



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluando el uso del Código de Barras (COI – Citocromo
c Oxidasa subunidad I) dentro del complejo
Chlorospingus ophthalmicus (Aves: Thraupidae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

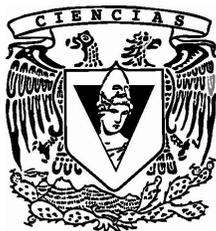
P R E S E N T A:

SANDRA MARISOL RAMIREZ BARRERA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS

2012





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del Alumno
Ramírez
Barrera
Sandra Marisol
56 13 49 48
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
301220576
2. Datos del Tutor
Dra.
Blanca Estela
Hernández
Baños
3. Datos del Sinodal 1
Dra.
Livia Socorro
León
Paniagua
4. Datos del Sinodal 2
Dr.
Luis Antonio
Sánchez
González
5. Datos del Sinodal 3
Dr.
Alejandro
Zaldívar
Riverón
6. Datos del Sinodal 4
M. en C
Fabiola
Ramírez
Corona
7. Datos del Trabajo Escrito
Evaluando el uso del Código de Barras (COI – Citocromo c Oxidasa subunidad I) dentro del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* (Aves: Thraupidae)
83 p.
2012

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de los proyectos, **PAPIIT** IN 202509-2 “Filogenia y variación genética dentro del complejo *Hylocharis leucotis* (Aves: Trochilidae) utilizando secuencias de genes mitocondriales y nucleares”, **CONACyT** 0090774 “Evolución molecular filogenia y filogeografía de los colibríes mexicanos” y **CONABIO** HB035 “Códigos de Barras de ocho complejos de especies de aves mexicanas”. Además de la beca para la Elaboración de Tesis, otorgada por el proyecto **PAPIIT** IN 225611-3 “Filogenia molecular y filogeografía del complejo *Eugenes fulgens* (Aves: Trochilidae) utilizando genes mitocondriales y nucleares”.

A mi familia, la mejor.

Mis padres, Guillermo Ramírez Piedad y Sandra Barrera Martínez, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi formación académica y personal, por su infinita paciencia, su confianza y su cariño. Sobre todo, porque su ejemplo de trabajo y esfuerzo han sido y serán la mayor inspiración para mí, los amo y admiro muchísimo.

Mis hermanos Jessica y Alejandro, por compartir conmigo la alegría de elegir nuestro propio camino, por acompañarme en él y por ser mis mejores amigos también.

A mis abuelos, Guillermina Martínez y Manuel Barrera, por todo el cariño con el que me he visto beneficiada durante toda mi vida, por consentirme y confiar en mí a cada paso. Siempre los tengo presentes.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por el privilegio que ha significado para mi la formación universitaria recibida.

A la Dra. Blanca Estela Hernández Baños, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza que ha tenido en mí a lo largo del desarrollo de este proyecto, por su generosidad académica y personal. Porque no todo lo que nos ha enseñado se encuentra en los libros. Y porque gracias a usted he podido concluir este ciclo, ¡al fin!

A la M en C. Fabiola Ramírez Corona por aceptar instruirme en la realización de la fase experimental de este proyecto, por facilitarme el uso de las instalaciones del laboratorio experimental a su cargo, por el apoyo, el cariño, la paciencia, la confianza que siempre demostró tener conmigo y finalmente por aceptar tan amablemente formar parte de mi jurado evaluador. Muchas gracias.

Al los miembros del jurado, Dra. Livia Socorro León Paniagua, Dr. Luis Antonio Sánchez González, Dr. Alejandro Zaldívar Riverón y la M en C Fabiola Ramírez Corona, por el compromiso y la dedicación con la que cada uno revisó mi trabajo, por los valiosos comentarios que sirvieron para el mejoramiento del mismo y por la amabilidad y buena disposición con la que siempre conté de su parte.

A mis compañeros tesisistas con los que comparto más que el espacio de trabajo, Meli, Chucho Pertusi y Jesús Santiago por su amistad, su compañerismo, su alegría, su ayuda y todas las anécdotas y charlas compartidas en este tiempo.

A Luz por el apoyo brindado en diversos momentos de la realización de esta tesis, por aceptar hacer una crítica preliminar de mi trabajo y por los valiosos comentarios y sugerencias hechos sobre la estructura y redacción del mismo.

A todos los miembros del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias, “Alfonso L. Herrera”, por la oportunidad de conocerlos y todas las facilidades que me han dado al permitirme aprender un poco de todo lo que saben.

Y por supuesto, a los que han sido mis amigos a lo largo de ésta y otras muchas carreras en la vida, porque con ustedes he comprobado que la amistad sólo puede ser construida con aquellas personas por las que sentimos profunda admiración: Cocol, Fabián Carmona, Daniel Cruz, Fabiola Villegas, José Antúnez y Alfredo López, gracias por ser la otra mitad de mi familia, por todos los momentos compartidos, porque toda la diversión que conozco empieza y termina con ustedes.

Por supuesto, a mi amigo Héctor Máximo, por estar en el momento y el lugar indicado, por salvarme del limbo y por darme el ejemplo de cómo se lucha en la vida. Te admiro, lo sabes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	1
1.1 El Código de Barras.....	5
1.2 El complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	14
Las subespecies de México	18
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS.....	22
4. MÉTODO	23
4.1 Muestreo del complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	23
4.2 Trabajo de Laboratorio	26
Extracción de DNA	26
Amplificación y Secuenciación	27
4.3 Análisis de Datos	30
Análisis de secuencias	30
Variación genética	31
Análisis de Distancias Genéticas.....	31
Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML)	33
Inferencia Bayesiana (IB).....	33
5. RESULTADOS	35
Variación genética	35
Composición Nucleotídica	39
Análisis de Distancias Genéticas.....	39
Matriz de distancias genéticas	39
Límites de especies a partir del Código de Barras.....	41

Reconstrucciones Filogenéticas.....	45
Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML)	45
Inferencia Bayesiana (IB).....	45
6. DISCUSIÓN	48
Las secuencias del gen COI.....	48
Los límites de especies del Código de Barras	51
Hipótesis de relaciones filogenéticas.....	56
7. CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	62
Consultas en Internet	71
APÉNDICES	72
Apéndice I.....	72
Apéndice II.	73
Apéndice III.	78
Apéndice IV.....	81
Apéndice V.	82
Apéndice VI.....	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las 5 especies propuestas dentro del complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	20
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar CO1.	28
Tabla 3. Tabla de haplotipos del complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i> de México.....	37
Tabla 4. Intervalos de distancias genéticas entre las subespecies del complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i> de México.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución y puntos de muestreo del complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	25
Figura 2a. Árbol de Neighbor-Joining para el complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	43
Figura 2b. Árbol de Neighbor-Joining para el complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i> más 4 especies género <i>Chlorospingus</i>	44
Figura 3. Árbol de Inferencia Bayesiana.	47

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En el ámbito científico, toda investigación biológica depende en gran medida del diagnóstico o identificación de las especies, éstas representan la unidad básica de las clasificaciones taxonómicas y agrupan a todos los organismos del mundo vivo (i. e. plantas, animales, hongos), de diferente forma según los conocimientos aplicados, el grupo de estudio y el punto de vista desde el cual son analizados (Valencia 1999), utilizando para ello, diferentes metodologías que, al ajustarse al campo de estudio desde la cual es explorada la diversidad biológica, ayudan en la determinación taxonómica y el estudio de las relaciones entre los organismos (Pesenti 2006). De tal manera que, en disciplinas como la ecología, genética, paleontología, microbiología y aún en la taxonomía, los conceptos de especie utilizados varían dependiendo del tipo de caracteres asociados al método, por el cual es clasificada una entidad biológica, utilizando para ello criterios tan diversos como pueden ser, comportamiento, distribución geográfica, afinidad reproductiva, tipos de alimentación, fisiología (Valencia 1999, Cerritos 2007).

Es por esta razón principalmente, que en la actualidad no existe un concepto de especie que pueda ser aplicable de manera universal a todos los organismos, pues por definición, éstas presenta características intrínsecas como reproducirse, jugar un papel ecológico, interactuar con otros organismos, tener una base genética, presentar cambios y variaciones especio-temporales, que hacen más difícil la delimitación objetiva y universal de lo que es una especie (Valencia 1999).

A pesar de ello, en la actualidad se estima que son alrededor de 1.75 millones de especies en todo el mundo, las que cuentan con una descripción y caracterización taxonómica formal (Hawksworth & Kalin-Arroyo 1995, Tangle 1997). Una labor notable, si tomamos en cuenta que la morfología ha sido la base del diagnóstico taxonómico desde que fue propuesto por Linneo, hace poco más de 250 años (Stoeckle & Hebert 2008).

El estudio de las variaciones fenotípicas que presentan algunos caracteres morfológicos de importancia taxonómica ha sido, hasta hace unos años, uno de los métodos más utilizados de identificación, y está basado en el concepto taxonómico de especie, es decir, describe “unidades fenéticas discretas que están separadas de otras por su discontinuidad en variación” (Crisci 1994, Valencia 1999). Este método presenta algunas características que lo hacen, aplicable en situaciones de identificación en campo, práctico al estar basado en caracteres externos, además de funcional u operacional que se basa en criterios demostrables empíricamente. Pero también ampliamente subjetivo, al no establecer cuando unos individuos son suficientemente distintos de otros, es decir, un grado de diferencia entre dos unidades taxonómicas que las haga merecedoras de la categoría de especie (Valencia 1999).

Es por ello que, tener una base morfológica como única herramienta para describir la diversidad de la vida tiene sus límites, pues los caracteres que distinguen a las especies, a menudo, presentan matices que pueden llegar a ser tan sutiles entre dos especies morfológicamente similares, como en el caso de las especies gemelas o crípticas (morfológicamente indistinguibles pero aisladas reproductivamente), donde estudios

morfológicos exhaustivos, no resultan suficientes para determinar que en realidad se trata de dos linajes evolutivamente independientes (Sáez 2009).

Aunado a ello, existen también algunas otras características que han complicado la identificación morfológica, como en los casos donde existe una amplia plasticidad fenotípica de los caracteres empleados, así como las identificaciones basadas en claves taxonómicas que generalmente incluyen solo en una etapa particular de la vida del organismo, lo que dificulta la identificación tanto de los ejemplares juveniles como de los neonatos, y aunque todos estos conflictos resultan inherentes al método, pueden de hecho, acarrear importantes errores en la clasificación biológica (Knowlton 1993, Jarman & Elliott 2000, Hebert *et al.* 2003, Hebert *et al.* 2004b, Omland *et al.* 2006, Rubinoff *et al.* 2006), razón por la cual, actualmente se han convertido en los puntos débiles más criticados de la taxonomía tradicional, pues ahora se sabe que estas inconsistencias son más comunes de lo que se pensaba (Rojas 1992).

Estas limitantes antes mencionadas del sistema de identificación morfológico, remarcan la necesidad de adoptar un nuevo enfoque para el reconocimiento taxonómico, que ayude a dilucidar y establecer los límites de especie de una manera más práctica (Hebert *et al.* 2003a, Hebert *et al.* 2004a), sin necesidad de recurrir al empleo de conceptos como el de “subespecie”, término utilizado en taxonomía para designar la variación geográfica y clinas presentes dentro de una misma especie (Mayr 1982, Gill 1982), que limitan la exploración de los patrones de variación que estas poblaciones han seguido a lo largo de su historia evolutiva, creando numerosos huecos de información que resultan

verdaderamente importantes en el estudio de la variación geográfica de las especies (Storer 1982).

En la búsqueda de nuevos caracteres útiles para el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas, particularmente entre grupos o especies cercanamente relacionadas, la incorporación de técnicas como el análisis de variación a nivel molecular (secuencias de DNA), ha permitido el establecimiento de los límites de especies a partir del análisis de variación entre las secuencias de genes, que pueden ser de origen nuclear y/o mitocondrial (Avice 1987), donde las relaciones genealógicas se representan en un diagrama o árbol de genes (filogenia), que refleja el grado de parentesco que existe entre las secuencias analizadas (Martínez 2007).

Es este grado de parentesco, el que permite un reconocimiento de los límites de especies bajo un enfoque molecular, tomando como base conceptual la definición de *especie filogenética* propuesta por Mishler y Donoghue (1982) y retomado posteriormente por Mishler y Brandon (1987). Según la cual, ésta representa “el taxón inclusivo más pequeño reconocido en clasificación, en el cual los organismos son agrupados por su evidencia de monofilia”, que los hace “diagnosticablemente distintos de otras especies, al formar una rama basal bien diferenciada dentro del árbol filogenético” (Cracraft 1987, Ereshefsky 1989). Bajo este concepto, el carácter monofilético de la evidencia molecular, es más inclusivo que los entrecruzamientos de las poblaciones, característica que lo hace aplicable, incluso a organismos con reproducción asexual (Valencia 1999).

Esta nueva disciplina de la taxonomía molecular no solo es la mejor fuente de información filogenética entre y dentro de las especies crípticas (Sáez 2009, Navarro-Sigüenza & Hernández-Baños 1999), sino que también ha permitido explorar de manera cada vez más efectiva las relaciones de ancestría-descendencia a niveles supraespecíficos, para tratar de formular hipótesis sobre sus eventos de especiación, el origen de su diversidad y sus relaciones filogenéticas (García-Deras 2003). Dirigiendo esta información hacia la realización de pequeños sistemas de identificación taxonómica basados en caracteres moleculares, (Bucklin *et al.* 1999, Trewick 2000). Sin embargo, esta práctica no ha logrado establecer un criterio taxonómico integral, pues los estudios moleculares actuales abarcan una gran cantidad de marcadores, que son utilizados de diferente manera según el grupo de estudio y la escala temporal en la que se explora su historia evolutiva (Navarro-Sigüenza & Hernández-Baños 1999).

1.1 El Código de Barras

“Código de Barras de la Vida” es el nombre que lleva el proyecto de bio-identificación taxonómica molecular propuesto en el año 2003 por el Dr. Paul D. N. Hebert, de la Universidad de Guelph, Canadá y su equipo de colaboradores (Hebert *et al.* 2003a). El principal objetivo de este proyecto internacional es lograr la identificación de todas las especies animales a partir del análisis de secuencias de un fragmento estandarizado de DNA mitocondrial. Debe su nombre a que fue concebido como un método capaz de discriminar a las especies a partir del orden variable de las líneas gruesas y finas que

formarían un código de barras – como el de los productos del supermercado – donde la forma de dichas líneas son el resultado de las diferentes combinaciones en las que se pueden encontrar los nucleótidos a lo largo de la cadena de DNA, caracterizada por ser, suficientemente larga como para contener variabilidad suficiente que permita hacer una discriminación taxonómica a partir de ella, y a la vez, lo suficientemente corta para garantizar la eficiencia del método dada su fácil obtención en el laboratorio (Stoeckle & Hebert 2008).

En animales, el gen seleccionado como Código de Barras, es un fragmento de aproximadamente 648 pares de bases, que codifica la formación de la enzima llamada Citocromo c Oxidasa subunidad 1 (gen CO1). Este fragmento genético es tan pequeño que la secuencia de sus nucleótidos puede ser descifrada con relativa facilidad a partir de la tecnología actual. Y aunque resulta ser una fracción muy pequeña de DNA, su variabilidad entre grupos biológicos captura la información suficiente para hacer una correcta discriminación de las especies (Hebert *et al.* 2003a, Hebert *et al.* 2003b, Hebert *et al.* 2004a, Stoeckle & Hebert 2008, Lane, 2009).

Estas secuencias de DNA mitocondrial pueden considerarse como verdaderos “códigos de barras genéticos”, debido a que la cantidad de combinaciones posibles en las que se pueden encontrar ordenados los cuatro nucleótidos que conforman la cadena de DNA es realmente enorme, de esta manera, un cálculo sencillo que contemple únicamente 15 posiciones diferentes de éstos nucleótidos, da como resultado más de un billón (4^{15}) de

códigos diferentes, un número cien veces superior al que se necesitaría para clasificar cada taxón de manera exclusiva (Hebert *et al.* 2003a).

Aunque no existe precedente de un sistema de identificación similar, es indudable que el DNA mitocondrial es la herramienta adecuada para los análisis de diversidad genética en animales, debido a las propiedades moleculares que posee, ya que a diferencia del DNA de origen nuclear, ésta es una molécula circular pequeña que posee un alto número de copias y se encuentra muy enrollado dentro de la célula, razones por las que es relativamente fácil de purificar y caracterizar, además de que carece de intrones y secuencias repetitivas que facilitan el alineamiento y análisis de las secuencias (Doyle & Gaut 2000, Llorente & Luna-Vega 1994, Wilson 1985, Quinn 1997).

El DNA mitocondrial es también una molécula interesante debido a que presenta una alta tasa de evolución (sustitución) a nivel de secuencias de nucleótidos, una gran variación intraespecífica, además de una recombinación prácticamente nula que le permite acumular mutaciones con gran rapidez en el tiempo, generando polimorfismos específicos en una población, a los que se les puede dar seguimiento temporal y espacial (Pakendorf & Stoneking 2005, Vázquez 2007). Además, el DNA mitocondrial presenta una herencia estrictamente materna (haploide) que es transmitido a la siguiente generación por oogénesis, lo que hace que una vez que una variación se establece en la hembra todos sus descendientes la posean, por lo que su patrón hereditario es clonal a lo largo del linaje materno y al no existir evidencia de que éste se pueda recombinar con otras moléculas de DNA mitocondrial diferentes o de que exista transferencia horizontal de su genoma, al

emplearlo es posible reconstruir la historia evolutiva de un taxón ([Wilson 1985](#), [Quinn 1997](#)). Esta reconstrucción evolutiva es interpretada mediante la representación gráfica que éstos eventos mutacionales (de una historia matrilineal) forman al conectarse filogenéticamente, dando como resultado un filograma que refleja las relaciones genealógicas existentes entre los haplotipos del grupo de estudio, donde la longitud de las ramas del árbol obtenido expresa la cantidad de cambio evolutivo en términos mutacionales, así, dichos resultados pueden ser comparados al sobreponerse con la distribución geográfica actual de sus poblaciones para dilucidar los procesos evolutivos responsables de ella ([Avice 2000](#)).

Salvo muy escasas excepciones, la región codificante del DNA mitocondrial de la mayoría de los organismos multicelulares y algunos protozoarios posee 37 genes que producen 13 polipéptidos esenciales para el proceso de la fosforilación oxidativa, dos RNA's ribosomales (12s y 16s) y 22 RNA's de transferencia más una región control que inicia la replicación y la transcripción, todo dispuesto a lo largo de una doble cadena de DNA de aproximadamente 15 a 20 kilobases de longitud ([Avice 1994](#), [Vázquez 2007](#), [Zhang et al. 2007](#)), un perfil modesto comparado con los más de 20, 000 genes que están presentes en el núcleo ([Lane 2009](#)). Sin embargo, el importante papel del genoma mitocondrial es revalorado cuando se toma en cuenta que la supervivencia de una célula depende de la respiración y ésta tiene lugar en las mitocondrias a través de una serie de complejos de grandes proteínas, cada una construida con hasta 43 subunidades. Estas subunidades son codificadas por los genes que residen tanto en el genoma mitocondrial

como en el nuclear, y que deben interactuar estrechamente entre ellas o la respiración no funciona (Lane 2009).

