



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Variación genética de las poblaciones de la especie
Habia fuscicauda (Cabanis, 1861)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Vicente de Jesús Castillo Chora



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS
2016**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título
Número de páginas
Año

1. Datos del alumno

Castillo
Chora
Vicente de Jesús
65877069
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307145970

2. Datos del Tutor

Dra.
Blanca Estela
Hernández
Baños

3. Datos del Sinodal 1

Dr.
Luis Enrique
Eguiarte
Fruns

4. Datos del Sinodal 2

Dra.
Livia Socorro
León
Paniagua

5. Datos del Sinodal 3

Dra.
Roxana
Acosta
Gutiérrez

6. Datos del Sinodal 4

Biól.
Alejandro
Gordillo
Martínez

7. Datos del Trabajo Escrito

Variación genética de las poblaciones de la especie *Habia fuscicauda* (Cabanis, 1861)
72 pág
2016

Esta página fue dejada intencionalmente en blanco

*Quid ibi laboris insumpserim,
quid sustinuerim difficultatis,
quoties desperaverim,
quotiesque cessaverim et contentione
discendi rursus inceperim;
testis est conscientia,
tam mea qui passus sum,
quam eorum qui mecum duxerunt vitam.*

*De cuánto trabajo me tomé,
cuánta dificultad hube de enfrentar,
cuántas veces desesperé,
y cuántas otras desistí
y empecé de nuevo,
por el empeño de aprender,
testigo es mi consciencia,
que lo ha
vivido.*

San Jerónimo

Agradecimientos

Le agradezco a Mi Familia por todo. Sin ustedes esto no habría sido posible ni tendría porqué.

Gracias a la Doctora Blanca E., por su inagotable paciencia y por confiar en mí para este proyecto (es tan amable que pude pasarme muchos años más haciendo la licenciatura).

A Alejandro Gordillo por su aporte en la recolección, identificación y preparación de ejemplares, así como en la coordinación de las salidas de campo.

A mis compañeros de cubil, gracias por sus enseñanzas, consejos y momentos varios, gracias por su amistad, gracias a los “Colibrís FC”.

Liz y Jaz, a pesar de todo las quiero mucho.

A mis compañeros de primer semestre: Alejandra, Gaby, Ana Charles, Toño, José, Sandra, Montseshausen, Sebas, Marco (+), Bere, Fatiasis y el resto. También a los que llegaron después: Neto, RayoJr-Naye, Maira S., y a los que no llegaron.

A Universum por permitirme encontrar personas increíbles y tantas otras cosas que no se deben de hacer. En especial gracias a mis compañeros de sala “Evolución”.

A los futbolistas de las Canchas.

¡Con ustedes el camino ha sido mejor!

A PAPIIT-DGPA proyecto IN215614: “Variación genética de las poblaciones mexicanas de *Habia rubica* y *Habia fuscicauda* (Aves: *Cardenalidae*)”.

Índice

Resumen	8
<i>Abstract</i>	9
1. Introducción	
-1.1. <i>Variación genética y filogenia</i>	10
-1.2. <i>Métodos de reconstrucción filogenética</i>	11
-1.3. <i>Marcadores moleculares</i>	13
-1.4. <i>Refugios de la diversidad y Modelado de distribución de especies</i>	14
-1.5 <i>Tasas de cambio y relojes moleculares</i>	15
2. Antecedentes	
-2.1. <i>Situación taxonómica del Género Habia</i>	16
-2.2. <i>Habia fuscicanda</i>	
-2.2.1. <i>Descripción</i>	18
-2.2.2. <i>Estatus taxonómico: subespecies</i>	18
-2.2.3. <i>Distribución</i>	19
3. Objetivos	22
4. Métodos	
-4.1. <i>Obtención de muestras</i>	23
-4.2. <i>Protocolo de Laboratorio</i>	25
-4.3. <i>Alineamiento de secuencias</i>	26
-4.4. <i>Medidas de diversidad genética</i>	26
-4.5. <i>Filogenia y red de haplotipos</i>	27
-4.6. <i>Estimación de tiempos de divergencia y análisis skyline plot</i>	28
-4.7. <i>Análisis de delimitación poblacional</i>	29
-4.8. <i>Análisis demográficos y de estructura poblacional</i>	30
-4.9. <i>Modelado de distribución de especies y proyección al Holoceno - Pleistoceno</i>	32

5. Resultados	
-5.1. Descripción de las secuencias de ADN y diversidad genética de las poblaciones	33
-5.2. Filogenia y red de haplotipos	36
-5.3. Análisis de delimitación poblacional	41
-5.4. Historia demográfica y de rango	44
-5.5. Modelado de distribución potencial al Holoceno-Pleistoceno	46
6. Discusión	
-6.1. Variación genética y filogenia	48
-6.2. Divergencia de los clados	51
7. Perspectivas	53
8. Conclusiones	54
9. Referencias	55
Apéndice	63

Resumen

Dentro del complejo *Habia fuscicauda* se reconocen seis subespecies, delimitadas en base a los patrones de coloración y distribución que presentan. Sin embargo, en aves Neotropicales y en otros vertebrados estos rasgos no son siempre coincidentes con la historia filogenética. Por lo tanto, en este estudio se revisaron las relaciones filogenéticas al interior de *H. fuscicauda*, mediante un análisis multilocus con dos marcadores mitocondriales y dos nucleares. Se obtuvieron muestras de 35 localidades desde San Luis Potosí hasta el centro de Panamá. Las muestras se asignaron a cuatro grandes poblaciones delimitadas *a priori* en función de las provincias biogeográficas, la distribución de las subespecies y la distancia geográfica que separa las localidades: San Luis Potosí (SLP), Istmo, Núcleo Centroamérica (NC) y Tierras Bajas de Centroamérica (LCA). La topología obtenida con los árboles filogenéticos de los cuatro genes indica la existencia de sólo dos grupos genéticos: el clado Norte que incluye a los individuos pertenecientes a las poblaciones Núcleo Centroamérica, Istmo y SLP, y el clado LCA que agrupa a los individuos presentes en la región LCA. Los resultados de los análisis del patrón de variación genética que presenta el marcador mitocondrial ND2 muestran historias demográficas diferentes para los dos grupos genéticos. La historia del clado Norte es consistente con la hipótesis de expansión demográfica reciente como lo indican las gráficas *mismatch* y de líneas de *skyline plot*, la *D*-Tajima y la red de haplotipos en forma de estrella. En cambio, el clado LCA parece ajustarse a la hipótesis de tamaños demográficos constantes. Con el modelado de distribución de especies se estimó la distribución potencial de los dos grupos genéticos encontrados en tres épocas (Holoceno-medio, Último Máximo Glacial y Último Interglacial). Los resultados muestran nichos ecológicos históricos y al presente diferentes y eventos de expansión y contracción de rango más marcados en la distribución geográfica histórica del clado Norte que del clado LCA.

Abstract

Habia fuscicauda is a complex with six subspecies described on the patterns of coloration and distribution shown. However in neotropical birds and other vertebrates those characters are not coincident with the phylogenetic history. In this way, i analyzed the phylogenetic relationships inside of *H. fuscicauda* using a multilocus analysis with two mitochondrial and two nuclear markers. I obtained samples of 35 localities from San Luis Potosí to center of Panamá. Four big populations were delimitating *a priori* in function of the biogeographical provinces, subspecies distribution and geographic distance between localities: San Luis Potosí (SLP), Isthmus, Central America Nucleus and Low Central America (LCA). The phylogenetic tree topology with four markers shows only two genetic groups: the North clade includes the individuals of the NC, Isthmus and SLP populations, and the LCA clade groups individuals of LCA population. The results of the patterns of genetic variation of the mitochondrial marker ND2 suggest two different demographic scenarios: North clade is congruent with demographic expansion hypothesis considering the results of mismatch plots and skyline plots, D -Tajima statistic and haplotypes network in star-like shape. In contrast the LCA group seems fit to hypothesis of constant demographic sizes. With the projection of species distribution model was estimated the potential distribution that each genetic group presented in three different epochs: mid-Holocene, Last Glacial Maximum and Last Inter-Glacial. The results suggest different historic ecological niches for the clades and events of expansion and contraction of range most notables in the historical distribution of North clade than LCA clade.

Variación genética de las poblaciones de la especie *Habia fuscicauda* (Cabanis 1861)

1. Introducción

1.1 Variación genética y filogenia

La cuantificación de la variación genética a nivel de individuos y poblaciones, así como la forma en que la variación está distribuida geográficamente son elementos importantes en el entendimiento de la biología de cualquier especie (Vigilant y Bradley 2004, Hickerson *et al.* 2010, Jetz *et al.* 2012). Los datos cuantitativos de la variación genética intraespecífica permiten obtener información referente al flujo génico y a la estructura e historia evolutiva de las poblaciones. Esto es posible porque los eventos demográficos que ocurren en las especies, tales como migraciones, cuellos de botella o expansiones poblacionales, alteran de manera drástica los patrones de diversidad molecular y las señales dejadas en el ADN por estos eventos demográficos pueden usarse actualmente para inferirlos (Martins *et al.* 2009).

La historia evolutiva de las especies y las poblaciones también puede ser esbozada en un patrón de ramificación de linajes evolutivos (Edwards 2009). Por ejemplo, una especie que ha sido separada genéticamente por una fuerte barrera mostrará patrones genealógicos dependientes de la duración de la barrera y de la historia demográfica de las diferentes poblaciones disyuntas (Avice 2009). Avice y colaboradores (1987) señalan que el patrón en las relaciones filogenéticas entre poblaciones aisladas es función del tiempo de separación: cerca a la divergencia de dos poblaciones, la población "A" respecto de la población "B" parecen polifiléticas; al pasar las generaciones y por el sorteo de linajes "A" y "B" serán monofiléticas; en tanto que en tiempos intermedios las poblaciones se definirán como parafiléticas.

Los árboles de genes son una poderosa herramienta para estudiar el proceso de divergencia, aunque se debe tener en cuenta que definir una especie como un tipo de linaje evolutivo puede estar en la interfase filogenia-tocogenia, donde se confundan las relaciones de parentesco con las intraespecíficas (De Queiroz y Donoghue 1990, Templeton *et al.* 2000). Por ello, Templeton (1989) propuso el concepto cohesivo de

especie: una especie como un linaje evolutivo con límites originados a partir de las fuerzas que crean comunidades reproductivas. Estas fuerzas consisten en: 1) *intercambiabilidad genética*: se establece como los factores que definen los límites de dispersión través del flujo génico y 2) *intercambiabilidad demográfica*: donde intervienen los factores que definen el nicho fundamental y los límites de dispersión de las nuevas variantes génicas a través de la deriva génica y la selección natural. Los miembros de una población intercambiable comparten el mismo nicho fundamental, el cual se define por la tolerancia intrínseca de los individuos a diversos factores ambientales, condiciones donde estos individuos son potencialmente capaces de sobrevivir y reproducirse. La porción del nicho fundamental que es efectivamente ocupado se conoce como nicho realizado (Hutchinson 1965).

Para inferir las relaciones evolutivas por medio de un árbol filogenético, usando secuencias moleculares es necesario hacer comparaciones homólogas, de tal manera que los nucleótidos en cada columna de la matriz están relacionados porque descienden de un residuo ancestral común (Kumar y Filipski 2008, Nixon y Carpenter 2012).

1.2 Métodos de reconstrucción filogenética

El objetivo de la reconstrucción filogenética es obtener estimaciones robustas de la filogenia y su confianza estadística. En los análisis filogenéticos de secuencias de ADN alineadas, casi todos los métodos describen su evolución usando un modelo que consta de dos componentes: un árbol filogenético y una descripción basada en diferentes parámetros de cómo las secuencias individuales cambian a lo largo de las ramas del árbol (Whelan *et al.* 2001, Kelchner y Thomas 2007).

Los modelos evolutivos utilizan diferentes parámetros para estimar el cambio de caracteres, de tal manera que dependiendo del modelo empleado se asume una determinada forma de evolución de secuencias. Por ejemplo, si un modelo es demasiado pobre, es decir, no están presentes parámetros clave, no tendrá una aproximación útil de la realidad. La consecuencia podría ser un error sistemático, en donde se obtiene una filogenia bien apoyada pero inexacta (Kelchner y Thomas 2007).

El criterio de Máxima Parsimonia (*MP*) no emplea ningún modelo de evolución de secuencias y se ha observado que esta ausencia de corrección se hace patente cuanto más divergentes son las secuencias, dado que el grado de homoplasia aumenta y el árbol real se vuelve menos probable a presentar el menor número de cambios (Felsenstein 1981). Además, si el árbol real tiene ramas terminales largas, dos secuencias poco relacionadas podrían parecer cercanamente emparentadas, un problema llamado atracción de ramas largas (*LBA*, por sus iniciales en inglés). La atracción de ramas largas es un posible resultado de no corregir la tasa de heterogeneidad de las sustituciones del ADN (Burns 1998, Sanderson y Shaffer 2002).

El método de máxima verosimilitud (*ML*, por sus iniciales en inglés) se define como un valor proporcional a la probabilidad de obtener los datos dado un modelo, es decir, la estimación de la filogenia es el árbol para el cual las secuencias observadas son las más probables con un modelo de evolución de secuencias y los valores de los parámetros que emplea (Williams y Moret 2003). Una ventaja que tiene sobre el criterio de parsimonia es que hace reconstrucciones más exactas de relaciones entre secuencias que han sido separadas por largo tiempo o que evolucionan rápidamente (Foster 2009). El algoritmo *ML* busca a través de un espacio multidimensional de valores de parámetros y el valor del parámetro que maximiza la verosimilitud es tomado como el correcto (Holder y Lewis 2003).

A diferencia, en el enfoque bayesiano el resultado final no depende de un valor específico del parámetro estimado, sino que se consideran todos los posibles valores, es decir, se hace una estimación marginal de la probabilidad del valor del parámetro en vez de conjunta (Holder y Lewis 2003). La inferencia bayesiana se centra en la estimación de la probabilidad posterior (*pp*) del árbol dados los datos. La *pp* es calculada integrando la densidad de la probabilidad sobre todos los parámetros posibles del modelo (Alfaro y Holder 2006). El enfoque Bayesiano, basado en la función de verosimilitud, ha provisto un método para estimar simultáneamente árboles y las medidas de incertidumbre asociadas a las ramas a partir de Cadenas de Markov Monte Carlo (*MCMC*) (O'Meara, 2012).

La probabilidad posterior representa la probabilidad que el clado correspondiente sea el correcto si el modelo y los datos son acertados. Por el

contrario, la interpretación exacta del *bootstrap* no paramétrico, que se emplea como medida de soporte en *ML* y *MP* es complicada y en primera instancia éste sólo ayuda a predecir si el mismo resultado sería observado si se aumenta el muestreo, no si el resultado es correcto (Huelsenbeck *et al.* 2002).

Generalmente, en los análisis se incluyen una o varias secuencias “externas” (*outgroups*) para enraizar el árbol. Esto permite definir qué nodos en el árbol son más antiguos o cambian más rápidamente (Holder y Lewis 2003).

1.3 Marcadores moleculares

Las poblaciones conespecíficas generalmente presentan polimorfismos distribuidos geográficamente a nivel del ADN mitocondrial (*mtDNA* por sus iniciales en inglés) (Ball *et al.* 1988). Para estudios intraespecíficos en animales, el *mtDNA* es ampliamente usado porque algunas de sus secuencias evolucionan más rápidamente que los genes nucleares y proveen más variación para reconstruir la historia evolutiva reciente de las especies debido a que nuevos estados de carácter se originan todo el tiempo (Melnick y Hoelzer 2005, Kumar 2008).

Existen diferentes factores que contribuyen a la rápida tasa de evolución de la mitocondria en animales (en plantas la tasa es muy lenta), entre ellos se puede destacar que sus mecanismos de reparación son más relajados, que hay un ambiente rico en oxígeno, al cual las moléculas de *mtDNA* son expuestas y se generan más mutaciones, o a que el *mtDNA* no está asociado a histonas, que por sí solas son conservativas y pueden restringir las tasas de evolución en ADN nuclear (Avisé 2009). Además, existe relajación de las restricciones funcionales, debido a que la mitocondria codifica pocos tipos de polipéptidos y no produce proteínas implicadas en su propia duplicación, traslación o transcripción (Wesley *et al.* 1979).

El *mtDNA* presenta características que lo hacen ser una molécula ideal para los análisis de variación genética: es distintivo y está presente en una amplia variedad de especies, lo que permite hacer comparaciones homólogas a diferentes categorías taxonómicas. Es fácil de aislar, tiene una estructura genética simple y carece de rasgos que compliquen su análisis como ADN repetitivo, elementos transponibles o

pseudogenes, su modo de herencia es matrilineal y carece de recombinación u otros rearrreglos genéticos (Wilson *et al.* 1985, Avise *et al.* 1987).

1.4. Refugios de la diversidad y modelado de distribución de especies

Para explicar la riqueza de la avifauna neotropical, principalmente en Sudamérica, Haffer (1969) propone que durante el Pleistoceno el área total se subdividió en parches de vegetación separados unos de otros por áreas abiertas. Las tierras bajas pudieron permanecer tropicales, pero los periodos secos y húmedos causaron cambios en la distribución de la vegetación. Estos cambios climáticos se debieron expresar, aunque de manera diferente, en varias partes del mundo. Las fluctuaciones globales en el clima y el paisaje durante el Pleistoceno (5 Ma - 12,000 años AP) pudieron promover divergencia entre poblaciones y especies debido al aumento de oportunidades para la diversificación de linajes en nuevos hábitats y la formación de barreras a la dispersión (Kearns *et al.* 2011).

Las ideas sobre que los ciclos glaciales del Pleistoceno causaron especiación alopatrica por subdividir poblaciones en áreas desconectadas (refugios), ganó popularidad debido a que encaja con los modelos de especiación geográfica propuestos por la síntesis moderna (Lovette 2005). De tal manera, los refugios crean estructura genética que puede no estar asociada con barreras físicas contemporáneas y las huellas de expansiones poblacionales relacionadas con el término de los ciclos glaciales deben estar contenidas en los marcadores moleculares. La coincidencia de estos eventos demográficos con cambios en el ambiente o paisaje puede ayudar a revelar los mecanismos ecológicos y evolutivos en que recae la diferenciación de las poblaciones (Martins *et al.* 2009, Chan *et al.* 2011). La expansión postglacial a un nuevo territorio es importante en la distribución geográfica de los genomas de poblaciones y especies ya que algunas poblaciones de una especie pudieron extinguirse en ciertas partes de su rango de distribución, otras poblaciones pueden haberse dispersado a nuevas áreas, mientras que otras sobrevivieron en refugios y se expandieron de nuevo y estos cambios en la distribución y tamaños poblacionales ocurrieron relativamente rápido (Hewitt 2000, Harvey y Brumfield 2014).

La existencia de los refugios es inferida indirectamente mediante datos

biogeográficos y reconstrucciones paleoclimáticas, mientras que los efectos de las épocas glaciales Pleistocénicas se pueden inferir a partir de la estructura genética de poblaciones, análisis filogeográficos y estudios de especiación con diferentes métodos (Hewitt 1996).

1.5 Tasas de cambio y relojes moleculares

El concepto de reloj molecular está basado en la observación realizada inicialmente por Zuckerkandl y Pauling (1965) que los cambios en las cadenas polipeptídicas de las hemoglobinas en mamíferos parecen ser proporcionales en número al tiempo evolutivo. Esta observación, de cambio proporcional al tiempo de divergencia entre taxa, se trasladó a secuencias de ADN y con base en la teoría neutral se aplicó, principalmente, a regiones no codificantes (Schwartz y Maresca 2006). A partir de estas ideas se ha ido alcanzando el objetivo de estimar el tiempo de divergencia entre linajes de un árbol filogenético en distintos niveles jerárquicos.

La exactitud en la estimación de las longitudes de las ramas es el parámetro más importante que se debe tener en cuenta, ya que en un sentido biológico las longitudes de las ramas indican el tiempo a partir de un ancestro común y la tasa a la cual las substituciones ocurren, lo cual permite reconstruir el aspecto temporal de la historia evolutiva (Kelchner y Thomas 2007, Li y Drummond 2012).

También es importante tener puntos de calibración o comparación paleontológicos, geoquímicos o geológicos con los cuales se comparan los estimados moleculares (Battistuzzi *et al.* 2010). Sin embargo, existen diversas complicaciones y limitaciones al uso de los relojes moleculares. Un problema es respecto al modo de usar los eventos geológicos y fósiles como punto de calibración. Por un lado, las consecuencias de los eventos geológicos son complejas para usarse exactamente en la calibración del cambio genético y, además, una barrera pudo sólo acentuar un patrón de divergencia ya gestado o por el contrario no influir en absoluto (Edwards y Beerli 2000).

