



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**“Variación genética de *Euphonia affinis* (Lesson, 1842) (Aves: Fringillidae)
utilizando genes mitocondriales y nucleares”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ALMA MELISA VÁZQUEZ LÓPEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Blanca Estela Hernández Baños
Facultad de Ciencias UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Juan José Morrone Lupi
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Servando Núñez Farfán
Instituto de Ecología, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx., JUNIO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

“Variación genética de *Euphonia affinis* (Lesson, 1842) (Aves: Fringillidae)

utilizando genes mitocondriales y nucleares”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓL. ALMA MELISA VÁZQUEZ LÓPEZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: Dra. Blanca Estela Hernández Baños
Facultad de Ciencias UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Juan José Morrone Lupi
Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Juan Servando Núñez Farfán
Instituto de Ecología, UNAM

México, Cd. Mx., Junio, 2016



OFICIO FCIE/DEP/258/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **30 de noviembre de 2015** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Evolutiva** del (la) alumno (a) **VÁZQUEZ LÓPEZ ALMA MELISA** con número de cuenta **406010948** con la tesis titulada "**Variación genética de *Euphonia affinis* (Lesson, 1842) (Aves: Fringillidae) utilizando genes mitocondriales y nucleares**", realizada bajo la dirección del (la) **DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS**:

Presidente: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Vocal: DRA. LIVIA SOCORRO LEÓN PANIAGUA
Secretario: DR. JUAN JOSÉ MORRONE LUPI
Suplente: DRA. ROSARIO MATA LÓPEZ
Suplente: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 9 de mayo de 2016



M del Coro Arizmendi Arriaga
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

MCAA/MJFM/ASR/grf*

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT por la beca otorgada durante los cuatro semestres correspondientes a la maestría.

Al proyecto PAPIIT IN-215614 por el financiamiento para el trabajo de laboratorio y de campo que hicieron posible realizar este proyecto.

A mi tutora la Dra. Blanca Estela Hernández Baños, gracias por su confianza, apoyo, revisiones y comentarios para la realización de este proyecto.

Al comité tutorial el Dr. Juan José Morrone Lupi y el Dr. Juan Servando Núñez Farfán, por sus revisiones, comentarios y observaciones a lo largo de este proyecto.

Al Jurado de examen Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, Dr. Juan José Morrone Lupi, Dra. Livia Socorro León Paniagua, Dra. Rosario Mata Robles y Dr. Juan Servando Núñez Farfán por sus comentarios y observaciones fundamentales para mejorar el manuscrito final.

Al Biól. Alejandro Gordillo Martínez, por el apoyo técnico otorgado, comentarios y observaciones al proyecto.

A la M. en C. Fabiola Ramírez Corona por el apoyo técnico en el trabajo de laboratorio.

A los académicos y alumnos del Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, UNAM.

A las colecciones científicas: Moore Laboratory Zoology, American Museum of Natural History, Louisiana Museum of Natural History, Academy of Natural Sciences Philadelphia, Museum of Comparative Zoology, Delaware Museum of Natural History, Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias UNAM y la Colección Nacional de Aves del Instituto de Biología, UNAM, por el préstamo de ejemplares taxidermizados.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis padres Uriel y Lulú por darme la vida, por cuidarme y buscar lo mejor para mí. Gracias por amar a su familia, por ser responsables y cariñosos, por enfrentar cualquier situación con valentía y nunca darse por vencidos. Gracias mamá por tu amor y apoyo infinito, por enseñarme a cuidar lo que se ama y a no detenerme en la lucha profesional sin importar los obstáculos. Papá gracias por todo tu amor, por dejarme miles de buenos recuerdos y heredarme la mejor guía: tu ejemplo de trabajo, superación y amor. A los dos gracias por enseñarme como se construye una familia.

A mis hermanos Rita, Uriel y Óscar, gracias por su cariño, por ser mis amigos y cómplices, por apoyarme durante la realización de este proyecto y durante toda mi vida. Los quiero mucho y son una parte esencial en mí. A Uriel y su hermosa familia.

A mis abuelos: Lulú y Justino, Elvira y David. A mis abuelas por ser un ejemplo de fortaleza. Abuelita Lulú gracias por todo tu amor, por contagiarme con tu alegría y buenos deseos, eres muy importante en mi vida.

A mis tíos Jorge, Edith, Leticia y primos gracias por acompañarme siempre, los quiero mucho.

A toda mi familia por estar siempre ahí, en los momentos de alegría, pero también en los momentos de dificultades y tristezas, sin duda todo es mejor en su compañía.

A Rubén, gracias amor por tu cariño, tus enseñanzas, por ser mi confidente y mi cómplice. También quiero agradecerte por compartir tus días, tus planes e inquietudes conmigo, por hacerme parte de tu vida y de tu familia, a tu lado los momentos buenos son mejores y los malos son más fáciles de afrontar. Te amo.

A la Doctora Blanca, gracias por creer en mí para formar parte de su equipo de trabajo, por apoyarme desde el momento en que llegué al Museo de Zoología, por compartirme su experiencia y conocimiento en cuestiones académicas y en el ámbito personal, en pocas palabras gracias también por su amistad.

A mis compañeros y amigos Museo de Zoología he aprendido mucho de ustedes al verlos siempre esforzarse para cumplir sus metas: Jesús Santiago, Marisol, Neto, Vicente, Alondra, Tania, y Luz. A Said, Marisol, Anuar, Neto, Jesús Santiago y Luz por su apoyo en el trabajo de campo.

Al Museo de Zoología, a la Facultad de Ciencias y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mis amigos y biólogos consentidos Jaime, Xarini, Wendy, Gisel, Yolanda, Zitlali e Irina, quiero agradecerles su amistad y ejemplo, han sido una fuente de inspiración para mí. Gracias también por los buenos momentos por todas las risas, bailes, charlas, música y diversión.

También quiero agradecer a las personas que he conocido a lo largo de la maestría, tanto profesores como compañeros, he aprendido mucho de ustedes.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS -----	1
RESUMEN -----	2
ABSTRACT -----	3
I. INTRODUCCIÓN -----	4
1.1 FAMILIA FRINGILLIDAE Y GÉNERO <i>EUPHONIA</i> -----	7
1.2 GENERALIDADES DE <i>EUPHONIA AFFINIS</i> (LESSON 1849) -----	11
1.3 OBJETIVOS -----	13
1.3.1 GENERAL -----	13
1.3.2 PARTICULARES -----	13
II. MÉTODO -----	14
2.1 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS GENÉTICOS -----	14
2.1.1 Obtención de muestras y trabajo de laboratorio. -----	14
2.1.2 Análisis de secuencias -----	18
2.1.2.1 Análisis filogenéticos -----	18
2.1.2.2 Tiempos de divergencia -----	19
2.1.2.3 Estructura y variación genética -----	20
2.2 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS MORFOMÉTRICOS -----	21
2.2.1 Obtención de datos morfométricos -----	21
2.2.2 Análisis de datos morfométricos -----	22
2.3 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS -----	24
2.3.1 Modelado de Nicho Ecológico actual y paleodistribuciones -----	24
2.3.2 Similitud y superposición de nicho ecológico -----	25
III. RESULTADOS -----	27
3.1 DATOS GENÉTICOS -----	27
3.1.2 Análisis filogenéticos -----	28
3.1.3 Tiempos de divergencia -----	31
3.1.4 Estructura y variación genética -----	33
3.2 DATOS MORFOMÉTRICOS -----	35
3.3 MODELADO DE NICHOS ECOLÓGICOS -----	44
3.3.1 Modelado de Nicho Ecológico actual y paleodistribuciones -----	44
3.3.2 Superposición de Nicho Ecológico -----	46
IV. DISCUSIÓN -----	52
4.1 RELACIONES FILOGENÉTICAS -----	53
4.2 HISTORIA BIOGEOGRÁFICA -----	54
4.3 VARIACIÓN MORFOLÓGICA -----	57
4.4 SIMILITUD DE NICHOS ECOLÓGICOS -----	59
V. CONCLUSIONES -----	61
VI. LITERATURA CITADA -----	62

VI. APÉNDICES	74
APÉNDICE I.	74
APÉNDICE 2.	79
APÉNDICE 3	81

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Euphonia affinis</i> _____	7
Figura 2. Morfotipos para <i>Euphonia affinis</i> _____	13
Figura 3. Localidades de <i>Euphonia affinis</i> (tejidos) _____	14
Figura 4. Localidades <i>Euphonia affinis</i> (Piel) _____	22
Figura 5. Filogenia reconstruida, para genes concatenados y particionada, por el método de Inferencia Bayesiana _____	30
Figura 6. Tiempos de divergencia _____	32
Figura 7. Redes de haplotipos _____	34
Figura 8. Intervalo de confianza del 95% de la media para machos (Logaritmo Natural) en <i>E. a. affinis</i> y <i>E. a. godmani</i> _____	36
Figura 9. Intervalo de confianza del 95% de la media para hembras (Logaritmo Natural) en <i>E. a. affinis</i> y <i>E. a. godmani</i> _____	37
Figura 11 Gráficos de Análisis de Componentes Principales para Machos _____	40
Figura 12 Gráficos de Análisis de Componentes Principales para Hembras _____	42
Figura 13. Distribuciones geográficas obtenidas por medio de Modelo de Nicho Ecológico _____	45
Figura 14. Paleodistribuciones obtenidas por la proyección de Nicho Ecológico para <i>E. a. affinis</i> y <i>E. a. godmani</i> _____	46
Figura 15. Distribución de casos en el espacio ambiental, generado por los tres componentes con mayor porcentaje de variación _____	47
Figura 16. Prueba de identidad de Nicho Ecológico _____	50
Figura 17. Prueba de fondo _____	51
Cuadro 1. Grupos filogenéticos dentro del género <i>Euphonia</i> _____	9
Cuadro 2. Localidades para <i>E. affinis</i> y grupo externo _____	14
Cuadro 3. <i>Primers</i> utilizados en este estudio _____	17
Cuadro 4. Secuencias obtenidas del GENBANK para complementar el grupo externo utilizado en este estudio _____	19
Cuadro 5. Porcentaje de composición nucleotídica por gen y sitios polimórficos _____	27
Cuadro 6. Distancias genéticas pareadas por gen para las especies bajo estudio _____	29
Cuadro 7. Tiempo de divergencia obtenidos en BEAST v1.8 _____	31
Cuadro 8. Valores de diversidad para cada gen _____	34
Cuadro 10. ANOVA de los datos obtenidos para machos para comparar <i>E. a. affinis</i> y <i>E. a. godmani</i> _____	38
Cuadro 11. ANOVA de los datos obtenidos para hembras para comparar <i>E. a. affinis</i> y <i>E. a. godmani</i> _____	38
Cuadro 12. Valores de Eigenvectores para el Análisis de Componentes (Machos) _____	40
Cuadro 13. Valores de Eigenvectores para el Análisis de Componentes (Hembras) _____	40
Cuadro 14. Valores de Eigenvectores (APC) _____	48
Cuadro 15. Estadísticos descriptivos para las variables ambientales con mayor importancia de acuerdo al Análisis de Componentes Principales _____	48

RESUMEN

Actualmente la integración de información genética, morfológica y ecológica en el análisis de límites de especie ha ido en aumento, lo que permite delimitar una especie de acuerdo a la historia evolutiva de los grupos biológicos. En este sentido este trabajo tuvo como objetivo reconocer los linajes evolutivos independientes dentro de *Euphonia affinis* en tres niveles genético, morfológico y ecológico. *E. affinis* habita las tierras bajas de la Vertiente del Pacífico de México hasta Costa Rica y la Vertiente del Golfo de México, se han descrito tres subespecies: *E. a. godmani* distribuida en el oeste de México desde el Sur de Sonora hasta el centro de Guerrero, *E. a. affinis* de Oaxaca, Chiapas y la Península de Yucatán hasta Centroamérica y *E. a. olmecorum* en la Costa del Golfo de México del Sur de Tamaulipas y Este de San Luis Potosí hasta el norte y sur de Chiapas. Las subespecies *E. a. affinis* y *E. a. olmecorum* han sido consideradas como un grupo polifilético por algunos autores. El análisis multilocus se realizó con los genes ND2, ODC, GAPDH, MUSK y BRM de 23 individuos de *E. affinis*, 19 pertenecen a la distribución del Este de México y Centroamérica y cuatro individuos distribuidos en el oeste de México. Las filogenias obtenidas para los genes ND2, ODC y MUSK y genes concatenados muestran monofilia recíproca para dos clados dentro de *E. affinis*: uno compuesto por los individuos del oeste de México y otro por los individuos del este de México y Centroamérica. Las redes de haplotipos, valores de Fst y distancias genéticas de dichos genes también aportan evidencia de la divergencia entre los individuos del Este de México y Centroamérica y los individuos distribuidos en el Oeste de México. Sin embargo, no se cuenta con información del centro de la vertiente del Pacífico (Guerrero y Oaxaca), por lo que es necesario complementar dicho muestreo. De acuerdo a los tiempos de divergencia la separación entre los linajes del oeste de México (*E. a. godmani*) y del Este de México y Centroamérica (*E. a. affinis*) ocurrió en un intervalo de 1.34-4.3 Ma, periodo en el que los ciclos glaciares y el enfriamiento global fragmentaron la vegetación tropical del área Neotropical, por lo que dicha fragmentación pudo haber propiciado la divergencia de ambos linajes dentro de *E. affinis*. Dichos linajes también muestran una divergencia a nivel morfológico en el patrón del plumaje y en los análisis morfométricos se encontraron diferencias significativas en seis caracteres: cuerda alar, largo de la cola, largo del culmen desde la parte expuesta, alto y ancho del pico desde la base y alto de la mandíbula. En lo que respecta a los análisis de similitud de nicho ecológico, encontramos que el linaje distribuido en el oeste de México presenta un nicho ecológico más restringido respecto al linaje del este de México y Centroamérica, ambos linajes muestran una superposición en su nicho ecológico, sin embargo, también se identifican diferencias en la distribución geográfica y nicho ambiental. Con la evidencia obtenida a nivel genético, morfológico y ecológico, se concluye que *E. affinis* representa dos linajes evolutivos independientes, se propone sean elevados a nivel de especie, lo que permitiría reflejar la historia evolutiva en la taxonomía del grupo, además de complementar la información de patrones históricos evolutivos en las especies de las tierras bajas de México y Centroamérica.

ABSTRACT

Currently the integration of genetic, morphological and ecological information in the analysis of species boundaries has increased, which has allowed obtaining taxonomy according to the evolutionary history of biological groups. In this sense, the goal of this study was to recognize the independent evolutionary lineages within *Euphonia affinis* in three levels genetic, morphological and ecological to make a taxonomic proposal. *Euphonia affinis* inhabits the lowlands of the Pacific slope of Mexico to Costa Rica and the Gulf of Mexico slope. *E. affinis* have three subspecies described: *E. a. godmani* distributed in the Pacific Slope from southern of Sonora to Guerrero, *E. a. affinis* from Oaxaca, Chiapas and the Yucatan Peninsula to Central America and *E. a. olmecorum* from Tamaulipas and San Luis Potosi East to northern of Chiapas. Multilocus analysis was performed with the ND2, ODC, GAPDH, MUSK and BRM genes for 23 individuals of *Euphonia affinis*, 19 from eastern Mexico and Central and four individuals from western of Mexico. Phylogenies obtained for ND2, ODC, MUSK genes and for concatenated matrix show reciprocal monophyly, to *E. a. godmani* y *E. a. affinis*. Haplotype networks, Fst values and genetic distances also provide evidence of the divergence between individuals of Eastern Mexico and Central America and individuals distributed in western Mexico, with evidence of two genetic lineages: *E. a. godmani* distributed in western Mexico and *E. a. affinis* distributed along the slope of the Gulf of Mexico, and Central America to Costa Rica. However, no information is available from the center of the Pacific slope (Guerrero and Oaxaca), so it is necessary to supplement with such sampling. According to the divergence time, the separation of the lineages occurred between 1.34 and 4.3 Ma, a period in which the ice ages and global cooling fragmented tropical vegetation of the Neotropical area, so the divergence of *Euphonia affinis* lineages are attributed to the fragmentation of tropical vegetation in the past. These lineages also showed a divergence at the morphological level in the pattern of plumage and morphometric analysis significant differences in six characters: wing chord, tail length, culmen long, height and width of the peak and height of the jaw from de nostrile. The ecological niche analysis showed that the lineage distributed in western Mexico has a more restricted niche in respect of eastern lineage niche. Both lineages showed an overlap in their ecological niche, however, differences in geographic and environmental niche are also identified. With the evidence obtained from genetic, morphological and ecological data, this work concluded that *E. affinis* represents two independent evolutionary lineages, which are proposed them to be elevated to species level. This would reflect the evolutionary history in the taxonomy of the group, and complementing the historical information about evolutionary patterns in species of the lowlands of Mexico and Central America.