Particularmente, la enzima del Citocromo c Oxidasa subunidad 1, maneja el paso final de la respiración celular. En los mamíferos, por ejemplo, este complejo está formado por 13 subunidades, tres de ellas, incluyendo la subunidad 1, están codificadas por el DNA mitocondrial, y diez por genes nucleares. Si la subunidad de CO1 no trabaja de manera conjunta, los electrones no se transfieren al oxígeno y la respiración falla, provocando la muerte de la célula. Esta cooperación es aún más complicada si se toma en cuenta que el genoma mitocondrial evoluciona típicamente de 10 a 30 veces más rápido (Lane 2009).

No existe, sin embargo, una razón *a priori* que condicione el uso de un gen específico como base para los análisis de identificación molecular, aunque, el gen del Citocromo c Oxidasa subunidad 1 posee dos características importantes, la primera es que las secuencias iniciadoras de la transcripción son relativamente grandes en la mayoría, si no es que en todos los phylum de animales, lo que asegura que en la mayoría de los casos, la recuperación del fragmento de este gen sea casi completa (Folmer *et al.* 1994, Zhang & Hewitt 1997), en segundo lugar, CO1 parece tener un mayor intervalo de señal filogenética (interpretada como: cantidad de cambio \propto tiempo evolutivo transcurrido), que cualquier otro gen mitocondrial, y como en otros genes codificadores de proteínas, los nucleótidos situados en tercera posición muestran una alta incidencia de sustitución de bases, con una tasa de evolución molecular que es aproximadamente tres veces mayor que la de los RNA's ribosomales 12S y 16S (Knowlton & Weigt 1998) donde de hecho, son más frecuentes las

inserciones y deleciones (indels) que provocan cambios en el marco de lectura (Doyle & Gaut 2000).

La evolución de este gen, por lo tanto, es lo suficientemente rápida como para poder reflejar la acumulación de variaciones incluso entre especies estrechamente emparentadas o de poblaciones que se han separado recientemente (Hebert 2003a, Hebert *et al.* 2003b, Hebert *et al.* 2004b, Lane 2009), formando grupos filogeográficos dentro de una misma especie, lo que se conoce como complejos de especies, con una similitud genética estrecha (Cox & Hebert 2001, Wares & Cunningham 2001, Hebert *et al.* 2004b) y aunque el COI puede ir acompañado de otros genes mitocondriales para resolver dichos casos de divergencia reciente, puede proporcionar más información filogenética que otros como en el caso del Citocromo b (Simmons & Weller 2001), ya que los cambios en la secuencia de este gen COI, se producen más lentamente (Lynch & Jarrell 1993). Como resultado de ello, un organismo no identificado puede ser asignado a una categoría taxonómica superior (phylum u orden) tan solo con el análisis de sustitución de aminoácidos, mientras que al analizar la sustitución de nucleótidos es posible incluso asignarle una categoría específica (Hebert *et al.* 2003a).

Un ejemplo claro de la forma en la que funcionan estos códigos de barras es sin duda el que atañe al grupo de los primates, donde cada célula contiene alrededor de 3.5 millones de pares de bases, un fragmento de tan solo 648 pares de bases, indica que mientras los seres humanos nos diferenciamos entre sí en una o dos pares de bases, estas diferencias se van acentuando al compararnos con nuestros parientes más cercanos,

difiendo de los chimpancés en aproximadamente 60 sitios y de los gorilas en alrededor de 70 (Stoeckle & Hebert 2008, Lane 2009).

Los resultados más recientes señalan que la obtención de diversos Códigos de Barras de animales tanto marinos como terrestres ha permitido distinguir alrededor de un 98% de las especies reconocidas a través de un estudio taxonómico previo y que el 2% restante, pertenece a análisis realizados entre especies muy afines o estrechamente relacionadas cuyos linajes divergieron hace relativamente poco tiempo (Stoeckle & Hebert 2008).

Este sistema de identificación ha quedado bien establecido con la utilización del gen COI como marcador estándar en todo el reino animal, con excepción del phylum Cnidaria, donde las tasas de evolución mitocondrial son excepcionalmente bajas en comparación con el resto de los animales, sin embargo, existen otros grupos biológicos donde se ha intentado implementar este mismo sistema de identificación molecular (e.g. plantas y hongos), aunque teniendo otros marcadores moleculares, debido a que en estos grupos el genoma mitocondrial evoluciona muy lentamente, por lo que el grado de resolución entre especies muy afines resultaría muy imprecisa (Vijayan & Tsou 2010, Chase & Fay 2009).

Más recientemente, la formación del Consorcio de grupos de trabajo para el Código de Barras de la Vida en Plantas, ha identificado algunos loci de DNA como *rbcL*, *matK*, *rpoC1*, *rpoB*, que podrían funcionar como Código de Barras (Pennisi 2007). Estos marcadores, han mostrado tener diferente efectividad en la discriminación de plantas terrestres, pues mientras que en algunos casos se logra identificar claramente a las especies,

en otras ocasiones únicamente se puede identificar el género al que pertenecen (von Cräutlein 2011), además de que no siempre funcionan los mismos marcadores, lo que hace difícil encontrar una combinación que sea universalmente efectiva. En los hongos, por otra parte, la combinación de los marcadores ITS1 e ITS2 han resultado muy efectivos en la discriminación de especies, aunque los alineamientos de estas secuencias han resultado un tanto complicados (von Cräutlein 2011).

De esta manera, el Código de Barras ya está ayudando a acelerar la catalogación de la biodiversidad, mediante la creación de una base de datos pública llamada Barcode of Life Data Systems, BOLD Systems por sus siglas en inglés (www.barcodinglife.org), que hasta el momento cuenta con 1, 578, 818 registros de poco más de 150, 000 especies que incluyen los Reinos Animal, Vegetal, Fungi y Protista, siendo las aves, mariposas y polillas los grupos con mayor número de secuencias. Cada uno de estos registros pertenece a especímenes que son registrados en la base de datos con la mayor cantidad de información disponible como: nombre de la colección donde se encuentra el ejemplar, el número de acceso asignado, clasificación taxonómica, información adicional (tipo de reproducción, sexo, estadio, tipo de tejido colectado), datos del sitio de colecta (país, estado, localidad, coordenadas, elevación) y la fotografía del ejemplar (Ratnasingham & Hebert 2007).

Para coordinar todo este esfuerzo, en 2005 fue creado el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL), integrado por 150 instituciones de 45 países que apoyan el desarrollo de los códigos de barras de DNA como un método estándar para la identificación de las especies. El conjunto de registros actuales será conducido por el Proyecto

Internacional del Código de Barras de la Vida: una alianza de 25 naciones con planes para procesar 5, 000,000 de especímenes de 500,000 especies para el año 2014 (Stoeckle & Hebert 2008).

Entre los hallazgos más importantes que ha arrojado el uso de esta herramienta molecular está el reconocimiento de especies crípticas, como conjuntos de especies que antes eran consideradas de alta “variabilidad intraespecífica”. Uno de los ejemplos más ilustrativos de ello es el realizado en el año 2004 por el Dr. Paul Hebert y sus colegas de Costa Rica, en colaboración con Daniel Janzen y John Burns, de la Universidad de Pennsylvania y el Instituto Smithsonian respectivamente, quienes trabajaron con una mariposa cuyas poblaciones fueron consideradas durante mucho tiempo pertenecientes a la especie *Astrartes fulgerator*, por presentar una morfología asombrosamente similar durante la etapa adulta, pese a que durante la etapa juvenil (orugas) sus diferencias son tan evidentes que pueden abarcar aspectos como la morfología, el hábitat en el que se distribuyen y el tipo de alimentación que prefieren. Este estudio basado en el Código de Barras identificó un conjunto de por lo menos diez especies diferentes, mostrando que al utilizar caracteres no relacionados con la morfología es posible obtener una diagnosis taxonómica objetiva (Hebert *et al.* 2004a).

Adicionalmente, se han llevado a cabo numerosos estudios de identificación para grupos de mariposas, arañas, hemípteros, nematodos, peces, entre otros, donde el empleo del marcador COI ha permitido hacer identificaciones exitosas (Vijayan & Tsou 2010), que igualmente tienen su contraparte en estudios donde esta efectividad no ha sido corroborada

satisfactoriamente ([Dasmahapatra et al. 2010](#)), por lo que resulta importante seguir obteniendo datos que hagan la investigación de la eficacia del COI cada vez más robusta, aportando evidencia que permita identificar aquellos grupos biológicos en los cuales éste sistema es o no válido.

Una vez establecido este sistema de identificación molecular, será posible superar algunos factores que han impedido la correcta discriminación de las especies bajo el enfoque taxonómico y los organismos podrán ser identificados prácticamente en cualquier etapa de su desarrollo, los límites de la diversidad intraespecífica podrán ser cuantificables, además de que podrán ser reconocidas las especies hermanas, lo que hará que las decisiones taxonómicas sean más objetivas ([Hebert 2003a](#)).

1.2 El complejo *Chlorospingus ophthalmicus*

La especie *Chlorospingus ophthalmicus* (Familia: Thraupidae), considerada un complejo debido al problema que ha representado el establecimiento de los límites de especies, tanto dentro del género *Chlorospingus*, donde algunas de las especies incluidas (*C. inornatus*, *C. tacarcunae*), han sido consideradas por diferentes autores, variedades de *Chlorospingus ophthalmicus* ([AOU 1998](#)), como entre las poblaciones de la misma especie, donde la diversidad morfológica ha permitido la descripción de hasta 25 subespecies, a lo largo de toda su área de distribución ([Isler & Isler 1999](#)), que se extiende desde el centro de México hasta el noreste de Argentina, en un intervalo de altitud que oscila entre los 1,000 y 3,500 msnm ([Howell & Webb 1995](#), [AOU 1998](#)).

Esta distribución tan amplia de *Chlorospingus ophthalmicus*, se encuentra, estrechamente vinculada al bosque mesófilo de montaña (BMM). Bioma de distribución restringida, que reúne un conjunto de características ecológicas muy particulares, y se encuentra en un intervalo de altitud entre los 600 y 3, 000 msnm, que en ocasiones genera una distribución discontinua en forma de parches, a manera de archipiélago (Foster 2001, Rzedowsky 2006).

Debido a esto, la distribución que presentan las poblaciones del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, se encuentra altamente fragmentada hacia el norte, particularmente en México, donde forma conjuntos de poblaciones aisladas limitadas por barreras geográficas claras (Hernández-Baños *et al.* 1995, Watson & Peterson 1999, Rzedowsky 2006), que aparentemente evitan el flujo génico entre sus poblaciones. En contraste, las poblaciones presentes a lo largo de Sudamérica muestran una distribución mucho más continua en donde el BMM se extiende uniformemente por casi 3,000 Km sobre las montañas de los Andes (Bonaccorso *et al.* 2007, Sánchez-González *et al.* 2007).

Existen numerosos registros sobre la alta diversidad avifaunística que prevalece en este ecosistema, mucha de la cual está integrada por taxones endémicos con rangos de distribución altamente restringidos, y una extrema divergencia morfológica y genética de sus poblaciones (Hernández-Baños *et al.* 1995, Navarro-Sigüenza *et al.* 2001, Rzedowsky 2006, Sánchez-González *et al.* 2008). En este sentido, *Chlorospingus ophthalmicus* es una especie altamente politípica, integrada por 25 subespecies (Isler & Isler 1999) que se caracterizan por tener los ejemplares morfológicamente más distintivos en Sudamérica,

mientras que los de México y Centroamérica presentan una variación fenotípica relativamente más sutil aunque de carácter discreto (Sánchez-González *et al.* 2007).

Esta variación morfológica diferencial entre las subespecies que se distribuyen en el norte y sur del continente, llevó posteriormente a Isler e Isler (1987) a clasificarlas en ocho morfotipos basados en los caracteres morfológicos de la coloración del iris, la presencia-ausencia de una mancha post ocular y/o una banda pectoral. Lo que dio como resultado, que todas las subespecies distribuidas en Sudamérica, desde Venezuela hasta Argentina, fueran clasificadas dentro de siete morfotipos, debido a que son las que presentan mayor variación fenotípica. Mientras que el octavo morfotipo, denominado grupo “*ophthalmicus*” incluye todas las subespecies distribuidas desde México hasta el sur Centroamérica (Isler & Isler 1987).

Así, este grupo “*ophthalmicus*” se encuentra formado por un conjunto de diez subespecies que presentan una mancha post ocular, una banda pectoral y el iris color oscuro (Isler & Isler 1987). De ellas, seis se distribuyen en México, en un claro patrón de correspondencia con las principales barreras geográficas, esto es, 1) *C. o. ophthalmicus*, se distribuye a lo largo de la Sierra Madre Oriental, desde el sureste de San Luis Potosí hasta Totontepec, en el norte de Oaxaca, 2) *C. o. albifrons*, se encuentra en las montañas de Guerrero en la Sierra Madre del Sur, 3) *C. o. wetmorei*, está presente únicamente en la Sierra de los Tuxtlas, Veracruz 4) *C. o. dwighti*, habita en la región de los Chimalapas en Oaxaca y las montañas del Macizo Central de Chiapas, y 5) *C. o. postocularis*, habita las

montañas de la vertiente del pacífico de la Sierra Madre de Chiapas y Guatemala ([García-Moreno et al. 2004](#), [Bonaccorso et al. 2007](#), [Sánchez-González 2007](#), [Weir et al. 2008](#)).

Entre estas subespecies reconocidas dentro del complejo sobresale 6) *C. o. persimilis*, cuya distribución se reduce de manera exclusiva a las montañas de la Sierra de Miahuatlán, en la porción oeste del estado de Oaxaca, y algunas veces es considerada parte de la subespecie *albifrons* ([AOU 1998](#)), como una población disyunta cuya diferenciación genética podría ser resultado del aislamiento geográfico que por grandes periodos de tiempo han mantenido separadas a ambas poblaciones ([Sánchez-González 2002](#), [Sánchez-González et al. 2007](#), [Bonaccorso et al. 2007](#)). Las cuatro subespecies restantes (*C. o. honduratus*, *C. o. regionalis*, *C. o. novicius* y *C. o. punctulatus*) se distribuyen a través de Centro América desde El Salvador hasta el oeste de Panamá ([AOU 1998](#)).

A pesar de que las diferencias fenotípicas entre estas poblaciones mexicanas son relativamente sutiles ([Tabla 1](#)), [Howell y Webb \(1995\)](#) propusieron una nueva subdivisión para las poblaciones mexicanas del complejo, basada en las diferencias y similitudes que se presentan los patrones de coloración de la cabeza y la garganta y reconocieron tres subgrupos: 1) subgrupo “*ophthalmicus*”, que incluye todas las poblaciones de la Sierra Madre Oriental, 2) subgrupo “*albifrons*”, que incluye las poblaciones de la Sierra Madre del Sur y 3) subgrupo “*postocularis*”, que incluye las poblaciones de la Sierra de Los Tuxtlas, la región de los Chimalapas en Oaxaca y las montañas del Macizo Central y la Sierra Madre del Chiapas, éste se extiende hacia Centroamérica través de Honduras, hasta el norte de Nicaragua ([Howell & Webb 1995](#)).

Las subespecies de México

De manera particular, en las poblaciones mexicanas del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, se han realizado extensos trabajos realizados desde la década de los 90's, que han tenido como principal objetivo el estudio de la variación y diferenciación genética de las poblaciones por medio de la electroforesis de aloenzimas (Peterson *et al.* 1992) y el análisis de secuencias de diversos fragmentos de DNA mitocondrial (García-Moreno *et al.* 2004, Bonaccorso *et al.* 2007, Weir *et al.* 2008). Adicionalmente, se han realizado estudios sobre la variación geográfica de sus vocalizaciones (Sosa-López 2004) y los límites de especie basados en caracteres morfológicos (Sánchez-González 2002, Sánchez-González *et al.* 2007).

Todos estos estudios previos han aportado evidencia sobre el alto grado de variación geográfica a nivel genético y morfológico, presente dentro y entre las poblaciones, pese a que como ya se ha mencionado antes, éstas son fenotípicamente, las más homogéneas de toda la gama conocida de la especie.

Los patrones de variación encontrados en la mayoría de los casos, coincide con la presencia de barreras geográficas que limitan la distribución de las poblaciones, aún sobre un muestreo relativamente limitado, que ha resultado suficiente para obtener árboles filogenéticos con buen soporte estadístico de confiabilidad (bootstrap), podría sugerir, según los propios autores, que éste conjunto de subespecies de México representen en realidad un complejo de especies restringidas localmente, conformado por más de una especie (Peterson *et al.* 1992, Sánchez-González 2002, García-Moreno *et al.* 2004,

Sánchez-González *et al.* 2007), una idea que ha sido contemplada anteriormente por otros autores (Howell & Webb 1995, Stotz *et al.* 1996). Sin embargo, y debido a que los estudios sobre límites de especies no han resultado concluyentes, ya que los estudios con DNA hasta ahora realizados se basan únicamente en secuencias de origen clonal, no ha sido posible corroborar aún el estatus de estas poblaciones.

No obstante, cada una de estas subespecies parece haber permanecido aislada genéticamente durante largos periodos de tiempo, lo que eventualmente pudo haber llevado al desarrollo de una identidad fenotípica y filogenética que parece seguir una trayectoria evolutiva propia (Peterson *et al.* 1992, García-Moreno *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2007).

Taxón	Características de la corona	Características de la garganta	Mancha post-ocular	Banda pectoral
 <i>C. ophthalmicus</i> (Du Bus 1847)	Color café olivo, con cejas delgadas y manchas muy claras en la frente	Intermedia y moteada con barbas claras	Más larga y delgada, casi rodeando todo el ojo	Color verde amarillento
 <i>C. dwighti</i> (Underdown 1931)	Color olivo, con cejas gruesas y manchas muy claras en la frente	Clara y moteada con barba muy claras	Más larga, casi rodeando el ojo	Color verde olivo
 <i>C. albifrons</i> (Salvin y Godman 1889)	Color café canela, con cejas delgadas y manchas blancas y redondas en la frente	Oscura con barbas conspicuas moteada en los laterales	En forma de lágrima, casi rodeando el ojo	Color amarillo-naranja
 <i>C. wetmorei</i> (Lowery y Newman 1949)	Color olivo con cejas delgadas y manchas alargadas en forma de “V” en la frente	De coloración intermedia con motas y barbas claras	Más largo, casi rodeando totalmente el ojo	Color verde amarillento
 <i>C. postocularis</i> (Cabanis 1866)	Color sepia, con “orejas” blanquecinas y cejas delgadas	Clara y moteada	Detrás del ojo	Amarilla

Tabla 1. Características que diferencian a las especies propuestas dentro del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* (Sánchez-González 2002, Sánchez-González et al. 2007). Imágenes tomadas de (Sánchez-González et al. 2007), pintura mezclada por Marco Antonio Pineda Maldonado.

