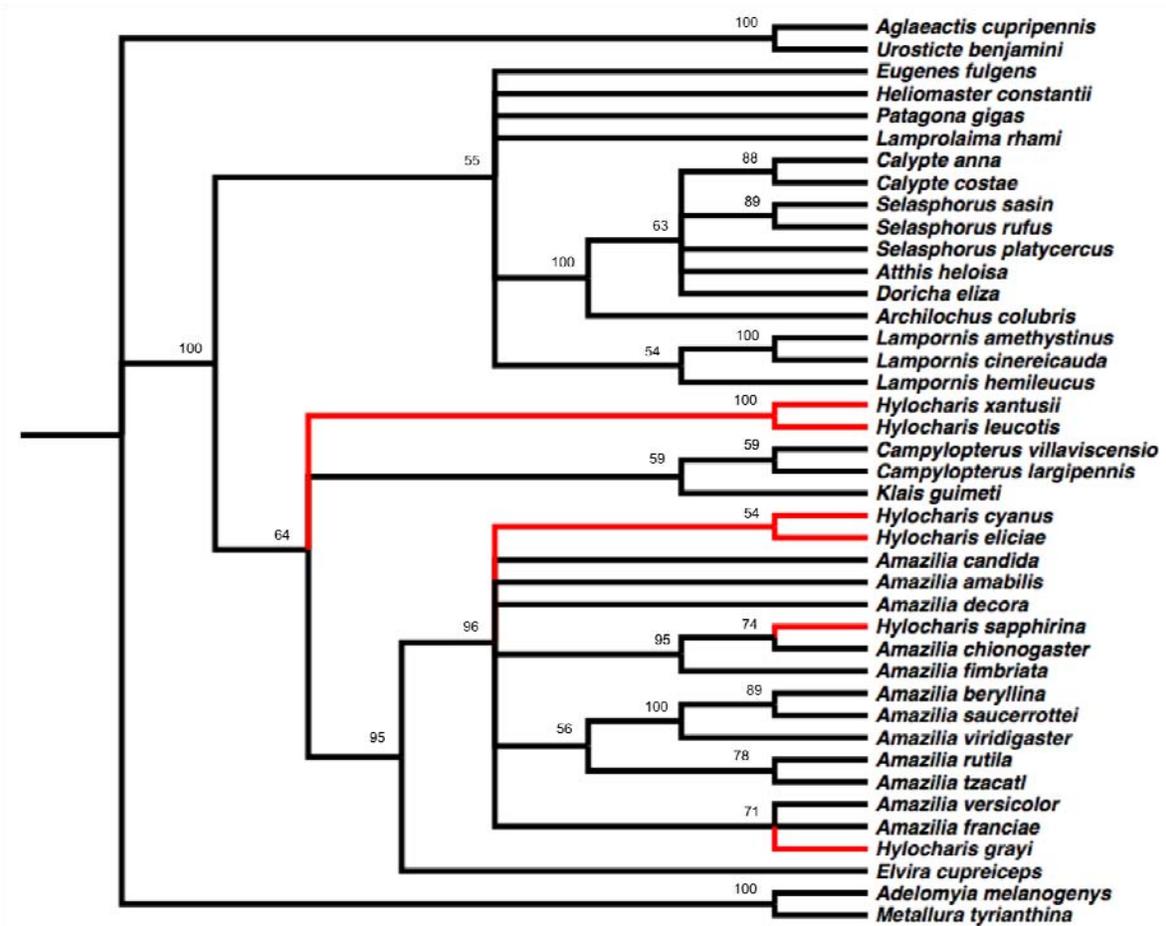
Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis del gen mitocondrial ND2, resultado de un consenso bayesiano. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de probabilidad posterior mayores a 0.91.

ND2: MÁXIMA PARSIMONIA



Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima parsimonia para el gen mitocondrial ND2 resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

ND2: MÁXIMA VEROSIMILITUD



Reconstrucción filogenética para 41 especies de colibríes, con base en un análisis de máxima verosimilitud para el gen mitocondrial ND2, resultado de un consenso de mayoría. Las ramas correspondientes a las especies del género *Hylocharis* se presentan en color rojo. Se indican los valores de bootstrap mayores a 50.

APÉNDICE II.

MUESTRAS Y LOCALIDADES: CAPÍTULO II

Números de colección y localidades de las 108 muestras de la especie *Hylocharis leucotis* utilizadas en éste estudio. También se presentan las muestras correspondientes al grupo hermano (*Hylocharis xantussi*, 8 muestras) y del grupo externo (*Hylocharis eliciae*, 2 muestras).