I. Introducción

El integrar información genética, morfológica, ecológica y conductual a la sistemática, proporciona información sobre la historia evolutiva de las especies y sus poblaciones (Köhler *et al.* 2010, Padial *et al.* 2010, Pavlova *et al.* 2014). La idea anterior ha llevado recientemente a los investigadores a revisar los límites de especie, haciendo uso de diversas herramientas y diferentes conceptos de especie.

El concepto de especie más ampliamente utilizado es el Concepto Biológico de Especie, propuesto por Mayr (1942), quien lo define textualmente como: “Las especies son grupos de poblaciones naturales que actualmente se reproducen o potencialmente pueden hacerlo”. Sin embargo este concepto de especie no ha satisfecho por completo a los taxónomos, debido a que resulta poco práctico en varios grupos taxonómicos (como fósiles, o especies con reproducción asexual) y sobre todo debido al amplio uso del nivel taxonómico de subespecie. El uso de subespecies puede resultar impráctico para diversas disciplinas, por ejemplo la conservación; debido a que muchas veces estas no representan procesos evolutivos o de aislamiento (Phillimore y Owens 2006; Zink 2004; Zink 2015).

Debido a la falta de un concepto que satisfaga la delimitación de las especies y que refleje la historia evolutiva de los linajes, se propusieron conceptos nuevos, tales como el Concepto Evolutivo (Wiley 1978) y el Concepto Filogenético (Cracraft 1983). En 2011, de Queiroz, propuso un nuevo concepto de especie: el Concepto Unificado de Especie, el cual se define como el conjunto de metapoblaciones que representan un linaje que evoluciona en forma separada de otros linajes. De Queiroz (2011) afirma que la relevancia de este concepto consiste en la unificación de los diferentes conceptos de especie, además de rescatar y considerar las diferentes propiedades inherentes a los organismos (aislamiento reproductivo, diferencias ecológicas, fijación de caracteres, etc.) que dan origen a los diversos conceptos de especie. El mismo autor ha hecho hincapié en el hecho que diversas características pueden ser cuantificables para distinguir entre grupos de especies y no todas tendrán el mismo nivel de divergencia, lo que dependerá de la naturaleza de los organismos y del tiempo que llevan divergiendo (De Queiroz 2005). Por lo que su propuesta y recomendación es proporcionar la mayor cantidad de evidencia posible entre los grupos que se busque evaluar, con el fin de

presentar una evidencia más sólida acerca de la divergencia y la evolución entre los linajes (De Queiroz 2007).

En Aves se han utilizado diversos métodos para delimitar a las especies. Así se han llevado a cabo análisis morfométricos (Ej. Navarro-Sigüenza *et al.* 2001), de coloración, donde los caracteres se pueden determinar en forma cualitativa y cuantitativa (Ej. Frith y Frith 1983, Rathbun *et al.* 2015), y metodologías que se han visto beneficiadas con el avance de la biotecnología y bioinformática, por ejemplo la generación de filogenias utilizando caracteres moleculares, resaltando la variación genética dentro de las poblaciones (Ej. Olsson *et al.* 2013), caracteres provenientes de los cantos (Ej. Sosa-López *et al.* 2013), y por último, se ha usado el modelado de nicho ecológico (Ruiz-Sánchez *et al.* 2015). Generalmente este tipo de estudios tiene como objetivo resolver límites dentro de complejos de especies, o bien evaluar las subespecies propuestas, muchas veces reconocidas por autoridades taxonómicas como AOU (American Ornithology Union) o IOC World Bird List (International Ornithology Committee).

Los caracteres morfométricos han sido útiles para diferenciar especies (Ej. Weller 2000; Navarro-Sigüenza *et al.* 2001) y distinguir patrones de variación geográfica atribuidos a aspectos ecológicos, como el caso de las clinas (Grant 1972), o con categorías geográficas distinguibles, atribuidas a distribuciones alopátricas y/o factores históricos, que resultaron en una divergencia morfológica (Sánchez-González *et al.* 2007). Actualmente, gracias al uso de caracteres genéticos, se sabe que la complejidad geológica, heterogeneidad del ambiente y las oscilaciones climáticas han influido en los patrones de diversidad genética, demográfica y divergencia en las poblaciones de las especies (Ej. de-Nova *et al.* 2012; Gu *et al.* 2013; Rodríguez-Gómez y Ornelas 2015), hipótesis que no se pueden comprobar con el uso exclusivo de caracteres morfológicos. Adicionalmente, con el uso de modelado de nicho ecológico, se han podido sustentar las hipótesis obtenidas con datos genéticos (Smith *et al.* 2011), delimitar especies (Raxworthy *et al.* 2007; Ruiz-Sánchez *et al.* 2015) y entender el proceso de especiación, con procesos como el Conservadurismo de Nicho y Divergencia de Nicho Ecológico (Brook *et al.* 2006; Hua y Wiens 2013),

Cada vez son más los estudios donde se pretende poner a prueba los límites de especie, integrando más de dos métodos con el fin de obtener resultados más robustos (Ej. Ruíz-Sánchez y Sosa 2010; Rivera *et al.* 2011). Sin embargo, siguen siendo más los trabajos que

utilizan una sola metodología, por lo que resulta relevante continuar construyendo una taxonomía integrativa, haciendo uso de métodos que incorporen el origen y evolución de las especies, como sugiere Padial *et al.* 2010.

Con el propósito de contribuir a la generación del conocimiento taxonómico, patrones geográficos, procesos evolutivos y de especiación que originan a las especies, el objetivo principal de este trabajo es identificar los linajes evolutivos independientes dentro de *Euphonia affinis* (Lesson, 1842) en tres niveles: genético, con datos multilocus moleculares; morfológico, con caracteres morfométricos; y ecológico, con el modelado de nicho ecológico.

Euphonia affinis es un ave del orden Passeriformes de la familia Fringillidae, residente de las tierras bajas de México y Centroamérica hasta Costa Rica (AOU 2003). Se distribuye a lo largo de la Vertiente del Pacífico desde Sonora hasta el centro de Guerrero en México y en el este de México desde el este de San Luis Potosí y a lo largo de toda la vertiente del Golfo, y en la Costa de Pacífico del suroeste de Oaxaca a Centroamérica desde Nicaragua hasta el Noroeste de Costa Rica (Howell and Webb 1999).

Existen dos unidades geográficas y morfológicas descritas para *E. affinis* en las cuales se ha basado la descripción de las dos subespecies actualmente reconocidas (AOU 1998) (Fig. 1): *Euphonia affinis godmani* (Brewster, 1889) (Fig. 1a.) que se distribuye en el oeste de México, desde Sonora hasta el centro de Guerrero y *Euphonia affinis affinis* (Lesson, 1842) (Fig. 1b.) del este de San Luis Potosí, Sureste de Tamaulipas, Veracruz, Puebla y norte-suroeste de Oaxaca y la Península de Yucatán hasta Honduras, y en la Costa del Pacífico de Centroamérica desde Nicaragua hasta el noroeste de Costa Rica. Las características morfológicas que distinguen las dos subespecies son las plumas cobertoras subcaudales, en color blanco para *E. a. godmani*, y en color amarillo en *E. a. affinis*, características constantes en ambos sexos. Dickerman (1981) describe una tercera subespecie *Euphonia affinis olmecorum*, basada en diferencias de coloración de las hembras, describiéndolas con una coloración más pálida con respecto a las hembras de *E. a. affinis*. La distribución descrita para *E. a. olmecorum* es la siguiente: en la Costa del Golfo de México del Sur de Tamaulipas y Este de San Luis Potosí hasta el norte y sur de Chiapas (Hilty 2011), sin embargo, dicha subespecie no ha sido oficialmente reconocida y es considerada junto con *E. a. affinis* un grupo polifilético (Clement "Checklist" 2011).

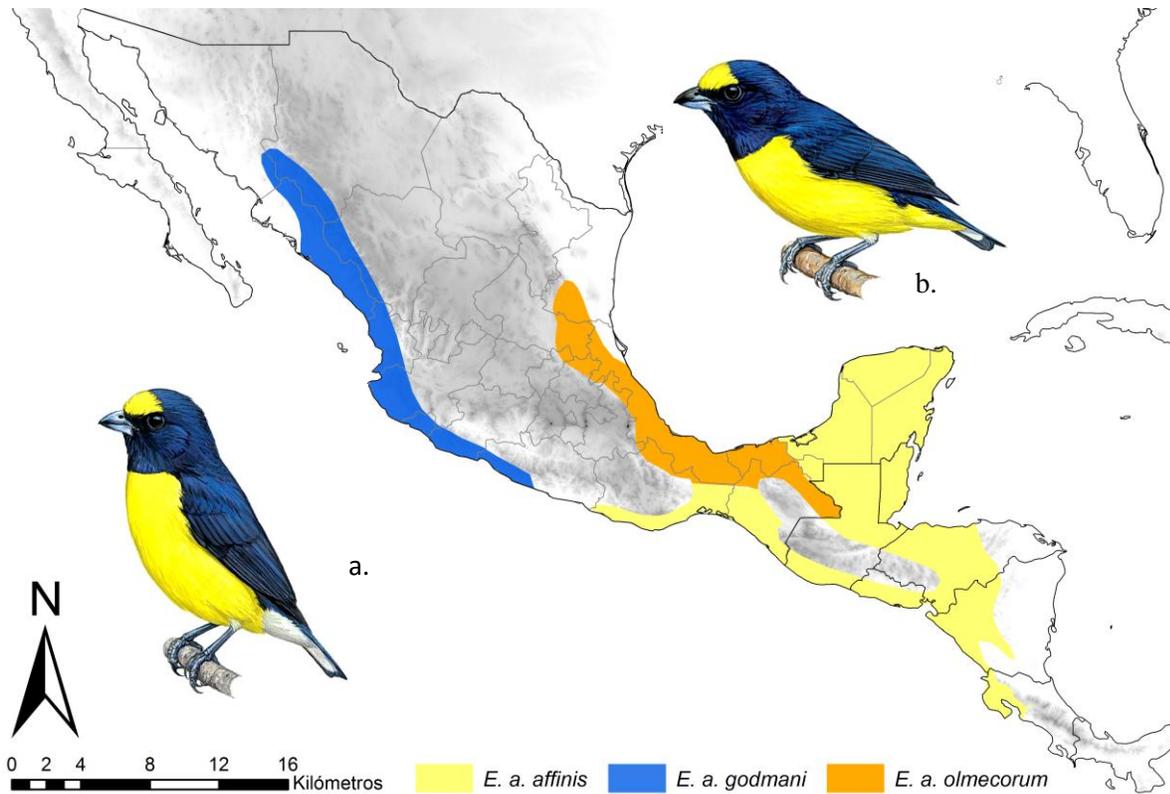


Fig. 1. Distribución geográfica de *Euphonia affinis*. Dos unidades morfológicas y geográficas *E. a. godmani* (a) distribuida del sur de Sonora hasta el Centro de Guerrero, y (b) *E. a. affinis*/*E. a. olmecorum* distribuido del este de San Luis Potosí, suroeste de Tamaulipas, Veracruz, hasta la Península de Yucatán, suroeste de Oaxaca hasta la Costa del Pacífico desde Nicaragua hasta el noroeste de Costa Rica. Imágenes Hilty 2011, distribuciones modificadas de Natureserve.

1.1 Familia Fringillidae y género Euphonia

La familia Fringillidae conocidos como pinzones (*finches* en inglés), son aves del orden Passeriformes. Se caracterizan por ser de tamaño pequeño a mediano, con pico cónico y en algunos casos, plano. En general sus hábitos son vegetarianos, alimentándose principalmente de semillas y frutas. Estas aves se distribuyen alrededor de todo el mundo, con una diversidad

mayor en Eurasia, sin embargo, se encuentran bien representadas en África, Norteamérica y Sudamérica (Collar y Newton 2010).

Los miembros de la familia Fringillidae presentan reducida la 10ª pluma primaria en las alas, característica compartida con otras familias del orden y con quienes forman el grupo de Oscines de nueve plumas primarias (Hall 2005). Tradicionalmente, se reconocían dos grandes grupos dentro de Fringillidae (Sibley y Ahquist 1982), cada uno conformaba una subfamilia: Fringillinae, que sería el grupo basal con tres especies del género *Fringilla*, de distribución Paleártica. Carduelinae siendo la más numerosa, con 47 géneros y que presenta la mayor diversidad morfológica, ecológica y de distribución, lo que ha generado que dentro de la subfamilia se sugirieran varios subgrupos o tribus (IOC 2015). Recientemente ha sido propuesta una nueva subfamilia, Euphoninae (Yuri y Mindell 2002, Zuccon *et al.* 2012), conformada por los géneros *Euphonia* y *Chlorophonia*, anteriormente incluidos en la familia Neotropical Thraupidae. Sin embargo, la historia evolutiva de esta subfamilia permanece desconocida.

Los géneros *Euphonia* y *Chlorophonia* son géneros de distribución Neotropical y probablemente se trate de géneros parafiléticos (Zuccon *et al.* 2012), trabajo que con base a una análisis multilocus para la familia Fringillidae, revela que la especie *Euphonia musica* está más relacionado con la especie *Chlorophonia cyanea*. El IOC World Birds List (International Ornithological Committee) (Gill y Danks, 2015) propone que Euphoninae debería estar formada por tres géneros: *Chlorophonia* compuesto con cinco especies: *C. cyanea*, *C. pyrrhophrys*, *C. flavirostris*, *C. occipitalis* y *C. callophrys*; *Cyanophonia* que incluiría a las tres eufonias de capucha azul: *E. musica*, *E. elegantissima* y *E. cyanocephala*; y *Euphonia* que incluiría a las 24 especies restantes del género *Euphonia*.

El género *Euphonia* contiene 27 especies todas distribuidas en la región Neotropical (AOU 2003). Ridgely y Tudor (2009) describen al género como aves de cola pequeña y picos aplanados. Generalmente los machos presentan una coloración azul negruzca en la cabeza, y en la mayoría de los casos con un copete anterior amarillo, sin embargo, existen cinco variantes de patrón de coloración. La parte del abdomen suele ser amarillo, contrastando con la garganta negra. A diferencia de los machos, las hembras son pardas, con coloraciones olivo o amarillo, y

en la parte ventral grises, o café-castaño. La mayor parte de las eufonias tienen hábitos arbóreos, habitando desde bosques húmedos, sabanas, zonas montanas y tierras bajas. Son especies conspicuas que frecuentemente se encuentran perchando en las partes altas de los árboles, donde suelen vocalizar. Sus cantos no tienen una estructura definida; por lo que en general son los llamados los que suele encontrarse descritos en la literatura. En lo que respecta a sus hábitos alimenticios las eufonias son aves frugívoras, consumen una gran cantidad de bayas, y muérdago que maceran en sus picos antes de ingerirlos. La construcción de los nidos es en forma de cúpula, de material fibroso y con entrada lateral.