Además existen sesgos intrínsecos a los métodos moleculares y no moleculares de estimación (Battistuzzi *et al.* 2010). Por ejemplo, algunos resultados muestran que las tasas de evolución de secuencias no son constantes en el tiempo y

pueden ser heterogéneas entre los distintos linajes en una filogenia (Arbogast *et al.* 2002, Li y Drummond 2012), aparte que la medida de diferenciación genética entre secuencias no necesariamente es una confiable indicación de cuando divergieron. Es así que las comparaciones filogenéticas usando *mtDNA* normalmente se restringen a poblaciones conespecíficas o especies relacionadas cuya separación no exceda unos pocos millones de años (Avice *et al.* 1987). Si el aislamiento reproductivo se acumula gradualmente entre poblaciones alopátricas, no habrá un único evento de especiación y por lo tanto no existe una sola fecha exacta de la especiación. En estos casos, la filogenia y su estudio sólo podría revelar información sobre el rango de tiempo a través del cual el aislamiento persistió (Nichols, 2001).

2. Antecedentes

2.1 Situación taxonómica del género *Habia*

Las especies comúnmente reconocidas dentro del ensamble Cardinalini son altamente variables con respecto a la coloración del plumaje, canto, tamaño corporal, distribución geográfica y grado de dimorfismo sexual (Klicka *et al.* 2007).

El estudio molecular realizado por Klicka *et al.* (2007) sobre la sistemática de la tribu Cardinalini empleó 175 taxa de Oscines, de los cuales 48 especies eran pertenecientes a esta tribu. Los resultados basados en los marcadores mitocondriales ND2 y Citocromo-b no logran un consenso sobre la afinidad evolutiva de la tribu respecto a los otros linajes de Oscines, sin embargo, identifica a la tribu Cardinalini como un clado bien soportado que engloba a los géneros *Habia*, *Piranga*, *Chlorothraupis*, *Granatellus* y *Amaurospiza*. El mismo estudio muestra que el género *Habia* es parafilético, con *Habia fuscicauda* como especie hermana de *H. gutturalis*; *H. rubica* es parte del clado hermano de éstas, pero más relacionada con el género *Chlorothraupis* (Figura 1).

La especie *H. fuscicauda* fue descrita por Cabanis en 1861 dentro del género *Phoenicothera*. En 1922 se decidió que el nombre genérico *Habia*, propuesto por Blyth en 1840, era el válido y que *Phoenicothera* pasaba a ser una sinonimia del género (Oberholser 1922). Actualmente el género *Habia* se conforma por 5 especies:

la especie *H. rubica* se mantuvo; las especies *H. alfaroana* y *H. rubra* fueron reasignadas dentro de *H. rubica*. La especie *H. salvini* pasó a ser una subespecie de *H. fuscicauda* y las especies *H. cristata* y *H. gutturalis* no tuvieron ningún cambio (Oberholser 1922, Del Hoyo *et al.* 2011), mientras que la especie *H. atrimaxillaris* fue descrita en 1924 (Dwight y Griscom 1924) (Figura 2).

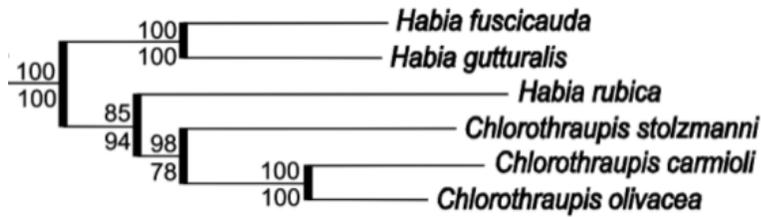


Figura 1. Árbol de Maxima Verosimilitud que muestra las relaciones filogenéticas entre *Habia* y *Chlorothraupis* dentro de Cardinalini (tomado de Klicka *et al.* 2007).

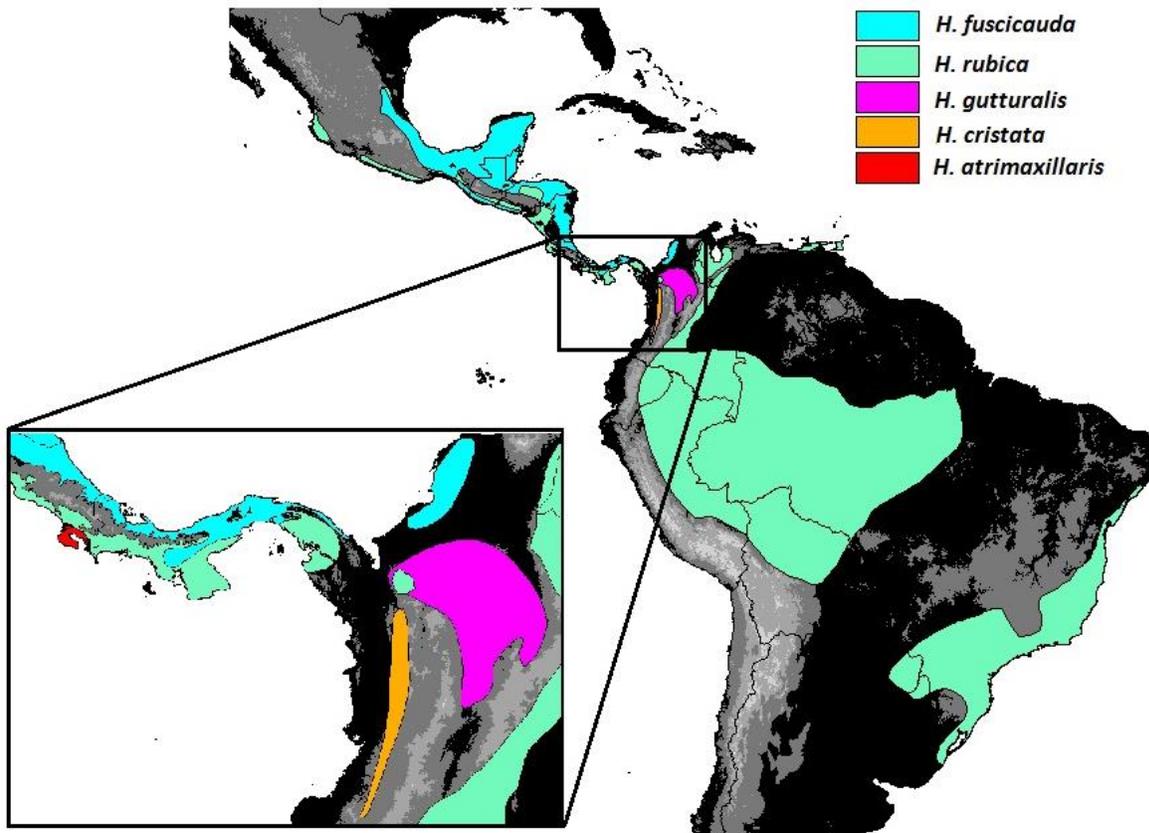


Figura 2. Distribución de las especies que conforman el Género *Habia*.

2.2 *Habia fuscicauda*

2.2.1 Descripción

La habia gorjirroja, como también se le conoce por su garganta rojiza, es de talla media, varía entre los 18 y los 20 centímetros de longitud y tiene un peso entre 29 y 47 gramos.

El macho es de cabeza color rojo opaco, con una corona carmesí poco visible y lores oscuros. Sus partes superiores son café oscuro con un ligero matizado rojo, las alas cobertoras superiores son rojizas y las plumas de vuelo oscuras con bordes color rojo opaco. La cola y plumas terciarias de rojo a café rojizo y la garganta de color escarlata-rosado intenso, que contrasta con el rojo opaco de los costados de la cabeza y el café-rojizo del pecho (Del Hoyo *et al.* 2011).

La hembra es café oscura de la parte superior y pálida en el resto del cuerpo con la garganta color amarilla. Ésta se encarga de construir el nido, el cual consta de una voluminosa estructura de hojas y materiales gruesos (Del Hoyo *et al.* 2011).

El hábitat de la especie se restringe a bosques viejos con crecimiento secundario y hacia los bordes de los bosques, arbustos, matorrales, malezas espesas o plantaciones abandonadas. El rango altitudinal de su distribución va del nivel del mar hasta los 1200 msnm en México, lugar donde alcanza su máximo nivel altitudinal (Del Hoyo *et al.* 2011). La alimentación del ave consiste en artrópodos incluyendo hormigas, orugas, chapulines escarabajos y otros insectos; además de frutos, semillas, bayas e incluso vertebrados de pequeño tamaño. Forrajean en la vegetación a menos de 5 metros.

2.2.2 Estatus taxonómico: subespecies

Dentro de la especie *Habia fuscicauda* se han descrito seis subespecies, las cuales difieren principalmente por la intensidad en la coloración de su plumaje (Del Hoyo *et al.*, 2011) (Figura 3).

- 1) ***Habia fuscicauda salvini*** (Berlepsch 1883) con distribución restringida en México y Guatemala, y amplia en Belice, Honduras y El Salvador.
- 2) ***H. f. insularis*** (Salvin 1888) en parte del sureste mexicano y el norte de Guatemala.
- 3) ***H. f. discolor*** (Rigday 1901) restringida a Nicaragua.

4) *H. f. fuscicauda* (Cabanis 1861) presente en el sur de Nicaragua, parte de Costa Rica y Panamá.

5) *H. f. willisi* (Parkes 1969) solamente registrada en Panamá.

6) *H. f. erythrolaema* (P. L. Sclater 1862) únicamente presente en la costa del Atlántico de Colombia.

Un problema que identificaron Avise y Ball (1992) es que la descripción de subespecies está hecha usualmente con rasgos morfológicos o de comportamiento, cuya base genética puede ser poco conocida y, aún más, se suelen asignar especímenes a diferentes subespecies primordialmente por su localización geográfica, lo cual dificulta entender alguna relación entre diferenciación filogenética y separación espacial; también se ha observado que los taxa definidos morfológicamente pueden no representar adecuadamente los patrones de diversidad genética en aves neotropicales (Cheviron *et al.* 2005), como puede ser la presencia de fenotipos alternativos en respuesta a factores no genéticos (Núñez-Farfán *et al.* 2003).

2.2.3 Distribución

Habia fuscicauda tiene una distribución que se restringe a la zona Neotropical. La parte más norteña de la distribución se encuentra en México, en San Luis Potosí y llega al centro de Panamá en un aparente continuo que comprende todo el sur mexicano y atraviesa Centroamérica. Las áreas alopátricas de la distribución se encuentran en la costa Atlántica de Colombia y en el sur de Chiapas y en El Salvador (Del Hoyo *et al.* 2011) (Figuras 2 y 3).

La distribución que se observa actualmente incluye regiones geográficas que son reconocidas por su complejidad. En México se distribuye en la región del Istmo de Tehuantepec, la cual une Norteamérica con el Núcleo de Centroamérica y es reconocida como una barrera biogeográfica para muchos taxa (Mulcahy *et al.* 2006). El Istmo, junto con la Depresión de Nicaragua delimitan una segunda zona geográfica, la cual se conoce como núcleo de Centroamérica (NC) y cuyo principal rasgo orogénico son las tierras altas de Chiapas y Guatemala (Marshall y Liebherr 2000). La depresión de Nicaragua formada entre 12.8-7.1 Ma es la principal barrera entre las tierras altas de Guatemala y Chiapas con la cordillera de Talamanca (17.5 Ma) (Miguez-Gutiérrez

et. al. 2013).

Al sur de la Depresión de Nicaragua, la distribución de la especie comprende las Tierras Bajas de América Central (Costa Rica y Panamá). Esta zona se posiciona en la intersección de cuatro placas tectónicas, cuyos límites crean un paisaje accidentado, lo cual contribuye a la extinción local y aislamiento genético en las poblaciones (Miguez-Gutiérrez *et al.* 2013). La complejidad de esta área se debe a su papel como una zona transición entre las biotas de norte y Sudamérica, además de su variada fisiografía, geomorfología e historia geológica (Jackson *et al.* 1996).

Esta zona, a pesar de ser pequeña en extensión geográfica es una de las más complejas física y biológicamente en el mundo (Bagley y Johnson 2014) y estudios de filogeografía comparada con avifauna neotropical muestran que la alta diversidad beta de esta región es resultado de múltiples ciclos de vicarianza y dispersión, quizá siendo la dispersión el rasgo principal en la conformación biogeográfica (Witt 2004). La cordillera de Talamanca es la barrera geográfica más conspicua que se presenta y separa de manera importante la región LCA en la zona Este y la Oeste (Kohlmann y Halffter 1988). Esta barrera es importante porque del lado Este podemos encontrar a las especies *H. rubica* y *H. atrimaxillaris*, mientras que en el lado Oeste de la cordillera únicamente se encuentra la especie *H. fuscicauda*.

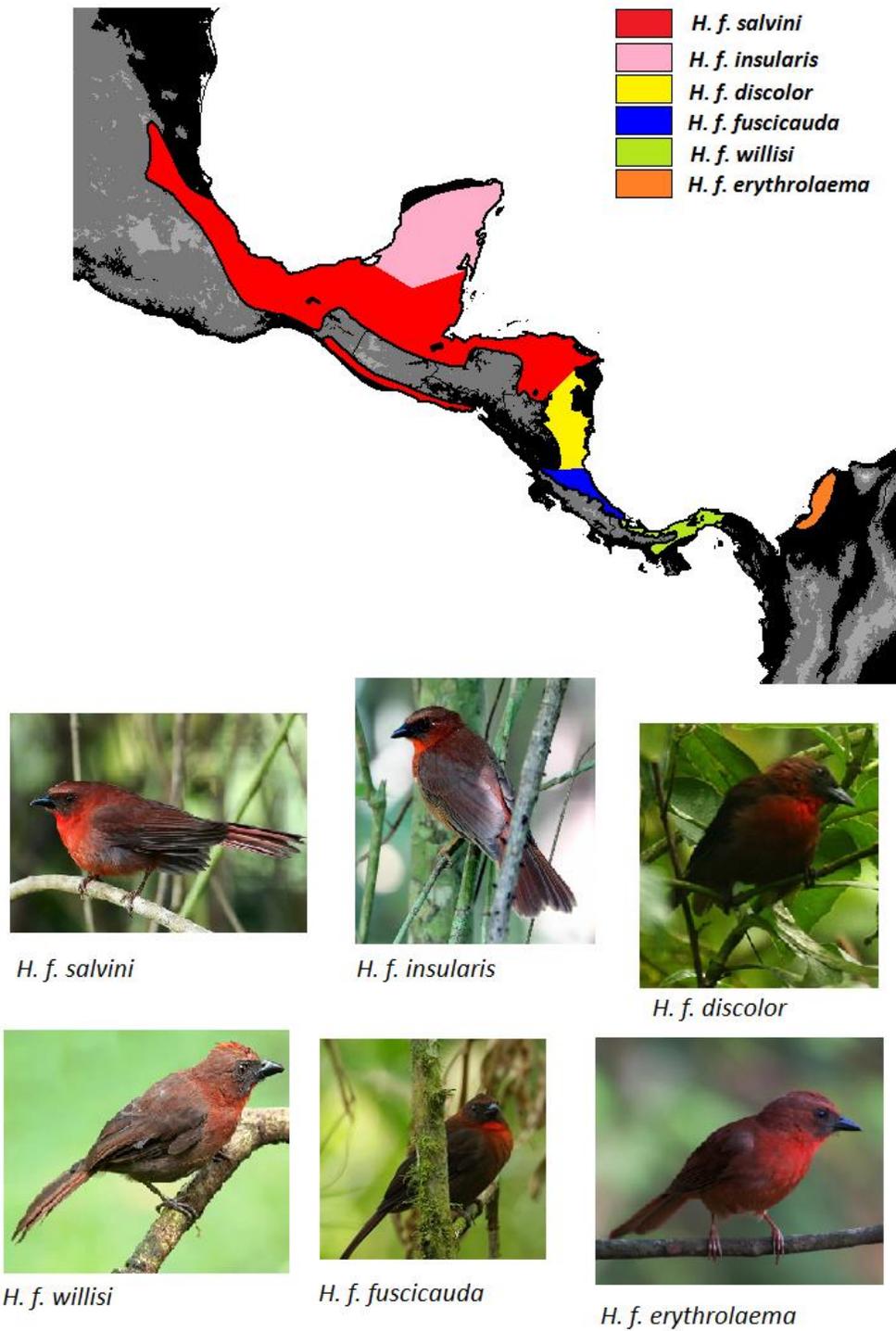


Figura 3. Distribución geográfica de las 6 subespecies reconocidas para *Habia fuscicauda*.

3. Objetivos

General:

Describir y analizar los patrones de variación genética en las poblaciones de la especie *H. fuscicauda* y establecer una hipótesis de filogenia entre sus poblaciones.

Particulares:

- Describir la variación genética de las poblaciones de la especie *H. fuscicauda*.
- Identificar los procesos que pudieron o pueden estar manteniendo los patrones de variación genética observados en las poblaciones.
- Estimar los tiempos de divergencia entre las principales poblaciones de la especie.
- Delimitar las áreas de estabilidad histórica para la especie y compararla con la evidencia genética.

4. Material y métodos

4.1. Obtención de muestras

Los 64 tejidos que se utilizaron para realizar las extracciones de ADN mitocondrial y nuclear de la especie *H. fuscicauda* se encuentran depositados en la colección de tejidos del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Las muestras han sido colectadas en diferentes salidas de campo y se encuentran almacenadas en congeladores a -72°C. También se solicitaron tejidos a la Universidad de Washington (3) y a la Universidad del estado de Louisiana (9) que corresponden a la distribución Centroamericana (Tabla AT1, ver Apéndice).

Con la intención de aumentar el muestreo de las poblaciones de Centroamérica y Veracruz, se solicitaron las secuencias del gen mitocondrial ND2 de 66 individuos al Laboratorio de John Klicka del *Museum of Natural History and Culture*, de las cuales dos pertenecen a las especies más emparentadas con *H. fuscicauda* y fueron empleadas como grupo externo: *H. gutturalis* y *H. atrimaxillaris* (Klicka *et al.* 2007) (Tabla AT2, ver Apéndice). La especie *H. rubica* también fue empleada como grupo externo.

Se obtuvieron muestras de 35 localidades, a partir de las cuales se delimitaron 4 poblaciones en función de la distribución de las subespecies, las provincias Biogeográficas reconocidas por Morrone (2004) y la distancia geográfica que separa a las localidades (Figura 4):

- 1) **Zona del Istmo:** incluye a la población del Istmo, junto con los individuos de El Rosario, Tabasco, dada su cercanía geográfica. Para esta población se emplearon muestras de 22 individuos.
- 2) **Zona núcleo Centroamérica:** que incluye las subpoblaciones de:
 - a) Subpoblación Península de Yucatán, junto con los individuos de la localidad Yaxchilán, Campeche, dada su cercanía geográfica, y que putativamente representan la subespecie *H. f. insularis*, esta subpoblación cuenta con 30 individuos.
 - b) Subpoblación de Chiapas en la costa del Pacífico, siendo la única área alopatrica de la que se tienen muestras, con n =7.

c) Subpoblación presente en las tierras bajas del Este de Centroamérica, presenta 25 individuos muestreados.

d) Subpoblación de Nicaragua (n = 3).

3) **Tierras Bajas de Centroamérica** (LCA, *Low Central America*): conformada por la población LCA que cuenta con 34 individuos muestreados.

4) **SLP** (San Luis Potosí): los dos individuos muestreados se asignaron en una población adicional, pero el bajo número de muestras impidió obtener algunos estadísticos y resultados.