2. JUSTIFICACIÓN

Dado que *Chlorospingus ophthalmicus*, es uno de los complejos de aves donde se han explorado más intensamente los límites de especies a partir de criterios morfológicos (Sánchez-González 2002, Sánchez-González *et al.* 2007), moleculares (Peterson *et al.* 1992, García-Moreno *et al.* 2004, Bonaccorso *et al.* 2007, Weir *et al.* 2008) y de variación vocal (Sosa-López 2004). Tanto la marcada variación geográfica, como la profunda diferenciación genética encontrada entre sus poblaciones, sugieren que este complejo podría estar formado por, al menos cinco unidades evolutivas independientes, claramente delimitables a partir de los conceptos de especie taxonómica, evolutiva y filogenética.

En este sentido, el análisis de variación de las secuencias del gen COI en este complejo, pone a prueba la eficacia del sistema de identificación del Código de Barras, frente a la amplia evidencia de límites de especies dentro del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, para corroborar si mediante este sistema es posible obtener una discriminación de estos mismos límites de especies que aporten evidencia al respecto.

3. OBJETIVOS

Objetivo general

- 1. Discriminar los límites entre especies de aves del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*. Mediante el uso de secuencias del gen COI.**

Objetivo particular:

- Realizar inferencias taxonómicas a partir de la identificación de unidades evolutivas (i.e. especies).
- Determinar el grado resolución que brindan las secuencias del gen COI, en la construcción de hipótesis filogenéticas utilizando los métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana.

4. MÉTODO

4.1 Muestreo del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*

En este trabajo se realizó una discriminación de los límites de especies dentro del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* de México, aplicando los criterios de identificación del proyecto internacional del Código de Barras que se explicarán más adelante, asumiendo el concepto filogenético de especie.

Para ello se compilaron 96 secuencias de la región estandarizada del gen COI, de las cuales, 81 pertenecen a las diferentes subespecies del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* en México, 7 a subespecies del mismo complejo distribuidas en Centro y Sudamérica (Weir *et al.* 2008), (Apéndice I), 4 a las especies *Chlorospingus inornatus*, *Chlorospingus pileatus*, *Chlorospingus semifuscus* y *Chlorospingus tacarcunae* (Weir *et al.* 2008), y 3 a las especies *Euphonia minuta*, *Euphonia lanirostris* y *Euphonia elegantissima*, utilizadas como grupo externo en los análisis presentados.

La razón por la que fueron utilizadas secuencias externas al complejo mexicano es, poder generar un “perfil taxonómico”, sugerido por el sistema de identificación del Código de Barras, utilizando secuencias de taxones afines bien identificados que puedan servir como punto de referencia en la identificación de la posición jerárquica que adopta cada subespecie de México, por medio de la comparación de congruencia, con respecto a: **1)** las subespecies centroamericanas del morfotipo “*ophthalmicus*” (Isler & Isler 1987), que han formado un clado bien diferenciado junto a la subespecie mexicana *C. o. postocularis* en

los análisis publicados anteriormente ([García-Moreno *et al.* 2004](#), [Bonaccorso *et al.* 2007](#) y [Weir *et al.* 2008](#)), y **2)** con respecto a los posibles arreglos obtenidos entre las subespecies sudamericanas del complejo y las especies del mismo género, que puede influir en la topología general del árbol obtenido.

En todos los casos, el número de acceso o colección así como la localidad a la que pertenece cada secuencia se puede consultar en el [Apéndice II](#). Mientras que la posición geográfica de las localidades del complejo mexicano se muestra en la [Figura 1](#).

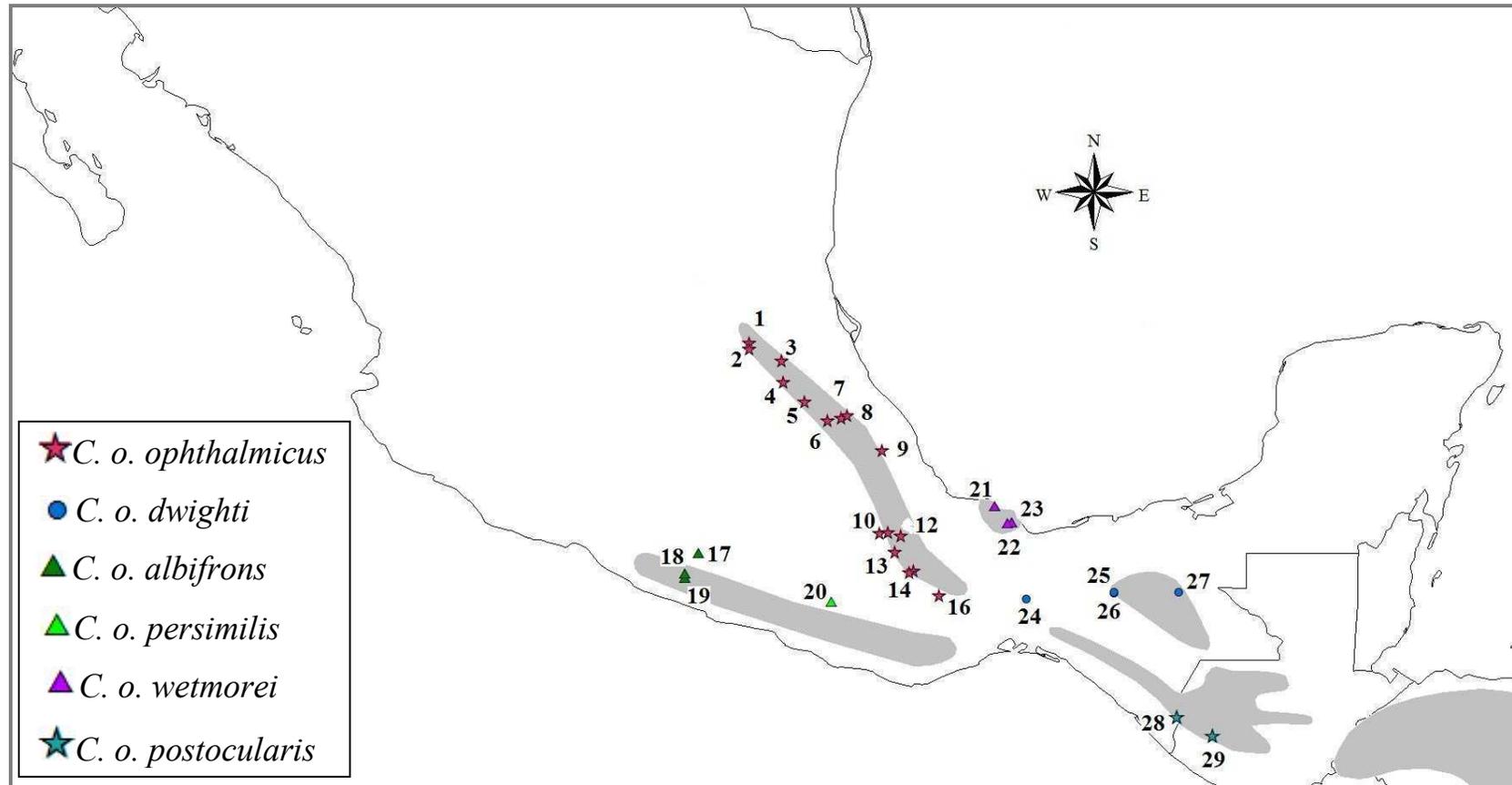


Figura 1. Representación gráfica de la Distribución geográfica de las 6 subespecies que integran el complejo *Chlorospingus ophthalmicus* en México (AOU 1998) y puntos de muestreo: 1. Tres Lagunas, Qro. 2. Santa Inés, Qro. 3. Tlanchinol, Hgo. 4. Carretera Majorena – Tlahuelimpa, Hgo. 5. El Potrero, Hgo. 6. San Andrés, Pbla. 7. Jonotla, Pbla. 8. Cuitchat 8 Km al NE de Cuetzalan, Pbla. 9. Jardín Botánico de Xalapa, Ver. 10. Sierra Huautla, Puerto Soledad, Oax. 11. Sierra Huautla, Puente fierro, Oax. 12. San Marín Caballero, Oax. 13. Teotitlán, Peña Verde, Oax. 14. La Esperanza, Oax. 15. Brecha Km 102 de la carretera. Tuxtepec – Oaxaca. 16. Cerro Zempoaltépetl, Oax. 17. Carrizal del Bravo, Gro. 18. Sierra Atoyac, Gro. 19. Nueva Delhi, Gro. 20. Reyes Llano Grande, Oax. 21. Cerca de Estación Biológica Los Tuxtlas, Ver. 22. El Bastonal, Ver. 23. Sierra Santa Martha, Ver. 24. Chalchijapa, Oax. 25. Coapilla a 6.5 Km N, Chis. 26. Carretera Copainalá – Ocotepc, Chis. 27. Pueblo Nuevo, Chis. 28. Volcán Tacaná, Chis. 29. Quetzaltenango, Guatemala. Mapa generado con el programa ArcView GIS 3.2. (ESRI 1999).

4.2 Trabajo de Laboratorio

Primero se realizó una búsqueda exhaustiva de las muestras de tejido disponibles para las poblaciones del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, en la Colección de Tejidos del Museo de Zoología, “Alfonso L. Herrera”, de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Se lograron identificar un total de 79 muestras pertenecientes a 28 localidades que cubren buena parte del área de distribución del complejo en México. Con ellas se generó una base de datos de colecta para su posterior sistematización y mapeo ([Figura 1](#)).

Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de muestras de tejido (músculo, corazón e hígado), de las que se tomó una fracción pequeña (~ 25 mg), preferentemente de partes donde éste se observa en buen estado de conservación o no muy deshidratado. Las muestras se colocaron dentro de tubos Eppendorf de 1.5 ml de capacidad, y fueron sumergidas en aproximadamente 1ml de alcohol diluido al 70% donde se mantuvieron a una temperatura constante de 4°C hasta el momento de ser procesadas.

Esta extracción de DNA se realizó utilizando el kit “DNAasy Tissue Kit” de Qiagen, siguiendo el protocolo adjunto del fabricante ([Apéndice III](#)). Una vez terminada la fase de extracción, se estimó la concentración de DNA obtenido, mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE 1X (Tris, ácido acético y EDTA 0.5M) teñido con Bromuro de Etidio (0.625 mg/ml, Apex), en una solución de 0.5 µg/ml (1 gota/50 ml

ddH₂O), para ser visualizado en el transiluminador de luz ultravioleta, donde la estimación de DNA fue realizada visualmente a partir de la comparación de intensidad de banda con ayuda del marcador de peso molecular Lambda (λ = 25 ng DNA / μ l), en un gradiente conocido.

Amplificación y secuenciación

Se realizó la amplificación de un fragmento del gen COI cuyo tamaño aproximado es de 661 pares de bases, por medio de la técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos COIbird F1 y COIbird R1, obtenidos de [Hebert *et al.* \(2004b\)](#) y de la página del BOLD Systems (Sistema de Datos del Código de Barras de la Vida), <http://www.boldsystems.org/views/primerlist.php>

Debido a que como ya se ha dicho, los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen COI permiten, en la mayoría de los casos, la recuperación casi total del fragmento específico, en este trabajo fue posible obtener la secuencia tanto de la cadena pesada (H), como de la ligera (L), por lo que, la verificación de errores y presencia de sitios variables se realizó a partir de la comparación de por lo menos dos secuencias. Para los casos donde la amplificación fue problemática se recurrió al primer COIbirdR2 sugerido por [Stoeckle \(2009\)](#). Estos oligos fueron fabricados por Invitrogen y el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. ([Tabla 2](#)).

Oligonucleótido	Secuencia nucleotídica	Tm (° C)
COIbird F1 (forward)	5' TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC 3'	58
COIbird R1 (reverse)	5' ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG 3'	58
COIbird R2 (reverse)	5' ACTACATGTGAGATGATTCCGAATCCAG 3'	58

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar COI.

Las primeras amplificaciones se realizaron en un volumen de reacción de 53.5 μ l, que consta de 5 μ l de Buffer A 10x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 9.1, 0.1% TritonTM X-100), 5 μ l de dNTP's Mix (10 mM), 5 μ l de cada Primer (10 μ M), 4 μ l MgCl₂ (50 mM), 0.5 μ l de Taq Polimerasa (5U/ μ l) además de 25 μ l de agua ultra pura y 4 μ l de DNA templado (~ 10 ng), utilizando el programa de termociclador TouchDown que consta de 1 minuto inicial a 94 °C, seguido de 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 90 segundos a 53 °C y 60 segundos a 72 °C, seguidos por 25 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 90 segundos a 54 °C y 60 segundos a 72 °C, más 5 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 90 segundos a 55 °C y 60 segundos a 72 °C con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Aquellas extracciones que presentaron una baja concentración de DNA genómico fueron amplificados utilizando el kit de PCR, REDTaq Polymerase, SIGMA-ALDRICH, en un volumen de reacción de 50 μ l que incluyen 27.5 μ l de agua ultrapura, 5 μ l de 10X REDTaq PCR Reaction Buffer, 1 μ l de dNTP's Mix (10 mM), 5 μ l de cada primer (10 μ M), 2.5 μ l de REDTaq DNA Polymerase (1 U/ μ l) y 4 μ l de DNA templado (~ 10 ng). Se utilizó el programa de termociclador reportado por Hebert *et al.* (2004b) que consta de 60

segundos iniciales a 94 °C, seguido por 5 ciclos de 60 segundos a 94 °C, 90 segundos a 45 °C y 90 segundos a 72 °C más 30 ciclos de 60 segundos a 94 °C, 90 segundos a 51 °C y 90 segundos a 72 °C con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Todos los productos de PCR fueron corroborados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X que posteriormente fue teñido con Bromuro de Etidio (0.5 µg/ml) y visualizado con luz ultravioleta, haciendo uso del marcador molecular de 100 pb (Nucleic Acid Markers, 100 pb DNA Ladder, Axygen) para confirmar por comparación visual si la amplificación obtenida fue del tamaño esperado (~ 600 – 700 pb). Durante la primera mitad del trabajo de laboratorio, aquellos productos que cumplieron este criterio fueron purificados y sometidos a la posterior reacción de secuenciación.

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo siguiendo el protocolo del Co-precipitante Vivid Violet (Visible Co – precipitante, Bioselec) cuyo fin es eliminar todas las impurezas propias de la reacción química tales como: excesos de Taq polimerasa, primers y desoxinucleótidos o dNTP's, precipitando únicamente el DNA total de la reacción para después re-suspender en 100 µl de agua ultrapura ([Apéndice III](#)). Una vez teniendo el producto de PCR purificado se procedió con la Reacción de Secuencia, que consiste en amplificar nuevamente el segmento específico de DNA utilizando el Kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing de Applied Biosystems, para realizar una nueva PCR cuyo volumen de reacción es de 10 µl que incluyen: 2 µl de Big Dye, 2 µl de Buffer, 0.5 µl de un primer, 2.5 µl de ddH₂O y 3 µl del producto de PCR, volviendo a utilizar el mismo programa de termociclador con el que originalmente fueron amplificados y

repetiendo la misma receta con el segundo primer. Esta Reacción de Secuencia es nuevamente liberada de impurezas mediante el mismo protocolo de purificación con Vivid Violet, donde finalmente es eliminado cualquier rastro de etanol. Una vez terminada esta última fase de laboratorio, las muestras obtenidas (dos por cada PCR) fueron llevadas al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM para ser procesadas en el Secuenciador Automático de DNA 3100 de Applied Biosystems, a cargo de la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar.

Por otro lado, durante la segunda mitad del trabajo de laboratorio, los productos de PCR obtenidos fueron enviados a secuenciar a la High-Throughput Genomics Center de la Universidad de Washington, en Seattle E. U. desde donde recibimos vía correo electrónico los archivos de las secuencias listas para ser editadas. En ambos casos se verificó la calidad de las secuencias utilizando el software para análisis de secuencias SEQUENCHER v4.8 – Build 3768 (1991 – 2007 Gene Codes Corporation), donde éstas fueron alineadas para corroborar manualmente la presencia de sitios variables mediante el análisis de sus cromatogramas.

4.3 Análisis de Datos

Análisis de secuencias

Una vez terminada la fase de edición de las secuencias obtenidas en el laboratorio, éstas fueron nuevamente alineadas, ahora junto con las secuencias del NCBI ([Weir et al. 2008](#)),

utilizando el programa ClustalX 2.1 (Larkin *et al.* 2007), para formar la matriz de datos (96 secuencias), a partir de la cual, fueron estimados los niveles de variación genética y estructura filogeográfica.

Variación genética

El análisis de variación genética comenzó con la identificación de la cantidad de haplotipos en los que se agruparon las secuencias de la matriz original. Esto se realizó mediante la utilización de la herramienta “redundant taxa” del software para análisis filogenéticos McClade 4.06 (Maddison & Maddison 2003), y sirvió para generar una matriz de haplotipos que fue caracterizada registrando el número de sitios conservados, variables y filogenéticamente informativos utilizando el programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011). Adicionalmente se obtuvo la tabla de composición nucleotídica, con las frecuencias estimadas para cada nucleótido y la matriz de distancias genéticas, calculadas utilizando el del modelo de sustitución nucleotídica de 2 parámetros de Kimura (1980).

Análisis de Distancias Genéticas

A partir de la matriz de distancias genéticas, se generaron los dendogramas de distancia utilizando el algoritmo de Neighbor – Joining (NJ), esta prueba se realizó con un bootstrap de 1,000 réplicas para determinar los valores de confiabilidad en los nodos del árbol de obtenido y utilizando nuevamente el modelo de sustitución de nucleótidos de dos

parámetros de Kimura (1980), (MEGA5), tal como se ha hecho en todos los trabajos del proyecto del Código de Barras revisados (Hebert *et al.* 2003a, Hebert *et al.* 2003b, Hebert *et al.* 2004a, Hebert *et al.* 2004b, Dasmahapatra *et al.* 2010, Vijayan & Tsou 2010).

Los análisis de distancias genéticas basados en el modelo de sustitución de 2 parámetros de Kimura y el método de distancias Neighbor Joining son, junto con el perfil taxonómico ya descrito, los criterios adoptados por el sistema de identificación del Código de Barras. Estos dos criterios resultan ser la opción más viable para un sistema como este, pues se ha afirmado que este modelo de sustitución, resulta ser la mejor opción cuando las distancias son pequeñas, como en el caso de las especies estrechamente relacionadas (Nei & Kumar 2000), mientras que el algoritmo de Neighbor – Joining resulta un método sencillo que demanda poco esfuerzo computacional en comparación con otros métodos, además de que ha mostrado sólidos resultados en el análisis de grandes bases de datos (Hebert *et al.* 2003a). Este criterio de distancias genéticas para realizar asignaciones taxonómicas, en realidad representa la combinación más básica (sencilla) del estudio de las divergencias genéticas, que facilita la homogenización del método para los diversos grupos de estudio (i.e. plantas, animales, hongos, bacterias).