Aunque no existe un estudio específico que determine las relaciones filogenéticas y los límites de especie dentro del género *Euphonia*, se han sugerido hipótesis acerca de sus relaciones filogenéticas y su distribución (AOU 1998; Hilty 2011; Zuccon *et al.* 2012; Cuadro 1). Dichos estudios se resumen en la Cuadro 1.

Cuadro 1.

Grupos filogenéticos dentro del género *Euphonia* (AOU 1998, Hilty 2011 y Zuccon *et al.* 2012).

Especies (Grupos)	Distribución geográfica	Hábitat
<i>Euphonia elegantissima</i>	Tierras altas desde México hasta Panamá.	Bosque de pino-encino, bosque mesófilo de montaña.
<i>Euphonia musica</i> ¹	Islas de las Antillas: Santo Domingo, República Dominicana, Puerto Rico, Antigua y Barbuda, Isla Guadalupe.	Habita desde bosques secos a húmedos, áreas perturbadas y en distintas altitudes.
<i>Euphonia cyanocephala</i>	Sur de Colombia, Ecuador, Venezuela, Guyana Francesa, Perú, Bolivia, Argentina, Paraguay y Brasil.	En los límites de los bosques, áreas de crecimiento secundario, plantaciones y áreas abiertas.
<i>Euphonia jamaica</i>	Jamaica.	Bosques y sus bordes, áreas abiertas, jardines y áreas de crecimiento secundario.
<i>Euphonia plumbea</i>	Colombia, Brasil, Venezuela, Guyana Francesa, NE de Perú y N de Brasil.	Bosques secos, sabanas y áreas abiertas.
<i>Euphonia affinis</i>	Costa oeste y este de México, Centroamérica desde Nicaragua hasta el NE de Costa Rica.	Zonas semiabiertas, bosque seco, bosque de crecimiento secundario, matorral, áreas de cultivo, límites de bosque húmedo y bosque de galería.

<i>Euphonia luteicapilla</i>	Tierras bajas del Caribe, del E de Nicaragua al NW de Panamá, S de Costa Rica al E de Panamá.	Bosque seco a húmedo. Áreas semiabiertas, de cultivo y de crecimiento secundario.
<i>Euphonia chlorotica</i> ²	Venezuela, Brasil, Colombia, Perú, Bolivia, Paraguay y Argentina.	Borde de bosques en ríos, vegetación en crecimiento, áreas abiertas. Desde bosques secos a húmedos, bosques de galería.
<i>Euphonia trinitatis</i>	Colombia y Venezuela.	Bosques secos, bosques de galería, borde de bosques húmedos, áreas de matorral y zonas de cultivo.
<i>Euphonia concinna</i>	Colombia.	Áreas abiertas secas, bosques semiabiertos, sitios de baja elevación y bosque seco.
<i>Euphonia saturata</i>	Colombia, W de Ecuador y NW de Perú.	Áreas abiertas, parques, valles secos con bosque caducifolio.
<i>Euphonia finshi</i>	Venezuela, N de Brasil y Guyana Francesa.	Bosque de galería, bordes de bosque húmedo, sabanas y parches de bosque.
<i>Euphonia violacea</i>	Venezuela, Brasil, Panamá, Brasil, Paraguay y Argentina.	Bosque húmedo.
<i>Euphonia laniirostris</i>	Costa Rica, Colombia y Panamá, Perú, Ecuador, Brasil, Paraguay y Argentina.	Bosque húmedo.
<i>Euphonia hirundinacea</i>	Costa Oeste de México desde San Luis Potosí. Costa Rica y Honduras. En Centroamérica tierras bajas de Nicaragua hasta Costa Rica.	Bosques húmedos, límites entre los bosques húmedos y los bosques secos.
<i>Euphonia chalybea</i>	Brasil, E de Paraguay y NE de Argentina.	Dentro de bosques húmedos y en sus bordes, áreas abiertas, en tierras bajas.
<i>Euphonia fulvicrissa</i>	Panamá, Colombia y Ecuador.	Bosques húmedos y sus límites.
<i>Euphonia imitans</i>	Costa Rica y Panamá.	Bosques húmedos y sus límites, zonas abiertas, en tierras bajas.
<i>Euphonia gouldi</i>	Desde el sureste de México hasta el extremo de Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá.	Bosque húmedo perennifolio.
<i>Euphonia chrysopasta</i>	Colombia, Venezuela, Brasil, Ecuador y Bolivia.	Bosque húmedo, y sus límites en tierras bajas.
<i>Euphonia mesochrysa</i>	Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia.	Bosque húmedo y bosques de niebla.

<i>Euphonia minuta</i>	Sureste de México, hasta Panamá. Colombia, Ecuador, Venezuela y Brasil.	Bosque tropical húmedo y a lo largo de sus límites.
<i>Euphonia annae</i>	Costa Rica a Panamá, hasta Colombia.	Bosque de niebla y sus límites. Bosques de crecimiento secundario.
<i>Euphonia xanthogaster</i>	Panamá, Colombia, Ecuador, Venezuela, Brasil, Perú y Bolivia.	Bosques húmedos y a sus alrededores. Bosque de niebla.
<i>Euphonia rufiventris</i> ³	Venezuela, Colombia, Bolivia y Brasil.	Dosel de bosque húmedo y sus alrededores.
<i>Euphonia pectoralis</i>	Brasil, E de Paraguay y NE de Argentina.	Dosel del Bosque húmedo y sus alrededores.
<i>Euphonia cayennensis</i> ³	SE de Venezuela y NE de Brasil.	Bosque húmedo y sus límites. Áreas abiertas secas.

De acuerdo con los análisis hechos por Zuccon *et al.* (2012): ¹*Chlorophonia cyanea* cercana a las Eufonias: *E. musica*, *E. elegantissima* y *E. cyanocephala*. ²*Euphonia finshi* relacionada con *E. chlorotica* y ³*Euphonia cayennensis* y *E. rufiventris*.

1.2 Generalidades de *Euphonia affinis* (Lesson 1849)

Euphonia affinis (Lesson, 1842) es un ave de tamaño pequeño, que habita las tierras bajas de México y Centroamérica, principalmente en la vegetación de Bosque Tropical Seco, en los límites del Bosque Tropical Perennifolio y Bosque de galería, comúnmente a una altitud del nivel del mar a 1000 msnm, pero puede llegar hasta 2500 msnm. Residente todo el año, se distribuye a lo largo de la Vertiente del Pacífico en México y Centroamérica y la Vertiente del Golfo de México (Fig. 1).

Con dimorfismo sexual marcado (Fig. 2), los machos exhiben una coloración amarilla en el vientre y un copete amarillo, mientras que la cabeza, dorso y garganta, presenta una coloración negro-azulado. A diferencia de los machos las hembras, son pardas, con el dorso y la cabeza en una coloración que va del gris a gris olivo, y el vientre amarillo pálido. A lo largo de su distribución geográfica, *E. affinis* presenta discontinuidades morfológicas, que ha resultado en tres hipótesis taxonómicas:

1) Dentro de *E. affinis*, hay dos subespecies: *E. a. godmani* (Brewster, 1889), que se distribuye en la Costa del Pacífico de SE de Sonora al centro de Guerrero y presenta las plumas cobertoras

subcaudales en color blanco. *Euphonia. a. affinis* (Lesson, 1842), distribuida a lo largo de la Costa del Golfo de México del S de Tamaulipas y el E de San Luis Potosí al N y S de Chiapas, Península de Yucatán y Cozumel hacia el sur a través de Belice y Guatemala al N de Honduras, Costa del Pacífico de México de O de Oaxaca al sur a través de la Costa NO de Costa Rica (Guanacaste) y presenta las plumas cobertoras subcaudales en color amarillo. Esta hipótesis es la más aceptada en la literatura (Howell and Webb 1995) y por la autoridad taxonómica AOU 1998.

2) Dentro de *E. affinis* existen tres subespecies: *E. a. godmani* y *E. a. affinis*, descritas anteriormente, y *E. a. olmecorum* (Dickerman, 1981) (Hilty 2011), no reconocida por el AOU 1998. Para *E. a. olmecorum*, los machos no presentan diferencias morfológicas respecto a *E. a. affinis*, sin embargo, las hembras tienen una coloración más pálida respecto a las hembras de *E. a. affinis*. Para ésta tercera subespecie sugerida (*E. a. olmecorum*), la distribución geográfica sería, la Costa del Golfo de México del S de Tamaulipas y al SE de San Luis Potosí al y N de Chiapas, mientras que *E. a. godmani* presentaría una distribución que va de la Costa del Pacífico de SE de Sonora al centro de Guerrero y *E. a. affinis* presentaría una distribución que va de la Península de Yucatán y Cozumel hacia el Sur a través de Belice y Guatemala al N de Honduras. Costa del Pacífico de México de O de Oaxaca al Sur a través de la Costa NO de Costa Rica (Guanacaste). De acuerdo con Clement “Checklist” (2011) la distribución de *E. a. olmecorum* se encuentra en el sureste de México: Oaxaca y Chiapas; y considera a *E. a. affinis* y *E. a. olmecorum* como un grupo polifilético.

3) Una tercera hipótesis considera a *E. affinis* y *E. godmani* como dos especies distintas (Ridway y Friedamn 1901; Navarro y Peterson 2004).

Para *E. affinis* no existe un estudio que mida la variación geográfica dentro de sus poblaciones, salvo, algunas observaciones; Ridgway y Friedman (1901) reportan una media menor para caracteres morfométricos, en los individuos de Honduras y describen a los individuos de la Península de Yucatán, más oscuros respecto a los que provienen de otras localidades. En lo que respecta a *E. godmani*, la describen muy similar a *E. minuta humilis* pero más grande y más oscura. Ambas subespecies han sido relacionadas con las especies *E. chlorotica*, *E. luteicapilla* y *E. minuta* (Hilty 2011).

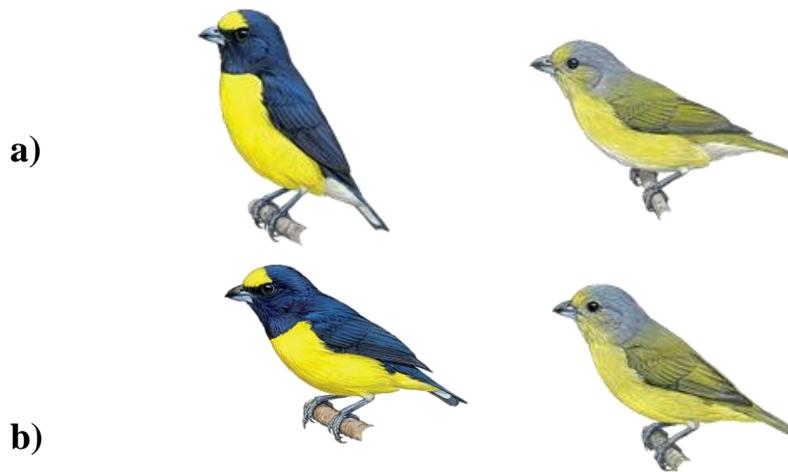


Fig. 2. Morfotipos para *E. affinis*. Columna izquierda machos, columna derecha hembras. a) *E. a. godmani* y b) *E. a. affinis*.

1.3 Objetivos

1.3.1 General.

Reconocer linajes evolutivos independientes dentro de *Euphonia affinis*, en los niveles genético, morfológico y ecológico, para poder reevaluar el estatus taxonómico de la especie y sus subespecies propuestas.

1.3.2 Particulares

- a) Obtener las relaciones filogenéticas, distancia genética, índice de Fijación F_{st} y tiempos de divergencia dentro de los linajes determinados con datos multilocus, obtenidos con los genes nucleares Musk (Receptor de la Tirosina en Músculo y esqueleto), BRM (Proteína Brahma, intrón 11), ODC (Ornitina-descarboxilasa) y GAPDH (Gliceraldehído-3fosfato deshidrogenasa, intrón 11) y con el gen mitocondrial ND2 (NADH deshidrogenasa subunidad 2).
- b) Evaluar la variación morfométrica entre los linajes encontrados con los datos multilocus (genéticos) en *Euphonia affinis*.
- c) Reconstruir los modelos de Nicho Ecológico y distribución geográfica, actual, para el último máximo glacial (~22,000) y el último periodo interglacial (~120,000 – 140,000) para cada uno de los linajes genéticos encontrados. Así como evaluar la similitud o diferenciación de nicho ecológico.

- d) Reevaluar el estatus taxonómico de las subespecies descritas, en *Euphonia affinis*, con base a la historia evolutiva reconstruida.

II. Método

2.1 Obtención y análisis de datos genéticos

2.1.1 Obtención de muestras y trabajo de laboratorio.

Para este trabajo se utilizaron muestras de tejido pertenecientes a distintas colecciones científicas, tanto para el grupo de estudio y el grupo externo (Fig. 3 y Cuadro 2).

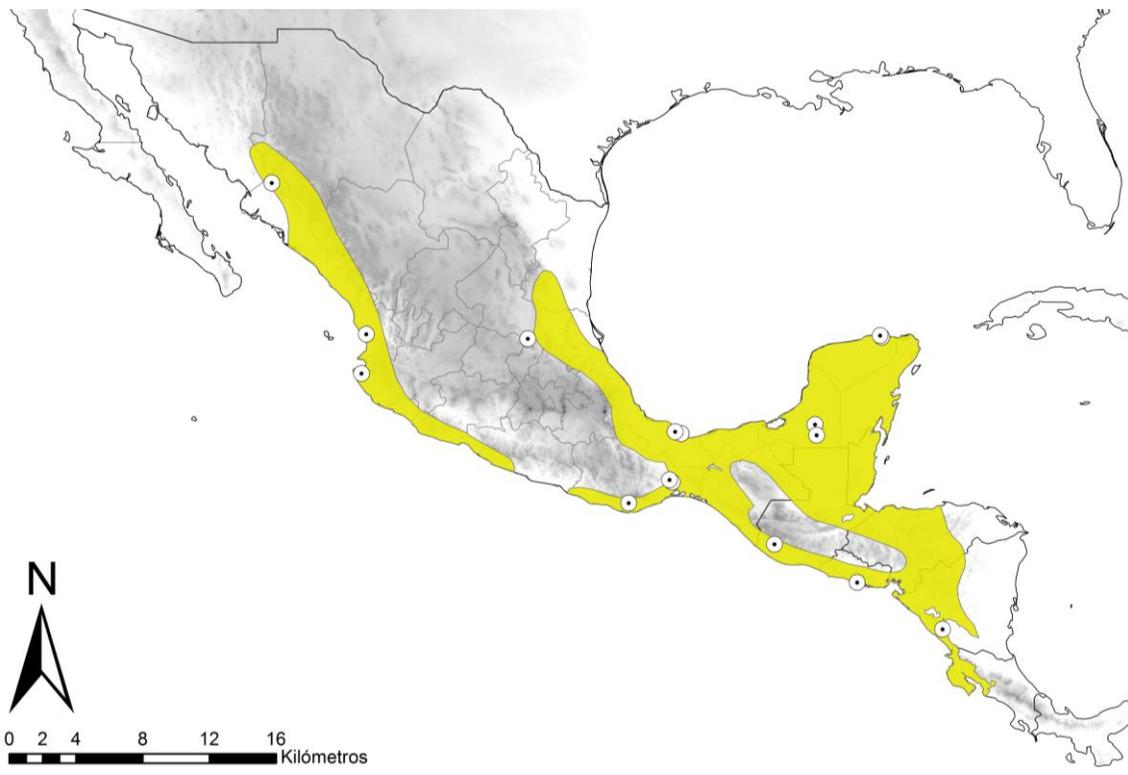


Fig. 3. Localidades de *Euphonia affinis* (tejidos).