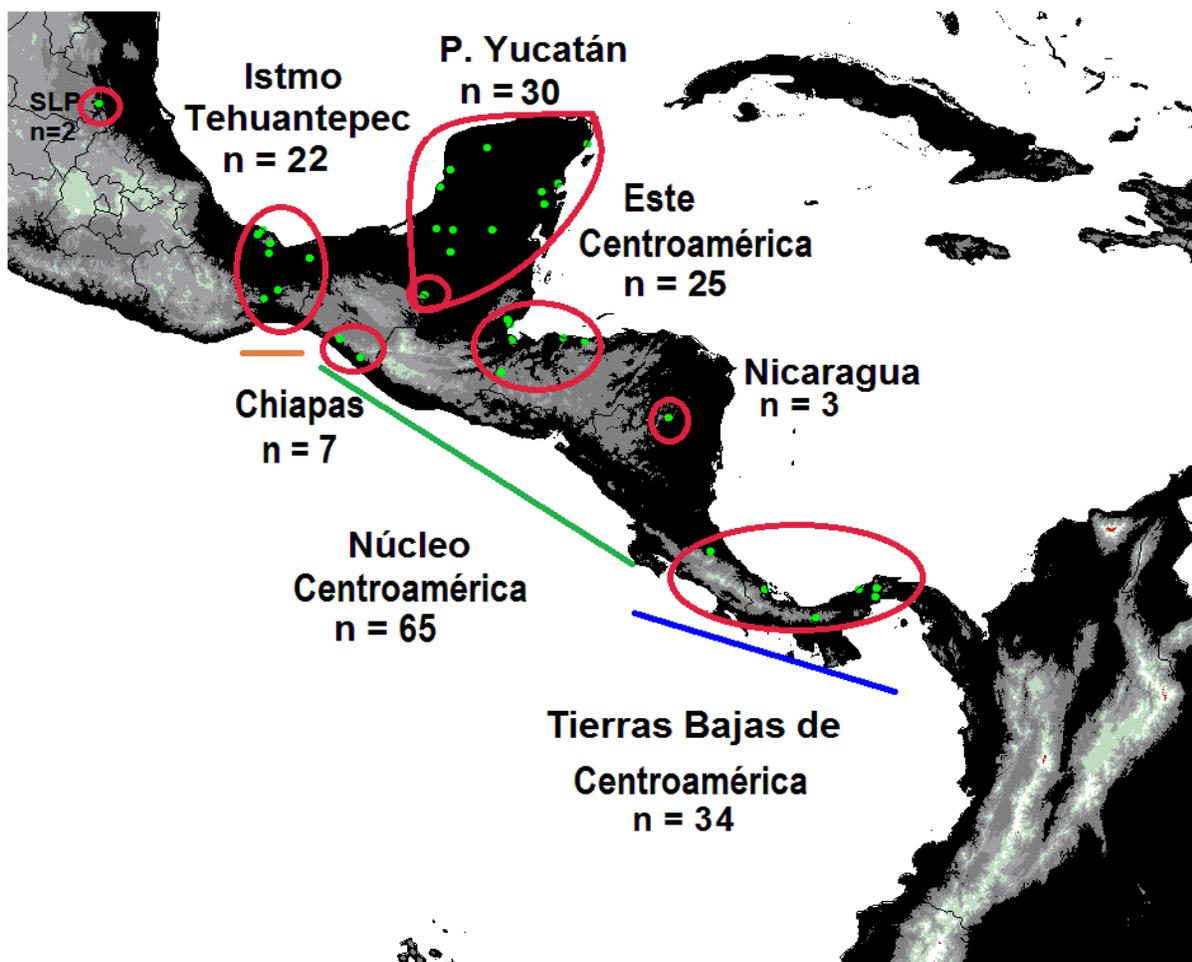


Figura 4. Las tres zonas geográficas reconocidas y las cuatro poblaciones delimitadas en función de la distancia geográfica y las provincias biogeográficas reconocidas por Morrone (2004).

4.2. Protocolos de laboratorio

El DNA se extrajo a partir de hígado o tejido muscular congelados a -70 °C con ayuda del kit de extracción *DNAeasy Qiagen* con las especificaciones del fabricante en una elución final de 100 μ l de *buffer* AE.

Se amplificaron cuatro genes: las subunidades 2 y 4 de la NADH deshidrogenasa de origen mitocondrial, con los *primers* L-5212 - H-6313 (Sorenson *et al.* 1999) y LEU - ND4 (Arévalo *et al.* 1994), respectivamente. Los genes nucleares se amplificaron empleando los *primers* ODC-2F - ODC-2R para obtener el intrón 6 del gen Ornitina dextracarboxilasa (ODC) y ACO1-i9F2 - ACO1-i9R2 para amplificar el intrón-9 del gen Aconitasa-1 que se encuentra ligado al cromosoma sexual Z (Barker *et al.* 2008). Las secuencias particulares para cada *primer* empleado se encuentran en la Tabla AT3 (ver Apéndice).

La amplificación de las regiones de ADN mediante la técnica de *PCR* se llevó a un volumen final de 12.5 μ l, utilizando el siguiente protocolo: 0.5 μ l de extracción, 9.5875 μ l de agua desionizada, 1.25 μ l de *buffer* A (10x), 0.1875 μ l de mix-dntp's a 10 μ M, 0.375 μ l de MgCl₂ (50 μ M), 0.25 μ l de cada *primer* (10 μ M) y 0.1 μ l de taq polimerasa. En muestras difíciles se llegó a un volumen final de 14 μ l aumentando la cantidad de ADN.

Las pruebas de temperatura correspondientes se realizaron en un termociclador Multigene Optimax (*Labnet international*). Para la amplificación de los dos genes mitocondriales los protocolos utilizados fueron los siguientes: 2:30 minutos de desnaturalización a 94 °C seguido de 35 ciclos de: apertura 94 °C por 30 s, alineamiento 54 °C ó 50 °C durante 45 s y elongación a 72 °C por 2 minutos; seguido de 10 minutos de extensión a 72 °C. Para amplificar las dos regiones de ADN nuclear se utilizó el siguiente protocolo: 2:30 minutos de desnaturalización seguido de 35 ciclos de: *apertura* a 94 °C por 30 s, alineamiento a 54 °C (ACO1-i9) ó 65 °C (ODC) durante 30 s y elongación a 72 °C durante 60 s. Finalmente, 10 minutos de extensión a 72 °C.

En cada corrida se emplearon muestras control para asegurar que no hubiera contaminación. El resultado de la amplificación se corrió en un gel de agarosa al 1 %

en la cámara de electroforesis con un voltaje de 120 V durante 20 minutos. Posteriormente fue teñido con bromuro de etidio y visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta a 254 nm (Bio-imaging Systems). Los productos para las reacciones de *PCR* se mandaron a secuenciar a la Universidad de Washington, EUA (*High-Throughput Genomic Unit*).

4.3. Alineación de secuencias

Las secuencias *forward* y las secuencias *reverse* fueron empalmadas y alineadas en *Sequencher 4.8* (*GeneCodes, Ann Arbor, MI, EUA*) con ayuda de una secuencia de referencia para cada gen, la cual fue obtenida de *GeneBank (NCBI)*. Las ambigüedades y discrepancias entre las secuencias fueron corregidas manualmente con ayuda de los cromatogramas.

El alineamiento múltiple de secuencias para cada gen y el grupo externo se llevó a cabo en *Clustal X* (Thompson *et al.* 1997). El alineamiento resultante para cada gen fue analizado con *jModelTest 2.1.6* (Posada y Crandall 2008) para obtener el modelo de sustitución y valor de los parámetros que se ajustaran mejor a los datos empleando el Criterio de Información de Akaike (Akaike 1973).

4.4. Medidas de diversidad genética

Para analizar y describir a las poblaciones en función de su variación genética se emplearon diversos estimadores.

La diversidad haplotípica (Hd) se define como la probabilidad de que tomados dos haplotipos aleatoriamente de una muestra éstos sean diferentes y se calculó con la siguiente fórmula:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 \right)$$

donde (n) es el número de individuos, (k) es el número de haplotipos y (P_i) es la frecuencia del haplotipo i .

El valor medio de las diferencias pareadas π se computó mediante la ecuación:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k P_i P_j d_{ij}$$

de acuerdo a: (d_{ij}) como la proporción de diferencias nucleotídicas entre las secuencias i y j , k siendo el número de haplotipos, P_i la frecuencia absoluta del haplotipo i y n es igual al tamaño muestral.

El estimador de Watterson, o theta de Watterson (θ_s ó θ_w) (Watterson 1975), es estimado bajo el modelo de sitios infinitos para DNA no recombinante:

$$\theta = \frac{S}{a_1}$$

donde (S) es la proporción de sitios segregantes y (a_1) se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}$$

(n) es el número de individuos.

Estos estadísticos fueron calculados con ayuda del programa *DnaSP* 5.0 (Librado y Rozas 2009).

4.5. Filogenia y red de haplotipos

Se construyó un árbol Bayesiano, uno de Máxima Verosimilitud y otro de Máxima Parsimonia usando la matriz concatenada de los cuatro genes y una matriz con el gen mitocondrial ND2.

Los árboles bayesianos fueron construidos con ayuda del programa *MrBayes* v3.2.3 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). En todos los casos se emplearon 3 cadenas calientes y una fría, con un *burn-in* del 25% y 10 millones de generaciones con un muestreo cada 1,000 árboles. Se emplearon los valores de tasas de cambio y frecuencia de bases obtenidas en *jModelTest* y para la matriz concatenada se utilizó el algoritmo *reversible-jump*. El algoritmo de salto-reversible caracteriza de mejor manera los datos que no son homogéneos (diferentes genes), porque considera modelos en todo el rango de complejidad (Gowri-Shankar y Rattray 2007, Eastman et

al. 2011).

Los árboles de *ML* fueron elaborados con el programa *Rxml.GUI* 1.31 (Silvestro y Michalak 2011). Los valores de apoyo para los árboles fueron obtenidos a partir de 10,000 réplicas *bootstrap*. Es importante resaltar que el programa sólo trabaja con el modelo de evolución *GTR* (Tavare 1986), por lo cual los árboles fueron construidos con los supuestos de este modelo. Dado que este algoritmo de búsqueda sólo admite topologías con un valor mayor de verosimilitud a la topología anterior (*hill-climbing*), fue necesario realizar múltiples búsquedas con diferentes árboles de inicio para disminuir la probabilidad de que la topología resultante sea un máximo local (Wilkinson 1995, Rokas 2001, Pattengale *et al.* 2010, Stamatakis 2015).

La obtención de los árboles más parsimoniosos se llevó a cabo con el programa *PAUP* 4.6.0 (Swofford 2002). En todos los casos el árbol de inicio se obtuvo añadiendo secuencias al azar y la búsqueda se realizó mediante el método *TBR* (*Tree Bisection and Reconnection*) donde el árbol de inicio es partido en dos subárboles y reconectados en diferentes partes de las ramas (Swofford 1991). Los valores de apoyo fueron calculados con 100 réplicas *bootstrap*.

Se empleó el programa *Network* 4.6.1.3 (Bandelt *et al.* 1999) para construir una red de haplotipos para cada uno de los genes empleando el algoritmo *median-joining*. En el caso de los marcadores mitocondriales se modificó la proporción de 1:1 para transiciones/transversiones a una 3:1 recomendada para *mtDNA*.

4.6. Estimación de tiempos de divergencia

Para calcular los tiempos de divergencia de los principales grupos filogenéticos dentro de la especie *H. fuscicauda* se empleó el programa *BEAST* v1.8 (Drummond *et al.* 2012). Ante la ausencia de fósiles que permitieran calibrar el reloj molecular se empleó únicamente la tasa de sustitución de los diferentes marcadores. La tasa de sustitución para el gen mitocondrial ND2 es de 2.5 % por Ma (media = 0.0125, DE = 0.1), para el marcador nuclear Aco1-i9 en 0.19 % por Ma (media = 0.00145, DE = 0.45) (Pulgarín-R. *et al.* 2013) y para ND4 la tasa fue ligeramente menor que para el otro gen mitocondrial ND2 (2.0 % por Ma, media = 0.01, DE = 0.4) (Pacheco *et al.* 2011). Fue empleado un proceso de Yule y se eligió un reloj molecular relajado, es decir, no

se asumió divergencia constante en todas las ramas, sino que se le asignó una función de probabilidad lognormal (Li y Drummond, 2012). Se realizaron dos corridas independientes. En cada una se computaron 250 millones de generaciones y se muestreó un árbol cada 2,500, se descartó el 25 % como *burn-in*. Con ayuda de *Tracer* v1.6 (Rambaut y Drummond 2014) se combinaron las dos corridas y se verificó que se hubiera alcanzado un valor de tamaño efectivo muestral (*ESS*) mayor al límite recomendado para los parámetros del modelo, $ESS > 200\ 000$. Por último, con el programa *TreeAnnotator* v1.8.2 (Rambaut y Drummond 2012) se resumió la información obtenida de los árboles.

4.7. Análisis de delimitación y estructura poblacional

La estructura genética poblacional de la especie *H. fuscicauda* fue estimada mediante dos métodos: 1) Con el programa *Structure* 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000) y 2) con el programa *Geneland* (Guillot y Estoup 2005), usando *R* (R Development Core Team 2008).

El algoritmo que emplea *Geneland* agrupa las muestras en un cierto número de grupos K , de tal manera que cada grupo es homogéneo. El agrupamiento se hace tomando en cuenta tanto el haplotipo del individuo como su georreferencia exacta. Se evaluaron 10 corridas independientes con valores de K desde 1 a 5 y un millón de iteraciones MCMC (*Markov chain - Monte Carlo*) muestreando cada 100. Se asumió correlación en la frecuencia de los haplotipos entre grupos.

El análisis *Structure* consistió de 500 mil réplicas *burn-in* y un millón de réplicas para calcular el mejor número de poblaciones K para los datos genéticos. Se evaluaron valores para K de 1 a 5 con 10 repeticiones para cada una. Los parámetros con los cuales corrió el programa son: modelo mezclado (el gen del individuo analizado puede provenir de otra población) y frecuencias alélicas correlacionadas (debido a posible migración), además a cada individuo se le asignó un id correspondiente a la población de la cual procede (Pritchard *et al.* 2000, Pritchard 2010). En los dos casos el valor de K que mejor se ajustó a los datos y la corrida para el valor de K que mejor representó el agrupamiento de individuos fue obtenido con el programa *CLUMPAK* (Kopelman *et al.* 2015).

Además, se llevaron a cabo estimaciones de la diferenciación poblacional e interconectividad entre los grupos encontrados. El estadístico F_{ST} , en términos de coeficientes de endogamia, para fines de practicidad, se puede interpretar como:

$$F_{ST} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} \quad (\text{Slatkin 1991}).$$

En la fórmula f_0 es la probabilidad de identidad por descendencia (*ibd*, por sus iniciales en inglés) de dos haplotipos diferentes tomados de la misma población y f_1 es la probabilidad de *ibd* de dos haplotipos tomados de diferentes poblaciones. La significancia estadística se puede estimar permutando haplotipos entre poblaciones entre grupos. Se esperan valores cercanos a cero para grupos de poblaciones poco o nada diferenciados (Excoffier *et al.* 2005).

El análisis de varianza molecular (AMOVA), prueba la estructura genética mediante un análisis jerárquico de varianza. La varianza total se particiona en componentes de covarianza debidos a diferencias intra-individuos, inter-individuos y poblacionales. La significancia se logra permutando haplotipos, individuos o poblaciones entre individuos, poblaciones o grupos de poblaciones (Excoffier *et al.* 2005).

El estadístico F_{ST} y el AMOVA se calcularon con el programa *Arlequin* v3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005).

4.8. Análisis demográficos

Los gráficos *mismatch* representan la distribución del número observado de diferencias entre pares de haplotipos. Una regla de dedo es que las distribuciones son unimodales para poblaciones con reciente expansión demográfica o poblaciones que tuvieron expansión de rango con altos niveles de migración entre subpoblaciones conjuntas; mientras que los gráficos son multimodales para poblaciones con tamaños históricos constantes o con expansión de rango pero baja tasa de migración (Ray *et al.* 2003, Excoffier *et al.* 2009). El índice *ruggedness* de Harpending (*HRI*) de la distribución observada toma valores altos para distribuciones multimodales y bajos para distribuciones unimodales (Harpending 1994).

Una expansión poblacional sucede cuando una población en equilibrio aumenta de tamaño en cierto número de generaciones, pasando de un tamaño N_0 a N_1 . De igual manera la expansión espacial ocurre si el rango de una población aumenta sobre el tiempo y el espacio (Excoffier *et al.* 2005), y una expansión de rango lo suficientemente grande puede llevar a la misma señal en la distribución *mismatch* que la expansión demográfica sólo si hay migrantes intercambiándose entre poblaciones o subpoblaciones y que durante la expansión también se dé un crecimiento poblacional, tal que se llegue a un modelo de islas infinitas (Ray *et al.* 2003, Excoffier *et al.* 2009).

En la distribución del número de diferencias observadas entre pares de haplotipos, la forma depende del número de genes (Nm) intercambiados entre poblaciones, es decir, depende del producto $N * m$, no sólo de la tasa de migración (m) o el tamaño poblacional (N).

También se realizó la prueba de neutralidad D de Tajima (Tajima 1989), la cual está basada en el modelo de sitios infinitos sin recombinación. Esta prueba compara dos estimadores del parámetro mutacional theta:

$$\theta = 2Nu \quad (\text{para poblaciones haploides}).$$

El estadístico D está definido cómo:

$$D = \frac{\theta_{\pi} - \theta_S}{\sqrt{\text{Var}(\theta_{\pi} - \theta_S)}}$$

Los valores de D con significancia estadística, no sólo se refieren a factores de selección natural operando, sino que pueden indicar expansión poblacional, cuellos de botella o heterogeneidad en la tasa de mutación (Tajima 1993). En cambio, si D resulta positiva quiere decir que π tiene un mayor valor que θ , indicación de que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva (Tajima 1989). La significancia del estadístico D se prueba generando muestras aleatorias bajo la hipótesis de neutralidad y equilibrio poblacional. El valor de probabilidad del estadístico D es obtenido como la proporción de valores aleatorios del estadístico F_S menores o iguales a los observados. Las distribuciones *mismatch* y el estadístico D de Tajima se calcularon con el programa *Arlequin v3.5.1.2* (Excoffier *et al.* 2005).

Con los tiempos estimados para la divergencia de cada uno de los dos grupos genéticos encontrados se realizó un análisis de *skyline plot*. Se corrió el modelo por

100 millones de generaciones en *BEAST* v1.8 (Drummond *et al.* 2012), muestreando cada 100. Con el programa *Tracer* v1.6 (Rambaut y Drummond 2014) se descartó el 20% de *burn-in*, se verificó que se hubiera alcanzado un valor *ESS* > 200 000, y se procedió a calcular los gráficos de *skyline plot*.

4.9. Modelado de distribución de especies y proyección al Pleistoceno-Holoceno

El modelado de distribución de especies (*SDM*, *species distribution model*) fue realizado para cada grupo genético encontrado, con el programa *MaxEnt* (Phillips *et al.* 2004).

De acuerdo a Hewitt (1996) y Chan *et al.* (2011), el SDM es una herramienta que apoya en la hipótesis de conservadurismo de nicho (o dicho de otra manera que ha estado adaptada a los mismos rangos ecológicos en toda su historia evolutiva) y no la de ocurrencia de adaptación a nuevas condiciones ecológicas.

Los datos consistentes en georreferencias para avistamientos de la especie fueron obtenidos de la base GBIF (www.gbif.es). Se eliminaron los registros que caen en el mismo punto para reducir los sesgos que puede producir el muestro.

Se empleó información de las 19 variables bioclimáticas de Bioclim (*WorldClim – Global Climate Data*) (Hijmans *et al.* 2005). Para cada una de las variables se extrajo el valor de *raster* y se hizo un análisis de correlación de variables con la intención de no redundar en la información o no mantener variables que parecen importantes para la especie pero no lo son en realidad. Por ejemplo, la BIO3 (Isotermalidad) recoge información tanto de la BIO2 como de la BIO7. Se consideró el límite de 0.90% como valor de correlación entre variables.

Con el programa *R* (R-development core team 2008) se estimaron las distancias de Mahalanobis. Se eliminaron los datos que se encontraban a más de dos desviaciones estándar con la intención de no incluir en el modelo datos que exageran las capacidades ecológicas de la especie. En total se emplearon 817 registros: 643 para el clado Norte y 164 registros para el clado LCA.

También se realizó un análisis de componentes principales para estimar cuantos componentes explican al menos el 90% de los datos. El corte se hizo en cinco componentes en los dos casos: Para el clado Norte se usaron las siguientes variables:

Bio4, Bio5, Bio6, Bio7, Bio8, Bio13, Bio16 y Bio17; y para el clado LCA se emplearon las variables Bio1, Bio2, Bio3, Bio4, Bio14, Bio15, Bio16 y Bio19.

Finalmente, en Bioclim (*WorldClim – Global Climate Data*) (Hijmans *et al.* 2005) se obtuvieron capas de las condiciones climatológicas del Holoceno-medio (6,000 años AP), Último Máximo Glacial (22,000 años AP) y Último Interglacial (~120,000 – 140,000 años AP), con la intención de modelar la distribución de la especie a estos tiempos. Se emplearon los modelos de *CCSM (Community Climate System Model)* los cuales simulan el sistema climático terrestre.