Población ID	Número de colección	Especie	Localidad	Estado	País	Georreferencias
<i>H. eliciae</i> Grupo externo	CHIS037 CHIS061 EU042562	<i>H. eliciae</i> (grupo externo)	Pijijiapan, Rancho Lluvia de Oro 900 m al NW de Ranchería Las Guadalupe.	Chiapas	México	15°44'41.79"N; 93°06'18"W
<i>H. xantusii</i> Grupo hermano	CONA698 CONA701 CONA702 CONA727 CONA732 CONA739 CONA740 CONA742	<i>H. xantusii</i> (grupo hermano)	San Dionisio, 2 Km al NW.	Baja California Sur	México	23°33'30.99"N; 109°51'56.01"W
SMOccChi	CHI084 CHI085	<i>H. leucotis</i>	Cumbres de Güerachi.	Chihuahua	México	26°42'52.70"N; 107°18'51.33"W
SMOrNL	MM736 MM744	<i>H. leucotis</i>	San Antonio Peña Nevada, 13.5 Km al NE.	Nuevo León	México	23°50'25.8"N; 99°53'47.4"W
SMOccDgo	IALL201 IALL202 IALL203 IALL206 IALL207 IALL210 IALL212 IALL220 IALL227 IALL229 IALL231 IALL256	<i>H. leucotis</i>	-Pueblo Nuevo, 3.5 Km al E de El Salto.	Durango	México	23°46'19.88"N; 105°19'18.80"W

SMOccJal	JK03-199 JK03-200 JK03-201 JK03-202 JK03-203 JK03-204 JK03-216 JK03-217 JK03-222 JK03-321 JK03-322 JK03-323 JK03-324 JK03-353 JK03-354 JK03-356	<i>H. leucotis</i>	Sierra de Bolaños, 3 km S, 11.5 km al W, Rancho Carracito.	Jalisco	México	21°49'41.88"N; 103°53'24"W
	JK07-363 MM343 MM344 MM345 MM351 MM375 MM381 MM403 MM408 MM409 MM410 MM411 MM427	<i>H. leucotis</i>	Nuevo San Juan (Mpio), 12 km al W.	Michoacán	México	19°23'06.72"N; 102°14'24.71"W
ENTMor	GMS1460 GMS1500 GMS1501 GMS1502 JK04-802 JMD451 JMD476	<i>H. leucotis</i>	Huitzilac 11 km al NE, Fierro del Toro.	Morelos	México	19°05'12.48"N; 99°11'37.68"W
SMSGro	AMT031 AMT050 AMT061 AMT114 AMT135 AMT139 AMT145 JK04137 JK04138 JK04139	<i>H. leucotis</i>	Carrizal de Bravo	Guerrero	México	17°35'33.39"N; 99°50'17.48"W
MOax	BRB1054 BRB1055 BRB1056 BRB1087 BRB1137 BRB1147 BRB1148 MT321 MT322 MT323 MT372 MT380	<i>H. leucotis</i>	- La Esperanza. - Ixtlan, 4 km al E, Finca Boone Halberg.	Oaxaca	México	17°19'34.32"N; 96°27'55.07"W

SNChis	BEHB08003 BEHB08-007 BEHB08-012 BEHB08-018 BEHB08-022 BEHB08-024 BEHB08-027 BEHB08-033 BEHB08-034 BEHB08-035 BEHB08-036 BEHB08-037 BEHB08-050 BEHB08-052	<i>H. leucotis</i>	Cerro Huitepec.	Chiapas	México	16°43'40.25"N; 92°41'47.03"W
MGtm	GAV2383 JK02-125 JK02-128 JK02-131 JK02-137 JK02-169	<i>H. leucotis</i>	Santa María de Jesús 5km al SW, Finca de Santa María.	Departamento Quetzaltenango	Guatemala	14°43'00.12"N; 91°32'06"W
MSalv	8178 8245 8267 9392 9405 9435 7830 7832 8952 8953 8972 9106 4938 5013	<i>H. leucotis</i>	- Parque Nacional Montecristo - Bosque La Montañona - Cantón Joya, El Matazano, Cerro Cacahuatique - Cantón Llano Grande, Caserío La Montañona	Chalatenango	El Salvador	14°00'23.26"N; 89°00'23.19"W 14°07'58.79"N; 88°54'46.79"W 13°45'43.10"N; 88°11'60.00"W 14°07'44.39"N; 88°54'46.799"W

APÉNDICE III

ESTRATEGIAS DE PARTICIÓN: CAPÍTULO II

A) GENES COMBINADOS.