Cuadro 2.

Localidades para *E. affinis* y grupo externo.

Especie	Núm. de Catálogo	Localidad	Institución	Fecha de Colecta
<i>E. a. godmani</i>	VGR 1073	Bajosori 10 km al SO de Choix, Ejido 1. Municipio Choix, Sinaloa, México.	MZFC	24/08/2006
<i>E. a. godmani</i>	VGR 1189	Bajosori 10 km al SO de Choix, Ejido 1.	MZFC	20/09/2007

		Municipio Choix, Sinaloa, México.		
<i>E. a. godmani</i>	ORT 003	Singayta a 3.5 km. Municipio San Blas, Nayarit, México.	MZFC	03/12/2009
<i>E. a. godmani</i>	CPM 003	Jalisco, México.	MZFC	ND/05/2014
<i>E. a. affinis</i>	CONACYT 1301	Nizanda Camino a las Sábanas. Municipio Asunción Ixtaltepec, Oaxaca, México	MZFC	12/02/2002
<i>E. a. affinis</i>	GES 350	El Arroyo, 6 Km al S de Silvituc. Campeche, México.	MZFC	13/03/1998
<i>E. affinis</i>	MOL 15_58	Km 191 carretera Oaxaca – Puerto Ángel, Santiago La Galera. Municipio Candelaria Loxicha, Oaxaca; México	MZFC	
<i>E. a. affinis</i>	NIZA 120	Nizanda, Piedra Azul. Municipio de Asunción Ixtaltepec, Oaxaca, México.	MZFC	23/11/2002
<i>E. a. affinis</i>	Y408 192	Rancho San Salvador, Anexa Chunkilin. Municipio Río Lagartos, Yucatán, México.	MZFC	14/04/2008
<i>E. a. affinis</i>	YUC 13-60	Reserva de la Biósfera Río Lagartos. Municipio Tizimín, Yucatán, México.	MZFC	23/04/2013
<i>E. a. affinis</i>	MAGH 10_25	Reserva de la Sierra Gorda, El Pantanal, Orilla del Río Sta. María m 676.	CNAV/IB	04/01/2010
<i>E. a. affinis</i>	MAGH 10_36	Reserva de la Sierra Gorda, El Pantanal, Orilla del Río Sta. María m 676.	CNAV/IB	04/01/2010
<i>E. a. affinis</i>	MAGH 08_201	Reserva de la Sierra Gorda, El Pantanal, Orilla del Río Sta. María m 676.	CNAV/IB	17/12/2008
<i>E. a. affinis</i>	PEP 2770	Cerro San Martín Pajapan 2 Km al S La Valentina. Veracruz, México.	CNAV/IB	17/06/1994
<i>E. a. affinis</i>	PEP 2769	Cerro San Martín Pajapan 2 Km al S La Valentina. Veracruz, México.	CNAV/IB	17/06/1994
<i>E. a. affinis</i>	PEP 2768	Cerro San Martín Pajapan 2 Km al S La Valentina. Veracruz, México.	CNAV/IB	17/06/1994
<i>E. a. affinis</i>	PEP 2602	Sierra de Santa Martha a 5km del NE del Bastonal.	CNAV/IB	21/04/1998
<i>E. a. affinis</i>	DAB 1922	Las Plazulas, Laguna Blanca. Departamento de Granada, Nicaragua.	UWBM	23/10/1996
<i>E. a. affinis</i>	GAV 2440	San Felipe Retalhuleu 5 Km al Sur Finca el Niño. Departamento de Retalhuleu, Guatemala.	UWBM	01/10/2002
<i>E. a. affinis</i>	2099	24 km al Sur de Silvituc. Municipio Campeche, México.	KU	08/03/1998
<i>E. a. affinis</i>	1983	24 km al Sur de Silvituc. Municipio Campeche, México.	KU	08/03/1998
<i>E. a. affinis</i>	9347	Ánimas. Zacatecoluca. La Paz, El Salvador.	KU	06/04/2004

<i>E. a. affnis</i>	9346	Ánimas. Zacatecoluca. La Paz, El Salvador.	KU	06/04/2004
Grupo externo				
<i>Chlorophonia occipitalis</i>	DAB 1391	10 km al N de Matagalpa, Nicaragua	UWBM	17/04/1996
<i>Euphonia chlorotica</i>	3226	Bahía Negra, 14 km W, Estancia Triunfo; Alto Paraguay, Paraguay.	KU	09/10/1999
<i>Euphonia chlorotica</i>	3199	Bahía Negra, 14 km W, Estancia Triunfo; Alto Paraguay, Paraguay.	KU	07/10/1999
<i>Euphonia luteicapilla</i>	B 28445	2 km al SO del Río Farfán; Panamá	LUSMZ	ND7ND/ND
<i>Haemorhous mexicanus</i>	QRO. 251	La Florida, Municipio Careyta de Montes, Querétaro, México.	MZFC	09/03/1997

MZFC: Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias, UNAM. CNAV/IB: Colección Nacional de Aves/Instituto de Biología, UNAM. UWBM: Universidad de Washington, Museo de Burke, E.U.A. KU: Colección Ornitológica Universidad de Kansas, E.U.A. LUSMZ: Museo de Historia Natural de Louisiana, E.U.A.

Extracción de DNA. Se realizó mediante el Kit de extracción DNeasy de Qiagen, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Para verificar la presencia de DNA en las extracciones se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel de agarosa se preparó colocando 50µl de Buffer TBE 1X (Tris ácido bórico y EDTA), 0.5 g de agarosa, teñido con Bromuro de Etidio. Se cargó cada una de las celdas del gel con 2µl de DNA y 2µl del colorante azul de bromofenol 5X, aplicando 120 voltios por 15 minutos, concluido el tiempo, se observó en un Transiluminador.

Amplificación de DNA. La amplificación del DNA se llevó a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), con el siguiente protocolo: 9µL de agua inyectable estéril, 1.25µL de buffer 10X [500mM KCl, 100 mM Tris – HCl (pH 9.1) y 0.1 % Triton X-100], 0.1875µL de deoxinucleótidos 10mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25µL de oligonucleótido 1 (10mM), 0.25 µL de oligonucleótido 2 (10mM), 0.375µL de 50mM MgCl₂, 0.1µL de amplificasa (5u/µL) y 0.5 ó 1 µL de DNA, dependiendo de la concentración de DNA. En la Cuadro 3 se enumeran los genes amplificados, *primers* y su ubicación en el genoma.

Cuadro 3.

Primers utilizados en este estudio.

GEN	UBICACIÓN	PRIMERS	AUTOR
ND2	Mitocondria	L5219 CCC ATA CCC CGA AAA TGA TGC CCA TAC CCC GAA AAT GAT G H6313 CTC TTA TTT AAG GCT TTG AAG GC	Sorenson <i>et al.</i> 1999.
GAPDH	Autosómico	GAPDH 890 exón 11 ACC TTT AAT GCG GGT GCT GGC ATT GC GAPDH 950 exón 12 CAT CAA GTC CAC AAC ACG GTT GCT GTA	Friesen 1997.
ODC	Autosómico	ODC F GTT CTA CTT TCT CTG GAA CTA CTG CTC ODC R CAT CAA GTC AGT GAC TTA GCT AGC	Fjeldsa <i>et al.</i> 2003.
BRM	Z	BRM_intrón 11 Mex15 AGC ACC TTT GAA CAG TGG TT BRM_intrón 11 Mex16 TAC TTT ATG GAG ACG ACG GA	Friesen, 1997
MUSK	Z	MUSK F. CTT CCA TGC ACT ACA ATG GGA AA MUSK R CTC TGA ACA TTG TGG ATC CTC AA	Kimball <i>et al.</i> 2009

ND2: NADH deshidrogenasa subunidad 2

ODC: Ornitina-descarboxilasa

GAPDH: Gliceraldehído-3fosfato deshidrogenasa, intrón 11.

BRM: Proteína Brahma, intrón 11.

MUSK: Receptor de la Tirosina en Músculo y esqueleto.

La amplificación se llevó a cabo en termocicladores GeneAmp PCR System 9700 con los siguientes programas:

- ND2, MUSK y ODC. Desnaturalización a 94°C por 2:30 minutos, 35 ciclos con una desnaturalización de 94°C por 30 segundos, alineamiento 54°C (ND2), 58°C (MUSK) y 65°C (ODC) por 30 segundos, extensión de oligonucleótidos 72°C durante 1 minutos, con una extensión final de 72°C por 10 minutos.
- GAPDH-intrón 11 y BRM-intrón 11. Desnaturalización a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de de 94°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C durante 30 segundos y 72°C durante un minuto. Con una extensión final de 72°C durante 3 minutos.

Luego de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa (anteriormente descrito) de los productos obtenidos para corroborar que esta haya sido exitosa, siguiendo la metodología previamente descrita.

Posteriormente los productos de PCR obtenidos fueron enviados a secuenciar a la Institución High-Throughput Sequencing Solutions administrada por la Universidad de Washington en el Departamento de Ciencias Genómicas.

2.1.2 Análisis de secuencias

La edición de secuencias se realizó en el programa SEQUENCHER 4.8 (<http://www.genecodes.com>), se alinearon en el programa BIOEDIT (Hall 1999) con la función de alineamiento múltiple CLUSTAL IW (Thompson *et al.* 1994) y con el método de árbol de distancia *Neighbor Joining*. Los valores de composición nucleotídica, los sitios variables y no variables, y los sitios informativos para cada gen fueron obtenidos con el programa DNasp (Librado y Rozas 2009).

2.1.2.1 Análisis filogenéticos

Para la inferencia filogenética, primero se obtuvo el modelo evolutivo de sustitución nucleotídica para cada gen en el programa jModeltest 0.1 (Posada 2008), con base al criterio de información de Akaike (AIC: Akaike 1973). Posteriormente en el programa Mr. Bayes versión 3.0 (Huelsenbeck y Ronquist 2002) por medio del criterio de inferencia bayesiana, se infirieron las relaciones filogenéticas, para cada locus y genes concatenados, a partir de una matriz particionada y con el modelo evolutivo correspondiente para cada gen, bajos los siguientes parámetros: cuatro cadenas, dos frías y dos calientes en el análisis de Cadenas de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC), durante diez millones de generaciones, muestreando cada 250 generaciones y descartando el 25% de los árboles obtenidos (*burn-in*).

Para determinar las especies más cercanas filogenéticamente a *E. affinis*, se secuenció, y utilizó de la base de secuencias del GENBANK (ver Cuadro 4) secuencias del género *Euphonia*, y como grupo externo se adjuntó a los géneros *Haemorhous*, *Carpodacus* y *Fringilla*. En el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.* 2011) se obtuvo la matriz de distancias genéticas pareadas por gen bajo los siguientes parámetros: bajo el modelo de Máxima

verosimilitud, 500 réplicas para obtener el soporte por Bootstrap, utilizando las transversiones y transiciones y especificando el modelo evolutivo para cada gen.

Cuadro 4.

Secuencias obtenidas del GENBANK para complementar el grupo externo utilizado en este estudio.

Especie	Número de acceso	Autor
<i>Fringilla montifringilla</i>	GU816920 (Gen ODC)	Fjeldsa <i>et al.</i> (2010)
	GU816851 (Gen ND2)	Fjeldsa <i>et al.</i> (2010)
	JN715184 (Gen GAPDH)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	EU739811 (Gen MUSK)	Hackett (2008)
<i>Fringilla teydea</i>	KC767747 (Gen BRM)	Lifjeld <i>et al.</i> (2013)
<i>Haemorhous mexicanus</i>	KC292816 (ND2)	Smith <i>et al.</i> (2013)
	KC292792 (MUSK)	Smith <i>et al.</i> (2013)
	KM112839 (ODC)	Smith <i>et al.</i> (2013)
	JN715155 (GAPDH)	Smith <i>et al.</i> (2013)
<i>Carpodacus vinaceus</i>	HQ284789 (Gen GAPDH)	Topfer <i>et al.</i> (2011)
	KJ455737 (Gen ODC)	Preece <i>et al.</i> (2014)
	JN715444 (Gen ND2)	Preece <i>et al.</i> (2014)
<i>Euphonia finschi</i>	AF290106 (Gen ND2)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN15362 (Gen ODC)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN715180 (Gen GAPDH)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
<i>Euphonia chlorotica</i>	JN7151175 (Gen GAPDH)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
<i>Euphonia musica</i>	JN715451 (Gen ND2)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN15360 (Gen ODC)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
<i>Euphonia violacea</i>	JN715453 (Gen ND2)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN715363 (Gen ODC)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN71581 (Gen GAPDH)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
<i>Euphonia lanirostris</i>	JN715449 (Gen ND2)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN715358 (Gen ODC)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN715176 (Gen GAPDH)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
<i>Euphonia xanthogaster</i>	JN715454 (Gen ND2)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN715364 (Gen ODC)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
<i>Euphonia minuta</i>	JN715450 (Gen ND2)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN715359 (Gen ODC)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)
	JN715177 (Gen GAPDH)	Zuccon <i>et al.</i> (2011)

2.1.2.2 Tiempos de divergencia

Se obtuvieron los tiempos de divergencia con el programa BEAST v 1.8.0 (Drummond y Rambaut 2007). BEAST reconstruye las relaciones filogenéticas y calcula los tiempos de divergencia con el método de inferencia bayesiana. Se construyó una matriz particionada para los genes ND2, ODC y GAPDH, debido a que para estos genes se obtuvo la mayoría de muestras, así como las secuencias para el grupo externo obtenidas de GENE BANK.

BEAST solicita como información *a priori* la asignación de grupos, por lo que se tomó como base los grupos monofiléticos de la filogenia de genes concatenados sin agrupar y como grupo externo la especie *Plectrophenax nivalis* (Calcariidae), especie cercana a la familia Fringillidae. A cada partición se le asignó su modelo evolutivo correspondiente, así como su respectiva tasa de sustitución: 0.029s/s/Ma para ND2, 0.0014 s/s/Ma para ODC y 0.0012 s/s/Ma para GAPDH (Lerner *et al.* 2011). Se utilizó una calibración secundaria, con base a la divergencia de Fringillidae y los Oscines de nueve plumas primarias del Nuevo Mundo, hace 20-22 millones de años, tiempo estimado por Barker *et al.* (2004), se asignó una distribución normal, con una media de 21 millones de años y una desviación estándar de 1. El modelo Yule fue asignado como modelo de *Árbol a priori*, debido a que es un modelo de especiación simple y recomendable cuando se consideran secuencias de diferentes especies, de acuerdo con las recomendaciones del manual de BEAST. Por último, se corrió el análisis durante 10 000 000 millones de generaciones, muestreando cada 1000 árboles. Posteriormente, en el programa TRACER v 1.5 ([http:// tree.bio.ed.ac.uk/ software/ tracer/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/)) se confirmó que todos los valores de ESSs (Tamaño efectivo de muestra) tuvieran una distribución posterior mayor a 200.

Finalmente, en TREE ANNOTATOR v 1.8.0 (Drummond y Rambaut 2007) se desecharon los primeros 1000 árboles obtenidos y se definió una probabilidad posterior mayor de 0.5 para los clados, y así obtener la filogenia y tiempos de divergencia finales. El árbol fue editado en FigTree v 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

2.1.2.3 Estructura y variación genética

En el caso de las secuencias nucleares, se obtuvieron los alelos con base al método de Inferencia Bayesiana implementado en el programa PHASE v 2.1 (Stephens *et al.* 2001), con los siguientes parámetros: 1 000 iteraciones, intervalos de 1 y descartando los primeros 100 alelos obtenidos, únicamente se seleccionaron para los análisis posteriores los pares de haplotipos con una probabilidad posterior mayor a 0.90.