5. Resultados

5.1. Descripción de las secuencias de ADN y diversidad genética de las poblaciones

En total se amplificaron cuatro regiones genómicas de la especie *H. fuscicauda*: dos regiones mitocondriales: las subunidades ND2 y ND4 del gen NADH deshidrogenasa y dos nucleares: el intrón-6 del gen Ornitina dextracarboxilasa (ODC) y el intrón-9 del gen Aconitasa-1, que se encuentra en el cromosoma sexual Z.

La totalidad de las muestras pertenecientes a la subpoblación Este de Centroamérica y gran parte de la población de las Tierras Bajas de Centroamérica no están presentes en la colección del Museo de Zoología, por lo cual no fue posible obtener secuencias de regiones genómicas diferentes a ND2. En el resto de poblaciones y subpoblaciones se realizó un remuestreo de los individuos de cada clado genético con la intención de no amplificar todas las muestras para cada gen (Tabla 1).

La matriz concatenada final cuenta con 3423 pb (pares de bases). El gen ODC es el que presenta menos sitios variables (20). Por el contrario, el gen ND2 es el que tiene más sitios variables (69) e informativos para parsimonia con 51 sitios (Tabla 2). El gen mitocondrial ND4 tuvo una longitud de 924 pb y ND2 presentó una longitud variable entre 877 pb y 970 pb, pero se rasuró la matriz a la secuencia más corta. Los marcadores nucleares presentan una extensión de 635 pb para ODC y 987 pb para Aco1-i9 (Tabla 2).

La población Núcleo Centroamérica ($n = 65$) es la que mayor número de haplotipos tiene con $h = 24$. Sin embargo, su valor de diversidad haplotípica, $Hd = 0.84$, no difiere en gran medida en comparación con las otras poblaciones. Dentro de las subpoblaciones de NC, la subpoblación Este de Centroamérica ($n = 25$) tiene el valor más alto de diversidad haplotípica, $Hd = 0.94$, mientras que la subpoblación de Nicaragua ($n = 3$) presenta el valor más bajo, $Hd = 0.67$ (Tabla 3). La población del Istmo ($n = 22$) cuenta con 10 haplotipos y una diversidad haplotípica $Hd = 0.84$, mientras que la población presente en la región LCA ($n = 34$) también presentó 10 haplotipos y el valor más bajo de diversidad haplotípica $Hd = 0.79$ (Tabla 3).

La diversidad nucleotídica π es más baja en las poblaciones NC e Istmo $\pi = 0.0042$ y $\pi = 0.0032$, respectivamente, que en la población LCA, $\pi = 0.0058$ (= 0.58% de diferencias entre pares de secuencias; Tabla 3). Dentro de las subpoblaciones NC, Nicaragua presenta el valor más alto de $\pi = 0.025$ (Tabla 3), aunque el bajo muestreo en esta población hace poco confiables los valores de los estimadores, este valor alto es de esperarse porque la población presenta hibridación entre clados (se discute más adelante).

Tabla 1. Tamaño muestral de acuerdo al gen amplificado para cada población y subpoblación.

Población	Subpoblación	Mitocondrial		Nuclear	
		ND2	ND4	ODC	ACO1-i9
SLP		2	4	4	3
Istmo Tehuantepec		22	6	6	4
Núcleo Centroamérica	P. Yucatán	30	13	13	12
	Chiapas	7	3	3	2
	Este de Centroamérica	25	0	0	0
	Nicaragua	3	3	3	3
	Total	65	19	19	17
LCA		34	4	3	3
Total		123	33	32	27

Tabla 2. Número de bases amplificadas por gen, valores de sitios variables y sitios informativos para parsimonia y el mejor modelo de sustitución y los valores de los parámetros que emplea encontrados en *jModeltest* empleando el Criterio de Información de Akaike.

	ND2	ND4	ODC	AC01-i9
Número de secuencias	123	34	32	28
Pares de bases	877	924	635	987
sitios variables	69	35	20	53
Sitios inf. de parsimonia	51	30	13	48
Modelo de sustitución	TIM2 + Γ	HKY + I	TrN	TrN+I
Frecuencia de bases				
frecA	0.239	0.231	0.274	0.259
frecC	0.353	0.129	0.165	0.177
frecG	0.104	0.320	0.205	0.204
frecT	0.248	0.319	0.356	0.361
Tasa de sustitución				
r(AC)	4.185	1.000	1.000	1.000
r(AG)	198.040	32042.800	4.516	10.556
r(AT)	4.185	1.000	1.000	1.000
r(CG)	1.000	1.000	1.000	1.000
r(CT)	83.150	32042.800	1.065	4.730
r(GT)	1.000	1.000	1.000	1.000
Gamma/Sit. Inv.	$\Gamma=0.17$	I=0.869	-	I= 0.820

Tabla 3. Valores de diversidad genética obtenidos por población. Se indican el número de individuos (n), de haplotipos (h) y de sitios segregantes (s), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π) y theta de Watterson ($\theta-W$).

Población	Subpoblaciones	n	s	h	Hd	π	$\theta-W$
SLP		2	7	2	1	0.008	
Istmo		22	14	10	0.83	0.003	0.0051
NC		65	50	25	0.86	0.0042	0.014
	P. Yucatán	30	18	14	0.9	0.0032	
	Chiapas	7	3	4	0.81	0.0015	
	Este Centroamérica	25	20	12	0.83	0.0036	
	Nicaragua	3	27	2	0.67	0.025	
Norte		89	58	32	0.88	0.0037	0.011
LCA		34	19	10	0.80	0.0058	0.0064
Total		123	69	42	0.93	0.018	0.017

5.2. Filogenia y red de haplotipos

En total se obtuvieron 42 haplotipos en 35 localidades muestreadas con el gen mitocondrial ND2. Su red de haplotipos muestra la existencia de dos haplogrupos separados mediante una distancia de 20 pasos mutacionales (Figura 3). El primer haplogrupo, denominado Norte, comprende las poblaciones de SLP, Núcleo Centroamérica e Istmo, mientras que la población LCA conforma el segundo haplogrupo (Figura 4). El gen ND4 mantiene una dicotomía similar a la red ND2, con 17 pasos mutacionales, pero tiene menor resolución al presentar menor número muestral. En contraste, las redes para los genes nucleares no muestran un patrón de separación congruente con la delimitación geográfica propuesta (Figura 5).

Diez haplotipos están presentes en la población del Istmo, de los cuales siete son únicos. En la población NC hay 19 haplotipos únicos y seis compartidos y en la población LCA 9 de los 10 haplotipos encontrados son únicos (Tabla 4 y Figura 4). El H_12 se comparte en 16 localidades; está presente en las cuatro subpoblaciones delimitadas para NC y es uno de los dos haplotipos que esta población comparte con la del Istmo. El H_32 se comparte en cuatro localidades dentro de la región del Istmo y no se encontró en ninguna otra población, mientras que el H_7 está presente en cuatro localidades de la población LCA y es el único haplotipo que se comparte entre la población LCA y la población Núcleo Centroamérica (Tabla 4).

Es importante señalar la conformación de estrella resultante para el grupo Norte: un único haplotipo ancestral de alta frecuencia (H_12 en rojo) que da origen a varios haplotipos de baja frecuencia (en verde) y al H_32 (naranja), el cual a su vez es de alta frecuencia en la población del Istmo y da origen a cinco haplotipos, todos ellos presentes únicamente en esta población (Figura 4).

Los tres diferentes árboles construidos con el marcador ND2 coinciden en la topología general, por lo cual se puede determinar que existe congruencia en las relaciones filogenéticas resultantes (Walker *et al.* 1997, Melnick y Hoelzer 2005), y también en asignar un alto apoyo a algunos de los clados dentro del árbol, tomando en cuenta que se consideraron diferentes umbrales de soporte relativamente alto: para la probabilidad posterior $pp = 0.90$ y para el *bootstrap* $bt = 75\%$.

Con el gen ND2 el árbol de *MP* cuenta con 286 pasos, un índice de consistencia

CI = 0.75 y un índice de retención $RI = 0.95$ (Figura AF1-A, ver Apéndice). Y el árbol filogenético de *ML* tiene un valor de verosimilitud $-lnL = -2562.68$ (Figura AF1-B, ver Apéndice). Los árboles de *ML* y *MP* de la matriz concatenada presentan una topología similar (AF1-C y AF1-D, ver Apéndice). El árbol de *MP* cuenta con 240 pasos, un $CI = 0.90$ y $RI = 0.87$, valores indicativos de poca homoplasia (Farris 1989).

La principal relación que describe ND2 y la matriz concatenada es la separación de la especie *H. fuscicauda* en dos clados, patrón consistente con lo encontrado en las redes de haplotipos. Un clado contiene individuos de las poblaciones SLP, Núcleo Centroamérica e Istmo, denominado Clado Norte, y el otro clado presenta individuos pertenecientes a la población LCA y un individuo de la subpoblación Nicaragua. Los valores de soporte resultantes del método Bayesiano para la dicotomía Norte – LCA son altos (Figuras 4 y 5).

El clado Norte tiene valores de soporte altos para el gen ND2 (Figura 4), pero en la matriz concatenada tiene valores bajos de probabilidad posterior y de *bootstrap* para *MP* (Figura 5). Al interior de este clado se reconoce poca estructuración geográfica y sólo se forman algunas agrupaciones pequeñas. Llama la atención que algunos individuos pertenecientes a la población de Este de Centroamérica se presentan en el mismo subclado que forman los individuos de la región del Istmo, principalmente de la localidad de Los Tuxtles, aunque con valores de apoyo por debajo del umbral definido como alto (Figura 4).

El segundo clado, restringido a la zona LCA, que abarca 7 localidades entre Costa Rica y la parte central de Panamá, muestra valores de soporte altos en todos los casos Figuras 4 y 5).

El patrón general de separación a partir de la matriz concatenada indica que la diferencia principal Norte-LCA se dio hace 2.4 Ma – 700,000 años AP, con una $pp = 1$. La principal separación en el clado Norte, explicada por un posible evento de expansión demográfica indica una edad aproximada entre 270,000 – 970,000 años AP, mientras que para el clado LCA la divergencia se traslada a 140,000 – 740,000 años AP (Figura 6).

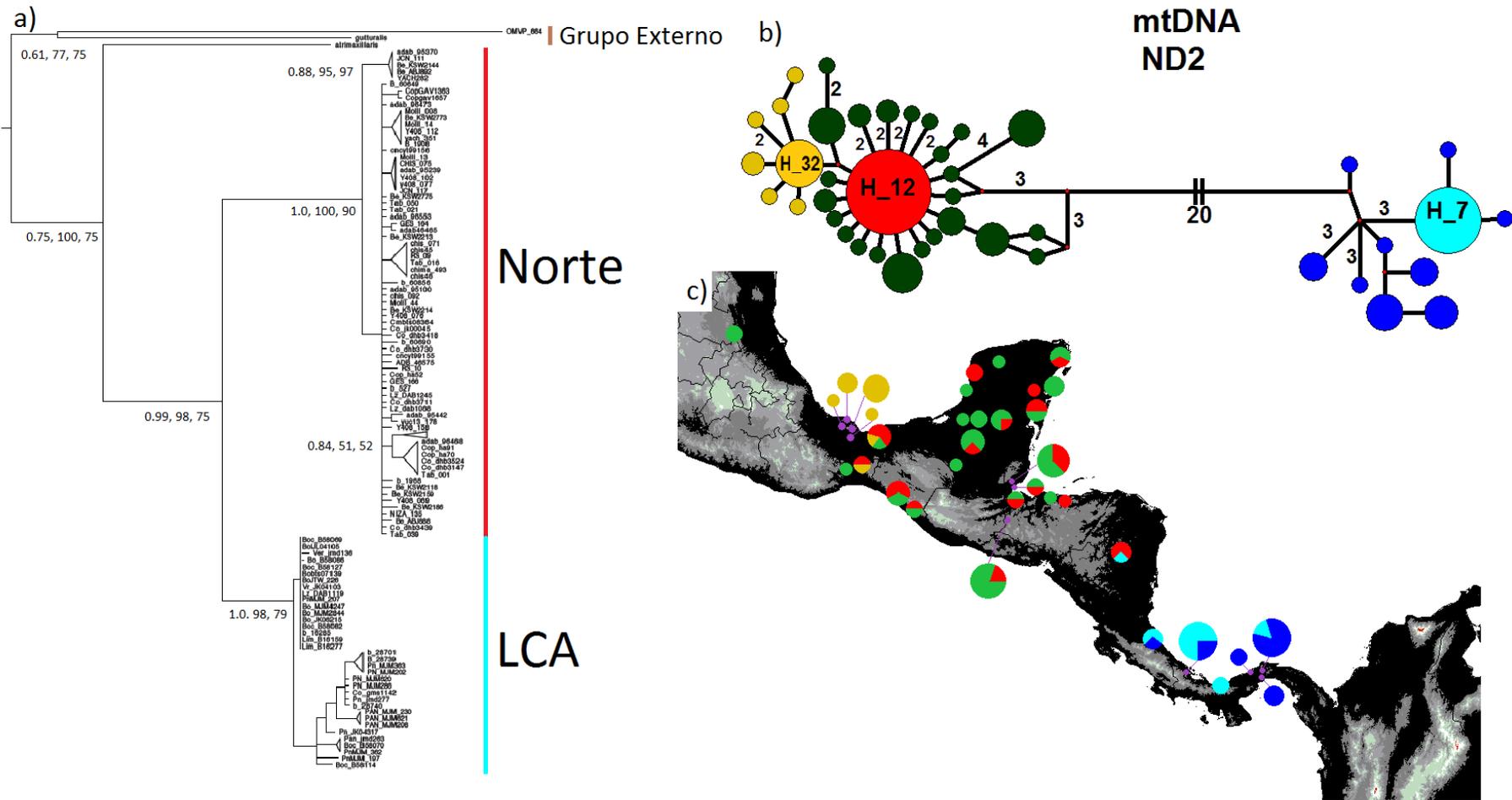


Figura 4. a) Árbol Bayesiano para el gen mitocondrial ND2. Se indican los valores de soporte en el orden Bayes-ML-MP. b) Red de Haplotipos construida con el algoritmo median joining para ND2, se indican los haplotipos compartidos y el número de pasos mutacionales entre haplotipos. c) Distribución geográfica de los haplotipos. El tamaño del círculo es indicativo del número de individuos que presentan el haplotipo.

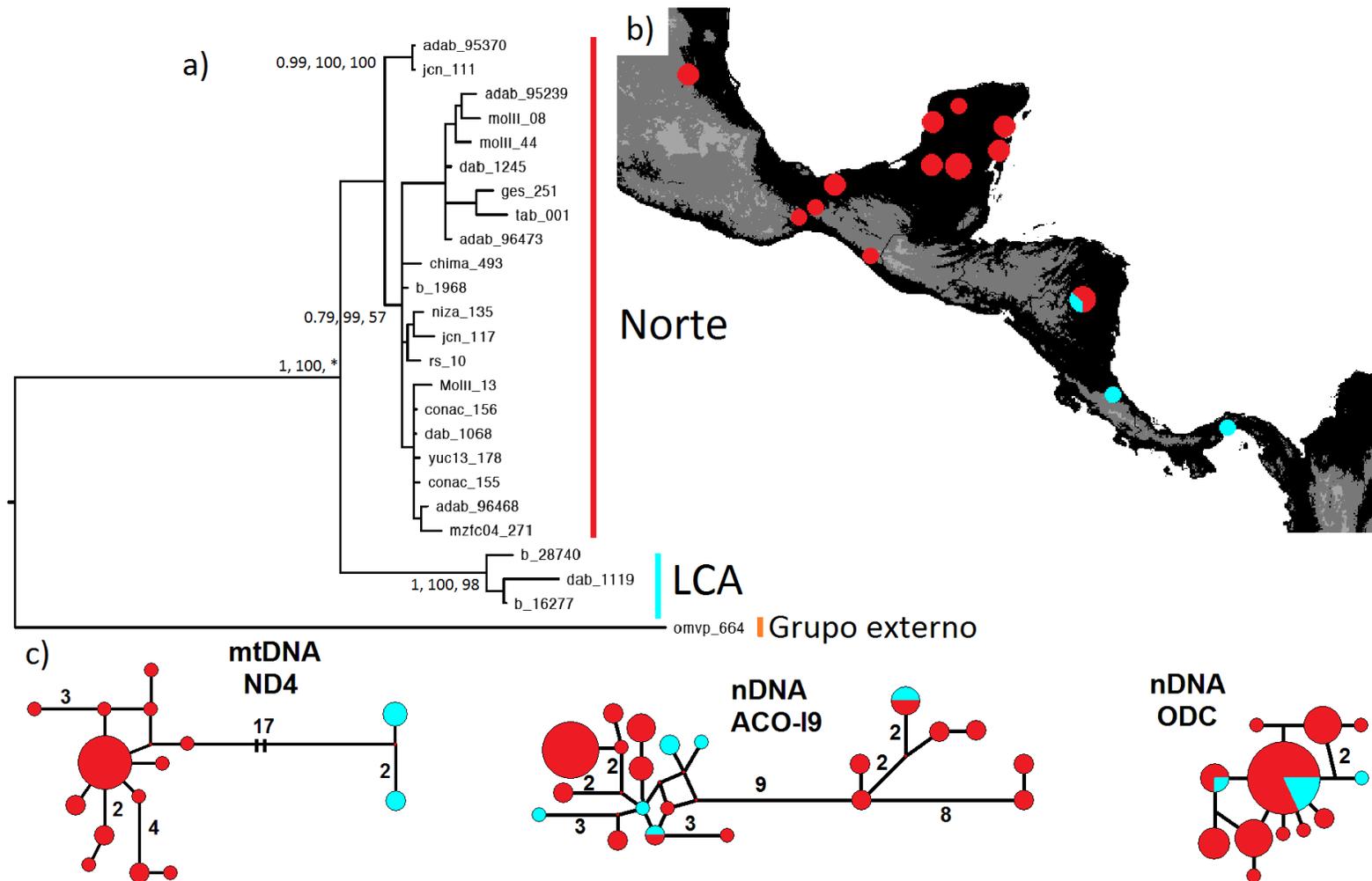


Figura 5. a) Árbol Bayesiano para la matriz concatenada. Se indican los valores de soporte en el orden Bayesiano-ML-MP. **b)** Distribución geográfica de los haplotipos. El tamaño del círculo es indicativo del número de individuos que presentan el haplotipo. **c)** Redes de Haplotipos construidas con el algoritmo median joining para los tres marcadores.

Tabla 4. Haplotipos compartidos entre una o más poblaciones para el gen ND2

Haplotipo	Población
7	NC (Nicaragua) y LCA.
12	Istmo y NC.
13	NC (Chiapas y P. Yucatán) y SLP.
15	Istmo y NC (P. Yucatán y Este Centroamérica).
18	SLP y NC (Chiapas, Este Centroamérica y P. Yucatán).