Modelo: TIM3+I

PARÁMETROS	PARTICIONES
	I
Revmat	1
Statefreq	2
Topology	3
Brlens	4

B) ATP+ND2

Modelo: TIM3+G (ATP), TrN+G (ND2)

PARÁMETROS	PARTICIONES	
	I	II
Revmat	1	2
Statefreq	3	4
Shape	5	6
Topology	7	7
Brlens	8	8

C) COMBINADOS (codones)

Modelo: TPM2uf+G (1a), TIM2+G (2a), TIM1+G (3a)

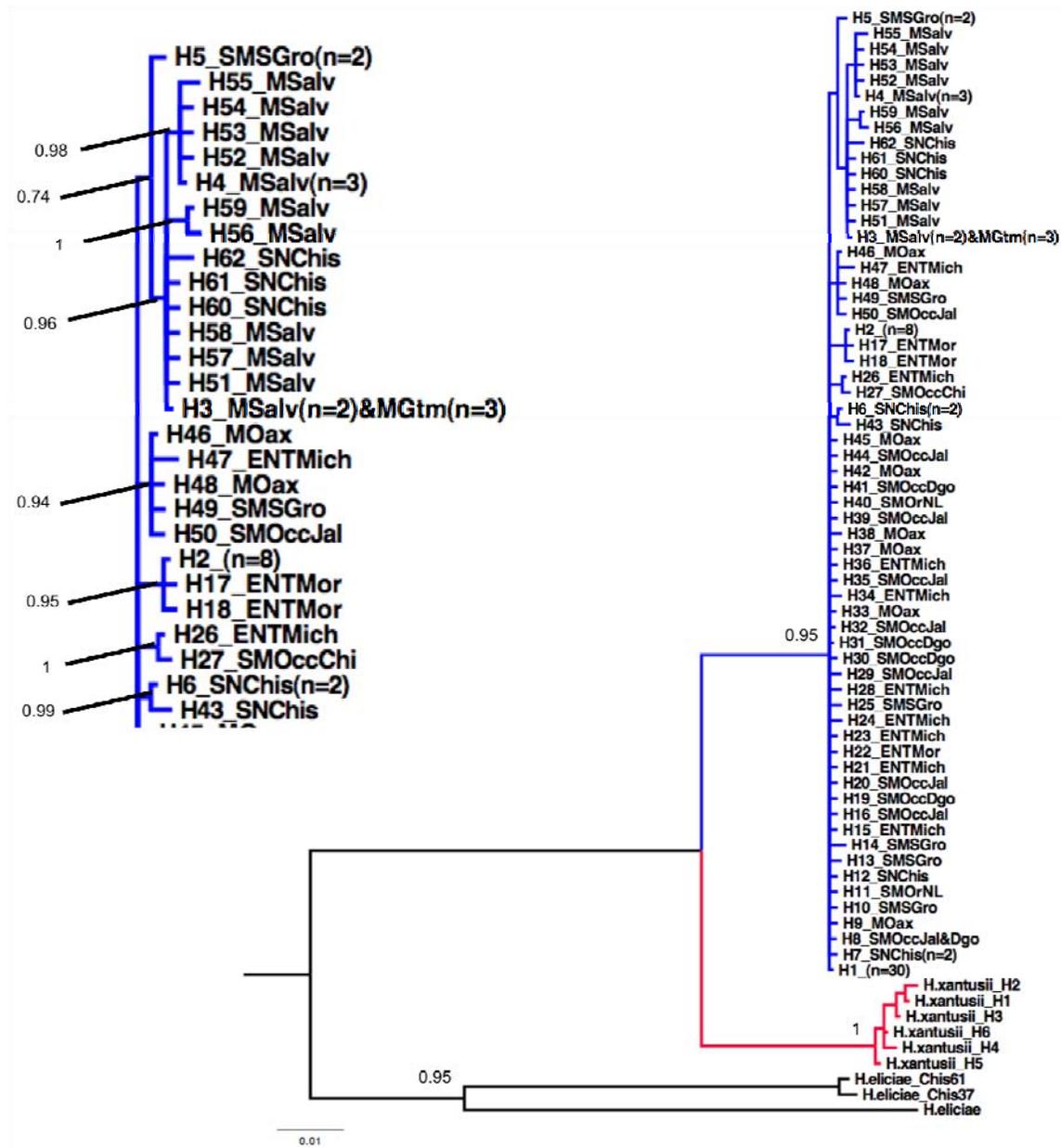
PARÁMETROS	PARTICIONES		
	I	II	III
Revmat	1	2	3
Statefreq	4	5	6
Shape	7	8	9
Topology	10	10	10
Brlens	11	11	11