Adicionalmente, se realizaron las reconstrucciones filogenéticas de Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB), con la intención de comparar el grado de resolución que este gen puede brindar a partir de los algoritmos de reconstrucción filogenética más utilizados actualmente.

Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud

La reconstrucción filogenética bajo el criterio de optimización de Máxima Parsimonia, fue realizada en el programa PAUP* versión 4.0 (Swofford 2002), a partir de una búsqueda heurística con 1000 réplicas de bootstrap. Mientras que para el análisis de Máxima Verosimilitud, la matriz de haplotipos fue analizada primero mediante el programa jModelTest versión 0.1.1 (Posada 2008), donde se obtuvo que el modelo de evolución molecular que mejor se ajusta a las secuencias, fue TIM2+I+G, para las cuales se identificó una distribución gamma, datos que fueron utilizados posteriormente en el análisis de Máxima Verosimilitud realizado con el programa GARLI versión 0.96b8 para OS X (Zwickl 2008), usando los valores de frecuencia nucleotídica sugeridos por el modelo (freqA= 0.2814, freqC=0.3342, freqG=0.1551 y freqT=0.2293) y se realizó una prueba de bootstrap con 1000 réplicas.

Inferencia Bayesiana (IB)

El análisis de reconstrucción filogenética basada en el método de Inferencia Bayesiana, se realizó en el programa Mr. Bayes (Ronquist y Huelsenbeck 2003), donde se utilizaron cadenas MCMC, para 10, 000,000 de generaciones, muestreando árboles cada 250 generaciones. La búsqueda de los mejores árboles, se realizó mediante la eliminación de las primeras 10,000 generaciones en dos ocasiones (burn-in). Este análisis permitió el cálculo de la probabilidad posterior, utilizada como medida de soporte en las ramas del árbol obtenido.

Todos los análisis descritos fueron realizadas de manera paralela utilizando únicamente las secuencias del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* y el conjunto de secuencias que incluye las especies sudamericanas del mismo género, con la intención de verificar si éstas últimas generan una variación en el arreglo obtenido para el complejo.

5. RESULTADOS

Variación genética

En este trabajo se logró amplificar un fragmento parcial de 661 pares de bases del gen COI, para 79 individuos de 28 localidades representativas del área de distribución del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* en México, y se lograron analizar 81 secuencias del mismo (2 tomadas de [Weir et al. 2008](#)). Estas secuencias fueron sometidas a diversos análisis de variación genética junto a 17 secuencias más obtenidas de la base de datos del Genbank (NCBI) que funcionaron como auxiliares en la determinación de grupo hermano y grupo externo del complejo ([Apéndice II](#)).

El análisis de agrupamiento de haplotipos hecho con McClade ([Maddison & Maddison 2003](#)) logró identificar un total de 37 haplotipos, de los cuales 23 fueron encontrados dentro de las poblaciones mexicanas del complejo ([Tabla 3](#)), incluida una secuencia de Guatemala perteneciente a una subespecie distribuida entre ambos países (*C. o. postocularis*, haplotipo BMM 413). De los 14 haplotipos restantes, 7 pertenecen a las diferentes subespecies del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* distribuidas en Centro y Sudamérica, 4 a diferentes especies del género *Chlorospingus* y 3 las especies utilizadas como grupo externo ([Apéndice IV](#)).

Estos 23 haplotipos encontrados para las subespecies mexicanas, muestran un patrón interesante que agrupa de manera exclusiva las secuencias de aquellos individuos pertenecientes a la misma subespecie, es decir, no se encontraron haplotipos compartidos

entre los individuos de las diferentes regiones geográficas (Tabla 3). Así, en la región de la Sierra Madre Oriental, donde se distribuye la subespecie *ophthalmicus*, se identificaron 8 haplotipos, 6 de los cuales se encuentran en la parte sur, exclusivamente en el estado de Oaxaca, mientras que los dos haplotipos restantes abarcan los estados de Querétaro, Hidalgo, Veracruz y Puebla. En la región de la Sierra Madre del Sur, fueron reconocidos 7 haplotipos, de los cuales uno está conformado únicamente por individuos de la Sierra de Miahuatlán (*C. o. persimilis*), algunas veces considerada parte de la subespecie *albifrons* (AOU 1998), a la cual pertenecen los 6 haplotipos restantes. La región que conecta la zona de Los Chimalapas en Oaxaca con la parte norte de Chiapas (Macizo Central), donde se reconoce a la subespecie *dwrighti*, agrupó tres haplotipos, de los cuales dos se encuentran en el estado de Chiapas. En la región de la Sierra de Los Tuxtlas, se identificaron 2 haplotipos que agrupan a los individuos de la subespecie *wetmorei*. Y finalmente, para la subespecie *postocularis*, descrita como habitante de las montañas de la vertiente del pacífico (Sierra Madre de Chiapas), tanto en el estado de Chiapas como en Guatemala, se obtuvieron los últimos 3 haplotipos encontrados en este análisis, de los cuales uno se encuentra en el vecino país.

No. de Haplotipo (# de secuencias)	No. de Colección	Subespecie	Localidades que agrupa	Región Geográfica		
1 (2)	BCTDA 002	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Hidalgo, El Potrero, 5 Km Tenango de Doria	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Puebla, Cuitchat, 8 km NE Cuetzalan	Sierra Madre Oriental		
2 (20)	PUE 010	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Querétaro, 7 Km S de Tres Lagunas al S del Madroño	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Querétaro, Santa Inés, 2 Km O	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Hidalgo, 5 Km E de Tlanchinol	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Hidalgo, a 4 Km de la carretera La Majonera-Tlahuelimpa	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Hidalgo, El Potrero 5 Km Tenango de Doria	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, México, Puebla, 2 Km al O de Jonotla	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	Puebla, San Andrés Tlahulancingo, 4 km E Ahuacatlán	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Veracruz, Jardín Botánico de Jalapa	Sierra Madre Oriental		
		3 (7)	OMVP 083	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Sierra Madre Oriental
				<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puente Fierro	Sierra Madre Oriental
<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, San Martín Caballero			Sierra Madre Oriental		
4 (2)	OMVP 956	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Distrito Teotitlán, Peña Verde	Sierra Madre Oriental		
5 (7)	MT 325	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Distrito Teotitlán, Peña Verde	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, La Esperanza, Km 79 carretera Tuxtepec-Oaxaca	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Brecha 60, km 104 de la carretera Tuxtepec-Oaxaca	Sierra Madre Oriental		
6 (2)	MT 329	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Sierra Madre Oriental		
		<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, La Esperanza, Km 79 carretera Tuxtepec-Oaxaca	Sierra Madre Oriental		
7 (1)	OMVP 939	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Distrito Teotitlán, Peña Verde	Sierra Madre Oriental		
8 (1)	MXJ 511	<i>C. o. ophthalmicus</i>	México, Oaxaca, Cerro Zempoaltépetl, Totontepec	Sierra Madre Oriental		

Tabla 3. Los 23 haplotipos obtenidos para las poblaciones mexicanas del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*. McClade 4.06 (Maddison & Maddison 2003).

9 (14)	B 18089	<i>C. o. dwighti</i>	México, Oaxaca, Chimalapas, Chalchijapa, 20 Km NE del campamento	Chimalapas y Norte de Chiapas
		<i>C. o. dwighti</i>	México, Chiapas, Coapilla a 6.5 Km N	Chimalapas y Norte de Chiapas
		<i>C. o. dwighti</i>	México, Chiapas, Carretera Copainalá-Ocotepec km 38 a 95.5 km de Coapilla	Chimalapas y Norte de Chiapas
		<i>C. o. dwighti</i>	México, Chiapas, 6 Km NE de Pueblo Nuevo, camino Aurora-Ermita	Chimalapas y Norte de Chiapas
10 (1)	BMM 598	<i>C. o. dwighti</i>	México, Chiapas, 6 Km NE de Pueblo Nuevo, camino Aurora-Ermita	Chimalapas y Norte de Chiapas
11 (1)	BMM 609	<i>C. o. dwighti</i>	México, Chiapas, 6 Km NE de Pueblo Nuevo, camino Aurora-Ermita	Chimalapas y Norte de Chiapas
12 (6)	AMT 012	<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, Carrizal del Bravo	Sierra Madre del Sur
		<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, Nueva Delhí	Sierra Madre del Sur
13 (1)	AMT 097	<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, Carrizal del Bravo	Sierra Madre del Sur
14 (1)	AMT 131	<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, Carrizal del Bravo	Sierra Madre del Sur
15 (1)	MXJ 437	<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, El Iris, Sierra de Atoyac	Sierra Madre del Sur
16 (1)	SIT 078	<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, Nueva Delhí	Sierra Madre del Sur
17 (2)	AMT 021	<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, Carrizal del Bravo	Sierra Madre del Sur
		<i>C. o. albifrons</i>	México, Guerrero, Nueva Delhí	Sierra Madre del Sur
18 (3)	OMVP 242	<i>C. o. albifrons</i>	México, Oaxaca, Reyes Llano Grande	Sierra Madre del Sur
19 (3)	MXJ 078	<i>C. o. wetmorei</i>	México, Veracruz, Cerca Estación Biológica Tropical Los Tuxtlas	Sierra de Los Tuxtlas
		<i>C. o. wetmorei</i>	México, Veracruz, El Bastonal (3 Km SE)	Sierra de Los Tuxtlas
		<i>C. o. wetmorei</i>	México, Veracruz, Volcán Santa Martha, Sierra de Los Tuxtlas	Sierra de Los Tuxtlas
20 (1)	MXJ 080	<i>C. o. wetmorei</i>	México, Veracruz, Volcán Santa Martha, Sierra de Los Tuxtlas	Sierra de Los Tuxtlas
21 (2)	BMM 438	<i>C. o. postocularis</i>	México, Chiapas, Río Malá, Volcán Tacaná, x Km unión Juárez	Sur de Chiapas y Centroamérica
22 (1)	BMM 439	<i>C. o. postocularis</i>	México, Chiapas, Río Malá, Volcán Tacaná, x Km unión Juárez	Sur de Chiapas y Centroamérica
23 (2)	BMM 413	<i>C. o. postocularis</i>	México, Chiapas, Río Malá, Volcán Tacaná, x Km unión Juárez	Sur de Chiapas y Centroamérica
			Guatemala, Quetzaltenango	Sur de Chiapas y Centroamérica

Composición nucleotídica

El análisis de composición nucleotídica, indicó que el fragmento de 661 pares de bases obtenido, se encuentra compuesto en un 24.5 % por timina, un 33.2 % de citosina, 26.1 % de adenina y un 16.2% de guanina, una proporción muy similar a la adoptada por el modelo de sustitución sugerida mediante el análisis con jModelTest (Posada 2008). Estas secuencias, se encuentran constituidas por 510 sitios conservados (77%), y 151 sitios variables (23%), de los cuales 107 resultaron ser filogenéticamente informativos, esto quiere decir que, los árboles filogenéticos obtenidos, fueron generados utilizando alrededor del 16% de cada una de las secuencias. Al respecto, se observó también que dentro de estas secuencias hay 626 bases idénticas, mientras que en las regiones variables las diferencias están dadas por 26 transiciones y seis transversiones.

Análisis de Distancias Genéticas

Matriz de distancias genéticas

La matriz de distancias genéticas estimada a partir del modelo de sustitución nucleotídica de 2 parámetros de Kimura (Apéndice V), indicó que las secuencias analizadas para las subespecies del complejo mexicano *Chlorospingus ophthalmicus*, muestran un intervalo de distancia que va desde el 0.20 hasta el 5.60. Los haplotipos pertenecientes a la misma subespecie estuvieron estrechamente vinculados, mostrando un intervalo de distancias entre los valores 0.20 y 0.90, este último encontrado dentro de la subespecie *C. o. persimilis* de la Sierra de Miahuatlán (OMVP 242), que mostró el intervalo de valores mínimos más amplio (Tabla 4).

En cuanto a las distancias obtenidas con respecto a las diferentes especies y subespecies de Centro y Sudamérica, se encontró que nuevamente son los haplotipos de *C. o. ophthalmicus* los que mantienen las distancias más grandes, esta vez con las especies *C. tacarcunae*, *C. inornatus* y *C. semifuscus*. Las distancias más pequeñas se encontraron entre los haplotipos de *C. o. postocularis* del sur de Chiapas (BMM 413, BMM 438 y BMM 439) y los haplotipos de *C. o. honduratus*, *C. o. regionalis* y *C. o. punctulatus* provenientes de El Salvador, Nicaragua y Panamá respectivamente. Un dato relevante es el obtenido para la especie *C. pileatus*, que mostró valores particularmente pequeños de distancia genética con respecto a prácticamente todos los haplotipos mexicanos (Apéndice V).

Subespecies mexicanas del complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	Intervalo de distancia dentro de las subespecies (%)	Intervalo de distancia entre las subespecies (%)			
		<i>C. o. dwighti</i>	<i>C. o. albifrons</i>	<i>C. o. wetmorei</i>	<i>C. o. postocularis</i>
<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.2 – 0.8	2.0 – 2.9	3.0 – 4.4	4.4 – 5.1	4.9 – 5.6
<i>C. o. dwighti</i>	0.2 – 0.3		2.8 – 3.4	3.6 – 3.9	4.1 – 4.6
<i>C. o. albifrons (persimilis)</i>	0.2 – 0.9			4.2 – 5.1	3.4 – 4.1
<i>C. o. wetmorei</i>	0.2 – 2.0				4.1 – 4.6
<i>C. o. postocularis</i>	0.2 – 0.3				

Tabla 4. Intervalos de distancias genéticas estimadas dentro y entre las poblaciones mexicanas del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, utilizando el modelo de sustitución nucleotídica de 2 parámetros de Kimura (1980). MEGA5 (Kimura *et al.* 2011).

Límites de especie a partir del Código de Barras

Los árboles de distancia que se generaron en el programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011), utilizando el algoritmo de Neighbor – Joining (NJ) y el modelo de sustitución nucleotídica de 2 parámetros de Kimura (1980), son la base medular de la discriminación de los límites de especies del proyecto internacional del Código de Barras (Hebert *et al.* 2003a).

En ellos fue posible reconocer la formación de cinco clados bien diferenciados para las poblaciones mexicanas del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*. Estos agrupamientos, corresponderían a las especies filogenéticas *Chlorospingus ophthalmicus*, *Chlorospingus dwighti*, *Chlorospingus albifrons*, *Chlorospingus wetmorei* y *Chlorospingus postocularis* (Figura 2a y 2b), (nombradas de manera binomial en adelante).

En el primer árbol de distancias, realizado únicamente para los haplotipos del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, mostró una topología de dos clados principales, el primero (nombrado clado mexicano en adelante), incluye los haplotipos *C. ophthalmicus* (99%), *C. dwighti* (99%) y *C. albifrons* (99%), y el segundo clado, incluye por un lado los agrupamientos formados por las subespecies centroamericanas del complejo (*C. o. honduratus*, *C. o. regionalis* y *C. o. punctulatus*) donde se incluye el conjunto de haplotipos de *C. postocularis* (99%), y por otro lado, a las subespecies sudamericanas del complejo (*C. o. bolivianus*, *C. o. argentinus* y *C. o. phaeocephalus*) relacionadas como grupos hermanos, donde *C. wetmorei* (100%) forma una rama basal (Figura 2a).

Sin embargo, esta topología no se mantienen intacta al incluir dentro del análisis las secuencias de las especies *Chlorospingus inornatus*, *Chlorospingus pileatus*,

Chlorospingus semifuscus y *Chlorospingus tacarcunae* (Figura 2b). Este hecho, modifica el arreglo de todo el complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, que al vincular a las subespecies sudamericanas con las especies externas, en una asociación ambigua de los taxones (subespecies del complejo y especies del género), modifica la topología del clado mexicano conformado así por *C. ophthalmicus* (99%), *C. dwighti* (99%), *C. albifrons* (99%) y *C. wetmorei* (100%), que en esta ocasión se encuentra relacionado con el haplotipo de *Chlorospingus pileatus* (Costa Rica). Esta rama particularmente, es interesante debido a que no cuenta con valores de bootstrap superiores al 70% (valor de soporte mínimo aceptado), por lo que muy probablemente se trate de una relación artificial.

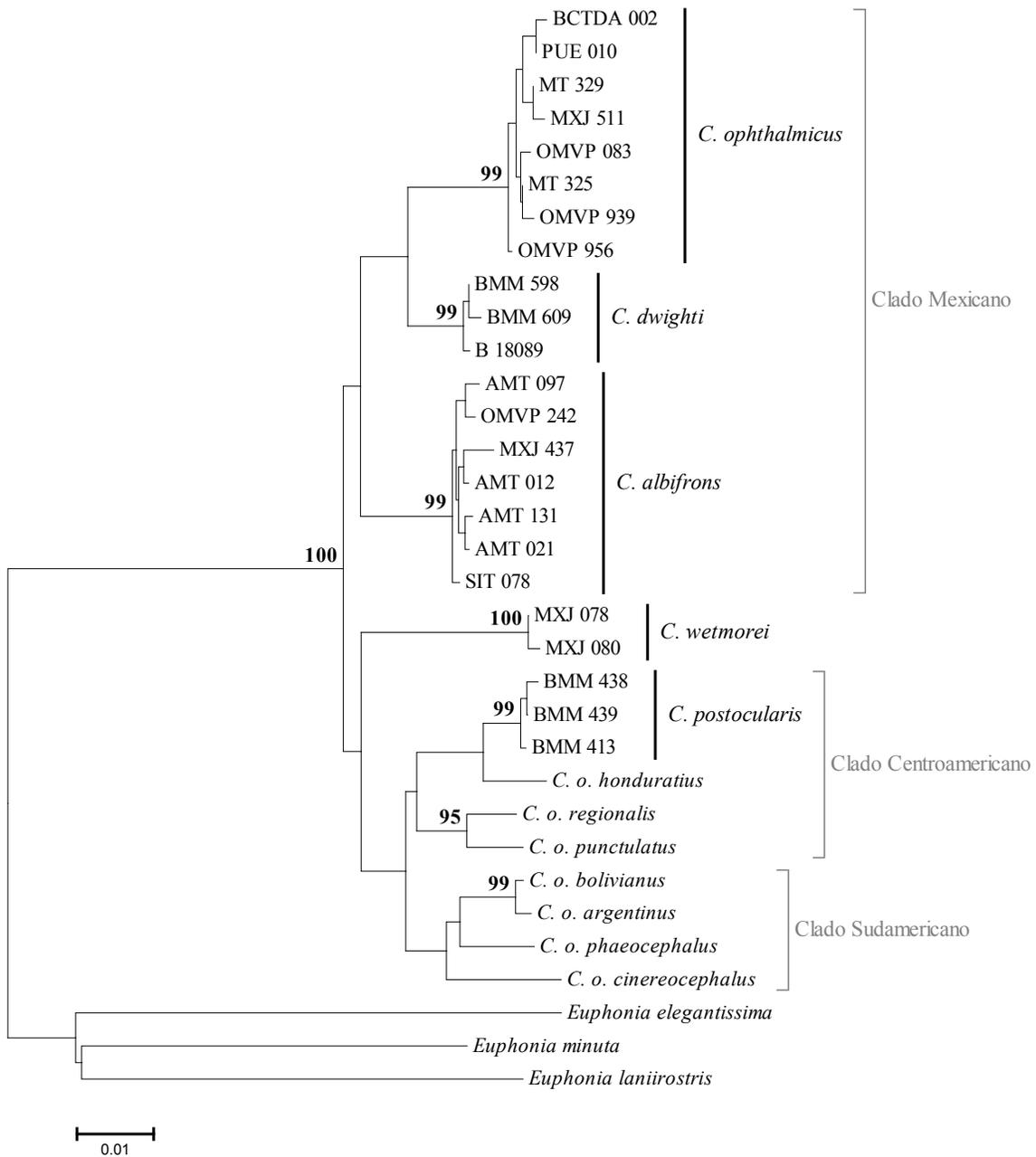


Figura 2a. Árbol de distancias genéticas de Neighbor-Joining elaborada con el programa MEGA5 (Tamura *et al.* 2011), donde se muestran los límites de especies encontrados para las poblaciones mexicanas del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*.