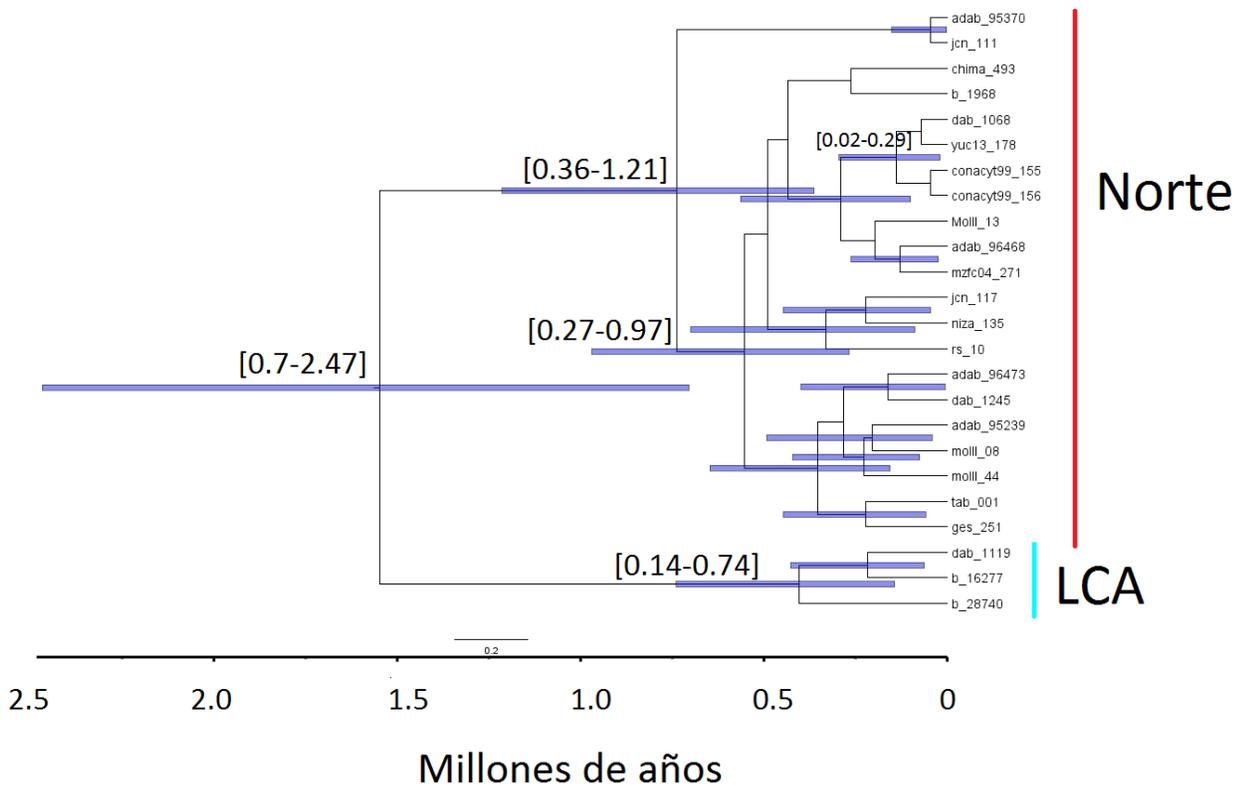


Figura 6. Tiempos de divergencia para la especie *H. fuscicauda* estimados en *Beast* empleando la matriz concatenada.

5.3. Análisis de delimitación poblacional

El resultado de la dicotomía Norte-LCA se confirma con el resultado de los análisis hechos en *Geneland* y *Structure*. Las isóclinas de asignación poblacional apoyan la separación Norte-LCA. Sin embargo, la población de Nicaragua no se asigna dentro del valor de 1 para las isóclinas de ninguno de los dos grupos, aunque tiene un valor más alto de pertenencia (0.8) al grupo de la zona Tierras Bajas de América Central (Figura 7). De manera similar, el análisis en *Structure* reconoce la existencia de dos grupos genéticos. Las poblaciones de SLP, Istmo y a excepción de un individuo en la población Núcleo Centroamérica se delimitan como una unidad genética (Figura 8, en azul). La población de las Tierras Bajas de América Central se reconoce como otro grupo genético (Figura 8, en naranja).

Los valores de F_{ST} sugieren que las poblaciones LCA e Istmo se diferencian de manera significativa ($P < 0.05$) respecto de todas las demás poblaciones y subpoblaciones y entre ellas (Tabla 5). Entre las subpoblaciones de NC sólo se indican diferencias significativas entre la subpoblaciones Península de Yucatán y Nicaragua, aunque el bajo número muestral de esta última ($n = 3$) no permite establecer un alto grado de confianza al resultado.

El árbol de *Neighbor Joining* construido con los mismos valores F_{ST} separa los dos grupos genéticos Norte - LCA. Dentro del clado Norte se agrupan la población SLP y la subpoblación Nicaragua, pero esta asociación es poco confiable dada la distancia geográfica y el bajo número muestral de cada una ($n = 3$) (Figura 9).

Como es de esperar, las diferencias genéticas en la especie *H. fuscicauda* se dan mayormente entre grupos de poblaciones (Norte - LCA) con el 79.6% de acuerdo al AMOVA y no al interior de los grupos o de las poblaciones (Tabla 6).

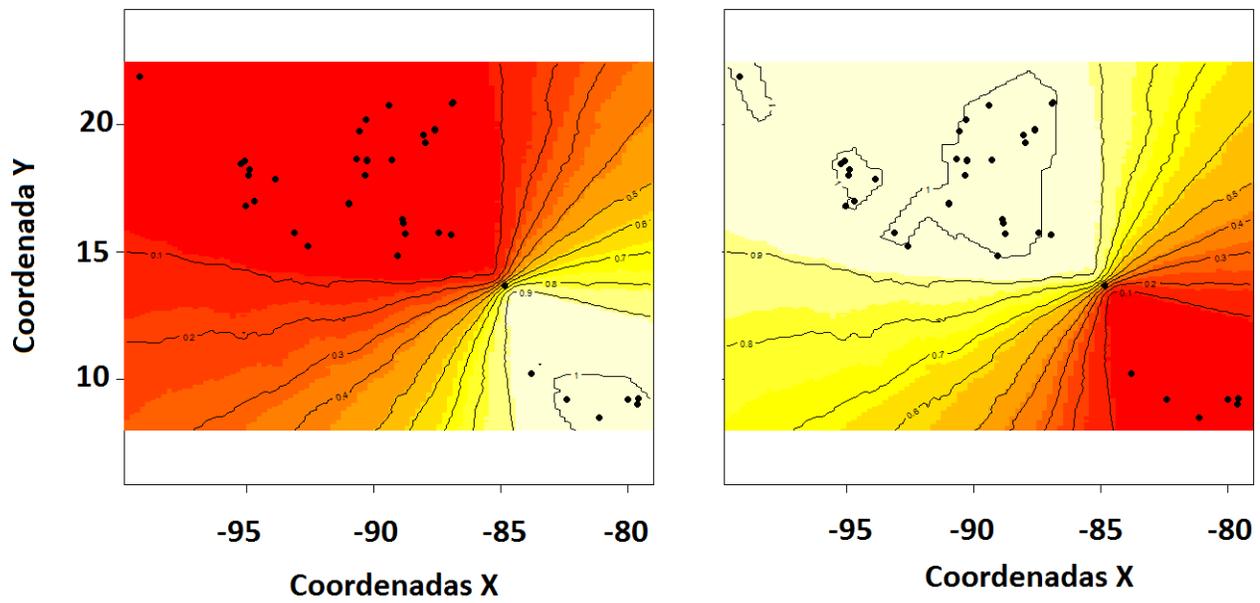


Figura 7. Análisis de membresía poblacional realizado en *Geneland* usando el marcador mitocondrial ND2. Del lado izquierdo se observa la probabilidad de pertenecer a la población Norte. En el lado derecho se muestra la probabilidad de pertenecer a la población LCA.

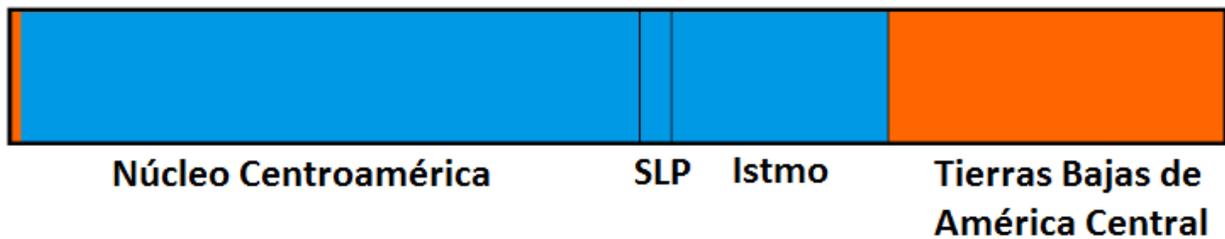


Figura 8. Análisis de delimitación poblacional realizado en *Structure* empleando el gen mitocondrial ND2. Se muestra la ocurrencia de dos grupos genéticos. El azul se corresponde a la población Norte y en naranja se señala la población LCA.

Tabla 5. Valor F_{st} con el gen ND2, n = 123. Número de permutaciones = 110, valor de significancia 0.05. Se señala con (+) las poblaciones con valores significativos.

	LCA	Istmo	Chiapas	Este C.	Nicaragua	Pen. Yuc.	SLP
LCA		+	+	+	+	+	+
Istmo	0.86		+	+	+	+	+
Chiapas	0.84	0.34		-	-	-	+
Este C.	0.85	0.20	0.04		-	-	+
Nicaragua	0.65	0.46	0.22	0.32		+	-
Pen. Yuc.	0.86	0.28	0.06	0.02	0.38		+
SLP	0.81	0.39	0.42	0.15	-0.13	0.24	

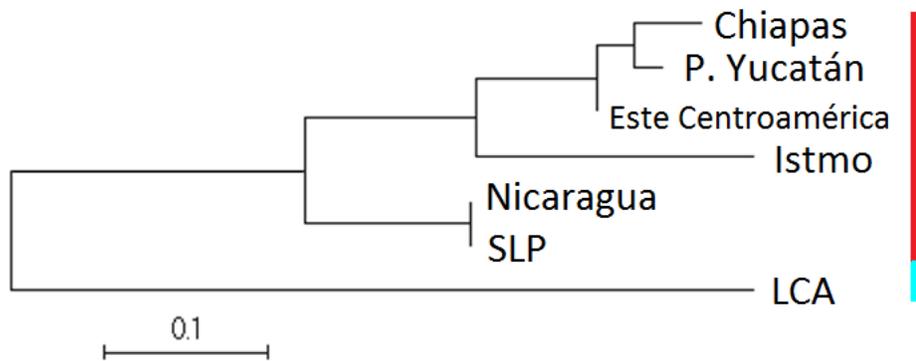


Figura 9. Árbol de *Neighbor-Joining* que resume gráficamente los valores F_{ST} . Se señala el grupo Norte en rojo y la población LCA en azul.

Tabla 6. AMOVA para la especie *H. fuscicauda* empleando el gen mitocondrial ND2, n = 123. P < 0.001 y 1023 permutaciones.

Variación	g.l.	suma de cuadrados	Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	3	2035.22	26.34	79.59
Entre poblaciones dentro de cada grupo	3	42.86	0.60	1.81
Dentro de las poblaciones	116	713.88	6.15	18.60
Total	122	2791.97	33.09	

5.4. Historia demográfica y de rango

Los resultados obtenidos mediante las gráficas de diferencias pareadas o *mismatch* indican que los datos se ajustan a un modelo de expansión demográfica-geográfica. Los valores del índice *reggadness* de Harpending (*HRI*) para expansión demográfica son significativos para la subpoblación de la Península de Yucatán y la población LCA, $P(\text{sim } HRI \geq \text{obs } HRI) < 0.05$, mientras el resto de las poblaciones y subpoblaciones presentan valores no significativos, $P(\text{sim } HRI \geq \text{obs } HRI) > 0.05$, es decir, no se rechaza la hipótesis nula de expansión demográfica (Tabla 7). Al evaluar los resultados de expansión de rango se encontró que todos los valores de *HRI* son no significativos, $P(\text{sim } HRI \geq \text{obs } HRI) > 0.05$, por lo cual no se puede rechazar la hipótesis de expansión de rango (Tabla 7).

Un análisis detallado de las distribuciones *mismatch* para los dos clados genéticos encontrados sugiere historias demográficas diferentes. El gráfico *mismatch* para el clado Norte se asemeja a una distribución unimodal, tal como lo indica el índice *raggedness* y el gráfico *skyline*, donde se puede observar un crecimiento demográfico reciente (Figura 10). El gráfico para LCA presenta una distribución errática, lo cual sugiere tamaños poblacionales constantes y se confirma con las gráficas *Skyline* (Figura 10).

La prueba de *D-Tajima* es consistente con lo encontrado en la gráficas *mismatch* y *skyline*. El valor *D-Tajima* es negativo y significativo para todas las poblaciones y subpoblaciones del clado Norte, $P < 0.05$, lo cual reafirma la hipótesis de expansión de rango y/o demográfico (Tabla 7).

Tabla 7. Valores obtenidos de los gráficos *mismatch* o de diferencias pareadas para cada población con $n > 3$ y los valores de la prueba de neutralidad *D-Tajima*. Valor de significancia en todos los casos 0.05.

Población	SLP	Istmo	Núcleo Centroamérica				Norte	LCA
Subpoblación			Chiapas	P. Yuc.	Este C.	Nic.		
n	2	22	7	30	25	3	89	34
Exp. Demográfica								

HRI	-	0.041	0.23	0.12	0.073	-	0.048	0.175
P(Sim. >= Obs.)	-	0.66	0.37	0.006	0.088	-	0.07	0.004
Exp. Espacial								
P(Sim. >= Obs.)	-	0.81	0.43	0.052	0.62	-	0.47	0.274
D-Tajima	-	-1.1	-0.73	-1.43	-1.39	-	-2.17	0.43
P(D simul < D obs)	-	0.001	0.01	0.001	0	-	0.001	0.03

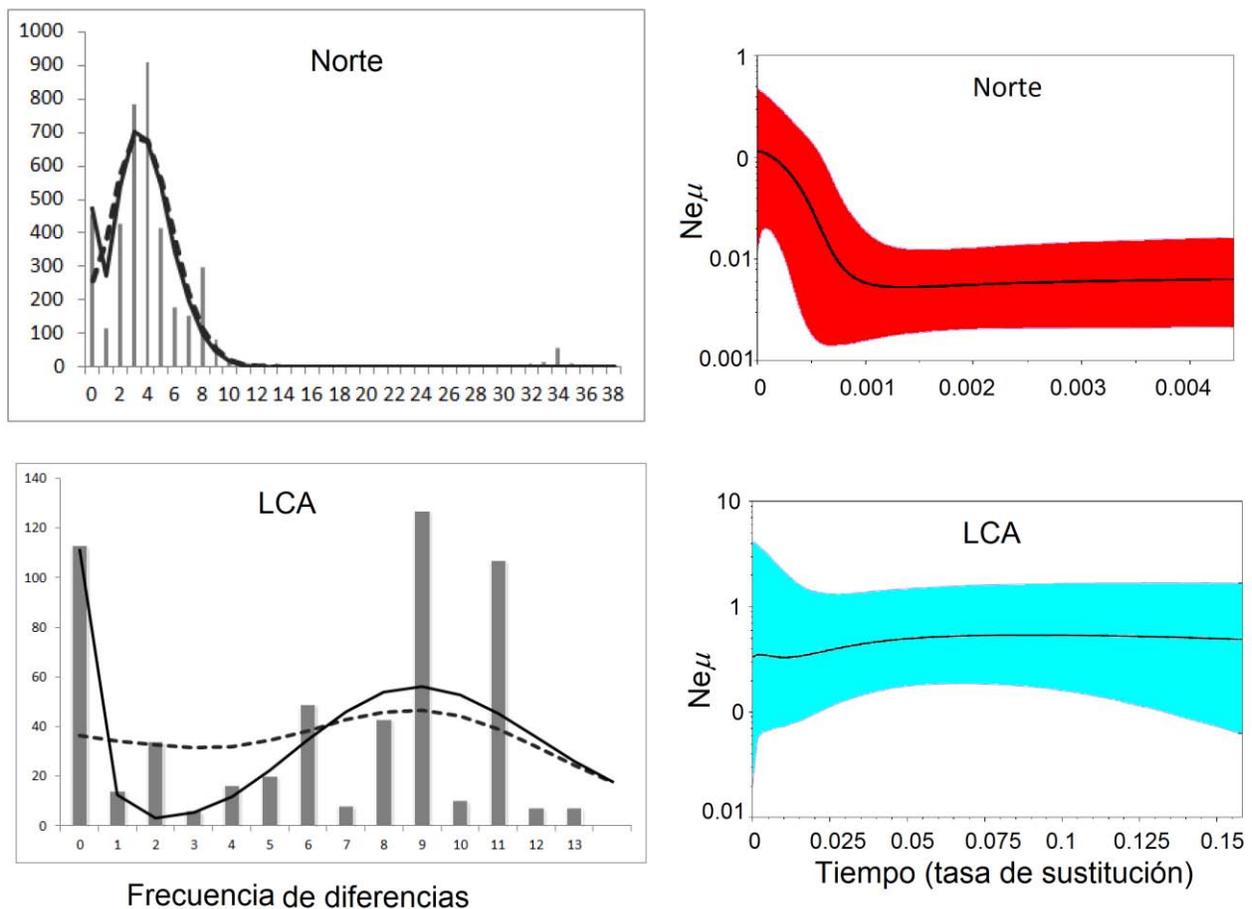


Figura 10. Distribuciones *mismatch* con el gen mitocondrial ND2. Las barras muestran las frecuencias observadas; la línea continua indica el modelo esperado bajo expansión de rango y la línea discontinua para expansión demográfica. Gráficos *skyline plots* basados en el gen mitocondrial ND2. La línea indica la media estimada de Ne y las áreas iluminadas representan el 95% de intervalo de confianza. Norte ($n = 89$) y LCA ($n = 34$).

5.5. Modelado de distribución potencial al Holoceno - Pleistoceno

El valor del área bajo la curva es $AUC = 0.96$ para los *training data* y de $AUC = 0.97$ para los puntos de prueba en el modelado de distribución de especies (*SDM*) para el clado LCA. El *SDM* para el clado Norte presenta valores de $AUC = 0.94$ para los datos de entrenamiento del modelo y de $AUC = 0.95$ para los datos de prueba del modelo. El valor AUC evalúa el desempeño del modelo, toma valores entre $0.5 < AUC < 1$, donde el límite inferior indica un desempeño igual al esperado con datos al azar y 1 una predicción perfecta (Raes y Steege 2007).

El modelado de distribución potencial de la especie al presente se ajusta de buena manera a la distribución que se tiene registrada. Como es de esperar el modelo registra áreas de alta probabilidad a las que la especie no ha tenido acceso, como es Cuba para el modelo del clado Norte (Figura 11-a) y el Sur de Colombia y Jamaica para el modelo LCA (Figura 11-a).

Los resultados para la distribución potencial a las principales condiciones climáticas de las que se tienen registro en el Holoceno-medio (6,000 años AP) muestran un área de distribución potencial mayor que en el presente para la población LCA, e identifica como de alta probabilidad áreas en el norte de Sudamérica, principalmente en Colombia y en Centroamérica (El Salvador, Guatemala y Belice; Figura 11-b). En el caso del clado Norte la distribución para el Holoceno-medio es semejante a la distribución actual a excepción de la zona de distribución en la costa del Pacífico, que incluye Chiapas y El Salvador que no se predicen (Figura 11-b).

En las condiciones del último máximo glacial (*LGM*), hace 22,000 años, se registran muchos parches de alta probabilidad para la ocurrencia de la especie, llaman la atención las áreas en Guerrero y Nicaragua, que no se había presentado (Figura 11-c). La población LCA se muestra estable en Panamá y Costa Rica, y se sugiere la costa Colombiana del Pacífico como un área ecológicamente viable para la especie (Figura 11-c).

Para las condiciones del último interglacial, hace 120,000 – 140,000 años, el área geográfica de alta probabilidad para el clado Norte es muy amplio. El análisis sugiere viabilidad ecológica para gran parte de Sudamérica, la región LCA, Nicaragua, el Istmo de Tehuantepec, El Salvador y Chiapas, así como un pequeño parche en

Guerrero (Fig. 11-d). En el caso del clado LCA la población se mantiene estable en Panamá, Costa Rica, pero parece aumentar de manera drástica su área potencial de distribución en la costa Colombiana del Pacífico (Figura 11-d).