D) ATP (codones) + ND2 (codones)

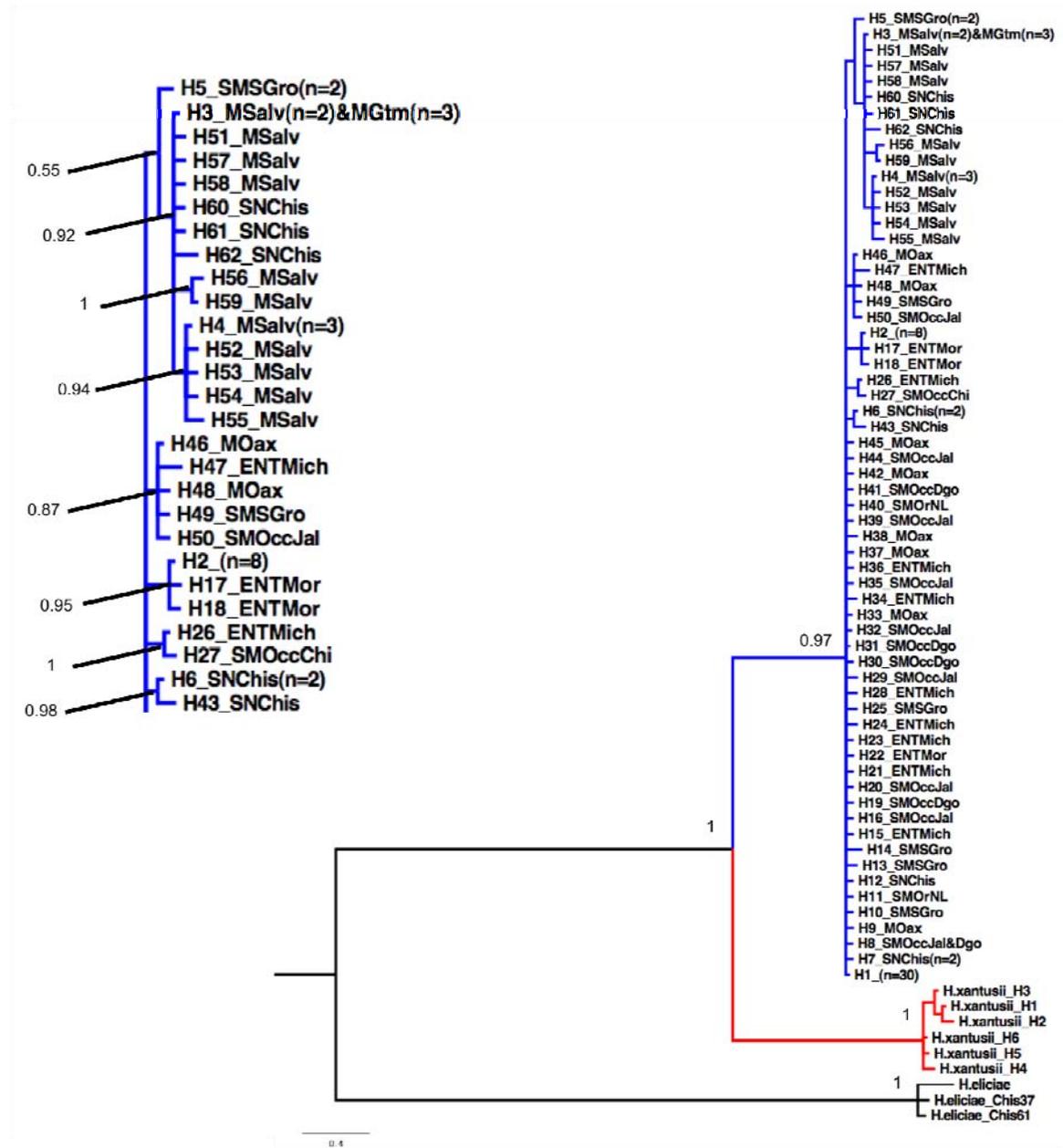
Modelo: TPM3uf (ATP1a, ATP3a+G), TrN+I (ATP2a), TPM2uf+G (ND2-1a), TPM1uf+I (ND2-2a), TIM1+I (ND2-3a)