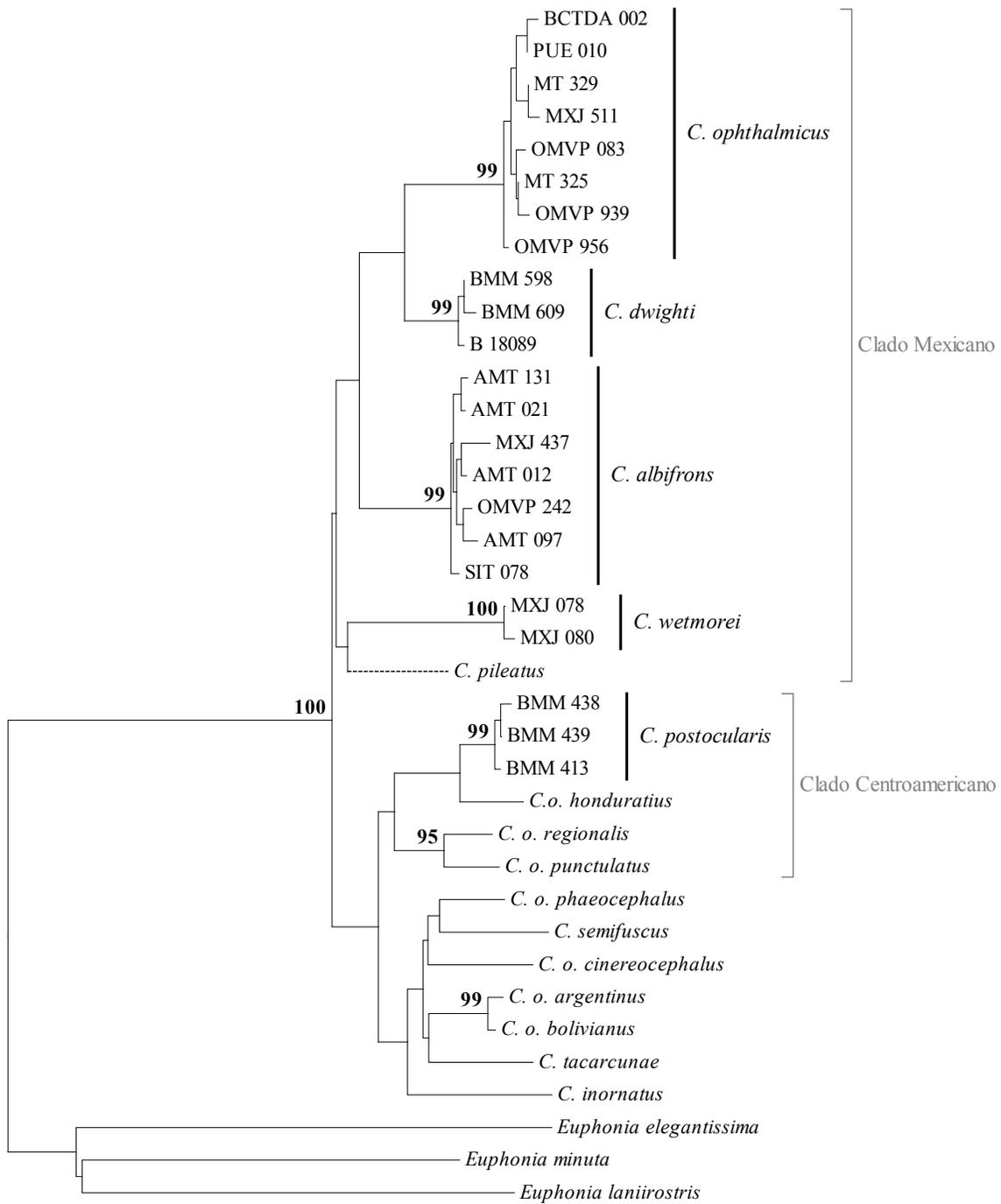


Figura 2b. Árbol de distancias de Neighbor-Joining, utilizando secuencias de cuatro especies del género *Chlorospingus*. MEGA5 (Tamura *et al.* 2011).

Reconstrucciones filogenéticas

Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML)

Tanto en la reconstrucción filogenética de Máxima Parsimonia como en la de Máxima Verosimilitud, elaboradas con el programa PAUP* v4.0 (Swofford 2002), las especies reconocidas mediante el sistema de identificación del Código de Barras, formaron clados claramente diferenciados. Sin embargo, las relaciones filogenéticas entre ellas no pudieron ser resueltas (politomía), en la mayoría de los casos. El único clado resuelto pertenece al conjunto de subespecies centroamericanas, donde *C. postocularis* de la Sierra Madre de Chiapas, se mantuvo unida a *C. o. honduratus*, *C. o. regionalis* y *C. o. punctulatus*, de la misma manera que en los análisis de distancias genéticas. Este único clado recuperado, contó con valores de bootstrap superiores al 70% en sus ramas internas, aunque la rama principal no estuvo bien soportada por los valores de ML (Apéndice VI).

Inferencia Bayesiana (IB)

La reconstrucción filogenética basada en el método de Inferencia Bayesiana, utilizando la matriz de datos con los haplotipos del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* y las especies *Chlorospingus inornatus*, *Chlorospingus pileatus*, *Chlorospingus semifuscus* y *Chlorospingus tacarcunae*, fue la hipótesis que mejor resolvió las probables relaciones filogenéticas entre los diferentes clados del complejo mexicano (Figura 3). De tal manera que, las especies *C. ophthalmicus* (99%), *C. dwighti* (98%), *C. albifrons* (97%) y *C.*

wetmorei (100%), conformaron nuevamente lo que hemos llamamos clado mexicano, muy similar al encontrado mediante el análisis de distancias donde *C. pileatus*, nuevamente se encontró incluido, aunque en esta ocasión no se estableció una relación clara respecto a ella. Esta inclusión no resuelta de *C. pileatus* dentro del clado mexicano junto al clado de *C. wetmorei* fueron las únicas ramas que no estuvieron soportadas por valores de bootstrap superiores al 70%, y evitaron la resolución total de las relaciones filogenéticas encontradas.

Por otra parte, la especie *C. postocularis* (98%), se encontró nuevamente más relacionada al complejo centroamericano que permaneció prácticamente idéntico al encontrado mediante los métodos de Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y los análisis de distancias genéticas de Neighbor-Joining. Sin embargo, no fue posible establecer la relación de grupos hermanos entre los clados principales.

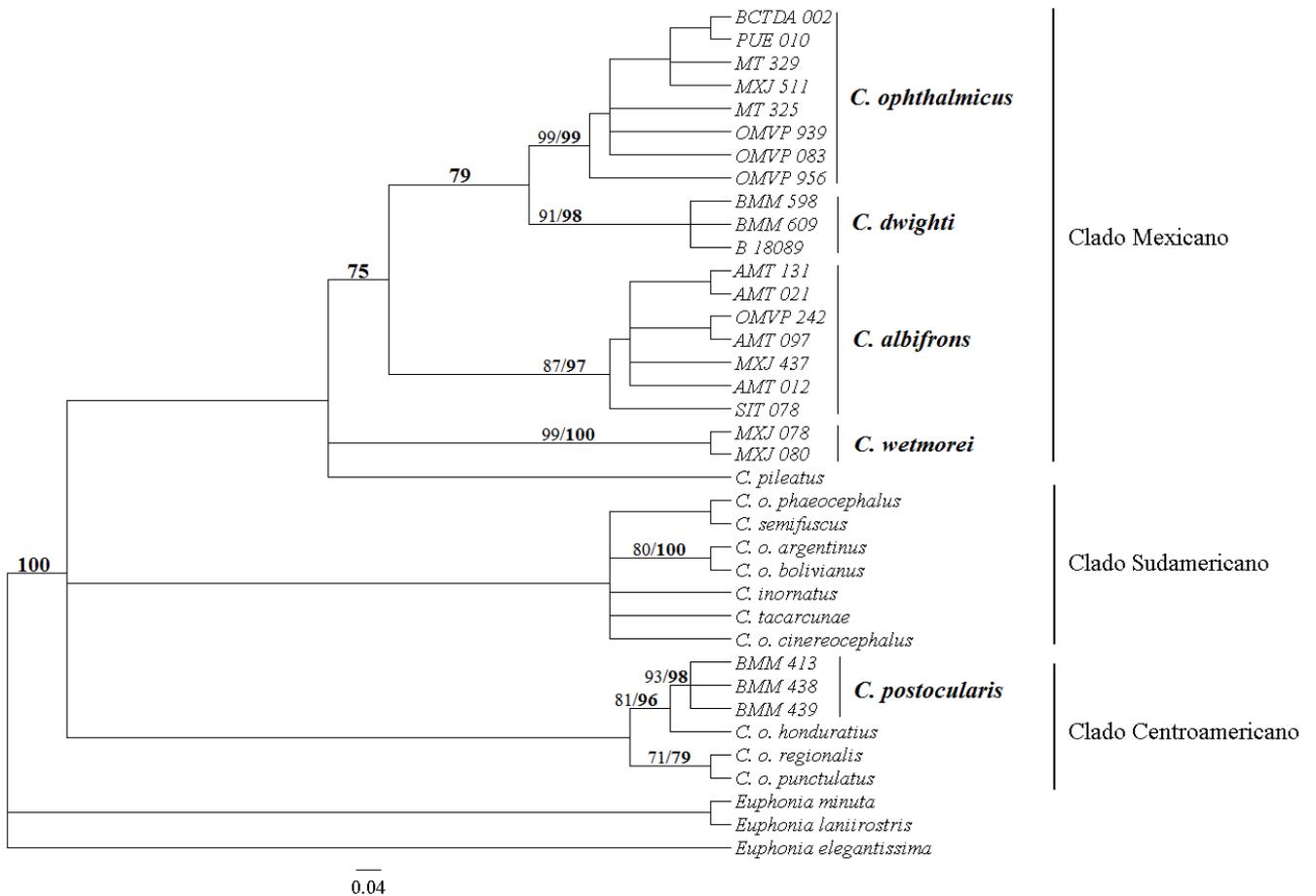


Figura 3. Reconstrucción filogenética de Mr. Bayes v3.1 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Donde se muestran los valores de soporte de bootstrap y probabilidad posterior, obtenidos para los métodos de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana respectivamente (ML / IB).

6. DISCUSIÓN

Las secuencias del gen COI

El reconocimiento de los límites de especies realizado con el Código de Barras (gen COI), primero permitió hacer una caracterización general del grado de variabilidad que presenta el gen COI, dentro de las poblaciones del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* de México. Esta caracterización, que comenzó con la delimitación del número de haplotipos en los que se agruparon los individuos muestreados, nos dio un primer indicio de la profunda diferenciación genética, ampliamente documentada que existe en las poblaciones del complejo, que corresponde con barreras geográficas claras (Peterson *et al.* 1992, García-Moreno *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2007, Bonaccorso *et al.* 2007, Weir *et al.* 2008), donde los haplotipos se encontraron, en todos los casos, conformados únicamente por individuos distribuidos en la misma región geográfica (Tabla 3).

Adicionalmente, el número de haplotipos encontrados por región, aunque muy probablemente se encuentran determinados por el número de muestras analizadas para cada una de ellas (Tabla 3), nos puede dar una idea del grado de variación que existe para el gen COI, en sus poblaciones. Por ejemplo, la asombrosa desproporción de riqueza haplotípica encontrada entre las poblaciones del norte y sur de la Sierra Madre Oriental, donde seis de los 8 haplotipos encontrados, corresponden únicamente a las poblaciones del estado de Oaxaca, con 20 individuos muestreados para esta zona, mientras que los dos haplotipos restantes, agruparon 22 individuos de poblaciones geográficamente distantes, que resumen la diversidad genética presente en los estados de Querétaro, Hidalgo, Veracruz y Puebla.

Esta mayor variabilidad encontrada en la zona sur de la Sierra Madre Oriental, quizá puede ser explicada tomando en cuenta la complejidad topográfica de la región conocida como “nudo de Zempoaltépetl”, que al ser una zona de contacto entre la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre del Sur, está caracterizada por un relieve complejo de pendientes pronunciadas (López de Llergo 2003, Pacheco 2011), que podrían estar provocando una profunda fragmentación del hábitat, que unida a los limitados intervalos de elevación y distribución ecológica restringida, determinados por el bosque mesófilo de montaña, ha sido considerado como un conjunto de factores que promueven la variación y especiación poblacional (Graves 1985). En este caso, agrupando a las poblaciones en pequeños grupos cohesivos, donde se ha encontrado un alto grado de diferenciación morfológica y genética (Sánchez-González 2002).

Otro ejemplo del alto grado de variación genética, vista en los agrupamientos de los haplotipos, es el de las poblaciones distribuidas en los estados de Guerrero y Oaxaca de la Sierra Madre del Sur, donde de los 7 haplotipos encontrados, solo uno pertenece al estado de Oaxaca, mientras que, de los seis haplotipos restantes, todos encontrados en Guerrero, cuatro se encuentran representados por una sola secuencia (Tabla 3). Esta diferencia puede indicar dos cosas, la primera es que entre las poblaciones de Guerrero y Oaxaca, el flujo genético haya estado disminuyendo por un periodo de tiempo significativo, como resultado del aislamiento geográfico que provoca la formación de islas del bosque mesófilo, promoviendo una diferenciación no trivial entre estas poblaciones (García-Moreno *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2007, Weir *et al.* 2008). La segunda posibilidad es, que al igual que en los trabajos anteriores, el muestreo disponible haya resultado insuficiente para

corroborar el grado de continuidad genética entre las poblaciones ([García-Moreno et al. 2004](#)), luego de que, para la Sierra de Miahuatlán (Oaxaca), únicamente fueron muestreados tres individuos y para las poblaciones de Guerrero, fueran muestreados 12 individuos.

Finalmente, el ejemplo contrario de alta diversidad genética entre poblaciones de la misma región geográfica, es el de la región comprendida entre la zona de los Chimalapas en Oaxaca y el Macizo Central de Chiapas, donde los 16 individuos muestreados fueron agrupados en 3 haplotipos, dos de los cuales están representados por una sola secuencia, mientras que el tercero agrupa 14 individuos de todas las localidades muestreadas para esta región. Este caso, no se encontró un patrón que sugiriera bajo flujo génico entre poblaciones distantes y dado que el muestreo no es realmente muy limitado, la baja diversidad genética encontrada, aunque podría deberse a un evento azaroso, también puede interpretarse como indicativo de continuidad genética entre las poblaciones de esta región.

Siguiendo con la exploración de la información contenida en las secuencias del gen COI, se encontró que los intervalos de distancias genéticas entre las poblaciones de cada región geográfica fue, en todos los casos superior al 2%, esto es importante debido a que se trata de una tasa de cambio moderada, generalmente aceptada como valor mínimo de divergencia entre especies estrechamente relacionadas ([Lovette 2004](#)). Lo que nos indica, una vez más que dentro de las poblaciones del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, el gen COI cumple con los parámetros de discriminación entre especies estrechamente relacionadas asumidas por el sistema de identificación del Código de Barras ([Hebert et al.](#)

2004b), además de corroborar que ésta tasa de cambio, de 2% por millón de años, es en general un valor ampliamente superado, lo que significaría que para los casos donde los límites de especies están tan bien explorados, éstos valores estandarizados son evidencia de una estructura genética profunda.

En cuanto a las distancias genéticas encontradas dentro de las poblaciones del complejo (subespecies en, AOU 1998), se observó que los intervalos más amplios se encuentran entre las poblaciones de la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre del Sur, donde como ya se mencionó, existe evidencia de una profunda divergencia genética entre los individuos del norte y sur de la Sierra Madre Oriental y de Guerrero y Oaxaca en la Sierra Madre del Sur (García-Moreno *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2007, Bonaccorso *et al.* 2007, Weir *et al.* 2008), (Tabla 4).

Los límites de especies del Código de Barras

Mediante la utilización del Código de Barras, fue posible hacer una clara identificación de los límites de especies para cinco poblaciones del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* de México, que coinciden con los propuestos anteriormente a partir de evidencia de variación geográfica a nivel morfológico (Sánchez-González 2002), genético (García-Moreno *et al.* 2004, Bonaccorso *et al.* 2007, Sánchez-González 2007, Weir *et al.* 2008) y de variación vocal (Sosa-López 2004), argumentos encontrados a lo largo de casi una década de exhaustivos muestreos e investigación sobre las características biológicas que diferencian estas poblaciones.

Donde la profunda divergencia genética se encuentra en un claro patrón de correspondencia con los principales macizos montañosos que limitan su distribución, lo que sugiere que esta diferenciación puede ser explicada a partir de los patrones históricos de aislamiento de las poblaciones (Peterson *et al.* 1992), (Figura 1).