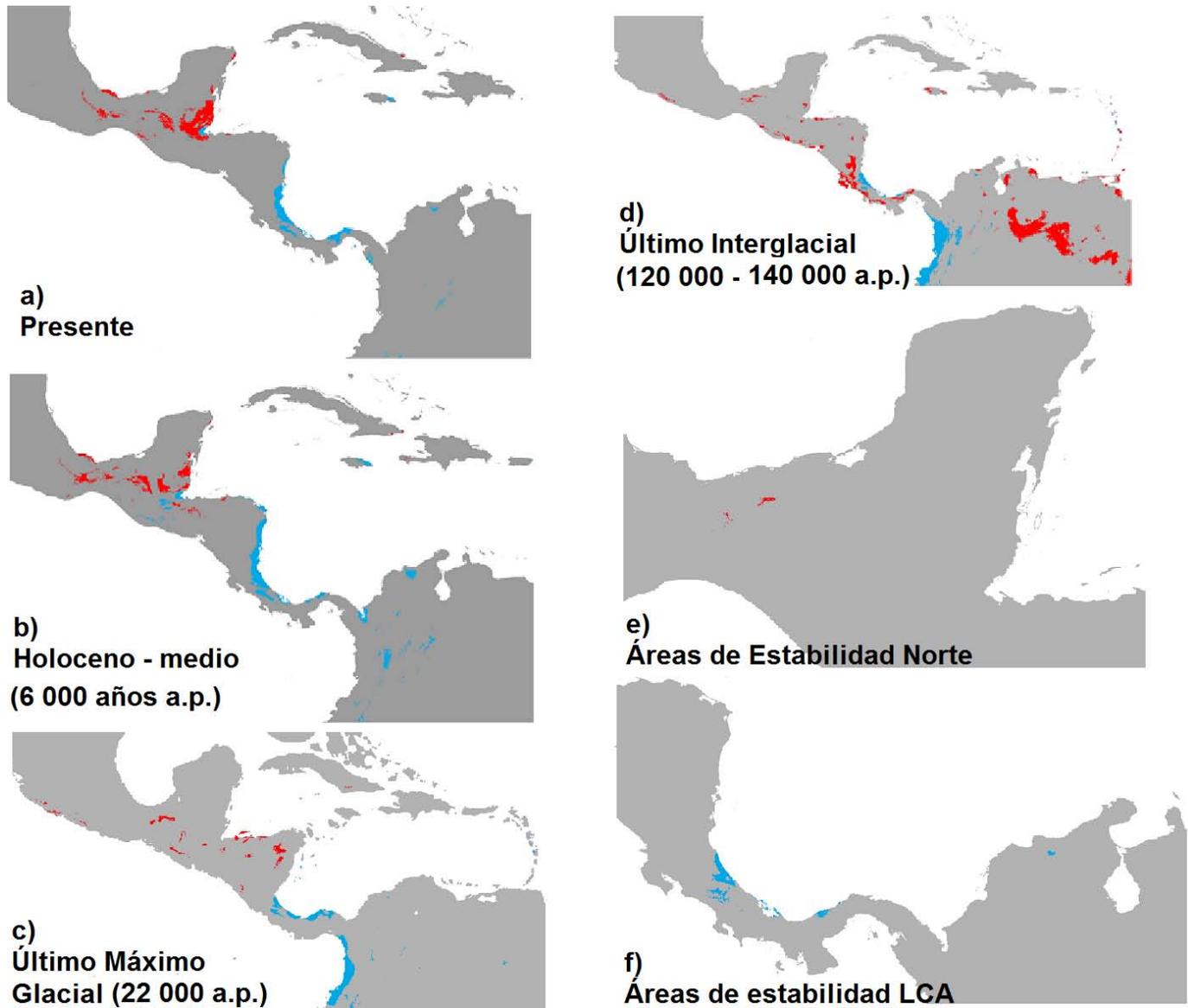


Figura 11. Distribución potencial para el clado Norte (rojo) y el clado LCA (azul) en cuatro tiempos: a) presente; b) Holoceno-medio; c) Último Máximo Glacial (*LGM*) y d) Último Interglacial (*LIG*). Áreas de estabilidad histórica o donde la especie tuvo alta probabilidad de presencia en los tres tiempos del pasado: e) Norte y f) LCA.

El *SDM* para el clado Norte sugiere dos áreas pequeñas históricamente estables en Veracruz y Tabasco, que corresponden al área geográfica de la población del Istmo (Figura 11-e). Los resultados también sugieren áreas de estabilidad histórica para la población LCA, es decir, áreas de alta probabilidad para la ocurrencia de la especie en los tres tiempos modelados al pasado. Estas áreas coinciden con las poblaciones LCA (Costa Rica y Panamá) y Colombia (no muestreada; Figura 11-f).

Sin embargo, se debe tener en mente que las áreas que aparecen como nicho potencial al pasado, a pesar de tener las condiciones climatológicas apropiadas, no confirman la ocurrencia de la especie, pues con la información que se cuenta no se puede determinar si ésta tuvo la capacidad de desplazarse y tolerar las condiciones bióticas presentes en dichas áreas.

6. Discusión

6.1. Variación genética y filogenia

Se describió y cuantificó la variación genética dentro de las poblaciones y entre poblaciones de la especie *H. fuscicauda*. El clado Norte presenta un valor de diversidad nucleotídica relativamente bajo $\pi = 0.0037$. Los valores bajos de π son indicativos de poblaciones con divergencia en el pasado cercano, tamaños poblacionales históricos pequeños ó poblaciones que han pasado por un cuello de botella (Li y Sadler 1991, Liu *et al.* 2006, Burney 2009). Dentro del clado Norte la población del Istmo ($\pi = 0.003$) y las subpoblaciones presentes en la población Núcleo Centroamérica ($\pi = 0.0042$; P. Yucatán $\pi = 0.003$; Chiapas $\pi = 0.001$ y Este de Centroamérica $\pi = 0.003$) presentan los valores más bajos de π . La subpoblación de Nicaragua es la que tiene un valor más alto de diferencias entre pares de secuencias $\pi = 0.025 = 2.5\%$, lo cual es de esperar porque presenta un individuo con haplotipo del clado LCA.

El estimador de Watterson, a diferencia de la diversidad nucleotídica, no está influenciado por la frecuencia de las secuencias. Si los valores de los dos estimadores son similares se considera que la población se comporta de manera cercana a la neutralidad (Nei 1987). Los baja diferencia entre los valores de $\theta-W$ (0.0064) y de π (0.0058) en la población LCA es próxima a la neutralidad. Mientras que para el clado

Norte el valor de θW (0.11) es casi del triple que para π (0.0037), esto es debido a la influencia de la alta frecuencia del H₁₂ en la estimación del parámetro de diversidad nucleotídica.

En el haplogrupo Norte el H₁₂ compartido en 16 localidades es propuesto como ancestral y posiblemente está implicado en la expansión de rango que se produjo en esta área (Cheviron *et al.* 2005). El haplogrupo Norte presenta cuatro haplotipos derivados compartidos entre poblaciones, lo cual indica una mayor tasa de migración respecto al haplogrupo LCA, dónde sólo se presenta un haplotipo compartido entre dos localidades.

Las relaciones filogenéticas con base en el análisis multilocus de cuatro genes muestran que al interior del clado Norte hay poca estructura geográfica, lo cual se espera en poblaciones con expansión demográfica o de rango reciente. Este resultado es consistente con lo mostrado en la red de haplotipos del gen ND2, que sugiere un evento de expansión demográfica o geográfica al mostrar un exceso de variantes de baja frecuencia (Slatkin y Hudson 1991, Excoffier *et al.* 2009). Un elevado número de variantes haplotípicas de baja frecuencia se puede deber a episodios de crecimiento demográfico, ya que se mantienen haplotipos que de otra manera se hubieran perdido (Harpending 1994), a que la migración es tan elevada que anula los efectos de la deriva génica o que ha transcurrido muy poco tiempo desde una expansión de rango, tal que un balance entre migración y deriva no se ha alcanzado (Slatkin 1993). Por el contrario, un cuello de botella deja una huella que consiste en baja diversidad haplotípica, porque causa pérdida de haplotipos raros y aumenta la frecuencia relativa de los de media y alta frecuencia. Las consecuencias son transitorias y se espera que desaparezcan una vez que el equilibrio mutación - deriva se alcance (Stone *et al.* 2002). A pesar de que la población LCA presenta el valor más bajo de diversidad haplotípica ($Hd = 0.80$) y el valor de D -Tajima es positivo y significativo, lo cual es indicativo de que la población ha decrecido o está actuando selección balanceadora, con los gráficos *mismatch* y *skyline plot* no se encontró evidencia de que la población haya decrecido.

El resto de las poblaciones y subpoblaciones muestran valores del parámetro D -Tajima negativos y significativos, lo mismo al evaluar el clado Norte en conjunto.

Este parámetro compara entre dos estimadores del parámetro mutacional θ , la $\theta-W$ y el estimador de Tajima $\theta-\pi$. La $\theta-W$ es más dependiente del tamaño poblacional al presente y $\theta-\pi$ es influenciado mayormente por el tamaño de la población original. Por lo tanto, una historia de selección direccional o crecimiento de rango al presente con altos niveles de migración genera un valor negativo y significativo para la D -Tajima (Tajima 1989, Liu *et al.* 2006).

La distribución *mismatch* para el clado Norte es bimodal con modas en 0 y 4 diferencias, mientras que para LCA es multimodal. Este resultado es congruente, de un modo general, con lo descrito para las poblaciones. Se espera para poblaciones con valores altos de migración que gran parte de los haplotipos hayan emigrado de la población muestreada antes de que lleguen a la coalescencia. Para el clado Norte se infiere que la mayoría de los eventos de coalescencia ocurren al tiempo de la expansión demográfica/espacial (moda en 4) y otros tantos en 0 diferencias. El gráfico *skyline plot* también soporta la hipótesis de expansión demográfica para este clado.

En cambio la población LCA presenta una distribución *mismatch* errática/multimodal, lo cual puede indicar baja tasa de migración o tamaños poblacionales constantes. En poblaciones con valores de migración bajos se espera que una gran cantidad de los eventos de coalescencia sean recientes y ocurran antes de que los genes emigren, diferencias = 0. (Ray *et al.* 2003, Excoffier *et al.* 2009). El gráfico *skyline plot* indica que la hipótesis de demografía constante para el clado LCA es la más probable.

El patrón dicotómico de dos grupos genéticos también se detecta con los análisis de delimitación poblacional en *Geneland* y *Structure* y con el estadístico F_{ST} . Los valores F_{ST} muestran que la población LCA se diferencia significativamente de todas las demás con valores $0.81 < F_{ST} < 0.86$. Estos valores son mayores a los obtenidos en otros trabajos que analizan el estadístico F_{ST} entre subespecies propuestas: colibrí de orejas blancas *Hylocharis leucotis* ($F_{ST} < 0.52$; Zamudio-Beltrán 2011), *Picoides villosus* ($F_{ST} < 0.86$ para 6/7 subespecies; Klicka *et al.* 2011) y la tucaneta, *Aulacorhynchus prasinus* ($F_{ST} = 0.57$; Puebla-Olivares *et al.* 2008).

En *Structure* se observa que dos de los tres individuos analizados para la subpoblación de Nicaragua se agrupan en el clado Norte y el restante presenta el

haplotipo H_7, presente en cuatro localidades del clado LCA, es decir, Nicaragua es un área de hibridación entre los dos clados. Al igual en *Geneland* la subpoblación de Nicaragua es mostrada con valores intermedios de pertenencia al clado Norte, probablemente debido a la hibridación presente.

La Cordillera de Talamanca y la Depresión de Nicaragua parecen ser las principales barreras geográficas que delimitan los dos clados genéticos. Como lo indica el *SMD* las condiciones para la distribución de la especie no son propicias en la ladera Este de la cordillera ni en gran parte de Nicaragua. Otros estudios, realizados en aves de tierras altas, muestran también la importancia de la Depresión de Nicaragua como barrera vicariante en la conformación de la estructura genética de la avifauna neotropical (D'Horta *et al.* 2013) a nivel de poblaciones: *Lepidocolapes affinis* (Arbeláez-Cortés *et al.* 2010) y *Aulacorhynchus prasinus* (Puebla-Olivares *et al.* 2008) y también en otros niveles de organización y de diferentes grupos de animales (Bagley y Johnson 2014). A pesar de esto, la población LCA mantiene flujo genético con la subpoblación delimitada en Nicaragua.

6.2. Divergencia de los clados

El SDM muestra que cada uno de los dos clados genéticos delimitados presenta un nicho ecológico diferente y también indica procesos que son respaldados por la evidencia genética. La proyección de la distribución potencial de los dos clados en los principales períodos de cambios ecológicos en el Pleistoceno - Holoceno predice áreas de estabilidad histórica para el clado LCA en Costa Rica, Panamá y una pequeña área en Colombia, que corresponde a la subespecie *H. f. erythrolaema*, y muestra que la disponibilidad de nicho ha sido más cambiante en el tiempo para el clado Norte, donde sólo se recuperan dos pequeñas áreas probables de estabilidad histórica. Este clado parece haber experimentado a lo largo de su historia evolutiva eventos de expansión y contracción de rango, que pueden estar acompañados de expansiones poblacionales y cuellos de botella (Harvey y Brumfield 2014), aunque los valores de diversidad genética no consistentes con áreas funcionando como refugios y áreas colonizadas en tiempos postglaciales (Hewitt 2000, Troy *et al.* 2001), lo cual puede ocurrir en poblaciones que atraviesan por una expansión de rango pero mantienen

altos niveles de flujo genético (Carnaval y Moritz 2008, He *et al.* 2010, Jezkova *et al.* 2015). De acuerdo a las ideas sobre los refugios Pleistocénicos, los eventos climáticos que ocurrieron en el Pleistoceno separaron muchas poblaciones que son consideradas conespecíficas, lo cual causó elevada diversificación filogeográfica intraespecífica (Ibrahim *et al.* 1996, Lovette 2005).

Sin embargo, los resultados del modelado de nicho ecológico deben ser tomados con precaución dado que no hay fósiles que permitan la reconstrucción de la paleodistribución con certeza (Moritz 2000) y que en el modelado se ignoraron factores bióticos y de vagilidad que pueden jugar un papel determinante en restringir o modificar la distribución realizada de la especie (Hewitt 1996, Carnaval *et al.* 2009).

Los clados parecen haber alcanzado la etapa de filogrupos, dado que el árbol mitocondrial presenta monofilia recíproca (Klicka y Zink 1999, Avise *et al.* 1987). Klicka y Zink (1999) identifican al filogrupo como una etapa evolutiva dentro del proceso de especiación a punto de alcanzar el nivel taxonómico de especie. De acuerdo a simulaciones computacionales que toman en cuenta el tamaño efectivo y el tiempo generacional, la etapa de filogrupos en *Oscines* es alcanzada en menos de 200,000 años tras la separación inicial de las poblaciones, pero continúan sin ser reconocidas como especies diferentes hasta 800,000 – 4.5 Ma después de la separación inicial (Klicka y Zink 1999). Por su parte, Avise y Walker (1998) encontraron que el 44 % de 63 especies de aves con origen en el Pleistoceno se habían dividido en filogrupos. Se espera que poblaciones aisladas en un refugio glacial sin migrantes, por el sorteo de linajes, presente clados discretos en 10,000 años para *mtDNA* al tener tamaño efectivo menor ($\frac{1}{4}$ parte) y tasas de cambio más rápidas respecto de genes nucleares (Stone *et al.* 2002, Kizirian y Donnelly 2004).

En cualquier caso los patrones filogenéticos encontrados no son consistentes con la hipótesis taxonómica de seis subespecies dentro del complejo *H. fuscicauda*, sino con dos filogrupos o subespecies. Pero es importante señalar que falta analizar ejemplares de la población colombiana (*H. f. erythrolaema*) que puede corresponder a un filogrupo diferente, puesto que se predice como un área históricamente estable para la especie en los cuatro tiempos modelados para el clado LCA.

7. Perspectivas

Los análisis mostrados sobre la filogenia y variación genética de la especie *Habia fuscicauda* abren la posibilidad de completar y complementar el estudio genético con la intención de dar una conclusión más contundente sobre el status taxonómico de dos clados genéticos presentes en el complejo *H. fuscicauda*.

Será importante obtener un muestreo de la zona de distribución perteneciente a la población colombiana, definida como *H. f. erythrolaema*. Además, completar el muestreo en las poblaciones de las Tierras Bajas de Centroamérica y Núcleo Centroamérica, de tal manera que sea posible evaluar los marcadores mitocondriales y los nucleares concatenados con un tamaño muestral más grande, con la finalidad de robustecer los resultados.

Complementar el estudio genético con análisis de morfología para establecer si se corresponden o no y determinar si realmente la morfología soporta de manera contundente la hipótesis taxonómica de seis o la de dos subespecies.

8. Conclusiones

Dentro del complejo *H. fuscicauda* se pueden reconocer dos grupos genéticos con correspondencia geográfica definida: por un lado el clado Norte, con correspondencia geográfica a las zonas de distribución que comprenden desde SLP, el Istmo de Tehuantepec y la zona Núcleo Centroamérica hasta Nicaragua; y por otro el clado LCA que comprende las regiones de Costa Rica y Panamá.

La filogenia encontrada con cuatro marcadores moleculares no es coincidente con la hipótesis taxonómica de seis subespecies dentro del complejo *H. fuscicauda*, aun en espera de incluir en el análisis la población colombiana.

La Cordillera de Talamanca junto con la Depresión de Nicaragua parecen ser las barreras geográficas más evidentes que posiblemente están limitando el intercambio genético entre los dos clados delimitados. Aunque en Nicaragua también se tiene una zona de contacto entre los dos grupos genéticos, como evidencia el haplotipo que comparten.

No sólo las barreras físicas han moldeado la estructura genética de los clados, dentro de las poblaciones del clado Norte se encontraron procesos altamente coincidentes con una expansión de rango/demográfica asociada: el árbol filogenético no resuelto al interior y la ausencia de correlación espacial-genética, la red de haplotipos en patrón de estrella, la cuasi ausencia de estructura genética, los gráficos *mismatch* y *skyline* y los análisis de *SDM* son coincidentes con este patrón.

La población del Istmo, que se agrupan dentro del mismo clado de acuerdo a los árboles filogenéticos muestra una ligera diferenciación, pues la población mantiene haplotipos privados y compartidos entre localidades.

Los datos genéticos (gráficos *mismatch* y *skyline*) y los obtenidos con el *SDM* parecen coincidir en indicar estabilidad demográfica y de hábitat en la población LCA, aunque los resultados del *SDM* se deben tomar como indicativos no como definitivos en tanto que falta evidencia que sustente la paleodistribución de la especie.

El *SDM* también indica que actualmente los dos clados tienen tolerancia a diferentes condiciones climatológicas y estas diferencias pueden afectar de manera importante la limitación de su distribución.

9. Referencias

- Akaike, H. 1973. "Information theory and an extension of the maximum likelihood principle". In B. N. Petrov and F. Csaki (Eds.), Second international symposium on information theory (pp. 267-281). Budapest: Akademiai Kiado.
- Alfaro, Michael E. y Mark T. Holder. 2006. "The Posterior and the Prior in Bayesian Phylogenetics." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37(1): 19–42.
- Arbeláez-Cortés, Enrique, Arpád S Nyári y Adolfo G Navarro-Sigüenza. 2010. "The Differential Effect of Lowlands on the Phylogeographic Pattern of a Mesoamerican Montane Species (*Lepidocolaptes Affinis*, Aves: Furnariidae)." *Molecular phylogenetics and evolution* 57(2): 658–68.
- Arbogast, B. S., Edwards, S. V., Wakeley, J., Beerli, P., y Slowinski, J. B. (2002). Estimating Divergence Times From Molecular Data on Phylogenetic and Population Genetic Timescales. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33(1), 707–740.
- Arévalo E., Davis S. K. y Sites J. W. Jr. 1994. "Mitochondrial DNA sequence divergence and phylogenetic relationships among eight chromosome races of the *Sceloporus grammicus* complex (Phrynosomatidae) in central Mexico." *Systematic Biology* 43: 387- 418.
- Avise John. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. "Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics." *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522.
- Avise, J. C., y D. Walker. 1998. "Pleistocene Phylogeographic Effects on Avian Populations and the Speciation Process." *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 265: 457–63.
- Avise, John C. 2009. "Phylogeography: Retrospect and Prospect." *Journal of Biogeography* 36: 3–15.
- Bagley, Justin C., y Jerald B. Johnson. 2014. "Phylogeography and Biogeography of the Lower Central American Neotropics: Diversification between Two Continents and between Two Seas." *Biological Reviews*: 767–90.
- Bandelt, H., P. Forster y A. Rohl. 1999. "Median joining networks for inferring intraspecific phylogenies." *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- Ball, R. M., Freeman, S., James, F. C., Bermingham, E., y Avise, J. C. 1988. "Phylogeographic population structure of Red-winged Blackbirds assessed by mitochondrial DNA". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(5), 1558–1562.
- Ball, R. M., y J. C. Avise. 1992. "Mitochondrial-Dna Phylogeographic Differentiation Among Avian Populations and the Evolutionary Significance of Subspecies." *The auk* 109: 626–36.
- Barker, F. Keith, Arion J. Vandergon y Scott M. Lanyon. 2008. "Assessment of Species Limits Among Yellow-Breasted Meadowlarks (*Sturnella* Spp.) Using Mitochondrial and Sex-Linked Markers." *The Auk* 125(4): 869–79.