Las redes de haplotipos fueron generadas en el programa Network (Bandelt 1999), utilizando el algoritmo *Median Joining*, con esto se obtuvo el número de haplotipos y sus frecuencias para cada uno de los cinco genes. Los parámetros de diversidad genética, como

Diversidad haplotípica (Hd) y el Índice de diversidad nucleotídica (Pi) y el F_{st} poblacional fueron calculados en el programa DnaSP v 5 (Librado y Rozas 2009).

2.2 Obtención y análisis de datos morfométricos

2.2.1 Obtención de datos morfométricos

Se obtuvieron medidas morfométricas de 418 ejemplares adultos de *Euphonia affinis* (213 machos y 121 hembras para *E. a. affinis*; 56 machos y 28 hembras para *E. a. godmani*) pertenecientes a distintas localidades a lo largo de la distribución geográfica de las dos unidades (Fig. 4). Se midieron siete caracteres, definidos con base a las recomendaciones de Baldwin *et al.* (1931). Los caracteres tomados son los siguientes: Longitud del Tarso (LT), Cuerda Alar (CA), Largo de la Cola (LC), Altura de Mandíbula hasta el Borde del Nostrilo (AMN), Largo del Culmen desde la Parte Expuesta (LCPE), Ancho del Pico desde la Base (ANPB) y Alto del Pico desde la Base (APB). Con el objetivo de evitar la variación debido al error de medición, cada carácter fue medido en tres eventos independientes y se trabajó con la media de los valores para cada ejemplar. Las mediciones se realizaron con un calibrador digital Vernier marca Mitutoyo con una resolución de 0.01 mm y un error instrumental de +/- 0.02mm.

Con los datos obtenidos se construyó una base de datos en Excel con la siguiente información para cada ejemplar: Museo, número de catálogo del ejemplar, sexo, localidad, municipio, estado, país, latitud y longitud, colector y fecha de colecta, para algunos ejemplares fue necesario obtener las coordenadas geográficas, cuando la descripción de la localidad lo permitiera. Los ejemplares provienen de las siguientes Colecciones Ornitológicas: Laboratorio de Zoología Moore (Moore Laboratory Zoology), Museo Americano de Historia Natural (American Museum of Natural History), Museo de Historia Natural de Louisiana (Louisiana Museum of Natural History), Academia de Ciencias Naturales (Academy of Natural Sciences), Museo de Zoología Comparada (Museum of Comparative Zoology), Museo de Historia Natural de Delaware (Delaware Museum of Natural History), Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, Facultad de Ciencias UNAM y de la Colección Nacional de Aves del Instituto de Biología, UNAM.

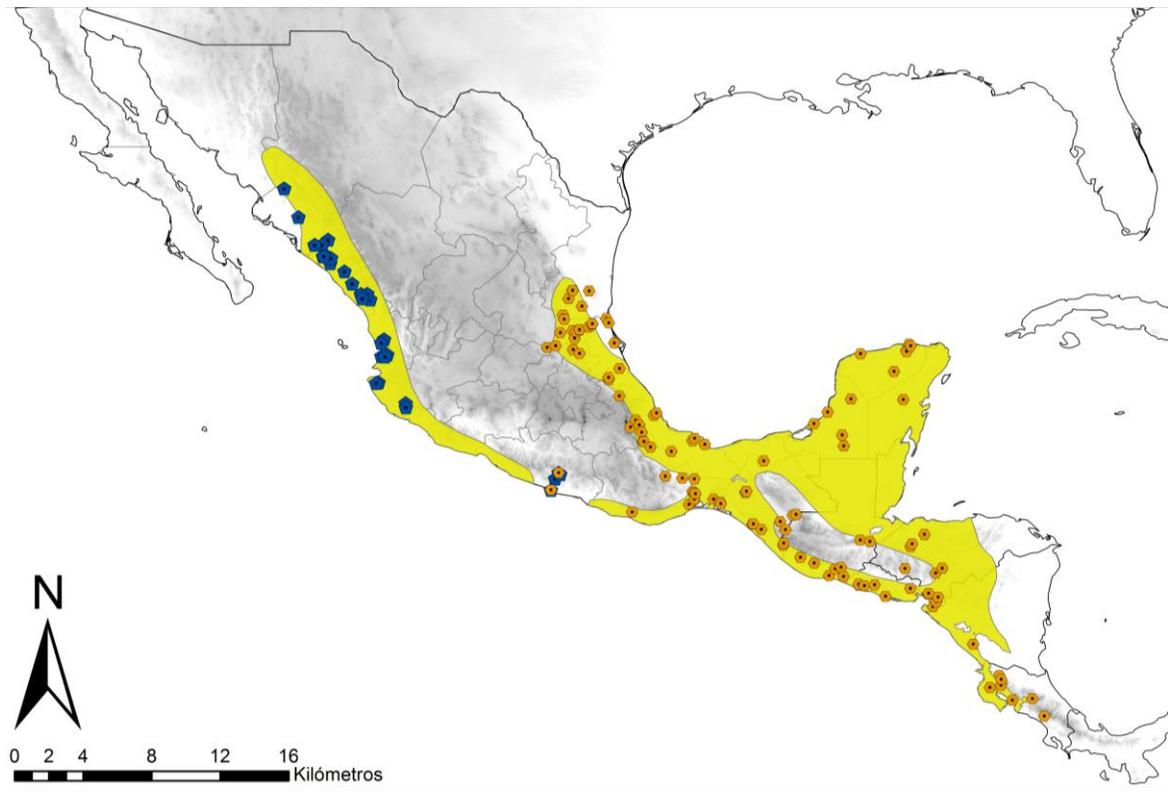


Fig. 4. Localidades *Euphonia affinis* (Peleas). Los puntos color azul corresponden a *E. a. godmani* y los puntos color amarillo a *E. a. affinis*.

2.2.2 Análisis de datos morfométricos

Previo al análisis estadístico de los datos, se clasificaron los ejemplares en dos grupos de estudio: *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, con base a los dos grupos genéticos obtenidos, y la distribución geográfica de las dos entidades morfológicas previamente descritas para la coloración del plumaje. Los análisis fueron realizados en el paquete estadístico SPSS Statistics v. 23. (IBM, 2015). Previamente de realizar los análisis los datos fueron transformados a Logaritmo Natural, la utilidad de la transformación de datos es reducir el sesgo que pueda existir entre los datos y ajustar los datos a una distribución normal.

Una vez transformados los datos, se realizó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una vía o factor, para encontrar diferencias en las medias de los caracteres entre machos y hembras, dentro de cada una de las dos unidades genéticas y geográficas descritas previamente. La prueba de ANOVA de una vía o factor nos permite contrastar las medias entre distintos grupos o poblaciones en una variable cuantitativa

(Dependiente), respecto a un factor que es una variable categórica (Independiente) que define los grupos que se busca comparar. En esta prueba la Hipótesis nula (H_0) es que no existen diferencias en las medias, mientras que la Hipótesis alternativa será que si existen diferencias en las medias de los grupos; los resultados se contrastaron de acuerdo con el valor de significancia o valor de P : sí el valor de P es >0.05 se acepta la H_0 , mientras que un valor de \leq a 0.05 se rechaza la H_0 . Debido a que se encontraron diferencias en las medias de algunos caracteres entre machos y hembras, los análisis posteriores se realizaron en forma separada para los sexos.

Para evaluar si existen diferencias en las medias entre *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, se realizó una ANOVA de una vía, donde la Hipótesis nula (H_0) fue que no existen diferencias en las medias de los grupos y como Hipótesis alternativa que si existen diferencias en las medias de los grupos. En este caso la variable independiente o factor está definida por el linaje genético: *E. a. affinis* o *E. a. godmani*.

Adicionalmente se realizó una prueba de Análisis de Componentes Principales. Los Análisis de Componentes Principales son una prueba de la estadística multivariada, útiles para encontrar la variabilidad de un conjunto de datos y ordenar por importancia las variables en la variación total de los datos. El análisis de componentes principales se realizó en el programa SPSS Statistics v. 23 (IBM 2015) bajo los siguientes criterios: para obtener los componentes principales se indicó al programa que obtuviera la matriz de covarianza, en lo que respecta a los valores perdidos se especificó la opción de eliminar del análisis los ejemplares que tuvieran valores perdidos, se obtuvieron los valores puntuales de cada componente por ejemplar por medio del método de regresión. Finalmente con éstos valores se construyeron los gráficos de dispersión de puntos con dos dimensiones como se indica a continuación: componente principal 1 versus componente principal 2, componente principal 1 versus componente principal 3 y componente principal 2 versus componente principal 3. De igual forma que los análisis anteriores, el ACP se realizó en forma separada para ejemplares machos y hembras.

2.3 Modelado de Nicho Ecológico

2.3.1 Modelado de Nicho Ecológico actual y paleodistribuciones

La distribución de Modelado de Nicho Ecológico se construyó utilizando el Modelo de Máxima Entropía, en el programa MaxEnt 3.3.3 (Phillips *et al.* 2011). Para construir los modelos, primero se obtuvieron registros para ambas unidades genéticas encontradas. Con el fin de evitar errores en los registros por una incorrecta identificación, se utilizaron los registros proporcionados por las colecciones científicas (citadas anteriormente), de los ejemplares analizados con datos morfométricos y las coordenadas de los ejemplares de tejidos. Para tratar de cubrir toda el área hipotética de distribución se complementó con tres registros visuales obtenidos en la herramienta AverAves (<http://ebird.org/content/averaves/acerca/>) para la unidad *E. a. godmani*.

Las variables ecológicas actuales se obtuvieron de la base de datos climáticos de WorldClim (Hijmans *et al.* 2005), disponibles en la página: <http://www.worldclim.org/>, en formato .tif y a una resolución de ~ 1Km. Para seleccionar las variables con las cuales realizar el modelo se hizo un Análisis de Componentes Principales y se seleccionaron las variables que presentaron valores > 0.8 en el Cuadro de Eingenectores. Las variables seleccionadas fueron: BIO1: Media de temperatura anual, BIO4: Temperatura estacional, BIO5: Temperatura máxima del mes más cálido, BIO6: Temperatura mínima del mes más frío, BIO7: Rango de temperatura anual, BIO8: Temperatura media del trimestre más húmedo, BIO9: Temperatura del trimestre más seco, BIO10: Temperatura media del trimestre más cálido, BIO11: Temperatura media del trimestre más frío, BIO12: Precipitación anual, BIO14: Precipitación del mes más seco, BIO16: Precipitación del trimestre más húmedo y BIO17: Precipitación del trimestre más seco.

Cada unidad genética fue modelada con los siguientes parámetros: 20 réplicas, el 25% de los puntos se utilizaron para calibrar el modelo y el 75% para correrlo, los siguientes valores se dejaron en forma automática en MaxEnt: 500 iteraciones, valor límite de convergencia 0.00001 y un valor de prevalencia de 0.5. Por último, de las 20 réplicas realizadas en cada modelo, se eligió la réplica con el mayor valor de AUC (Área bajo la curva).

Posteriormente en ArcGis v. 10.2.2 (ESRI 2014), cada modelo fue reclasificado en presencia-ausencia, a partir del valor de umbral dado por el umbral de presencia mínima, de acuerdo con los valores de probabilidad o Máxima Entropía que proporciona Maxent.

Para obtener las paleodistribuciones de los dos linajes encontrados con caracteres genéticos se proyectó el modelo obtenido en el presente en las capas disponibles en: <http://www.worldclim.org/>, del Último máximo glaciar (hace ~22,000), bajo dos escenarios: MIROC-ESM (Hasumim y Emori 2004) y CCSM (Collins *et al.* 2004). Estos escenarios simulan condiciones climáticas diferentes, CCSM asume un escenario más frío que MIROC (Otto-Bliesner *et al.* 2007) y el último periodo interglaciar (hace ~120,000 – 140,000) (Otto-Bliesner *et al.* 2007).

2.3.2 Similitud y superposición de nicho ecológico

Para evaluar la similitud y superposición de nicho ecológico se hicieron dos análisis que se describen a continuación. El primero fue un Análisis de Componentes Principales, donde se utilizaron los valores de las trece variables ambientales con las que se modeló cada linaje. Los valores fueron extraídos a partir de los modelos obtenidos para cada unidad en ArcGis y los análisis estadísticos se realizaron en SPSS Statistics v.23. (IBM, 2015).

El segundo método fue el propuesto por Warren *et al.* (2010) con la herramienta ENMTools. ENMtools es una herramienta que permite generar estadísticos para cuantificar la similitud de MNE, a partir de los modelos generados con las variables ambientales de elección, puntos de ocurrencias y utilizando el algoritmo de Máxima Entropía por medio del programa Maxent (Warren *et al.* 2010). Para poder cuantificar la similitud, el método se compone de tres análisis (Warren *et al.* 2010): El primer análisis fue obtener el valor observado de superposición de nicho, por medio de los estadísticos *I* y *D* de Schoener. Para obtener dicho valor se ingresó el modelo de nicho ecológico obtenido para *E. a. godmani* y el modelo de *E. a. affinis* en formato ASCII en la opción de superposición de nichos por archivos ASCII (Niche overlap), es importante recalcar que dicho modelo debe haberse obtenido en el mismo espacio geográfico. Al correr el análisis el programa utilizó los valores de idoneidad de cada celda de cada modelo ingresado para calcular los estadísticos *I* y *D* de Shoener, según las fórmulas:

Estadístico I :

$$I(p_X, p_Y) = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\sum_i (\sqrt{p_{X,i}} - \sqrt{p_{Y,i}})^2}$$

D de Schoener:

$$D(p_X, p_Y) = 1 - \frac{1}{2} \sum_i |p_{X,i} - p_{Y,i}|$$

Donde P_x y P_y son la medida de idoneidad para cada especie X y Y , en cada celda i , en ambas fórmulas. El programa generó un documento de texto con los valores de I y D , los cuales tienen un rango de 0 a 1, donde cero indica ninguna superposición y 1 nichos idénticos, los valores obtenidos, son los valores observados para I y D , que se compararon con las pruebas posteriores, que a continuación se explican.