Este sistema de identificación molecular, apoya la existencia de cinco linajes evolutivos independientes que corresponderían a las especies filogenéticas:

1. *Chlorospingus ophthalmicus*

Especie distribuida a lo largo de la Sierra Madre Oriental, desde el sur de San Luis Potosí hasta el norte de Oaxaca, donde se ha encontrado un patrón de diferenciación genética tan profunda que es capaz de formar clados recíprocamente monofiléticos entre las poblaciones del norte y el sur de la SMO (García-Moreno *et al.* 2004, Weir *et al.* 2008), esta diferenciación resulta consistente con el patrón de variación geográfica encontrado mediante un análisis morfológico, donde las poblaciones del norte y el sur presentan una variación clinal en cuanto al tamaño corporal y caracteres como la coloración de la garganta y la coronan (Tabla 1), (Sánchez-González 2002). Actualmente se considera una población más estrechamente relacionada con *C. dwighti*, afirmación que estuvo apoyada también por el análisis de variación vocal, a pesar de que en su tiempo, *C. dwighti*, estaba considerada más bien parte de *C. ophthalmicus*, sin embargo ambas poblaciones mostraron ligeras variaciones que las claramente diferenciables (Sosa-López 2004).

2. *Chlorospingus dwighti*

Esta especie, hasta hace relativamente poco tiempo no estaba bien caracterizada, y de hecho no pudo ser diagnosticada claramente mediante un primer análisis de variación morfológica (Sánchez-González 2002), mientras que a partir de los primeros análisis genéticos no pudo resolverse si estaba más relacionada con *C. ophthalmicus* o con *C. albifrons* (García-Moreno *et al.* 2004). Sin embargo, mediante el análisis de variación vocal, se encontró que ésta población tiene una diferencia estructural en sus vocalizaciones, a pesar de que en notas y tiempos se encuentre relacionada a las poblaciones de *C. ophthalmicus* (Sosa-López 2004), esta diferenciación entre ambas poblaciones fue posteriormente reflejada mediante el análisis de DNA mitocondrial (Bonaccorso *et al.* 2008, Weir *et al.* 2008). Actualmente se reconoce a *C. dwighti* como una población claramente diferenciada que se distribuye desde la porción este de Oaxaca (Chimalapas), hasta la zona del Macizo Central de Chiapas y está más estrechamente relacionada con las poblaciones de la Sierra Madre Oriental. Esta inferencia es apoyada no solo por los análisis moleculares sino también por los patrones geológicos y fisiográficos de la región, que hacen coincidir los tiempos de divergencia de los linajes de la Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur y el Macizo Central de Chiapas, con el surgimiento del Istmo de Tehuantepec (García-Moreno *et al.* 2004).

3. *Chlorospingus albifrons*

Especie compuesta por las poblaciones de Guerrero y Oaxaca de la Sierra Madre del Sur, dentro de la cual se incluye a *C. o. pesimilis* (AOU 1998). Donde se ha sugerido que si bien, el grado de diferenciación genética encontrado entre ellas, podría ser resultado de

largos periodos de aislamiento geográfico, esta divergencia no ha sido aún lo suficientemente significativa como para reflejar la existencia de más de un linaje evolutivo en la región, conclusión apoyada por los mayoría de los estudios realizados para este complejo (García-Moreno *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2007, Bonaccorso *et al.* 2008), excepto por Weir *et al.*(2008). Esta conclusión se encuentra apoyada también en la evidencia encontrada a través de los análisis de variación geográfica explorada a nivel morfológico y de variación vocal, donde se encontró que no existe prácticamente ninguna diferencia fundamental entre ambas poblaciones (Sánchez-González 2002, Sosa-López 2004).

Una hipótesis sobre el origen de la larga historia de aislamiento geográfico que estas tres especies comparten, asume que el patrón de colonización que ha tenido el complejo en el continente, tuvo que haber sido en dirección sur-norte, basado en los tiempos de divergencia obtenidos a partir del análisis de COII, tRNA-Lys, ATP'asa 6 y8, que coinciden con el surgimiento del Istmo de Tehuantepec (García-Moreno *et al.* 2004). Zona a menudo considerada, límite de distribución y diferenciación en diversas especies de aves, mamíferos y peces (Pauly *et al.* 2004), donde se ha observado que varios taxones de aves, que son diversos en Sudamérica, y alcanzan su límite de distribución en esta zona, con frecuencia presentan una diversidad reducida (Rodríguez-Contreras 2007), patrón que coincide con la variación morfológica del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*. Lo mismo que en algunos grupos de aves de distribución norteamericana que tienen su límite sur en la misma región, donde la diferenciación es aparentemente nula (Escalante-Pliego *et al.* 1998).

Sin embargo, aún no existe suficiente evidencia sobre si el origen del complejo fue en Centroamérica o en Sudamérica debido a que las relaciones jerárquicas encontradas entre los clados de México, Centro y Sudamérica no han podido resolverse con claridad mediante el uso de DNA mitocondrial.

4. *Chlorospingus wetmorei*

Se distribuye únicamente en la región de la Sierra de los Tuxtlas y ha sido ampliamente reconocida como la especie genéticamente más diferenciada del complejo mexicano (Peterson *et al.* 2002, García-Moreno *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2007). Además de que, mediante el análisis morfológico se encontró que, esta población presenta un carácter único (líneas en forma de “V” en la zona de la frente), que las diferencia de las poblaciones de la Sierra Madre Oriental, al que son morfológicamente más similares (Sánchez-González 2002, Sánchez-González *et al.* 2007).

Esta diferenciación genética y morfológica, es producto quizá, del alto grado de aislamiento geográfico al que están sujetas sus poblaciones, dado que la Sierra de los Tuxtlas, es un macizo montañoso que ha estado rodeado de otras masas montañosas por largos periodos de tiempo, lo que ha provocado el aislamiento de diversos grupos biológicos de distribución restringida, y es conocido como un foco importante de endemismo local, no solo para diversas especies de aves sino para una gran cantidad de grupos biológicos. Debido a ello, esta especie se ha encontrado como grupos externo de las especies *C. ophthalmicus*, *C. dwighti* y *C. albifrons*, o como la especie más relacionada al clado formado por las subespecies centroamericanas del complejo.

5. *Chlorospingus postocularis*

La especie mexicana con la distribución geográfica más sureña del país que también ha sido considerada, la población más norteña del complejo centroamericano (Ferrusquía 1998), y aunque ambas visiones son en realidad válidas, la evidencia apunta a que muy probablemente esta subespecie representa el límite norte de la distribución centroamericana del complejo, ya que salvo en los casos donde Centroamérica no se encuentre representado, al menos por una sola secuencia, la unión de esta subespecie al clado mexicano es de hecho un evento muy raro, lo que estaría indicando una relación ancestral con las poblaciones mexicanas (Weir *et al.* 2008). Al respecto de la ruta de colonización que siguieron las poblaciones del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* aún no hay una hipótesis claramente establecida, pues la estimación de los tiempos de divergencia (García-Moreno *et al.* 2004), no coincide con las relaciones genealógicas encontradas a partir del análisis de DNA mitocondrial (Weir *et al.* 2008).

Hipótesis de relaciones filogenéticas

A pesar de que, como ya hemos visto, este fragmento de DNA mitocondrial elegido como marcador molecular para la identificación taxonómica de las especies de animales (gen COI), posee la variabilidad suficiente, para realizar una buena discriminación entre linajes estrechamente relacionados (i.e. complejo *Chlorospingus ophthalmicus*), que coinciden con los límites de especies encontrados a partir de datos moleculares mucho más robustos como el análisis de genes concatenados (COII, tRNA – Lys, y ATP'asas 6 y 8). El grado de resolución que brinda COI para identificar poblaciones divergentes, es en cierto sentido

limitado, pues en comparación con estos mismos estudios que exploran la diversidad de otros genes de origen mitocondrial, este gen COI presenta una baja sensibilidad para identificar poblaciones divergentes a un grado tan fino, como en el caso de *C. ophthalmicus*, donde se ha sugerido que la baja tasa de migración entre las poblaciones del norte y sur de la sierra podrían estar promoviendo una divergencia genética profunda que las ha llevado a formar grupos recíprocamente monofiléticos entre ambas zonas (García-Moreno *et al.* 2004, Bonaccorso *et al.* 2007, Sánchez-González 2007, Weir *et al.* 2008), patrón filogeográfico que no fue posible recuperar en este estudio, aunque si se observó en los agrupamientos por haplotipos (Tabla 3).

Otro ejemplo de esta baja resolución dentro de las poblaciones del complejo mexicano, fue el encontrado para *C. albifrons* de la Sierra Madre del Sur y los individuos de la Sierra de Miahuatlán (*C. o. persimilis*), donde a pesar de los agrupamientos diferenciados entre los haplotipos de ambas poblaciones, tampoco fue posible identificar un patrón claro de divergencia genética, aunque en este caso puede decirse que dicho agrupamiento homogéneo entre ambas poblaciones, refuerza el reconocimiento de una sola unidad evolutiva entre las cuales no existe aún una estructura filogenética profunda. Estos casos podrían representar un estado muy temprano de divergencia genética encaminada a la formación de trayectorias evolutivas independientes, que no fueron recuperadas en este estudio (García-Moreno *et al.* 2004, Sánchez-González *et al.* 2007, Bonaccorso *et al.* 2007).

En cuanto a la capacidad del gen COI para establecer relaciones jerárquicas entre las diferentes especies del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, se encontró que, aunque los

criterios de reconstrucción filogenética de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud, mostraron claros agrupamientos entre los haplotipos de cada especie identificada a partir del Código de Barras, soportados por valores de bootstrap de hasta 100%, en el caso de MP ([Apéndice VI](#)), estos métodos no lograron resolver las relaciones de ancestría – descendencia entre las especies del complejo, generando una topología conocida como politomía blanda, pues el dado que se ha llegado a encontrar un patrón de relaciones entre los clados utilizando otros métodos (i.e. Inferencia Bayesiana), esta politomía encontrada únicamente hace suponer que es resultado más bien de la existencia de incertidumbre sobre cuál es el orden correcto de ramificación para estos algoritmos ([Martínez 2007](#)).

La única excepción fue para el caso del “clado centroamericano”, que mantiene una topología similar en casi todos los árboles obtenidos, tanto en los análisis de distancias genéticas como en los de reconstrucción filogenética, mientras que para las subespecies sudamericanas no se pudo encontrar arreglo filogenético alguno ([Apéndice VI](#)).

Estas relaciones genealógicas no resueltas entre las especies mexicanas del complejo, y dada la marcada diferenciación genética observada en estudios previos y reforzada en este, se puede deber quizá a una excesiva limitación de información filogenética contenida en apenas 661 pares de bases, pues para ser evidencia de divergencia reciente, se necesitaría encontrar resultados similares y en todos los casos donde este complejo ha sido analizado, esto no ha sido el caso.

La hipótesis “mejor” estructurada sobre las relaciones filogenéticas entre las especies del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, fue la obtenida por el método de

Inferencia Bayesiana (Figura 3), en este caso, la topología del árbol obtenido recupera la estructura jerárquica encontrada en los clados formados por los haplotipos de las especies mexicanas *C. ophthalmicus*, *C. dwighti*, *C. albifrons* y *C. wetmorei*, mediante el uso de otros marcadores moleculares (García-Moreno *et al.* 2004, Bonaccorso *et al.* 2007, Sánchez-González 2007, Weir *et al.* 2008). También recupera el orden jerárquico entre las subespecies centroamericanas del complejo con respecto a la especie *C. postocularis* y el agrupamiento de las subespecies de sudamericanas forman un clado diferenciado, aunque en asociación con las especies *Chlorospingus inornatus*, *Chlorospingus pileatus*, *Chlorospingus semifuscus* y *Chlorospingus tacarcunae*. Al respecto, es importante decir que la inclusión y exclusión de estas secuencias, tuvieron gran influencia sobre las relaciones filogenéticas encontradas, principalmente dentro del llamado “clado mexicano”, pues las relaciones genealógica dentro de este clado sólo se pudieron recuperar tomando en cuenta éstos haplotipos. Esto podría relacionarse con el hecho de que *C. inornatus* y *C. tacarcunae* han sido consideradas subespecies del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*, en algunas ocasiones (Zimmer 1947), aunque actualmente se encuentran claramente reconocidas como especies (AOU 1998).

En resumen, las relaciones genealógicas encontradas en las subespecies del complejo, a lo largo de toda su área de distribución (desde México hasta Argentina), conformaron clados bien diferenciados, que muestran una topología con relaciones jerárquicas claras entre los haplotipos de las regiones de: 1) México, 2) Centroamérica y 3) Sudamérica que coincide con lo encontrado en los análisis de secuencias de DNA

mitocondrial (COII, tRNA – Lys, y ATP'asas 6 y 8) por García-Moreno *et al.* (2004) y Bonaccorso *et al.* (2007).

Esta falta de estructura jerárquica encontrada a partir del uso de métodos alternativos al del Código de Barras nos hizo sospechar que quizá COI no posee un grado de diferenciación suficientemente poderoso como para ser usado en solitario al intentar establecer relaciones genealógicas entre grupos que están estrechamente relacionados, aunque si es capaz de identificar diferencias profundas entre poblaciones alopátricas razón por la que éste marcador molecular ha resultado muy eficiente en la identificación molecular de varios grupos biológicos, incluyendo a las aves (Hebert *et al.* 2004b, Kerr *et al.* 2011).

7. CONCLUSIONES

- Mediante el uso del sistema de identificación del Código de Barras, se lograron discriminar los límites de especies de cinco especies filogenéticas en México
 1. *C. ophthalmicus*, de la Sierra Madre Oriental.
 2. *C. dwighti*, del Macizo Central de Chiapas.
 3. *C. albifrons*, de la Sierra Madre del Sur.
 4. *C. wetmorei*, de la Sierra de los Tuxtlas.
 5. *C. postocularis*, de la vertiente del pacífico de Chiapas y Guatemala.
- Este sistema agrupa a *C. albifrons* y *C. persimilis* como una sola unidad, aunque la divergencia genética que existe entre sus haplotipos fue más amplia en comparación con el resto de los intervalos de divergencia genética interespecífica.
- El porcentaje de divergencia interespecífico fue superior al 2% en todos los casos.
- El gen COI es una herramienta molecular insuficiente para dilucidar las relaciones filogenéticas a detalle dentro del complejo *Chlorospingus ophthalmicus*.
- Sigue siendo indispensable el análisis a partir de DNA de origen nuclear que descarte el carácter conespecífico de las secuencias clonales.

REFERENCIAS

- American Ornithologists' Union (AOU). 1998.** Check-list of North American birds. 10th Ed. Washington, D. C.
- Avise, J. C. 2000.** Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, MA, EUA.
- Avise, J. C. 1994.** Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall. USA.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, 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.
- Bonaccorso, E., A. G. Navarro-Sigüenza, L. A. Sánchez-González, A. T. Peterson & J. García-Moreno. 2007.** Genetic differentiation of the *Chlorospingus ophthalmicus* complex in Mexico and Central America. *Journal of Avian Biology*. 39: 311-321.
- Bucklin, A., M. Guarnieri, R. S. Hill, A. M. Bentley, & S. Kaartvedt. 1999.** Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial CO1 sequence variation and competitive, species-specific PCR. *Hydrobiologia* 401: 239-254.
- Cerritos, F. R. 2007.** La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. Cap. 10. En: Eguiarte, L. E., Souza, V. & Aguirre, X. Compiladores. Ecología Molecular. México. SERMARNAT, INECOL, UNAM y CONABIO. pp. 325-349.
- Chapman, A. D. 2009.** Numbers of Living Species in Australia and the World. Australian Government. Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts. Report for the Australian Biological Resources Study. Canberra, Australia. 78 p.

- Chase, M. W & Fay, M. F. 2009.** Barcoding of Plants and Fungi. *Science* 325: 682-683.
- Cox, A. J. & P. D. N. Hebert. 2001.** Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10: 371-386.
- Crisci, J. 1994.** La especie: realidad y conceptos. En: Llorente, B. J. e I. Luna-Vega. 1994. *Taxonomía Biológica*. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. pp. 53-62.
- Dasmahapatra, K. K., M. Elias, R. I. Hill, J. I. Hoffmans & J. Mallet. 2010.** Mitochondrial DNA barcoding detects some species that are real, and some that are not. *Molecular Ecology Resources* 10: 264-273.
- Doyle, J. J. & B. S. Gaut. 2000.** Evolution of genes and taxa: a primer. *Plant Molecular Biology* 42: 1-23.
- Escalante-Pliego. B. P., A. G. Navarro-Sigüenza & A. T. Peterson. 1998.** Un análisis geográfico, ecológico e histórico de la diversidad de aves terrestres de México. En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot & J. Fa. Compiladores. *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología. Universidad Autónoma de México. México, D. F. pp. 279-304.
- ESRI. 1999.** ArcView Gis Ver. 3.2. Environmental Systems Research Institute Inc., California, EUA.
- Ferrusquía, V. I. 1998.** Geología de México: una sinopsis. En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot & J. Fa. Compiladores. *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp. 3-108.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, & R. Vrijenhoek. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3 (5): 294-299.

- Foster, P. 2001.** The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth Science Reviews*. 55: 73-106.
- García-Deras, G. M. 2003.** Límites de especies dentro del complejo *Cynanthus latirostris* (Aves: Trochilidae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- García-Moreno, J., A. G. Navarro-Sigüenza, A. T. Peterson & L. A. Sánchez-González. 2004.** Genetic variation coincides with geographic structure in the Common Bush-Tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 33: 186-196.
- Gill, F. B. 1982.** Might there be a resurrection of the subspecies?. *Auk* 99: 598-599.
- Graves, G. R. 1985.** Elevational correlates of speciation and intraspecific geographic variation in plumage in Andean forest birds. *The Auk*. 102: 556-579.
- Hawksworth, D. L. & M. T. Kalin-Arroyo. 1995.** Magnitude and Distribution of Biodiversity. En: Heywood, V. 1995. Global biodiversity assessment. Cambridge, UK: Cambridge University Press. pp. 107-191.
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. deWaard. 2003a.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences* B 270: 313-321.
- Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham & J. R. deWaard. 2003b.** Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences* B 270: S96-S99.
- Hebert, P. D. N., E. H. Penton, J. M. Burns, D. H. Janzen & W. Hallwachs. 2004a.** Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper

butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS), 101: 14812-14817.

Hebert, P. D. N., M. Y. Stoeckle, T. S. Zemlak & C. M. Francis. 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science, Biology (PLoS) 2* (10) e312: 1657-1663.

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

Howell, S. N. G. & S. Webb. 1995. A Guide to the birds of Mexico and northern Central America. Oxford University Press, Oxford, UK. p. 851.

Isler, M. L. & P. R. Isler. 1987. The tanagers: Natural history, distribution and identification. Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.

Isler, M. L. & P. R. Isler. 1999. The Tanagers: Natural History, Distribution and Identification, second. Ed. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

Jarman, S. N. & N. G. Elliott. 2000. DNA evidence for morphological and cryptic Cenozoic speciations in the Anaspididae “living fossils” from the Triassic. *Journal of Evolutionary Biology*. 13 (4): 624 – 633.

Kerr, K. C. R. 2011. Searching for evidence of selection in avian DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*. 11(6): 1045-1055.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.

Knowlton, N. 1993. Sibling Species en the Sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189-216.