PARÁMETROS	PARTICIONES					
	I	II	III	IV	V	VI
Revmat	1	2	3	4	5	6
Statefreq	7	8	9	10	11	12
Shape	-	-	13	14	-	-
Topology	15	15	15	15	15	15
Brlens	16	16	16	16	16	16

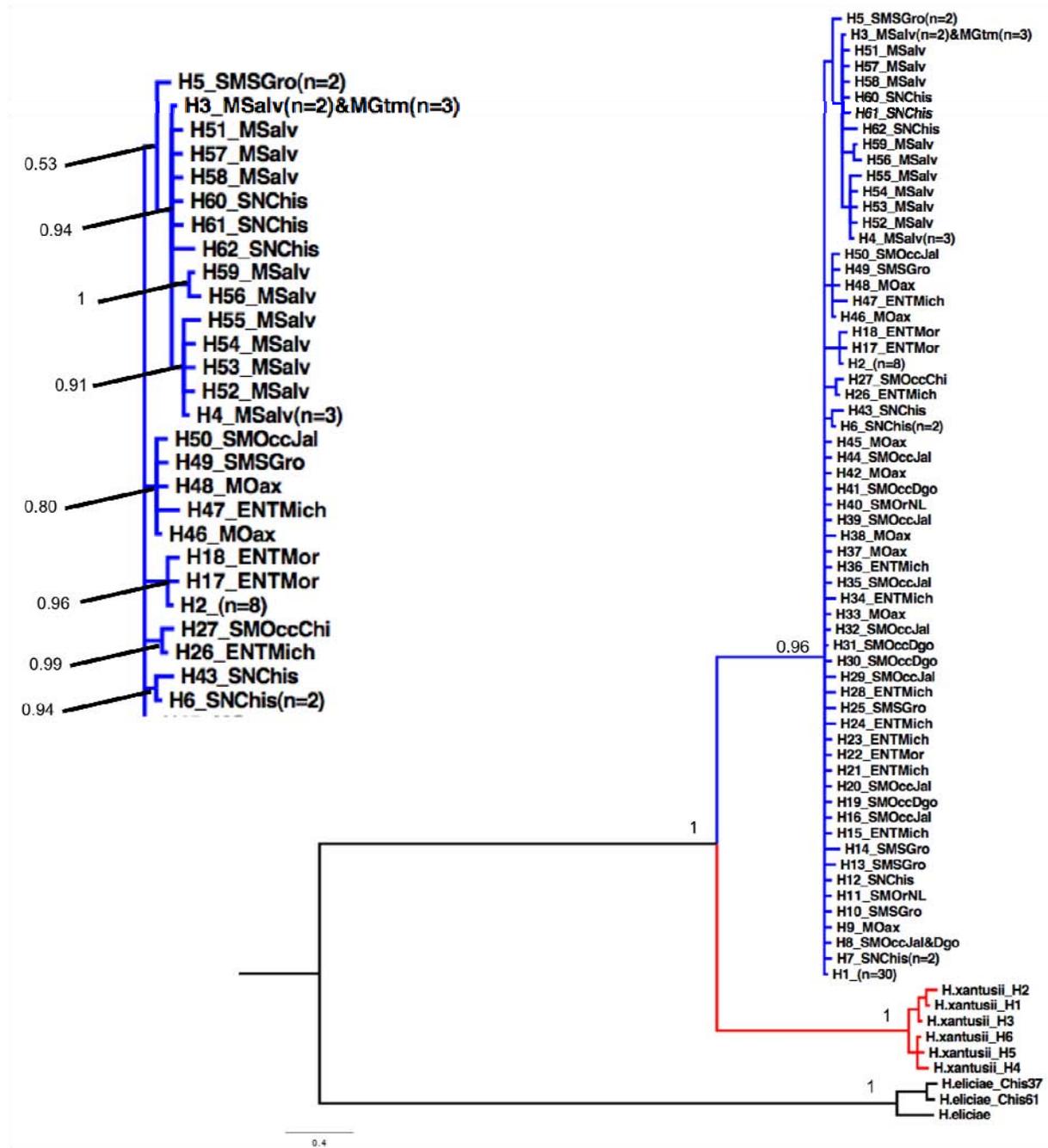
A) Genes combinados



B) ATP+ND2



C) COMBINADOS (codones)



D) ATP (codones) + ND2 (codones)