El segundo análisis es la “Prueba de Identidad” (*Identity test* en inglés), esta prueba permite probar si dos especies muestran diferencias estadísticamente significativas en los modelos de nicho ecológico que producen. Para correr dicha prueba, se ingresaron al programa los puntos de ocurrencia de *E. a. godmani* y *E. a. affinis* 72 y 104 respectivamente. Como primer paso el programa junta todos los puntos de ocurrencia y elige al azar un número determinado puntos, este número está dado por el número de ocurrencias de cada especie (72 para *E. a. godmani* y 104 para *E. a. affinis*). En segundo lugar, con los puntos elegidos al azar el programa generó un modelo de nicho ecológico a través del logaritmo de Maxent. Como tercer paso una vez obtenido el modelo de nicho ecológico, el programa calcula los valores de I y D . Los tres pasos se repitieron para cada una de las especies y se indicó que se generaran 100 réplicas. Con las 100 réplicas el programa generó un documento de texto con los valores de I y D obtenidos en cada réplica, con estos valores se obtuvo un histograma de frecuencias. El tercer análisis es la “prueba de fondo ambiental” (*background test* en inglés), determina si los modelos de nicho ecológico obtenidos para dos especies son más similares que lo esperado por el azar con base a las regiones geográficas en los que se encuentran sumergidas. De acuerdo al autor de esta metodología para delimitar el fondo ambiental (*background*) de una especie es importante considerar los conocimientos de la biología de la especie y su distribución, y una estrategia sugerida es utilizar un modelo de nicho ecológico obtenido previamente. Para realizar este análisis, como primer paso en ENMTTools se ingresaron los puntos de ocurrencia de *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, como fondo para cada especie se utilizó el modelo de nicho

ecológico para cada especie (explicado anteriormente) en formato ASCII. Para comparar el modelo de nicho ecológico de *E. a. affinis* contra el fondo de *E. a. godmani* se le indicó al programa que tomara una muestra del fondo de *E. a. godmani*, igual 104 puntos, que fue el número de puntos de ocurrencia ingresados para *E. a. affinis*. En paralelo para comparar el modelo de nicho ecológico de *E. a. godmani* contra el fondo de *E. a. affinis* se le indicó que tomara una muestra de 72 puntos, número de puntos de ocurrencia ingresados para *E. a. affinis*. Con estos datos el programa generó un modelo de nicho ecológico con los puntos de la especie focal, posteriormente tomó los puntos de ocurrencia al azar dentro del fondo de la especie contraria, y generó otro modelo de nicho ecológico. Una vez obtenidos ambos modelos calculó los valores de *I* y *D*, dicho procedimiento se repitió 100 veces. De este modo, el programa generó como archivo de salida un documento de texto con los valores de *I* y *D* calculados para cada una de las 100 repeticiones de la prueba, con dichos valores se construyó un histograma de frecuencias, para *E. a. affinis* versus el fondo *E. a. godmani* y otro para los valores de *I* y *D* de *E. a. godmani* versus el fondo de *E. a. affinis*. Por último en los histogramas generados para la prueba identidad y la prueba de fondo se señaló el valor observado de *I* y el valor observado de *D* para la interpretación de los resultados.

III. Resultados

3.1 Datos genéticos

Se obtuvo un total de 104 secuencias para *Euphonia affinis*, de las cuales 23 corresponden al gen mitocondrial ND2 (1044pb), y para los genes nucleares 21 para ODC (557), 16 para MUSK (500), 22 para GAPDH (283) y 22 para BRM (314pb). En la Cuadro 5 se observan los porcentajes de composición nucleotídica, los sitios polimórficos, informativos y monomórficos. El gen ND2 presentó 89 sitios filogenéticamente informativos, siendo el gen con más sitios variables, mientras que el gen GAPDH fue el gen menos variable, con sólo un sitio filogenéticamente informativo. Los sitios filogenéticamente informativos, corresponden a sitios con dos tipos diferentes de caracteres, cada uno ocurriendo al menos dos veces, e informan acerca de la variabilidad que tiene un gen.

Cuadro 5.

Porcentaje de composición nucleotídica por gen y sitios polimórficos.

	% T	% C	% A	% G	Sitios polimórficos	Sitios parsimoniamente informativos	Sitios monomórficos
ND2	25.6	32.5	31.6	10.4	100	89	897
ODC	36.6	16.9	27.3	19.1	13	10	535
MUSK	32.6	16.8	30.5	20.3	11	8	476
GAPDH	25.4	19.9	21.0	33.7	2	1	262
BRM	34.6	12.9	34.6	17.9	3	2	288

3.1.2 Análisis filogenéticos

Los modelos evolutivos de sustitución nucleotídica seleccionados, fueron los siguientes: HKY (BRM), HKY (GAPDH), HKY (ODC), TPM1uf (MUSK) y TVM+G (ND2). Con estos parámetros se obtuvieron seis topologías (ver apéndice), una para cada gen y una topología para genes concatenados (Fig. 5), con una matriz particionada e indicando para cada gen su modelo evolutivo correspondiente.

Euphonia affinis, es monofilética para el árbol de concatenados, ND2, ODC y MUSK, con una probabilidad posterior de 1; sin embargo, no lo es para la topología obtenida para BRM y GAPDH. En las seis topologías obtenidas, el grupo hermano del clado de *E. affinis*, está formado por las especies *E. chlorotica*, *E. luteicapilla* y *E. finschi*. Dentro del clado de *E. affinis* tanto en la filogenia de concatenados como para la filogenia de los genes ND2, ODC, MUSK y BRM se obtienen dos clados uno que agrupa los individuos del oeste de México (*E. a. godmani*) y el otro grupo a los individuos del este de México y Centroamérica (*E. a. affinis*), ambos con una probabilidad posterior de 1. Los valores de distancia genéticas pareadas se muestran en la Cuadro 6.

Cuadro 6.**Distancias genéticas pareadas por gen para las especies bajo estudio.**

ND2	<i>E. a. affinis</i>	<i>E. a. godmani</i>	<i>E. chlorotica</i>	<i>E. luteicapilla</i>
<i>affinis</i>				
<i>godmani</i>	0.11**			
<i>E. chlorotica</i>	0.14*	0.17*		
<i>E. luteicapilla</i>	0.15*	0.16*	0.09*	
<i>E. finschi</i>	0.14*	0.15*	0.09*	0.03**
ODC	<i>E. a. affinis</i>	<i>E. a. godmani</i>	<i>E. chlorotica</i>	<i>E. luteicapilla</i>
<i>affinis</i>				
<i>godmani</i>	0.01**			
<i>E. chlorotica</i>	0.01**	0.01**		
<i>E. luteicapilla</i>	0.01**	0.01**	0.01**	
<i>E. finschi</i>	0.01**	0.01**	0.01**	0.01**
GAPDH	<i>E. a. affinis</i>	<i>E. a. godmani</i>	<i>E. chlorotica</i>	<i>E. luteicapilla</i>
<i>affinis</i>				
<i>godmani</i>	0.00**			
<i>E. chlorotica</i>	0.05**	0.05**		
<i>E. luteicapilla</i>	0.05**	0.05**	0.00*	
<i>E. finschi</i>	0.121*	0.121*	0.115*	0.115*
MUSK	<i>E. a. affinis</i>	<i>E. a. godmani</i>	<i>E. chlorotica</i>	<i>E. luteicapilla</i>
<i>affinis</i>				
<i>godmani</i>	0.01**			
<i>E. chlorotica</i>	0.02**	0.02**		
<i>E. luteicapilla</i>	-	-	-	
<i>E. finschi</i>	-	-	-	-
BRM	<i>E. a. affinis</i>	<i>E. a. godmani</i>	<i>E. chlorotica</i>	<i>E. luteicapilla</i>
<i>affinis</i>				
<i>godmani</i>	0.01**			
<i>E. chlorotica</i>	0.06*	0.06*		
<i>E. luteicapilla</i>	0.07*	0.07*	0.07*	
<i>E. finschi</i>	-	-	-	-

P < 0.005 P < 0.05***

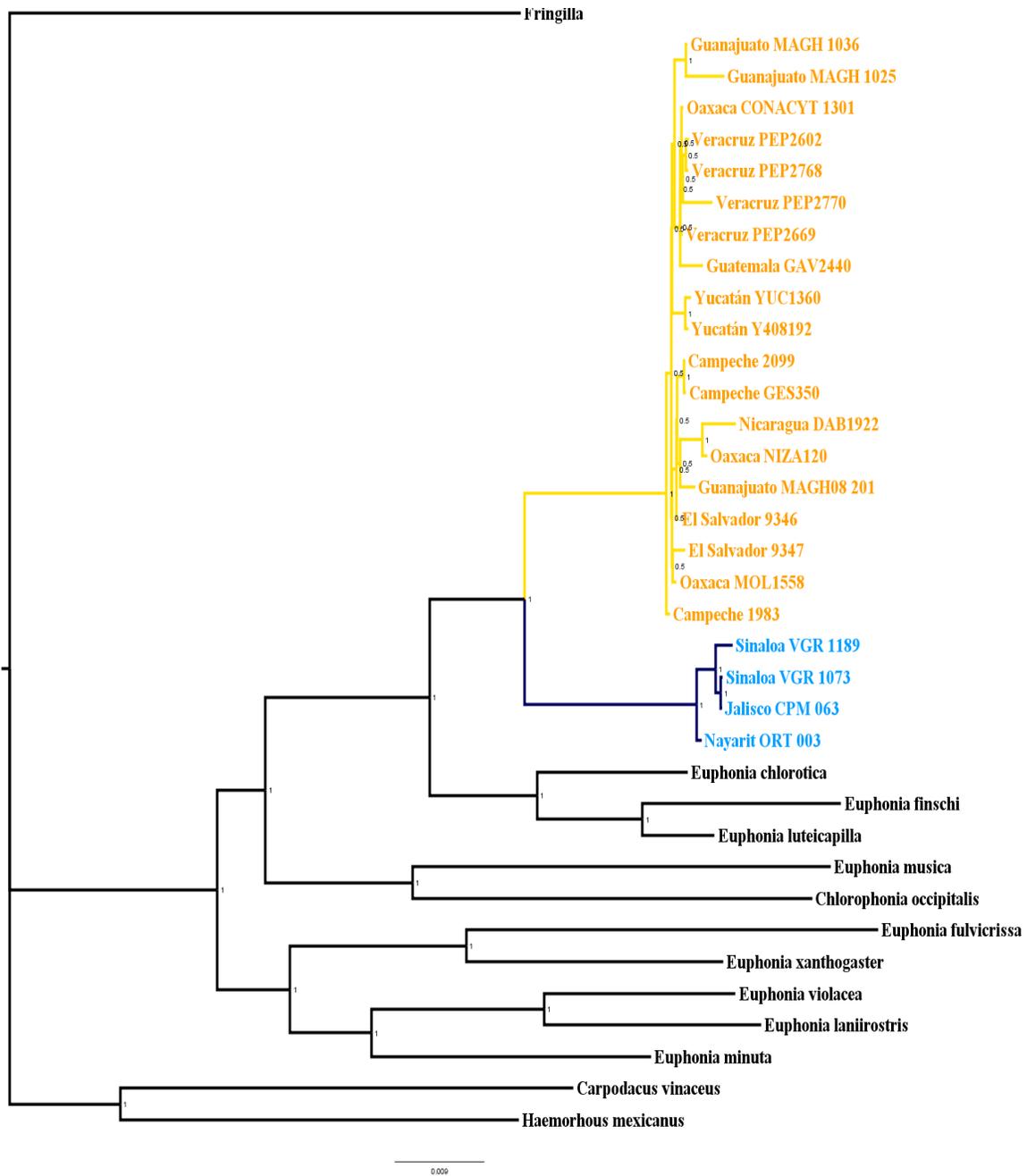


Fig. 5. Filogenia reconstruida, para genes concatenados y particionada, por el método de Inferencia Bayesiana. En color azul se representa el clado que agrupa a los individuos de *E. a. godmani* (oeste) y en amarillo a los individuos agrupados de *E. a. affinis* (este de México y Centroamérica).

3.1.3 Tiempos de divergencia

E. a. affinis y *E. a. godmani* divergieron hace 2.91 millones de años con un intervalo de 1.34-4.34 Ma, es decir, a finales del Plioceno e inicios del Pleistoceno (Fig. 6 y Cuadro 6). El clado de *Euphonia affinis* divergió de su grupo hermano hace 5 Ma, y la subfamilia Euphoninae divergió de los demás miembros de la familia Fringillidae hace 9.39 Ma.

Cuadro 7.

Tiempo de divergencia obtenidos en BEAST v1.8 (Drummond *et al.* 2007).

Valores	<i>Fringillidae</i>	<i>Carduelinae</i>	<i>Euphoninae</i>	<i>E.affinis/ E.godmani</i>	<i>Affinis</i>	<i>godmani</i>
Media	16.19	8.79	9.39	2.91	0.32	0.24
SD	0.15	0.10	9.55E-2	4.54E-2	4.03E-3	3.18E-3
Mediana	16.40	8.84	9.42	2.89	0.31	0.23
Media geométrica	15.92	8.51	9.22	2.80	0.31	0.22
Inferior HPD 95%	10.84	4.19	6.03	1.34	0.17	7.95E-2
Superior HPD 95%	21.38	12.49	12.72	4.34	0.51	0.42
ESS	334.7	403.7	322.4	297.6	518.3	943.7

SD: Desviación estándar. ESS: Tamaño efectivo de muestra.

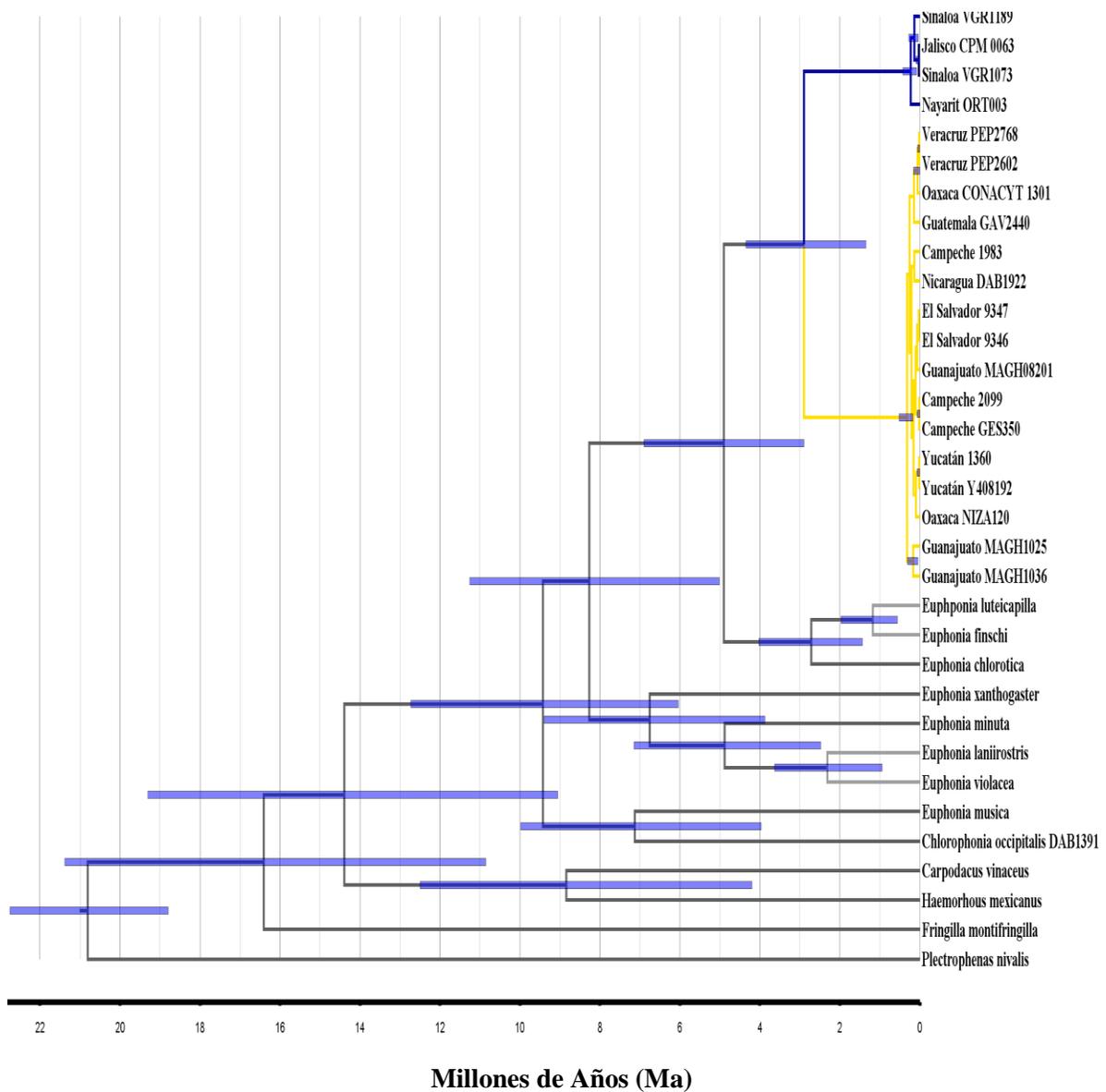


Figura. 6. Tiempos de divergencia obtenidos en BEAST v1.8 (Drummond *et al.* 2007). En azul se muestran las barras de tiempo de divergencia de cada nodo con la densidad posterior del 95%.