- Knowlton, N. & L. A. Weigt. 1998.** New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences* B 265: 2257-2263.
- Lane, N. 2009.** On the origin of bar codes. *Nature*. 462: 272-274.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. López, J. D. Thompson, T. J. Gibson & D. G. Higgins. 2007.** Clustal W and Clustal X versión 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
- Llorente, B. J. & I. Luna-Vega. 1994.** Taxonomía Biológica. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. p. 626.
- López de Llergo, R. 2003.** Principales rasgos geográficos de la República Mexicana. Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM. 50: 26-41.
- Lovette, I. 2004.** Mitochondrial dating and mixed support for the 2% rule in birds. *The Auk. A Quarterly Journal of Ornithology* 121 (1): 1-6.
- Lynch, M. & P. E. Jarrell. 1993.** A method for Calibrating Molecular Clocks and Its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135: 1197-1208.
- Maddison, D. R. & W. P. Maddison. 2003.** McClade 4. Versión 4.06 for OS X. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Martínez, C. L. 2007.** Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En: Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. Compiladores. Ecología Molecular. México. SERMARNAT, INECOL, UNAM y CONABIO. pp. 441-461.
- May, R. M. 1998.** How many species are there on earth?. *Science* 241(4): 1441-1449.
- Mayr, E. 1982.** Of what use are subspecies?. *The Auk* 99: 593-595.

- Navarro-Sigüenza, A. G. & Hernández-Baños, B. E. 1999.** Filogenia y clasificación de las aves: una nueva visión. En: Núñez-Farfán, J. y Eguiarte, L. E. Compiladores. La evolución biológica. Primera edición. Ed. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México y CONABIO. México, D.F. pp. 265-295.
- Navarro-Sigüenza, A. G., A. T. Peterson, E. López-Medrano & D. H. Benítez. 2001.** Species limits in Mesoamerican *Aulacorhynchus* toucanets. *Wilson Bull.* 113: 363 – 372.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000.** Molecular Evolution and phylogenetics. Oxford University Press.
- Omland, K. E., J. M. Baker & J. L. Peters. 2006.** Genetic signatures of intermediate divergence: population history of old and new world holartic ravens (*Corvus corax*). *Molecular Ecology.* 15: 795-808.
- Pacheco, F. M. 2011.** Tabla de volumen para *Quercus laurina* en la comunidad de Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Universidad de la Sierra de Juárez. Oaxaca, México. p. 63.
- Pakendorf, B. & M. Stoneking. 2005.** Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Reviews Genomics and Human Genetics.* 6: 165-183.
- Pauly, G. B., D. M. Hills & D. C. Canatella. 2004.** The history of a nearctic colonization: molecular phylogenetics and biogeography of the nearctic toads (*Bufo*). *Evolution* 58 (11): 2517-2535.
- Pennisi, E. 2007.** Wanted: A barcode for plants. *Science.* 318: 190-191.
- Pesenti, L. 2006.** Los conceptos de especie: algunas consideraciones desde la perspectiva de la práctica sistemática y su integración con el problema de la objetividad. Medellín, Colombia. *Versiones.* 6: 77-85.

- Peterson, A. T., P. Escalante-Pliego & A. G. Navarro-Sigüenza. 1992.** Genetic variation and differentiation in Mexican populations of Common bush-tanagers and Chestnut-capped Brush-Finches. *The Condor* 94: 244-253.
- Posada, D. 2008.** jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*.
- Quinn, T. W., 1997.** Molecular Evolution of the Mitochondrial Genome. En: Avian Molecular Evolution and Systematics. Mindell (editor). Academic Press. San Diego. pp. 3-23.
- Ratnasingham, S & P. D. N. Hebert. 2007.** BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*.
- Rodríguez-Contreras, V. 2007.** El papel del Istmo de Tehuantepec en los patrones biogeográficas de la avifauna mesoamericana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Rubinoff, D., S. Cameron & K. Will. 2006.** Are plant DNA barcodes a search for the Holy Grail?. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 21: 1-2.
- Rzedowski, J. 2006.** Vegetación de México. 1ra. Edición Digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. México. p. 504.
- Sáez, A. G. 2009.** Genes y especies. *Ecosistemas* 18 (1): 3-9.
- Sánchez-González. L. A. 2002.** Variación geográfica y límites de especies en las poblaciones de *Chlorospingus ophthalmicus* (Aves: Thraupidae) de Mesoamérica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sánchez-González, L. A., A. G. Navarro-Sigüenza, A. T. Peterson & J. García-Moreno. 2007.** Taxonomy of *Chlorospingus ophthalmicus* in Mexico and northern Central America. *The Bulletin of British Ornithologists' Club*. 127: 34-49.

- Sánchez-González, L. A., Morrone, J. J. & Navarro-Sigüenza, A. G. 2008.** Distributional patterns of the Neotropical humid montane forest avifaunas. *Biological Journal of Linnean Society*. 94: 175-194.
- Simmons, R. B. & S. J. Weller. 2001.** Utility and evolution of cytochrome *b* in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20 (2): 196-210.
- Sosa-López, J. R. 2004.** Variación geográfica en las vocalizaciones de las poblaciones de *Chlorospingus ophthalmicus* de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Stoeckle, M. & P. D. N. Hebert. 2008.** Barcode of Life. *Scientific American*. Oct: 82-88.
- Stoeckle, M. 2009.** COI barcoding primers for birds: methods from recent papers.
- Storer, R. W. 1982.** Subspecies and the study of geographic variation. *The Auk* 99: 599-601.
- Stotz, D. F., J. W. Fitzpatrick, T. A. Parker III & D. K. Moscovits. 1996.** Neotropical birds: ecology and conservation. University of Chicago Press. Chicago, Illinois.
- Swofford, D. L. 2002.** PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011.** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.
- Tangley, L. 1997.** How many species are there?. US. News and World Report. Aug.18,1997.
- Trewick, S. A. 2000.** Mitochondrial DNA sequences support allozyme evidence for cryptic radiation of New Zealand *Peripatoides* (Onychophora). *Molecular Ecology*. 9: 269-281.

- Valencia, A. S. 1999.** El problema del concepto de especie. En: Núñez-Farfán, J. y Eguiarte, L. E. Compiladores. La evolución biológica. Primera edición. Ed. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. México. pp. 189-202.
- Vázquez, E. 2007.** Filogeografía y Vertebrados Cap. 14. En: Eguiarte, L. E., Souza, V. & Aguirre, X. Compiladores. Ecología Molecular. México. SERMARNAT, INECOL, UNAM y CONABIO. pp. 441-461.
- Vijayan, K. & C. H. Tsou. 2010.** DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current Science*. 99: 1530-1541.
- von Cräutlein, M., H. Korpelainen, M. Pietiläinen & J. Rikkinen. 2011.** DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and Conservation*. 20: 373-389.
- Wares, J. P. & C. W. Cunningham. 2001.** Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 12: 2455-2469.
- Watson, D. A. & A. T. Peterson. 1999.** Determinants of diversity in a naturally fragmented landscape: humid montane forest avifaunas of Mesoamerica. *Ecography* 22: 582-589.
- Weir, J. T., E. Bermingham, M. J. Miller, J. Klicka, & M. A. González. 2008.** Phylogeography of a morphologically diverse Neotropical montane species, the Common Bush-Tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 47: 650-664.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, U. B. Gyllensten, K. M. Helm-Bychowski, R. G. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage & M. Stoneking. 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*. 26: 375-400.

Zhang, D. X. & G. M. Hewitt. 1997. Assessment of the universality and utility of a set conserved mitochondrial primers in insects. *Insect Molecular Biology*. 6 (2): 143-150.

Zhang, F., B. Su, Y. Zhang & L. Jin. 2007. Genetic studies of human diversity in East Asia. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Series B Biological Sciences*. B362: 987-995.

Zink, R. M., W. L. Rootes & D. L. Dittmann. 1991. Mitochondrial DNA variation, population structure, and evolution of the Common grackle (*Quiscalus quiscula*). *The Condor* 93: 318-329.

Zwickl, D. J. 2008. Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference. Ver. 0.96.

Consultas en Internet

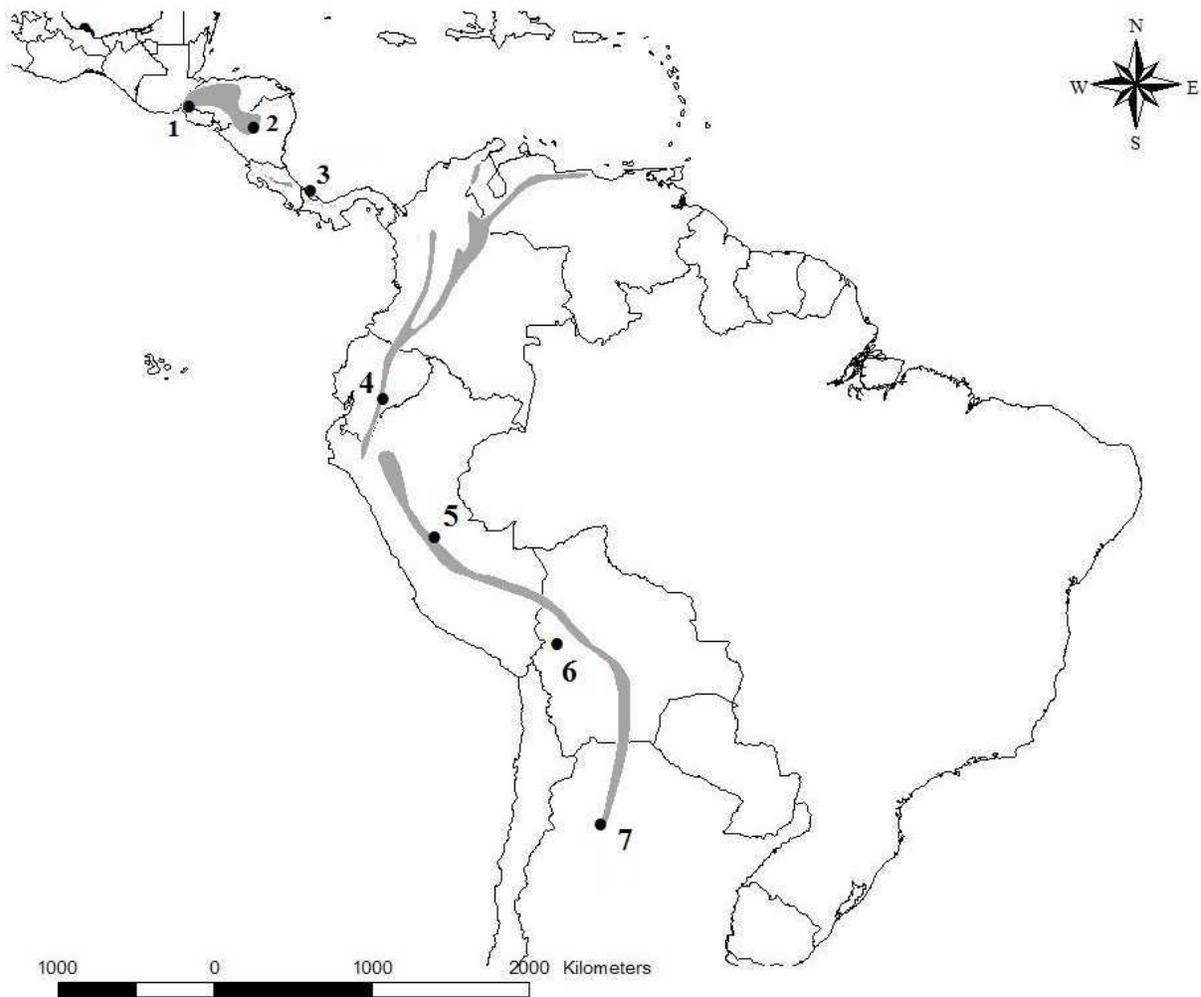
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

<http://www.aou.org/>

<http://www.boldsystems.org/views/login.php>

<http://www.boldsystems.org/views/projectmenu.php?&>

Apéndice I. Puntos de colecta reportados en GenBank, para las secuencias de las subespecies del complejo *Chlorospingus ophthalmicus* utilizadas: 1. *C. o. honduratus*. 2. *C. o. regionalis*. 3. *C. o. punctulatus*. 4. *C. o. phaeocephalus*. 5. *C. o. cinereocephalus*. 6. *C. o. bolivianus* y 7. *C. o. argentinus*.



# Sec.	Taxón	Subespecie	No. de Colección	# Loc.	Localidad	Estado/País
1	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BEHB 153	1	7 km S de Tres Lagunas, al S del Madroño	Querétaro
2	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	QRO 102	2	Santa Inés, 2 km W	Querétaro
3	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	QRO 103	2	Santa Inés, 2 km W	Querétaro
4	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	QRO 115	2	Santa Inés, 2 km W	Querétaro
5	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 085	3	5 km E Tlanchinol	Hidalgo
6	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 790	3	5 km E Tlanchinol	Hidalgo
7	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 791	3	5 km E Tlanchinol	Hidalgo
8	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 799	3	5 km E Tlanchinol	Hidalgo
9	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	EAM 013	4	Aprox. km 4 carretera La Majonera-Tlahuelimpa	Hidalgo
10	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	EAM 014	4	Aprox. km 4 carretera La Majonera-Tlahuelimpa	Hidalgo
11	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	EAM 019	4	Aprox. km 4 carretera La Majonera-Tlahuelimpa	Hidalgo
12	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BCTDA 002	5	El Potrero, 5 km Tenango de Doria	Hidalgo
13	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BCTDA 003	5	El Potrero, 5 km Tenango de Doria	Hidalgo
14	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 517	5	El Potrero, 5 km Tenango de Doria	Hidalgo
15	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 543	5	El Potrero, 5 km Tenango de Doria	Hidalgo
16	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 914	5	El Potrero, 5 km Tenango de Doria	Hidalgo
17	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	BMM 926	5	El Potrero, 5 km Tenango de Doria	Hidalgo
18	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	PUE 010	6	San Andrés Tlahulancingo, 4 km E Ahuacatlán	Puebla
19	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	PUE 149	7	2 km O Jonotla	Puebla

Apéndice II. Lista de secuencias analizadas por Localidad (* Muestras publicadas en [Weir et al. 2008](#)).

20	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	PUE 150	7	2 km O Jonotla	Puebla
21	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	PUE 119	8	Cuitchat, 8 km NE Cuetzalan	Puebla
22	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	IECO 065	9	Jardín Botánico de Jalapa	Veracruz
23	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 024	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
24	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 026	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
25	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 051	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
26	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 589	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
27	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 599	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
28	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 604	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
29	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 625	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
30	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 627	10	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puerto Soledad	Oaxaca
31	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 083	11	Sierra de Huautla, Distrito Teotitlán, Puente de Fierro	Oaxaca
32	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 1115	12	San Martín Caballero	Oaxaca
33	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 927	13	Distrito de Teotitlán, Peña Verde	Oaxaca
34	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 939	13	Distrito de Teotitlán, Peña Verde	Oaxaca
35	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 956	13	Distrito de Teotitlán, Peña Verde	Oaxaca
36	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	OMVP 976	13	Distrito de Teotitlán, Peña Verde	Oaxaca
37	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	MT 325	14	La Esperanza, km 79.5 carretera Tuxtepec-Oaxaca	Oaxaca
38	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	MT 327	14	La Esperanza, km 79.5 carretera Tuxtepec-Oaxaca	Oaxaca
39	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	MT 329	14	La Esperanza, km 79.5 carretera Tuxtepec-Oaxaca	Oaxaca
40	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	MT 330	14	La Esperanza, km 79.5 carretera Tuxtepec-Oaxaca	Oaxaca
41	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	MT 326	15	Brecha 60, km 102 de la carretera Tuxtepec-Oaxaca	Oaxaca
42	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>ophthalmicus</i>	MXJ 511	16	Cerro de Zempoaltépetl, ---km ---Totontepec	Oaxaca

(Continuación) Apéndice II. Lista de secuencias analizadas por Localidad (* Muestras publicadas en [Weir et al. 2008](#)).

43	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	AMT 012	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
44	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	AMT 018	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
45	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	AMT 021	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
46	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	AMT 067	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
47	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	AMT 091	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
48	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	AMT 097	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
49	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	AMT 131	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
50*	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	EU427588	17	Carrizal del Bravo	Guerrero
51	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	MXJ 437	18	Sierra de Atoyac, El Iris	Guerrero
52	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	SIT 065	19	Nueva Delhí	Guerrero
53	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	SIT 074	19	Nueva Delhí	Guerrero
54	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	SIT 078	19	Nueva Delhí	Guerrero
55	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	OMVP 210	20	Reyes Llano Grande	Oaxaca
56	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	OMVP 242	20	Reyes Llano Grande	Oaxaca
57	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>albifrons</i>	OMVP 243	20	Reyes Llano Grande	Oaxaca
58	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>wetmorei</i>	TUXFPO 027	21	Cerca Estación Biológica Tropical Los Tuxtlas	Veracruz
59*	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>wetmorei</i>	EU427586	22	El Bastonal (3 Km SE)	Veracruz
60	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>wetmorei</i>	MXJ 078	23	Sierra de Santa Martha	Veracruz
61	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>wetmorei</i>	MXJ 080	23	Sierra de Santa Martha	Veracruz
62	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	CHIMA 171	24	(Chimalapas) Chalchijapa, a 20 km NE del pueblo	Oaxaca
63	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	B 18089	24	(Chimalapas) Chalchijapa, a 20 km NE del pueblo	Oaxaca

(Continuación) Apéndice II. Lista de secuencias analizadas por Localidad (* Muestras publicadas en [Weir et al. 2008](#)).

64	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	B 18090	24	(Chimalapas) Chalchijapa, a 20 km NE del pueblo	Oaxaca
65	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	SIT 120	25	Coapilla a 6.5 km N	Chiapas
66	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	SIT 096	26	Carretera Copainalá-Ocotepec km 38 a 95.5 km de Coapilla	Chiapas
67	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	SIT 102	26	Carretera Copainalá-Ocotepec km 38 a 95.5 km de Coapilla	Chiapas
68	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	SIT 104	26	Carretera Copainalá-Ocotepec km 38 a 95.5 km de Coapilla	Chiapas
69	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	SIT 111	26	Carretera Copainalá-Ocotepec km 38 a 95.5 km de Coapilla	Chiapas
70	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	SIT 117	26	Carretera Copainalá-Ocotepec km 38 a 95.5 km de Coapilla	Chiapas
71	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	BMM 569	27	6 km NE de Pueblo Nuevo, Camino Aurora-Ermita	Chiapas
72	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	BMM 593	27	6 km NE de Pueblo Nuevo, Camino Aurora-Ermita	Chiapas
73	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	BMM 598	27	6 km NE de Pueblo Nuevo, Camino Aurora-Ermita	Chiapas
74	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	BMM 601	27	6 km NE de Pueblo Nuevo, Camino Aurora-Ermita	Chiapas
75	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	BMM 608	27	6 km NE de Pueblo Nuevo, Camino Aurora-Ermita	Chiapas
76	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	BMM 609	27	6 km NE de Pueblo Nuevo, Camino Aurora-Ermita	Chiapas
77	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>dwighti</i>	BMM 610	27	6 km NE de Pueblo Nuevo, Camino Aurora-Ermita	Chiapas
78	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>postocularis</i>	BMM 413	28	Volcán Tacaná, Río Malá, x km x Unión Juárez	Chiapas
79	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>postocularis</i>	BMM 438	28	Volcán Tacaná, Río Malá, x km x Unión Juárez	Chiapas
80	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>postocularis</i>	BMM 439	28	Volcán Tacaná, Río Malá, x km x Unión Juárez	Chiapas
81	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>postocularis</i>	BMM 444	28	Volcán Tacaná, Río Malá, x km x Unión Juárez	Chiapas
82*	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>postocularis</i>	EU427650	29	Quetzaltenango	Guatemala
83*	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>honduratus</i>	EU427651	30	Chalatenango, Cerro El Pital	El Salvador
84*	<i>C. ophthalmicus</i>	<i>regionalis</i>	EU427652	31	Matagalpa, Matagalpa (10 Km N)	Nicaragua

(Continuación) Apéndice II. Lista de secuencias analizadas por Localidad (* Muestras publicadas en [Weir et al. 2008](#)).