- Battistuzzi, F. U., Filipowski, A., Hedges, S. B., & Kumar, S. 2010. Performance of Relaxed-Clock Methods in Estimating Evolutionary Divergence Times and Their Credibility Intervals Research article, 27(6), 1289–1300.
- Burns, Kevin J. 1998. "Molecular Phylogenetics of the Genus *Piranga*: Implications for Biogeography and the Evolution of Morphology and Behavior." *The Auk* 115: 621–34.
- Burney, Curtis Wade. 2009. "Comparative Phylogeography of Neotropical Birds." Tesis Doctoral. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, *Department of Biological Sciences*.
- Carnaval, Ana Carolina, Michael J. Hickerson, Célio F. B. Haddad, Miguel T. Rodrigues y Craig Moritz. 2009. "Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot." *Science* 323: 785–89.
- Carnaval, Ana Carolina y Craig Moritz. 2008. "Historical Climate Modelling Predicts Patterns of Current Biodiversity in the Brazilian Atlantic Forest." *Journal of Biogeography* 35: 1187–1201.
- Chan, Lauren M., Jason L. Brown y Anne D. Yoder. 2011. "Integrating Statistical Genetic and Geospatial Methods Brings New Power to Phylogeography." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 523–37.
- Cheviron, Z., Shannon J. Hackett y Angelo P. Capparella. 2005. "Complex Evolutionary History of a Neotropical Lowland Forest Bird (*Lepidothrix Coronata*) and Its Implications for Historical Hypotheses of the Origin of Neotropical Avian Diversity." *Molecular phylogenetics and evolution* 36(2): 338–57.
- De Queiroz, Kevin y Michael J. Donoghue. 1990. "Phylogenetic systematics and species revisited." *Cladistics*. 6:83-90.
- Del Hoyo, J., Elliott, A. y Christie, D. A. 2011. Handbook of birds of the world. Vol. 16., Tanagers to New World Blackbirds. Lynx Editions, Barcelona.
- D'Horta, Fernando M., Andrés M. Cuervo, Camila C. Ribas, Robb T. Brumfield y Cristina Y. Miyaki. 2013. "Phylogeny and Comparative Phylogeography of *Sclerurus* (Aves: Furnariidae) Reveal Constant and Cryptic Diversification in an Old Radiation of Rain Forest Understorey Specialists." *Journal of Biogeography* 40(1): 37–49.
- Drummond A. J., Suchard M. A., Xie D. y Rambaut A. 2012. "Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7" *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-1973.
- Dwight J. y L. Griscom. 1924. "Descriptions of new birds from Costa Rica." *American Museum Novitates* 142: 1-5.
- Eastman, Jonathan, Alfaro, Michael E., Joyce, P., Hipp, Andrew L., y Harmon, Luke J. 2011. "A Novel Comparative Method for Identifying Shifts in the Rate of Character Evolution on Trees." *Evolution; international journal of organic evolution* 65(12): 3578–89.
- Edwards, S. V., y P. Beerli. 2000. "Perspective: Gene Divergence, Population Divergence, and the Variance in Coalescence Time in Phylogeographic Studies." *Evolution; international journal of organic evolution* 54(6): 1839–54.
- Edwards, Scott V. 2009. "Is a New and General Theory of Molecular Systematics

- Emerging?" *Evolution; international journal of organic evolution* 63: 1–19.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. "Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis." *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47- 50.
- Excoffier, Laurent, Matthieu Foll y Rémy J. Petit. 2009. "Genetic Consequences of Range Expansions." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40(1): 481–501.
- Farris, J. S. 1989. The retention index and the rescaled consistency index. *Cladistics* 5: 417–419.
- Felsenstein, J. 1981. "Evolutionary Trees from DNA Sequences: A Maximum Likelihood Approach." *Journal of molecular evolution* 17(6): 368–76.
- Gowri-Shankar, Vivek y Magnus Rattray. 2007. "A Reversible Jump Method for Bayesian Phylogenetic Inference with a Nonhomogeneous Substitution Model." *Molecular biology and evolution* 24(6): 1286–99.
- Guillot, F. Mortier y A., Estoup. 2005. "Geneland: A computer package for landscape genetics." *Molecular Ecology Notes* 5(3):708-711.
- Guillot, Gilles y François Rousset. 2013. "Dismantling the Mantel Tests." *Methods in Ecology and Evolution* 4(4): 336–44.
- Haffer, J. 1969. "Speciation in Amazonian forest birds." *Science* 165:131–37
- Harpending, R. C. 1994. "Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution." *Hum. Biol.* 66: 591-600.
- Harvey, M. G., y R. T. Brumfield. 2014. "Genomic Variation in a Widespread Neotropical Bird (*Xenops Minutus*) Reveals Divergence, Population Expansion, and Gene Flow." *arXiv preprint arXiv:1405.6571* 087(225).
- He, Lijun, Aibing Zhang, David Weese, Chaodong Zhu, Chaojun Jiang, Zhenguo Qiao. 2010. "Late Pleistocene Population Expansion of *Scylla Paramamosain* along the Coast of China: A Population Dynamic Response to the Last Interglacial Sea Level Highstand." *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 385(1-2): 20–28.
- Hewitt, Godfrey M. 2000. "The Genetic Legacy of the Quaternary Ice Ages. *Nature* 405, 907–913"
- Hewitt, Godfrey M. 1996. "Some Genetic Consequences of Ice Ages , and Their Role , in Divergence and Speciation." *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247–276.
- Hickerson, M. J. *et al.* 2010. "Phylogeography's Past, Present, and Future: 10 Years after Avise, 2000." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291–301.
- Hijmans R. J., Cameron S. E., Parra J. L., Jones P. G., y Jarvis A. 2005. "Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas." *International Journal of Climatology* 25:1965–1978.
- Holder, Mark y Paul O. Lewis. 2003. "Phylogeny Estimation: Traditional and Bayesian Approaches." *Nature reviews. Genetics* 4: 275–84.
- Hutchinson, George Evelyn. 1965. *The ecological theater and the evolutionary play*. New Haven: Yale University press.
- Huelsenbeck, John P., Bret Larget, Richard E. Miller y Fredrik Ronquist. 2002. "Potential Applications and Pitfalls of Bayesian Inference of Phylogeny." *Systematic biology*

51(5): 673–88.

- Ibrahim, Kamal M., Richard A. Nichols y Godfrey M. Hewitt. 1996. "Spatial Patterns of Genetic Variation Generated by Different Forms of Dispersal during Range Expansion." 77(November 1995): 282–91.
- Jackson, J. C. B., Budd, A. F., y Coates, A. G. (eds) 1996. *Evolution and Environment in Tropical America*. University of Chicago Press, Chicago. 436 pág.
- Jetz, W., Thomas, G. H., Joy, J. B., Hartmann, K., y Mooers, A. O. 2012. "The global diversity of birds in space and time." *Nature* 491(7424), 444-448.
- Jezkova, Tereza, Brett R. Riddle, Daren C. Card, Drew R. Schield, Mallory E. Eckstut y Todd A. Castoe. 2015. "Genetic Consequences of Postglacial Range Expansion in Two Codistributed Rodents (genus *Dipodomys*) Depend on Ecology and Genetic Locus." *Molecular Ecology* 24(1): 83–97.
- Kearns, Anna M., Leo Joseph, Kevin E. Omland, and Lyn G. Cook. 2011. "Testing the Effect of Transient Plio-Pleistocene Barriers in Monsoonal Australo-Papua: Did Mangrove Habitats Maintain Genetic Connectivity in the Black Butcherbird?" *Molecular Ecology* 20: 5042–59.
- Kelchner, Scot A. y Michael A. Thomas. 2007. "Model Use in Phylogenetics: Nine Key Questions." *Trends in Ecology and Evolution* 22: 87–94.
- Kizirian, David y Maureen A. Donnelly. 2004. "The Criterion of Reciprocal Monophyly and Classification of Nested Diversity at the Species Level." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32: 1072–76.
- Klicka, John, Garth Spellman, Kevin Winker, Vivien Chua y Brian T. Smith. 2011. "A Phylogeographic and Population Genetic Analysis of a Widespread, Sedentary North American Bird: The Hairy Woodpecker (*Picoides villosus*)." *The Auk* 128(2): 346–62.
- Klicka, J., y R. M. Zink. 1999. "Pleistocene Effects on North American Songbird Evolution." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 266: 695.
- Klicka, John, Kevin Burns y Garth M. Spellman. 2007. "Defining a Monophyletic Cardinalini: A Molecular Perspective." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 1014–32.
- Kohlmann, B. y G. Halffter. 1988. "Cladistic and biogeographical analysis of *Ateuchus* (Coleoptera: Scarabaeidae) of Mexico and the United States." *Folia Entomológica Mexicana* 74:109- 130.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., y Mayrose, I. 2015. "Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K". *Molecular Ecology Resources*, 1179–1191.
- Kumar, Sudhir y Filipinski, Alan. 2008. "Molecular Phylogeny Reconstruction". In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester 1–6.
- Librado, P., y Rozas, J. 2009. "DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data." *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Li, W. H., y L. A. Sadler. 1991. "Low nucleotide diversity in man." *Genetics* 129(2): 513-523.

- Li, Wai Lok Sibon y Alexei J. Drummond. 2012. "Model Averaging and Bayes Factor Calculation of Relaxed Molecular Clocks in Bayesian Phylogenetics." *Molecular biology and evolution* 29(2): 751–61.
- Liu, Jin-Xian, Tian-Xiang Gao, Koji Yokogawa y Ya-Ping Zhang. 2006. "Differential Population Structuring and Demographic History of Two Closely Related Fish Species, Japanese Sea Bass (*Lateolabrax Japonicus*) and Spotted Sea Bass (*Lateolabrax Maculatus*) in Northwestern Pacific." *Molecular phylogenetics and evolution* 39(3): 799–811.
- Lovette, Irby J. 2005. "Glacial Cycles and the Tempo of Avian Speciation." *Trends in Ecology and Evolution* 20(2): 57–59.
- Marshall, C. y J. Liebherr. 2000. "Cladistic biogeography of the Mexican Transition Zone." *Journal of Biogeography* 27:203- 216.
- Martins, Felipe M. *et al.* 2009. "Phylogeography of the Common Vampire Bat (*Desmodus Rotundus*): Marked Population Structure, Neotropical Pleistocene Vicariance and Incongruence between Nuclear and mtDNA Markers." *BMC evolutionary biology* 9: 294.
- Melnick, Don J. y Guy A. Hoelzer. 2005. "What Is mtDNA Good for in the Study of Primate Evolution?" *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews* 2(1): 2–10.
- Miguez-Gutiérrez, Alejandra, Jesús Castillo, Juan Márquez e Irene Goyenechea. 2013. "Biogeografía de La Zona de Transición Mexicana Con Base En Un Análisis de Árboles Reconciliados." *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84(1): 215–24.
- Moritz, C., J. L. Patton, C. J. Schneider y T. B. Smith. 2000. "Diversification of rainforest faunas: An Integrated Molecular Approach." *Annual Review of Ecology and Systematics* 31(1): 533–63.
- Morrone, J. J. 2004. "Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición." *Revista Brasileira de Entomologia* 48:149-162.
- Mulcahy, Daniel G., Benson H. Morrill y Joseph R. Mendelson. 2006. "Historical Biogeography of Lowland Species of Toads (*Bufo*) across the Trans-Mexican Neovolcanic Belt and the Isthmus of Tehuantepec." *Journal of Biogeography* 33(11): 1889–1904.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nichols, Richard. 2001. "Gene Trees and Species Trees Are Not the Same." *Trends in Ecology & Evolution* 16: 358–64.
- Nixon, K. C. y Carpenter J. M. 2012. "On Homology." *Cladistics*, 28: 160–69.
- Núñez-Farfán, Juan, Sonia Careaga, Juan Fornoni, Lorena Ruiz-Montoya, Pedro Valverde. 2003. "La evolución de la plasticidad fenotípica". *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 6(1):16-24.
- Oberholser, H. C., 1922. "*Phoenicotheraps* Cabanis becomes *Habia* Blyth." *Proceedings of the biological society of Washington*. 35, 79-80.
- O'Meara, Brian C. 2012. "Evolutionary Inferences from Phylogenies: A Review of Methods." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43(1): 267–85.
- Pacheco, M. Andreina, Fabia U. Battistuzzi, Miguel Lentino, Roberto F. Aguilar, Sudhir

- Kumar y Ananias A. Escalante. 2011. "Evolution of Modern Birds Revealed by Mitogenomics: Timing the Radiation and Origin of Major Orders" *Mol. Biol. Evol.* 28(6): 1927–42.
- Pattengale, N. D., Alipour, M., Bininda-Emonds, O.R.P., Moret, B.M.E., y Stamatakis, A. 2010. How many bootstrap replicates are necessary? *J. Comput. Biol.* 17:337-354.
- Peter G. Foster . 2009. "Maximum Likelihood and Bayesian Analysis in Molecular Phylogenetics". Natural History Museum, London.
- Phillips S. J., Dudik M, Schapire R. E. 2004. "A maximum entropy approach to species distribution modeling." In: Proceedings of the Twenty-First International Conference on Machine Learning, pp. 655–662. ACM, New York, NY, USA, Banff, Alberta, Canada.
- Posada, D., y Crandall, K. A. 1998. "Modeltest: testing the model of dna substitution." *Bioinformatics* 14(9):817-818.
- Pritchard, J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. "Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data." *Genetics* 155(2): 945–59.
- Pritchard, Jonathan K. 2010. "Documentation for Structure Software : Version 2 . 3." *Practice* 6(3): 321–26.
- Puebla-Olivares, F., E. Bonaccorso, A. Espinosa de los Monteros, K. E. Omland, J. E. Llorente-Bousquets, A. T. Peterson, and A. G. Navarro-Sigüenza. 2007. "Speciation in the Emerald Toucanet (*Aulacorhynchus prasinus*) complex." *Auk* 125:39-50.
- Pulgarín-R, Paulo C., Brian T. Smith, Robert W. Bryson Jr., Garth M. Spellman y John Klicka. 2013. "Multilocus Phylogeny and Biogeography of the New World Pheucticus Grosbeaks (Aves: Cardinalidae)." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(3): 122–1227.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raes, N., y ter Steege, H. 2007. "A null-model for significance testing of presence-only species distribution models." *Ecography* 30: 727–736
- Ray, N., M. Currat y L. Excoffier. 2003. "Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations." *Molecular Biology and Evolution* 20(1): 76–86.
- Rokas, Antonis. 2001. "Current Protocols in Molecular Biology" eds. Frederick M. Ausubel *et al.* : 1–14.
- Rambaut A., Suchard M. A., Xie D. y Drummond A. J. 2014. Tracer v1.6, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rambaut, A., y Drummond, A.J., 2012. TreeAnnotator v1.8.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Department of Computer Science, University of Auckland Available as part of the BEAST package.
- Ronquist, F., y Huelsenbeck, J. P. 2003. "Mrbayes 3: Bayesian Phylogenetic Inference under mixed models." *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Sanderson, Michael J. y H. Bradley Shaffer. 2002. "Troubleshooting m olecular." *Annu. Rev.*

- Ecol. Syst.* 33: 49–72.
- Schwartz, Jeffrey H. y Maresca, B. 2006. "Do Molecular Clocks Run at All? A Critique of Molecular Systematics." *Biological theory* 1(4): 357–71.
- Sequencher® version 4.8 sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA.
- Silvestro, D., y Michalak, I. 2011. "RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML." *Organisms Diversity and Evolution* 12:335-337
- Slatkin, M. 1993. "Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations." *Evolution* 47: 264–279.
- Slatkin, M. 1991. "Inbreeding coefficients and coalescence times." *Genet. Res. Camb.* 58: 167-175.
- Slatkin, M., y R. R. Hudson. 1991. "Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations." *Genetics* 129:555-562
- Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T. y Mindell, D. P. 1999. "Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and others vertebrates." *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12:105-114.
- Stamatakis, Alexandros. 2015. "The RAxML v8 . 1 . x Manual." 1–60.
- Stone, G., R. Atkinson y G. Brown. 2002. "The Population Genetic Consequences of Range Expansion: A Review of Pattern and Process, and the Value of Oak Gallwasps as a Model System." *Biodiversity* 10(1): 80–97.
- Swofford, D. L. 1991. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 3.1. Computer program distributed by the Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Swofford, D. L. 2002. "PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and Others Methods). Versión 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F., 1989a. "Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism." *Genetics* 123: 585–595.
- Tajima, F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology. Edited by Takahata, N. and Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA: Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59.
- Tavare, S. 1986. "Some Probabilistic and Statistical Problems in the Analysis of DNA Sequences." *American Mathematical Society: Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57–86.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In D. Otte and J. A. Endler (eds.). Speciation and Its Consequences. Sunderland, Mass.: Sinauer, pp. 3-27.
- Templeton, Alan R., Stephanie D. Maskas, and Mitchell B. Cruzan. 2000. "Gene Trees: A Powerful Tool for Exploring the Evolutionary Biology of Species and Speciation." *Plant Species Biology* 15: 211–22.
- Thompson, Julie D., Desmond G. Higgins y Toby J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving

- the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-4680.
- Troy, Christopher S, David E Machugh, and Jillian F Bailey. 2001. "Genetic Evidence for Near-Eastern Origins of European Cattle." *Nature* 410(6832): 1088–91.
- Vigilant, Linda y Brenda J. Bradley. 2004. "Genetic Variation in Gorillas." *American journal of primatology* 64(2): 161–72.
- Watterson, G.A. 1975. "On the number of segregating sites in genetical models without recombination." *Theo. Pop. Biol.* 256–276.
- Walker, Deette, William S. Nelson, Kurt A. Buhlmann y John C. Avise. 1997. "Mitochondrial DNA Phylogeography and Subspecies Issues in the Monotypic Freshwater Turtle *Sternotherus Odoratus*." *Copeia* 1997: 16–21.
- Wesley M. Brown, Matthew George, JR., y Allan C. Wilson. 1979. "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA". *Genetics.* 76:1967-1971.
- Whelan, Simon, Pietro Liò y Nick Goldman. 2001. "Molecular Phylogenetics: State-of-the-Art Methods for Looking into the Past." *Trends in Genetics* 17: 262–72.
- Wilkinson, Mark. 1995. "Majority-Rule Reduced Consensus Trees and Their Use in Bootstrapping." *Mol. Biol. Evol.* 13(3):437-444.
- Wilson, A. C., R. L. Cann, S. M. Carr, M. George, Jr., U. B. Gyllensten, K. M. Helm-Bychowski, R. G. Higuchi, S. R. Palumbi, E. M. Prager, R. D. Sage, and M. Stoneking. 1985. "Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics". *Biol. J. Linn. Soc.* 26:375-400.
- Williams, T.L. y Moret, B.M.E. 2003 An investigation of phylogenetic likelihood methods. Proceedings of 3rd IEEE International Symposium on Bioinformatics and Bioengineering (BIBE'03) , Bethesda, MD March 10–12.
- Witt, Christopher C. 2004. "Rates of Molecular Evolution and Application to Neotropical Avian Biogeography." Louisiana Sate University and Agricultural and Mechanical College, Department of Biological Sciences. 132 pág.
- Zamudio Beltrán, Luz Estela. 2011. "Filogenia Y Variación Dentro Del Complejo *Hylocharis Leucotis* Vieillot, 1818 (Aves: Trochilidae) Utilizando Secuencias de DNA." Tesis de Mestría. Facultad de Ciencias, UNAM. pág 86.
- Zuckerkindl E. y Pauling L. 1965. "Evolutionary divergence and convergence in proteins." *Evolving genes and proteins.* New York: Academic Press. p. 97–166.

8. Apéndice

Tabla AT1. Relación de tejidos de la especie *H. fuscicauda* con los que cuenta el Museo de Zoología de la facultad de ciencias “Alfonso L. Herrera” y que se amplificaron para alguno de los 4 marcadores empleados en este trabajo.