3.1.4 Estructura y variación genética

Las redes de haplotipos construidas con cada gen muestran una correspondencia geográfica entre los haplotipos y las poblaciones de *E. a. godmani*, en el oeste de México, y *E. a. affinis* en el este de México y Centroamérica (Fig. 7). En el caso del gen mitocondrial ND2 se obtuvieron 12 haplotipos y un valor de diversidad haplotípica (Hd) de 0.9289. La distribución geográfica de los haplotipos es la siguiente: dos haplotipos que agrupan a los individuos de *E. a. godmani*, distribuidos en el oeste de México, separados por 77 mutaciones respecto a los 10 haplotipos distribuidos en el este de México y Centroamérica, que representan a los individuos que pertenecen a *E. a. affinis*.

En patrón similar al del gene mitocondria se encontró en las redes obtenidas para los genes ODC y MUSK, donde se encontraron 11 y 7 haplotipos, y Hd de 0.8669 y 0.5668, respectivamente. La distribución geográfica de estos haplotipos está dada como sigue: para el gen MUSK 2 haplotipos en el oeste de México, separados por 3 mutaciones de los 9 haplotipos distribuidos en el este de México y Centroamérica; en la red construida para el gen ODC se encontraron 2 haplotipos distribuidos en el oeste de México, separados por 6 y 7 pasos mutacionales de los 5 haplotipos distribuidos en el este de México y Centroamérica.

Para la red del gen BRM, se detectaron 4 haplotipos, y obtuvo un valor de Hd de 0.500, de los cuatro haplotipos, uno agrupa al oeste de México, separados por un paso mutacional respecto a los haplotipos distribuidos en el este de México y Centroamérica.

Contrastando con las redes de haplotipos anteriores, la red obtenida para el gen GAPDH presentó solo tres haplotipos, de los cuales uno se encuentra distribuido a lo largo del oeste y este de México y Centroamérica. Los dos restantes se separan por un paso mutacional del haplotipo central. Para el gen GAPDH el valor de Hd fue 0.1723, siendo el gen con menor diversidad genética.

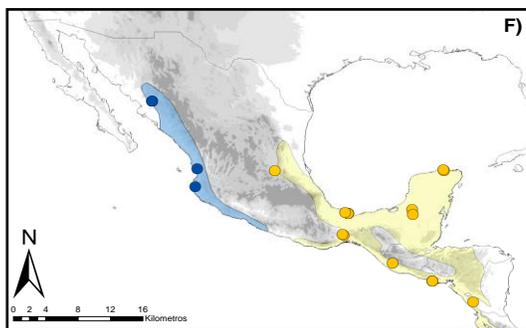
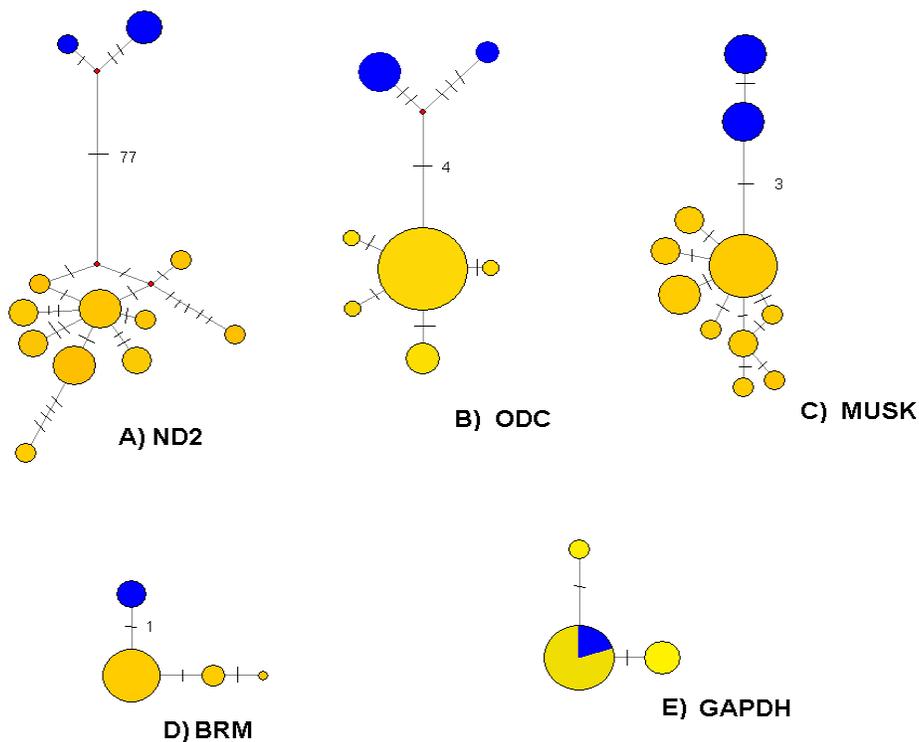


Figura. 7 Redes de haplotipos. En número se indican los pasos mutacionales entre *E. a. godmani* (azul) y *E. a. affinis* (amarillo). Dentro de los grupos, cada paso mutacional está representado por una línea. F) Distribución geográfica de los haplotipos, *godmani* representado en azul; *affinis* representado en amarillo.

Cuadro 8.
Valores de diversidad para cada gen.

	ND2	ODC	MUSK	GAPDH	BRM
Número de haplotipos	12	7	11	3	4
Diversidad haplotídica(Hd)	0.172	0.567	0.867	0.172	0.500
	σ 0.005	σ 0.006	σ 0.001	σ 0.005	σ 0.005
	SD: 0.074	SD: 0.082	SD: 0.041	SD: 0.074	SD: 0.077
Diversidad nucleotídica (Pi)	0.027	0.004	0.004	0.0006	0.00203
	σ 0.00007	σ 0.0000009	σ 0.0000003	σ 0.0000001	σ 0.000002
	SD: 0.008	SD: 0.0009	SD: 0.0005	SD: 0.074	SD: 0.0003
Theta por secuencia	27.094	3.021	2.731	0.460	0.689
Theta por sitio	0.027	0.005	0.005	0.001	0.002
Fst	0.973	0.803	0.785	0.042	0.857
D de Tajima	-0.018*	-0.673*	-0.709*	-1.138*	-0.304*

P <0.10*

3.2 Datos morfológicos

Se analizó un total de 418 ejemplares para *Euphonia affinis*, de los cuales 213 son machos y 121 hembras para la *E. a. affinis*, y 56 machos y 28 hembras para la subespecie *E. a. godmani*. El análisis de varianza entre machos y hembras para *E. a. affinis* y *E. a. godmani* muestra un valor de F con una significancia menor a 0.05 en las siguientes medidas: Cuerda Alar y Alto del Pico para ambas subespecies, y en forma adicional Largo del Culmen desde la Parte Expuesta, para la subespecie *E. a. affinis* (Apéndice 3). Por lo que los análisis posteriores se realizaron por separado para machos y hembras.

El análisis de varianza para comparar las medias de los machos entre los dos linajes *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, mostró un valor de significancia menor a 0.05 en los siguientes caracteres: Cuerda alar, Largo de la cola, Alto de la mandíbula al borde del nostrilo, Alto del pico desde la base, Largo del culmen desde la parte expuesta y Ancho del pico desde la base (Cuadro 10). Para *E. a. godmani* las medias son más grandes en cinco de los siete caracteres tomados, mientras que *E. a. affinis* presentó una media mayor en el Largo de la Cola y Largo del Culmen desde la parte expuesta (Figura 8).

Para las hembras, tenemos que el análisis de varianza mostró un valor de significancia menor a 0.05 en cinco de los siete caracteres: Largo del Tarso, Cuerda Alar, Largo de la cola, Alto del pico desde la base y Ancho del Pico desde la base (Cuadro 11). Igual que en el caso de los machos, *E. a. godmani* presenta medias mayores en cinco de los siete caracteres tomados, y las dos excepciones son las mismas (Largo de la cola y Largo del culmen desde la parte expuesta), ambas ligeramente mayores en *E. a. affinis* (Figura 9). En ambos ANOVAS, la variación fue mayor dentro de los grupos, que entre los grupos, como observamos en sus respectivas Cuadros (Cuadro 10 y 11).

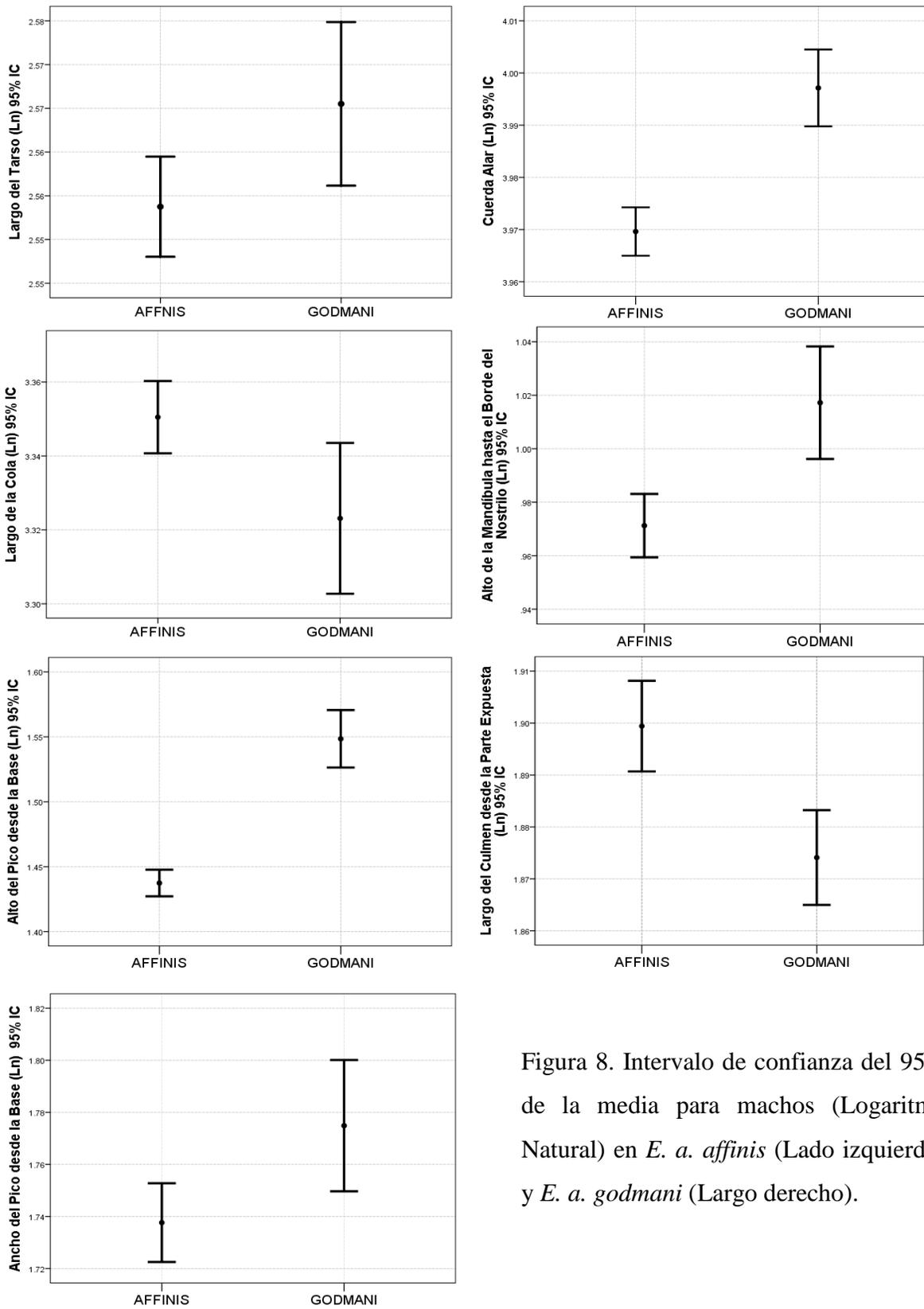


Figura 8. Intervalo de confianza del 95% de la media para machos (Logaritmo Natural) en *E. a. affinis* (Lado izquierdo) y *E. a. godmani* (Largo derecho).

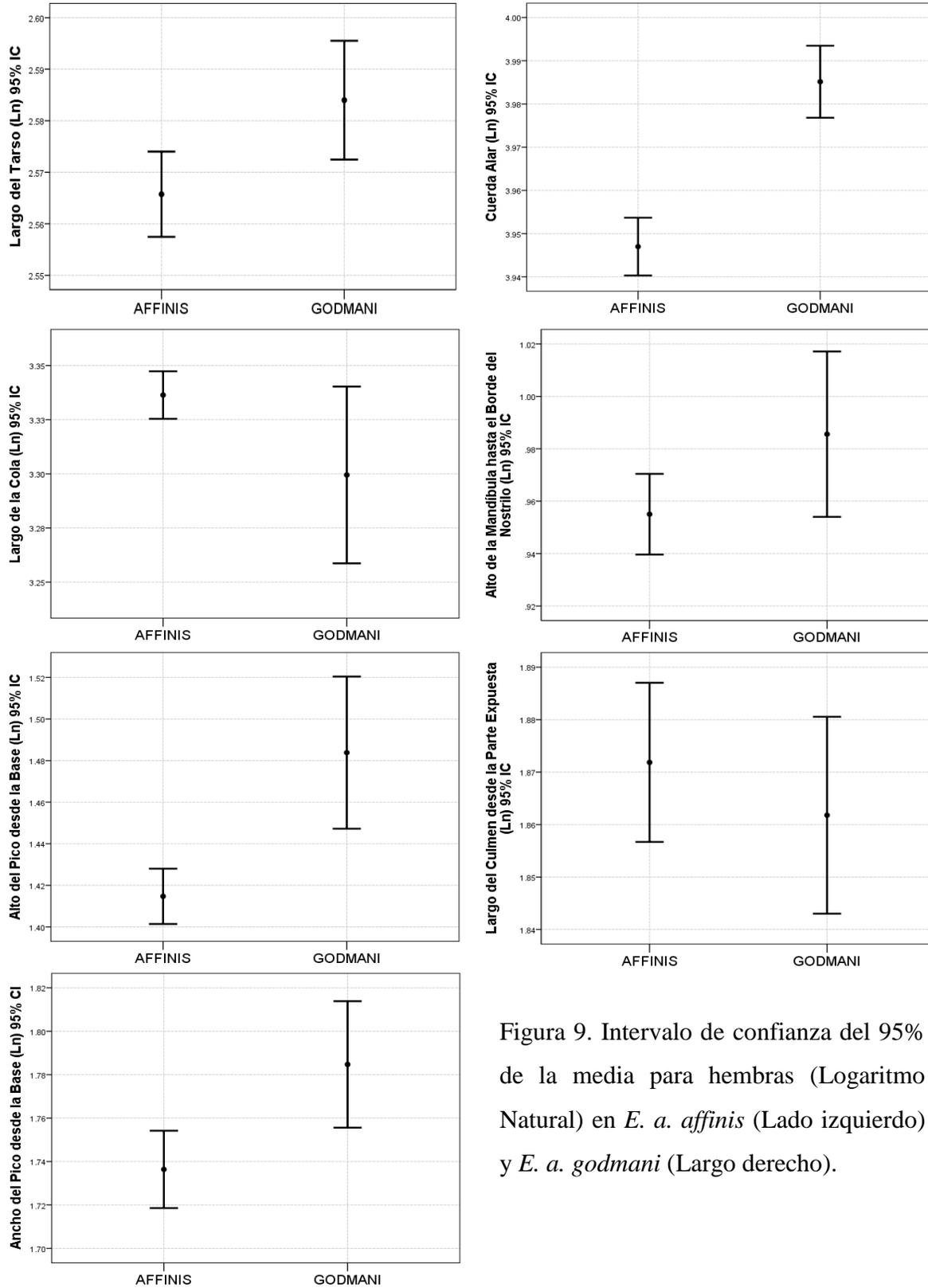


Figura 9. Intervalo de confianza del 95% de la media para hembras (Logaritmo Natural) en *E. a. affinis* (Lado izquierdo) y *E. a. godmani* (Largo derecho).