85*	<i>C. ophthalmicus punctulatus</i>	EU427653	32	Bocas del Toro, Los Planes (13 Km N)	Panamá
86*	<i>C. ophthalmicus phaeocephalus</i>	EU427654	33	Morona – Santiago, Cordillera del Cutucú	Ecuador
87*	<i>C. ophthalmicus cinereocephalus</i>	EU427655	34	Pasco	Perú
88*	<i>C. ophthalmicus bolivianus</i>	EU427656	35	La Paz, Cerro Asunta Pata	Bolivia
89*	<i>C. ophthalmicus argentinus</i>	EU427657	36	Tucumán, Tafi del Valle (20 Km S 6 Km E)	Argentina
90*	<i>C. pileatus</i>	EU427659	38	San José, La Georgina	Costa Rica
91*	<i>C. inornatus</i>	EU427658	37	Darién, Cerro Pirre	Panamá
92*	<i>C. tacarcunae</i>	EU427661	40	Darién, Cerro Chucanti	Panamá
93*	<i>C. semifuscus</i>	EU427660	39	Pichincha	Ecuador
94	<i>E. minuta</i>	JQ174818		De México hasta Sudamérica	
95	<i>E. elegantissima</i>	JQ174807		De México hasta Centroamérica	
96	<i>E. laniirostris</i>	JQ174814		Centro y Sudamérica	

(Continuación) Apéndice II. Lista de secuencias analizadas por Localidad (* Muestras publicadas en [Weir et al. 2008](#)).

Apéndice III. Protocolos de Laboratorio

Protocolo de extracción de DNA (KIT DNeasy, QIAGEN)

1. Tomar 25 mg de tejido en piezas pequeñas, colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y añadir 180 µl de buffer ATL.
2. Añadir 20 µl de Proteinasa K, y dar vórtex (de 5 a 10 segundos) e incubar a 55°C, hasta que el tejido esté completamente degradado (de 1 a 3 hrs.). Dar vórtex durante incubación para dispersar las muestras. La lisis será más rápida si el tejido está fragmentado.
3. Dar vórtex por 15 segundos y añadir 200µl de buffer AL. Mezclar por vórtex e incubar a 70 °C por 10 minutos.
4. Añadir 200µl de alcohol absoluto (100%) y mezclar vigorosamente con vórtex.
5. Colocar la mezcla del paso 4 en una columna DNeasy con un tubo de colector de 2 ml. Centrifugar a 8000 revoluciones por minuto (rpm) por 1 minuto. Tirar lo coleccionado y cambiar tubo de colector.
6. Añadir 500µl de buffer AW1, centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto. Tirar lo coleccionado y cambiar tubo de colector.
7. Añadir 500µl de buffer AW2, centrifugar a 14000 rpm, por 3 minutos. Tirar lo coleccionado y colocar la columna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml bien etiquetado.

8. Añadir 200µl de buffer AE directamente sobre la membrana de la columna DNeasy, incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto para eludir. Guardar lo colectado (aprox. 200µl de DNA) a -20 °C.

Opcional: Se coloca la columna en un nuevo tubo de 1.5 etiquetado y se repite paso 8. Se guarda lo colectado (aprox. 200µl), o bien se puede utilizar el mismo tubo para combinar los productos eluidos.

(Continuación). Apéndice III. Protocolos de Laboratorio

Protocolo de Purificación y Precipitación de DNA (Vivid Violet, BIOSELEC)

1. En un tubo de 1.5 ml combinar:
 - 1µl de 3M NaAc → 0.1 vol. De producto de PCR
 - 1µl de Vivid Violet Co-precipitante por cada 12 µl de PCR
 - 20µl de Etanol 100% a temperatura ambiente → 2.5 vol. del total de PCR
 - X µl del PCR (8.5µl y 12µl)
2. Dar vórtex por aproximadamente 10 segundos, incubar las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos después de mezclar.
3. Centrifugar a 13 500 rpm durante 5 minutos.
4. Aspirar o quitar con pipeta el sobrenadante, evitando tocar el pellet visible.
5. Agregar 200 µl de etanol al 70% para lavar el pellet agitando el tubo por inversión. Si se desprende el pellet, entonces volver a centrifugar nuevamente para pegarlo.
6. Tirar el sobrenadante.
7. Secar el pellet (evaporar el alcohol)
8. Re-suspender el pellet con 100 µl de ddH₂O

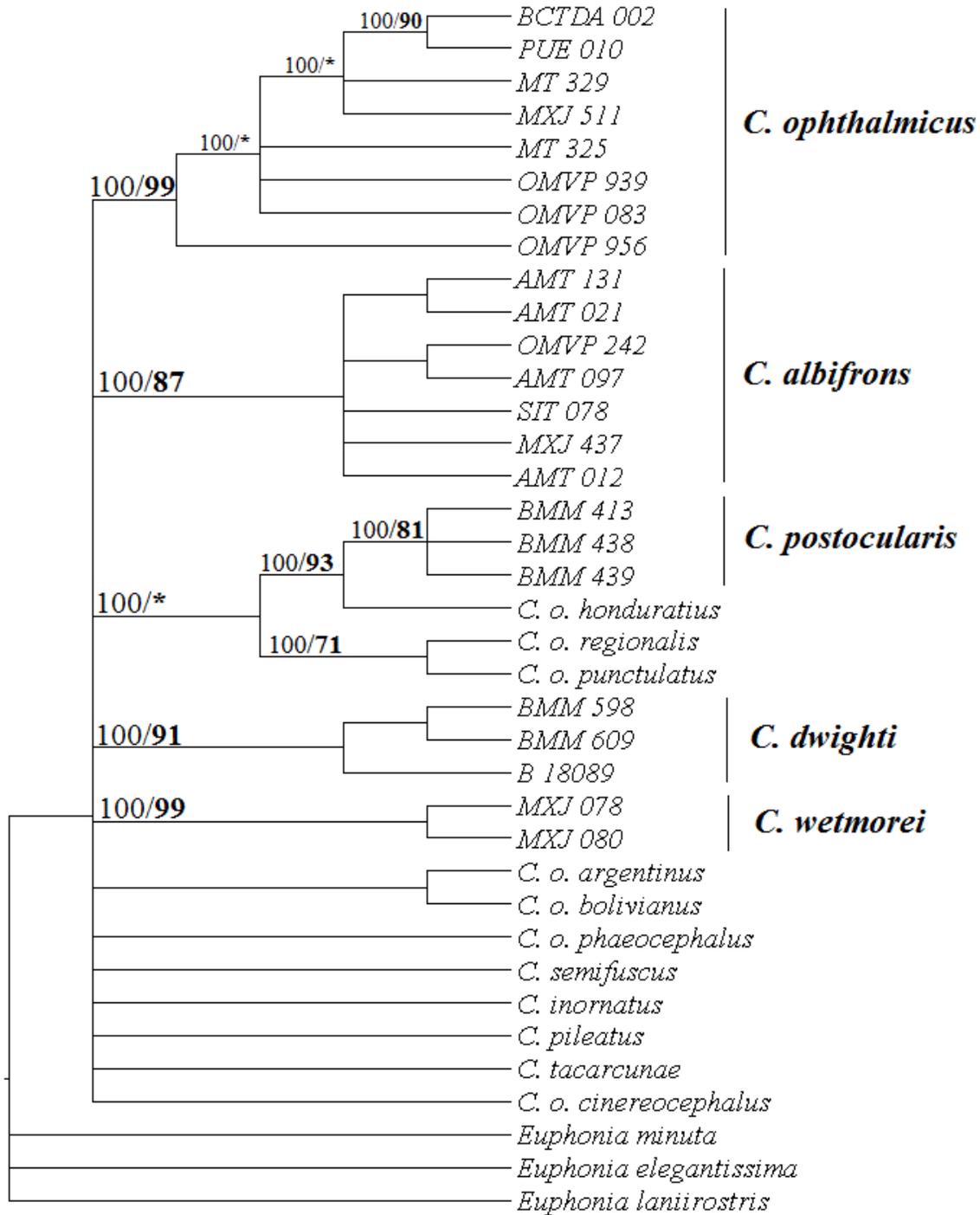
Apéndice IV. Secuencias (haplotipos) tomadas del GenBank. (* Publicadas en [Weir et al. 2008](#)).

No. de Haplotipo (# de secuencias)	No. de Acceso	Taxón	Localidad	Región Geográfica
24 (1)*	EU427651	<i>C. o. honduratus</i>	El Salvador, Chalatenango, Cerro El Pital	Centroamérica
25 (1)*	EU427652	<i>C. o. regionalis</i>	Nicaragua, Matagalpa, Matagalpa (10 Km N)	Centroamérica
26 (1)*	EU427653	<i>C. o. punctulatus</i>	Panamá, Bocas del Toro, Los Planes (13 Km N)	Centroamérica
27 (1)*	EU427654	<i>C. o. phaeocephalus</i>	Ecuador, Morona – Santiago, Cordillera del Cutucú	Sudamérica
28 (1)*	EU427655	<i>C. o. cinereocephalus</i>	Perú, Pasco	Sudamérica
29 (1)*	EU427656	<i>C. o. bolivianus</i>	Bolivia, La Paz, Cerro Asunta Pata	Sudamérica
30 (1)*	EU427657	<i>C. o. argentinus</i>	Argentina, Tucumán, Tafi del Valle (20 Km S 6 Km E)	Sudamérica
31 (1)*	EU427659	<i>Chlorospingus pileatus</i>	Costa Rica, San José, La Georgina	Centroamérica
32 (1)*	EU427661	<i>Chlorospingus tacarcunae</i>	Panamá, Darién, Cerro Chucanti	Centroamérica
33 (1)*	EU427658	<i>Chlorospingus inornatus</i>	Panamá, Darién, Cerro Pirre	Centroamérica
34 (1)*	EU427660	<i>Chlorospingus semifuscus</i>	Ecuador, Pichincha	Centroamérica
35 (1)	JQ174818	<i>Euphonia minuta</i>	De México hasta Sudamérica	
36 (1)	JQ174807	<i>Euphonia elegantissima</i>	De México hasta Centroamérica	
37 (1)	JQ174814	<i>Euphonia laniirostris</i>	Centro y Sudamérica	

No. de Haplotipo	Complejo <i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	<i>C. o. ophthalmicus</i>																							
2	<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.20																						
3	<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.80	0.60																					
4	<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.80	0.60	0.30																				
5	<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.60	0.50	0.20	0.20																			
6	<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.50	0.30	0.30	0.30	0.20																		
7	<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.80	0.60	0.30	0.30	0.20	0.30																	
8	<i>C. o. ophthalmicus</i>	0.60	0.50	0.50	0.50	0.30	0.20	0.50																
9	<i>C. o. dwighti</i>	2.90	2.80	2.50	2.20	2.30	2.50	2.50	2.60															
10	<i>C. o. dwighti</i>	2.80	2.60	2.30	2.00	2.20	2.30	2.30	2.50	0.20														
11	<i>C. o. dwighti</i>	2.90	2.80	2.50	2.20	2.30	2.50	2.50	2.60	0.30	0.20													
12	<i>C. o. albifrons</i>	3.90	3.80	3.40	3.10	3.30	3.40	3.40	3.60	3.10	3.00	3.10												
13	<i>C. o. albifrons</i>	4.10	3.90	3.60	3.30	3.40	3.60	3.60	3.80	3.30	3.10	3.30	0.20											
14	<i>C. o. albifrons</i>	4.20	4.10	3.80	3.40	3.60	3.80	3.80	3.90	3.40	3.30	3.40	0.30	0.50										
15	<i>C. o. albifrons</i>	4.40	4.30	3.90	3.60	3.80	3.90	3.90	4.10	3.30	3.10	3.30	0.50	0.60	0.80									
16	<i>C. o. albifrons</i>	3.80	3.60	3.30	3.00	3.10	3.30	3.30	3.40	3.00	2.80	3.00	0.20	0.30	0.50	0.60								
17	<i>C. o. albifrons</i>	4.10	3.90	3.60	3.30	3.40	3.60	3.60	3.80	3.30	3.10	3.30	0.20	0.30	0.20	0.60	0.30							
18	<i>C. o. albifrons</i>	4.10	3.90	3.60	3.30	3.40	3.60	3.60	3.80	3.00	2.80	3.00	0.50	0.30	0.80	0.90	0.60	0.60						
19	<i>C. o. wetmorei</i>	4.60	4.40	4.40	4.40	4.60	4.70	4.70	4.90	3.80	3.60	3.80	4.40	4.60	4.40	4.90	4.20	4.20	4.60					
20	<i>C. o. wetmorei</i>	4.70	4.60	4.60	4.60	4.70	4.90	4.90	5.10	3.90	3.80	3.90	4.60	4.70	4.60	5.10	4.40	4.40	4.70	0.20				
21	<i>C. o. postocularis</i>	5.60	5.40	5.40	5.10	5.30	5.40	5.40	5.60	4.30	4.40	4.60	3.90	4.10	3.60	4.10	3.80	3.80	3.80	4.20	4.40			
22	<i>C. o. postocularis</i>	5.40	5.30	5.30	4.90	5.10	5.30	5.30	5.40	4.10	4.30	4.40	3.80	3.90	3.40	3.90	3.60	3.60	3.60	4.40	4.60	0.20		
23	<i>C. o. postocularis</i>	5.40	5.30	5.30	4.90	5.10	5.30	5.30	5.40	4.10	4.30	4.40	3.80	3.90	3.40	3.90	3.60	3.60	3.60	4.10	4.20	0.20	0.30	
24	<i>C. o. honduratus</i>	5.30	5.10	5.40	5.10	5.30	5.40	5.40	5.60	4.40	4.60	4.80	4.30	4.40	3.90	4.80	4.10	4.10	4.10	4.10	4.30	1.50	1.40	1.40
25	<i>C. o. regionalis</i>	4.60	4.40	5.10	4.80	4.90	4.80	5.10	4.90	3.60	3.80	3.90	4.10	4.30	3.80	4.30	3.90	3.90	3.90	4.40	4.60	3.00	2.80	2.80
26	<i>C. o. punctulatus</i>	4.80	4.60	4.90	4.90	4.80	4.90	4.90	5.10	4.10	4.30	4.40	3.90	4.10	3.60	4.10	3.80	3.80	4.10	4.60	4.70	3.10	3.00	3.00
27	<i>C. o. phaeocephalus</i>	4.90	4.70	4.70	4.70	4.90	5.10	5.10	5.20	4.10	4.20	4.40	4.10	4.30	3.80	4.30	3.90	3.90	4.30	4.20	4.40	3.30	3.10	3.10
28	<i>C. o. cinereocephalus</i>	5.20	5.10	5.40	5.10	5.20	5.40	5.40	5.60	4.10	4.20	4.40	4.70	4.90	4.40	4.90	4.60	4.60	4.60	4.70	4.90	3.90	3.80	3.80
29	<i>C. o. bolivianus</i>	4.90	4.80	4.80	4.80	4.90	5.10	5.10	5.30	3.40	3.60	3.80	4.10	4.30	3.80	4.30	3.90	3.90	3.90	4.60	4.70	3.00	2.80	2.80
30	<i>C. o. argentinus</i>	5.20	5.10	5.10	5.10	5.30	5.40	5.40	5.60	3.80	3.90	4.10	4.10	4.30	3.80	4.30	3.90	3.90	3.90	4.90	5.10	2.60	2.50	2.50
31	<i>C. pileatus</i>	3.80	3.60	3.60	3.90	3.80	3.90	3.90	4.10	3.30	3.10	3.30	3.30	3.40	3.30	3.40	3.40	3.10	3.40	3.40	3.60	4.10	3.90	3.90
32	<i>C. tacarcunae</i>	5.30	5.10	5.10	5.10	5.30	5.40	5.10	5.60	4.10	4.30	4.40	4.80	4.90	4.40	4.90	4.60	4.60	4.60	4.90	4.80	4.30	4.10	4.10
33	<i>C. inornatus</i>	5.40	5.30	5.60	5.30	5.40	5.60	5.60	5.80	4.40	4.60	4.80	5.10	5.30	4.80	5.30	5.30	4.90	4.90	5.10	4.90	3.90	3.80	3.80
34	<i>C. semifuscus</i>	5.40	5.30	5.90	5.60	5.80	5.60	5.90	5.80	4.60	4.80	4.90	4.60	4.80	4.30	4.80	4.40	4.40	4.40	5.40	5.60	3.40	3.60	3.60
35	<i>E. minuta</i>	12.40	12.40	12.80	12.40	12.60	12.80	12.80	13.00	12.20	12.40	12.60	12.20	12.40	12.00	12.40	12.00	12.20	12.80	13.30	13.20	13.00	12.80	12.80
36	<i>E. elegantissima</i>	14.10	13.90	13.70	13.30	13.50	13.50	13.30	13.70	12.30	12.50	12.70	13.50	13.70	13.70	13.90	13.70	13.50	13.70	14.50	14.70	14.90	14.70	14.70
37	<i>E. laniirostris</i>	13.30	13.50	13.70	13.70	13.50	13.70	13.70	13.70	12.80	13.00	13.10	13.10	13.00	13.30	13.10	13.30	13.10	13.00	14.10	13.90	13.50	13.30	13.50

Apéndice V. Matriz de distancias genéticas para el complejo *Chlorospingus ophthalmicus*. El número de cada haplotipo se corresponde con el número de colección que se puede consultar en la [Tabla 3](#) y el [Apéndice IV](#), para las poblaciones de México, Centro y Sudamérica, respectivamente.

Apéndice VI. Topología encontrada mediante los métodos de Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML). Donde se muestran los valores de bootstrap para ambos métodos (MP / ML).



0.7