No. Catálogo	País	Estado/provincia	Localidad	ND 2	ND 4	ACOI 9	OD C	Latitud	Longitud
GES251			El Arroyo, 6 Km S Silvituc	x	x	x	x	- 90.2561111	18.5927777 8
MOL11 08			Nuevo Becal 4 km al Norte	x	x	x	x	- 89.2781167	18.5992333 3
MOL11 14			Nuevo Becal 4 km al Norte	x		x	-	- 89.2781167	18.5992333 3
CONACYT99-156			Tenabó a 7 Km W	x	x	x	x	- 90.3138889	20.1747222 2
CONACYT99-155			Tenabó a 7 Km W	x	x	x	x	- 90.3138889	20.1747222 2
MOL11 44			Nuevo Becal 4 km al Norte	x	x		x	- 89.2781167	18.5992333 3
B 1968			Calakmul, El Arroyo, 6 Km S Silvituc	x	x	x	x	-90.26	18.59
MOL11 13		Campeche	Nuevo Becal 4 km al Norte	x	x	x	x	- 89.2781167	18.5992333 3
Y408 069			Ejido Chulbac, La Sabana	x	-	-	-	-90.5773	19.7278833 3
Y408 077			Ejido El Pañuelo, El Mirador	x	-	-	-	- 90.3200333	18.0200666 7
Y408 112			Ejido El Pañuelo, El Mirador	x	-	-	-	- 90.3200333	18.0200666 7
Y408 076			Ejido El Pañuelo, El Mirador	x	-	-	-	- 90.3200333	18.0200666 7
Y408 158			Ejido El Pañuelo, El Mirador	x	-	-	-	- 90.3200333	18.0200666 7
Y408 102			Ejido El Pañuelo, El Mirador	x	-	-	-	- 90.3200333	18.0200666 7
CHIS 075		Chiapas	Pijijiapan, Rancho Lluvia de Oro 900 m NW de Ranchería las Guadalupe	x	-	-	-	-93.105	15.7449444 4

Yach 282		Porción norte de la Omega, Monumento Natural Yaxchilán	x	x	-	x	-	16.9016666
							90.9733333	7
CHIS 45		Pijijiapan, Rancho Lluvia de Oro 900 m NW de Ranchería las Guadalupe	x	x	-	x	-93.105	15.7449444
								4
CHIS 092		Pijijiapan, Rancho Lluvia de Oro 900 m NW de Ranchería las Guadalupe	x	-	-	-	-93.105	15.7449444
								4
CHIS 46		Pijijiapan, Rancho Lluvia de Oro 900 m NW de Ranchería las Guadalupe	x	-	-	-	-93.105	15.7449444
								4
RS 10		Rancho Las Conchitas	x	x	x	x	-92.596944	15.245
RS 09		Rancho Las Conchitas	x	x	-	x	-92.596944	15.245
CHIS 071		Pijijiapan, Rancho Lluvia de Oro 900 m NW de Ranchería las Guadalupe	x	-	-	-	-93.105	15.7449444
								4
YACH 351		Campamento Arqueológico INAH de Yaxchilán	x	-	-	-	-	16.9058333
							90.9827778	3
CHIMA 493		Chalchijapa, 2.3 km antes del pueblo en Galera	x	x	x	x	-	17.0066666
							94.6894444	7
NIZA 135	Oaxaca	Nizanda, El Naranjo	x	x	x	x	-95.0425	16.7924999
NIZA 23		Nizanda, El Naranjo	x	x	-	x	-95.0425	16.7924999
NIZA 19		Nizanda, El Naranjo	-	x	x	x	-95.0425	16.7924999
GES 164		Puerto Morelos, Jardín Botánico	x	-	-	-	-	20.8352777
							86.9005556	8
ADAB 96465		X-Hazil 3 Km S del cru..	x	-	-	-	-87.959722	19.2825
ADAB 96575		Felipe Carrillo Estación Santa	x	-	-	-	-88.026389	19.585278
ADAB 96465	Quintana Roo	X-Hazil 3 Km S	x	-	-	-	-87.959722	19.2825
GES 166	Méx.	Puerto Morelos, Jardín Botánico	x	-	-	-	-	20.8352777
							86.9005556	8
ADAB 96473		X-Hazil 3 Km S	x	x	x	x	-87.959722	19.2825
ADAB 95100		X-Hazil 3 Km S	x	-	-	-	-87.959722	19.2825
ADAB 96553		Felipe Carrillo Estación Santa	x	-	-	-	-88.026389	19.585278
ADAB 95370		Felipe Carrillo	x	x	x	x	-87.580556	19.818056
ADAB 96468		X-Hazil 3 Km S	x	x	x	x	-87.959722	19.2825
ADAB 95442		Felipe Carrillo	x	-	-	-	-87.580556	19.818056
B 0527		Puerto Morelos, Jardín Botánico	x	-	-	-	-	20.8352777
							86.9005556	8

ADAB 95239		Felipe Carrillo	x	x	x	x	-87.580556	19.818056
JCN 117		Ejido Camarones 1 km E	x	x	x	x	-99.18929	21.89059
JCN 111		Ejido Camarones 1 km E	x	x	x	x	-99.18929	21.89059
IALL 191		Camino a Tetlama	-	x	-	x	-	21.2540222
							98.6667028	2
IALL 190	SAN LUIS POTOSÍ	Camino a Tetlama	-	x	x	x	-	21.2540222
							98.6667028	2
MZFC04 271	TABASCO	Ejido Central Fournier, Laguna El Rosario, Rancho Las Melinas	x	x	x	x	-	17.8659833
							93.8726333	3
TAB 001		Ejido Central Fournier (Segunda Sección), Laguna El Rosario	x	x	x	x	-	17.8708333
							93.8833333	3
TAB 016		Ejido Central Fournier (Segunda Sección), Laguna El Rosario	x	-	-	-	-	17.8708333
							93.8833333	3
TAB 021		Ejido Central Fournier (Segunda Sección), Laguna El Rosario	x	-	-	-	-	17.8708333
							93.8833333	3
TAB 050		Ejido Central Fournier (Segunda Sección), Laguna El Rosario	x	-	-	-	-	17.8708333
							93.8833333	3
TAB 039		Ejido Central Fournier (Segunda Sección), Laguna El Rosario	x	-	-	-	-	17.8708333
							93.8833333	3
YUC13178	Yucatán	9.6 Km SE Acanceh, Municipio Acanceh, Yucatán	x	x	x	x	-89.39718	20.74431
OMVP 0664	OAXACA	Santa Ana del Progreso	x	x	x	x	-	16.82
							97.8883333	
B-35822*		Guapiles	-	x	-	x	-83.75	9.783333
B-16159*		Guapiles	x	-	-	-	-83.780645	10.216684
B-16277	Costa Rica	Limón	x	x	x	x	-83.780645	10.216684
B-16285*		Guapiles	x	-	-	-	-83.780645	10.216684
B-60649*		Copan Ruinas, 15 km ENE	x	-	-	-	-88.744722	15.73
B-60690*	Honduras	Depto. Copan	x	-	-	-	-88.744722	15.73
B-60856*		Copan Ruinas, 10 km ENE	x	-	-	-	-87.457222	15.764167
DAB1068*		La Luz	x	x	x	x	-84.852	13.702
DAB1119*	Nicaragua	La Luz	x	x	x	x	-84.852	13.702
DAB1245*		La Luz	x	x	x	x	-84.852	13.702
B-28701*		Chagres National Park (old boyscout camp)	x	x	x	-	-79.624153	9.034624

B-28739*	Pánama	Pánama	Chagres National Park (old boyscout camp)	x	-	-	-	-79.624153	9.034624
B-28740*			Chagres National Park (old boyscout camp)	x	x	x	x	-79.624153	9.034624

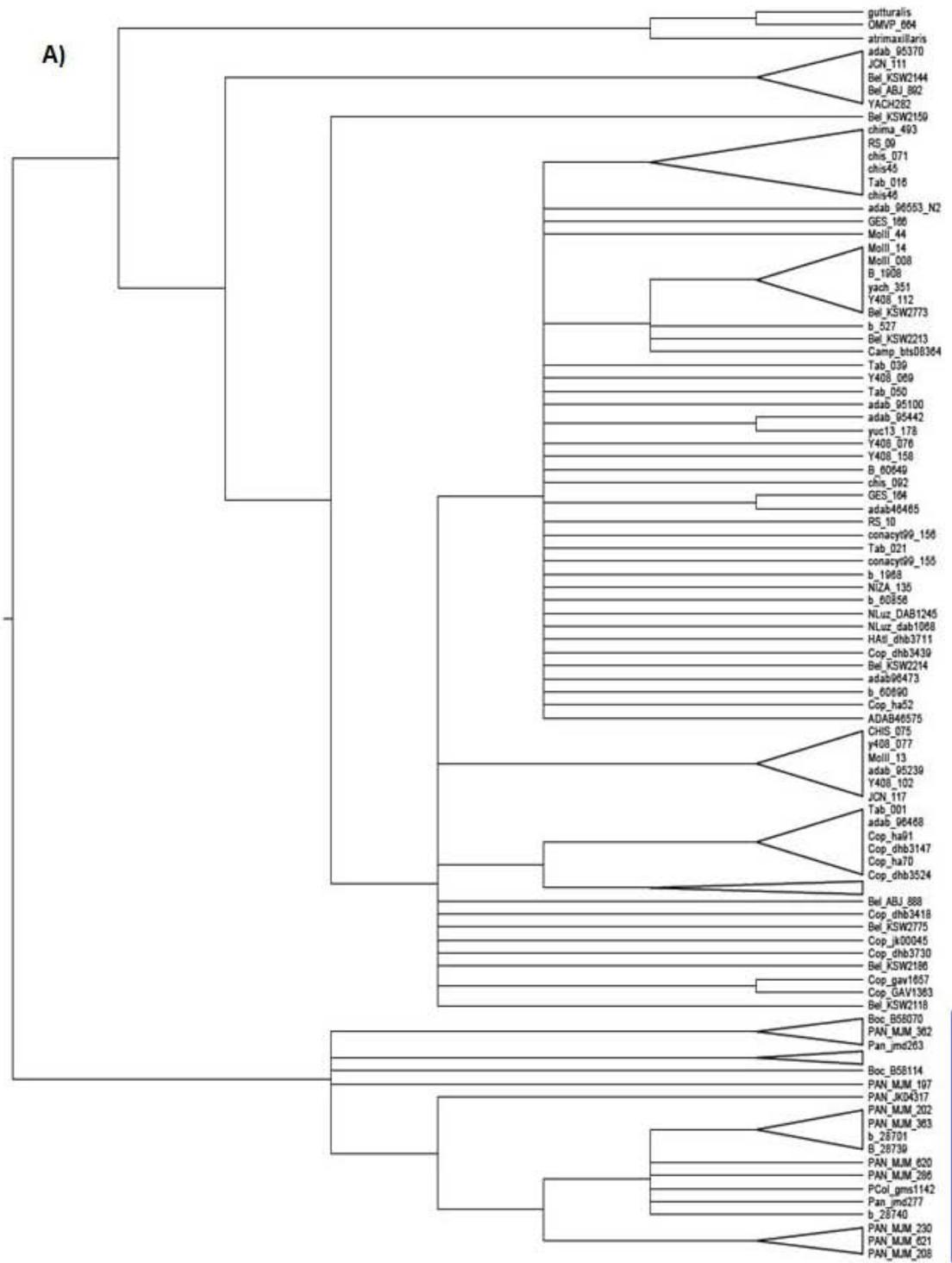
Tabla AT2. Secuencias solicitadas al Museum of Natural History and Culture.

Especie	Catálogo	País	Latitud	Longitud
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 8007/KSW2118		-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM8033_KSW2144		-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM8048/KSW2159		-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 8075/KSW2186		-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 9082/KSW2213	Belice	-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 9222/KSW2773		-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 9224/KSW2775		-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 9083/KSW2214		-88.8728	16.2633
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 18369/ABJ_888		-88.83	16.135
<i>Habia fuscicauda</i>	UAM 18369/ABJ_892		-88.83	16.135
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_ha52		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_ha91		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_ha70		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_dhb3524		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_gav1657		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_dhb3147	Honduras	-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_jk00045		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_dhb3730		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_dhb3439		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Copan_dhb3418		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	Atlan_dhb3711		-87.457222	15.764167
<i>Habia fuscicauda</i>	GAV1363		-89.05	14.86667
<i>Habia fuscicauda</i>	GLS 280		-94.87	18.23
<i>Habia fuscicauda</i>	MGL 106		-94.87	18.23
<i>Habia fuscicauda</i>	MGL 083		-94.87	18.23
<i>Habia fuscicauda</i>	GLS 256		-94.87	18.23
<i>Habia fuscicauda</i>	GLS 266		-94.87	18.23
<i>Habia fuscicauda</i>	TUX 1423		-95.079	18.5863
<i>Habia fuscicauda</i>	TUX 1418		-95.079	18.5863
<i>Habia fuscicauda</i>	PEP 2890	México	-95.21	18.45
<i>Habia fuscicauda</i>	FMNH 343367		-94.9	18
<i>Habia fuscicauda</i>	bts07 432		-99.07476	18.58412
<i>Habia fuscicauda</i>	bts07 433		-99.07476	18.58412
<i>Habia fuscicauda</i>	GLS 263		-94.87	18.23
<i>Habia fuscicauda</i>	TUX 1090		-95.079	18.5863
<i>Habia fuscicauda</i>	bts08-364		-90.6754	18.6413
<i>Habia fuscicauda</i>	bts07139		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	IJL04_105		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	JTW_226		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	B-58070		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	B-58086		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	B-58069		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	B-58082		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	B-58127		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	JK06_215		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	B-58114		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_2844		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_4247		-82.4016	9.2258
<i>Habia fuscicauda</i>	gms_1142		-80.01878	9.222532
<i>Habia fuscicauda</i>	jk 04 317	Panamá	-80.01878	9.222532
<i>Habia fuscicauda</i>	jmd 277		-79.5833	9.2516

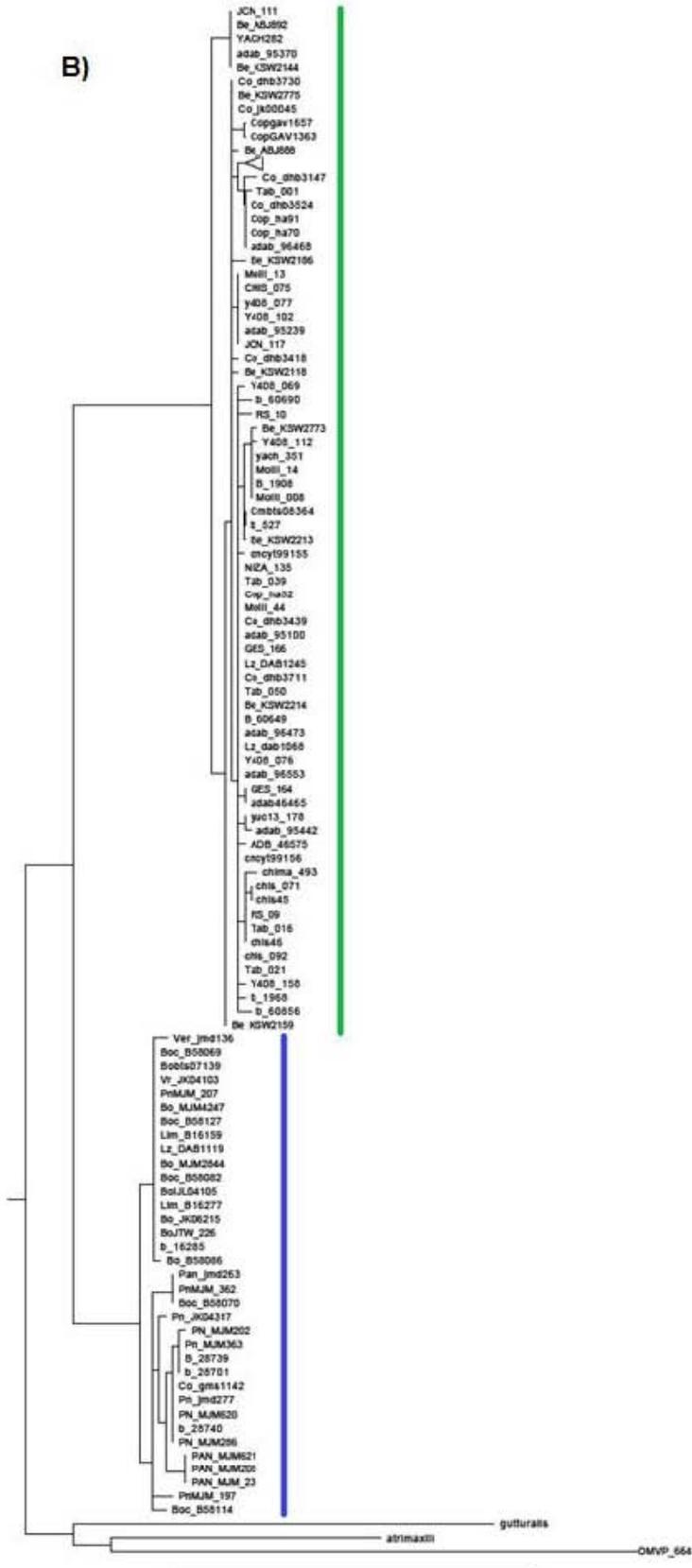
<i>Habia fuscicauda</i>	jmd 263		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	JK04103		-81.116667	8.5016
<i>Habia fuscicauda</i>	jmd136		-81.116667	8.5016
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_197		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_202		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_230		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_363		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_362		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_621		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_620		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_208		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_207		-79.5833	9.2516
<i>Habia fuscicauda</i>	MJM_286		-79.5833	9.2516
<i>Habia gutturalis</i>	PCPR089	Colombia	-	-
<i>Habia atrimaxillaris</i>	B16109	-	-	-

Tabla AT3. Primers con sus respectivas secuencias empleados para la amplificación de los cuatro genes empleados en este trabajo.

Gen	Primer	Secuencia
ND2	H6313	5'-CTC TTA TTT AAG GCT TTG AAG GC-3'
	L5219	5'-CCC ATA CCC CGA AAA TGA TG-3'
ND4	Leu	5'-CAT AAC TTT TAC TTG GAT TTG CAC-3'
	ND4	5'-CAC CTA TGA CTA CCA AAA GCT CA-3'
ACO1-i9	ACO1-I9F2	5'-CTC CTC TCA GGA TCC AGA T-3'
	ACO1-19R2	5'-CAA CTT TGT GGG GTC T-3'
ODC	ODC-2F	5'-GCG TGC AAA AGA ACT TGA CC-3'
	ODC-2R	5'-AGC CAC CAC CAA TAT CAA GC-3'



B)



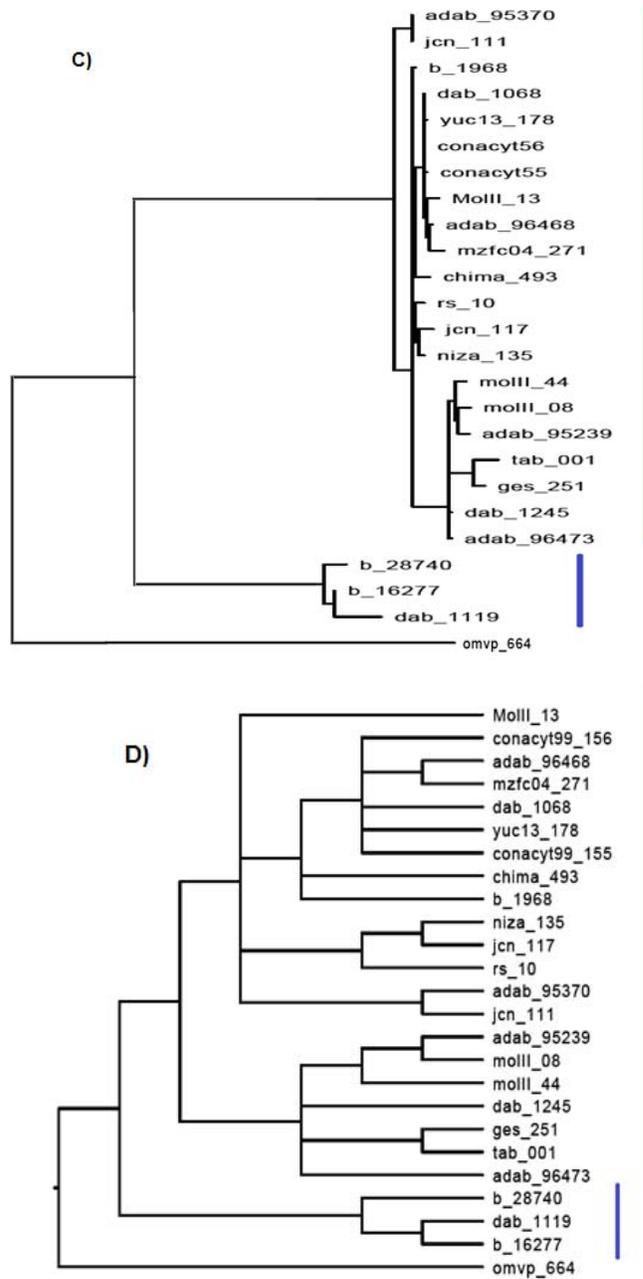


Figura AF1. Los diferentes árboles elaborados a partir de los tres métodos de reconstrucción filogenética empleados en este trabajo. A) Árbol ND2 de máxima parsimonia. B) Árbol ND2 de Máxima Verosimilitud. C) Árbol concatenado de Máxima Verosimilitud. D) Árbol concatenado de Máxima Parsimonia.