Cuadro 10.**ANOVA de los datos obtenidos para machos para comparar *E. a. affinis* y *E. a. godmani*.**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Largo del Tarso	Entre grupos	0.006	1	0.006	3.786	0.053
	Dentro de grupos	0.426	261	0.002		
	Total	0.432	262			
Cuerda Alar	Entre grupos	0.034	1	0.034	30.88	0.000
	Dentro de grupos	0.289	266	0.001		
	Total	0.323	267			
Largo de la Cola	Entre grupos	0.033	1	0.033	6.229	0.013
	Dentro de grupos	1.410	265	0.005		
	Total	1.443	266			
Alto de la Mandíbula hasta el borde del Nostrilo	Entre grupos	0.089	1	0.089	13.07	0.000
	Dentro de grupos	1.697	248	0.007		
	Total	1.786	249			
Alto del Pico desde la Base	Entre grupos	0.527	1	0.527	91.66	0.000
	Dentro de grupos	1.471	256	0.006		
	Total	1.998	257			
Largo del Culmen desde la Parte Expuesta	Entre grupos	0.028	1	0.028	8.164	0.005
	Dentro de grupos	0.907	262	0.003		
	Total	0.935	263			
Ancho del Pico desde la Base	Entre grupos	0.062	1	0.062	5.388	0.021
	Dentro de grupos	3.016	262	0.012		
	Total	3.079	263			

Cuadro 11.**ANOVA de los datos obtenidos para hembras para comparar *E. a. affinis* y *E. a. godmani*.**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Largo del Tarso	Entre grupos	0.007	1	0.007	3.948	0.049
	Dentro de grupos	0.267	144	0.002		
	Total	0.275	145			
Cuerda Alar	Entre grupos	0.033	1	0.033	27.312	0.000
	Dentro de grupos	0.178	147	0.001		
	Total	0.211	148			
Largo de la Cola	Entre grupos	0.030	1	0.030	6.078	0.015
	Dentro de grupos	0.715	145	0.005		
	Total	0.745	146			
Alto de la Mandíbula hasta el borde del Nostrilo	Entre grupos	0.020	1	0.020	3.059	0.083
	Dentro de grupos	0.902	136	0.007		
	Total	0.922	137			
Alto del Pico desde la Base	Entre grupos	0.100	1	0.100	18.053	0.000
	Dentro de grupos	0.745	134	0.006		
	Total	0.846	135			
Largo del Culmen desde la parte expuesta	Entre grupos	0.002	1	0.002	0.362	0.548
	Dentro de grupos	0.897	145	0.006		
	Total	0.899	146			
Ancho del Pico desde la Base	Entre grupos	0.053	1	0.053	5.877	0.017
	Dentro de grupos	1.329	147	0.009		
	Total	1.383	148			

En lo que respecta al análisis de componentes principales, los tres primeros componentes principales representan el 62.265 % de la varianza para machos y el 64.218 % de la varianza para hembras. De acuerdo con los valores de Eigenvalores obtenidos, las variables de mayor importancia para los componentes son: para el componente 1 Alto del Pico desde la Base y Alto de la Mandíbula hasta el Borde del Nostrilo, componente 2 Largo de la cola y Ancho del Pico desde la Base y para el componente 3 Largo del Tarso, en el caso de los machos (Cuadro 12). Para las hembras (Cuadro 13) las variables más correlacionadas con los componentes son: Para el componente 1 Alto del Pico desde la Base y Alto de la Mandíbula hasta el Borde del Nostrilo, componente 2 Ancho del Pico desde la Base y para el componente 3 el Largo de la Cola. En la figura 11 se observan los gráficos de dispersión de puntos, obtenidos para el análisis de componentes principales para machos. Para el gráfico del componente 1 versus componente 2 (Fig. 11 A) se observa que la mayor parte de los puntos para el linaje de *E. a. godmani* se concentran en el cuadrante 3 y 4, mientras que los puntos para el linaje *E. a. affinis* están dispersos en los cuatro cuadrantes. El gráfico del componente 1 versus componente 3, los puntos de *E. a. godmani* se concentran en el cuadrante 3, a diferencia de *E. a. affinis* que se dispersa en los cuatro cuadrantes (Fig. 11 B). En el gráfico del componente 3 y 2, la dispersión de los puntos es similar para ambos grupos, sin embargo, la dispersión de puntos de *E. a. godmani* se concentran más en el cuadrante 1. Para el análisis de componente en hembras, el gráfico de dispersión de puntos para el componente 1 y componente 2 presenta una dispersión de puntos similar a la de los machos, donde los puntos de *E. a. godmani* se concentran en el cuadrante 3 y 4, mientras que *E. a. affinis* se distribuye en los cuatro cuadrantes de forma similar. En el gráfico del componente 1 y componente 3, se observa que la dispersión de puntos de *E. a. godmani* se distribuye en los cuadrantes tres y cuatro, mientras que *E. a. affinis* se está distribuido en los cuatro cuadrantes. Para el tercer gráfico (componente 2 vs componente 3) la distribución de puntos para ambos grupos se encuentra en forma similar para ambos linajes, distribuyéndose en los cuatro cuadrantes.

Cuadro 12.

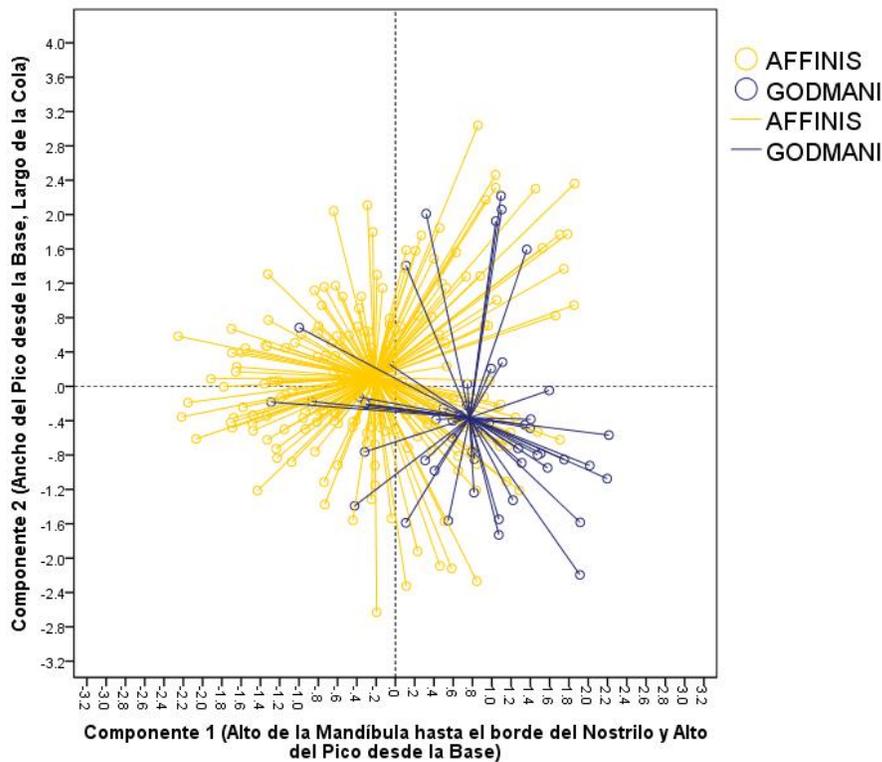
Valores de Eigenvectores para el Análisis de Componentes (Machos)

	Componente 1	Componente 2	Componente 3
LT	0.217	0.139	0.887
CA	0.607	0.412	0.247
LC	-0.244	0.674	0.058
AMN	0.781	-0.126	-0.191
APB	0.874	-0.204	-0.100
LCPE	0.386	0.276	-0.166
ANPB	-0.076	-0.721	-0.364
% de la varianza	28.629	47.158	62.265

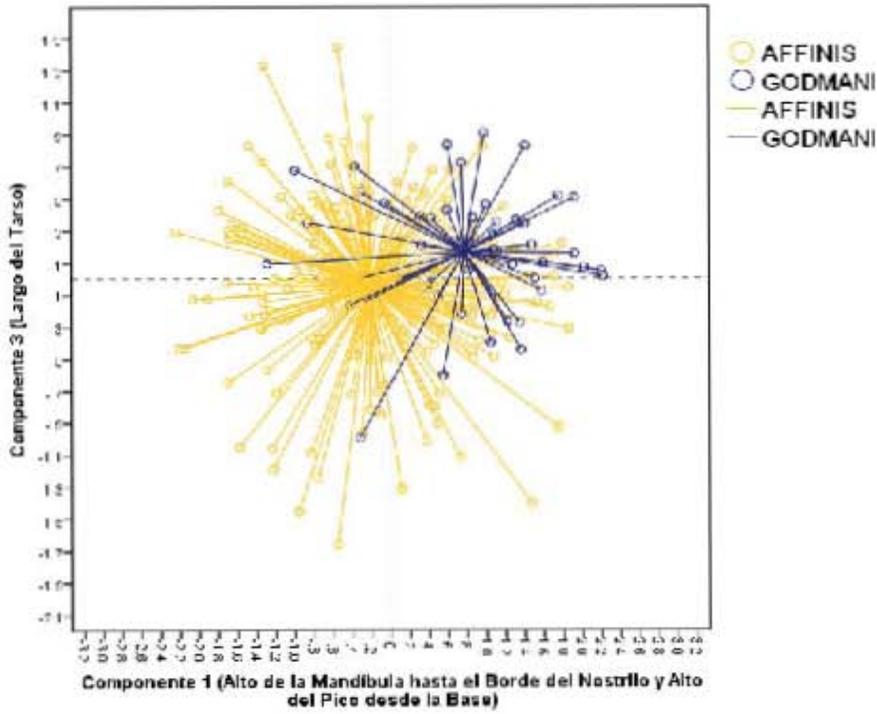
Cuadro 13.

Valores de Eigenvectores para el Análisis de Componentes (Hembras)

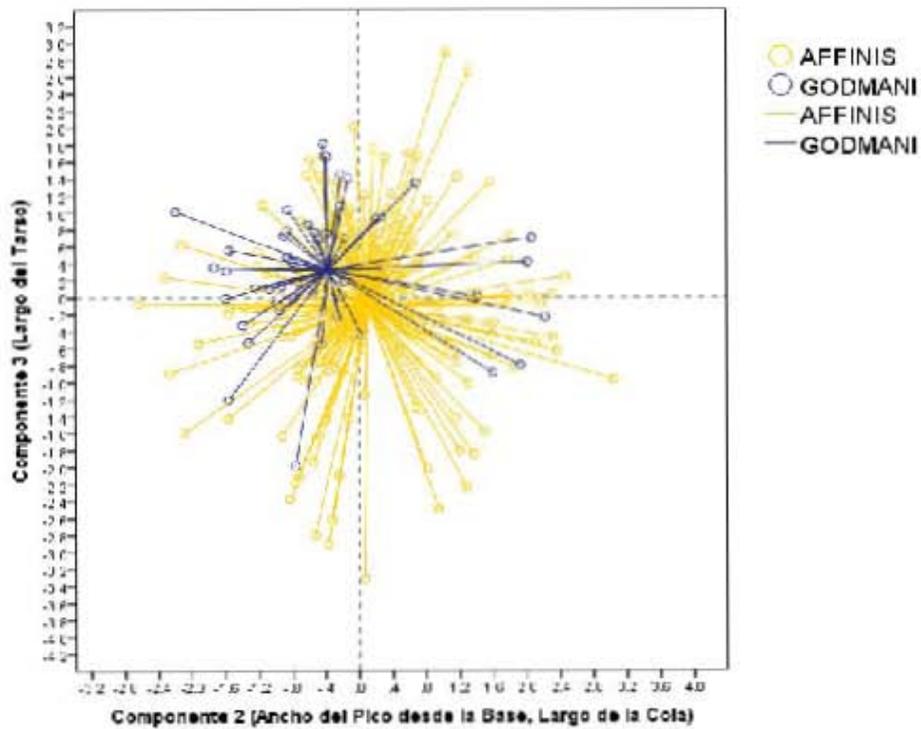
	Componente 1	Componente 2	Componente 3
LT	0.384	0.362	0.145
CA	0.592	-0.238	0.510
LC	-0.130	0.288	0.773
AMN	0.804	-0.174	-0.023
APB	0.843	-0.144	-0.062
LCPE	0.436	0.505	-0.444
ANPB	0.096	0.843	-0.068
% de la varianza	32.181	48.468	64.218



A)

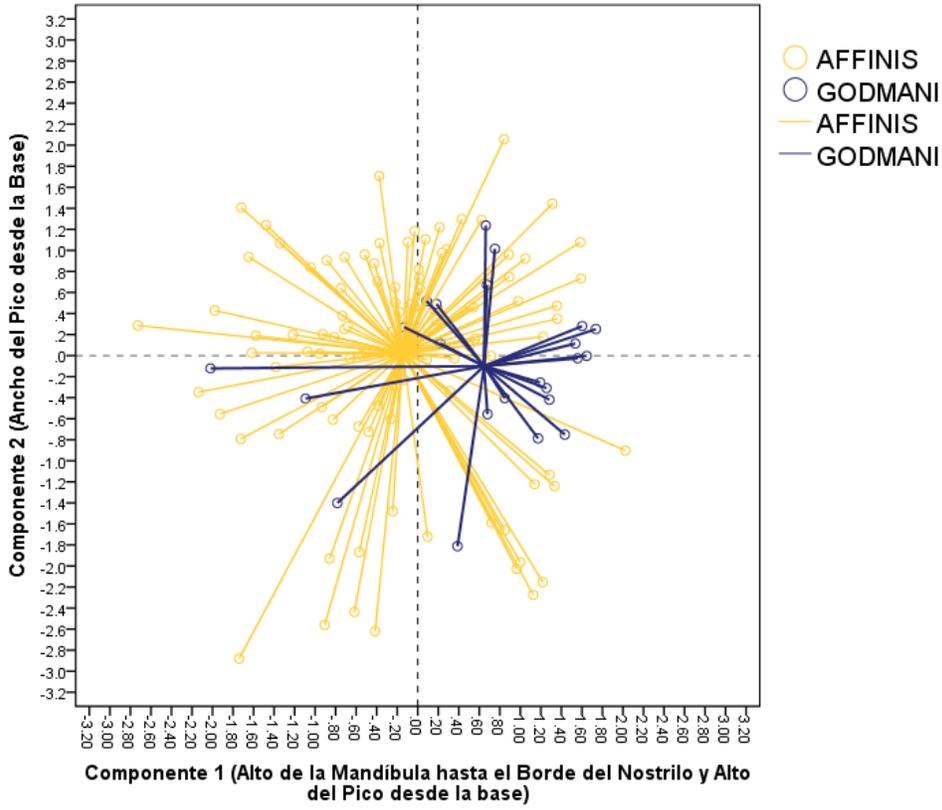


B)

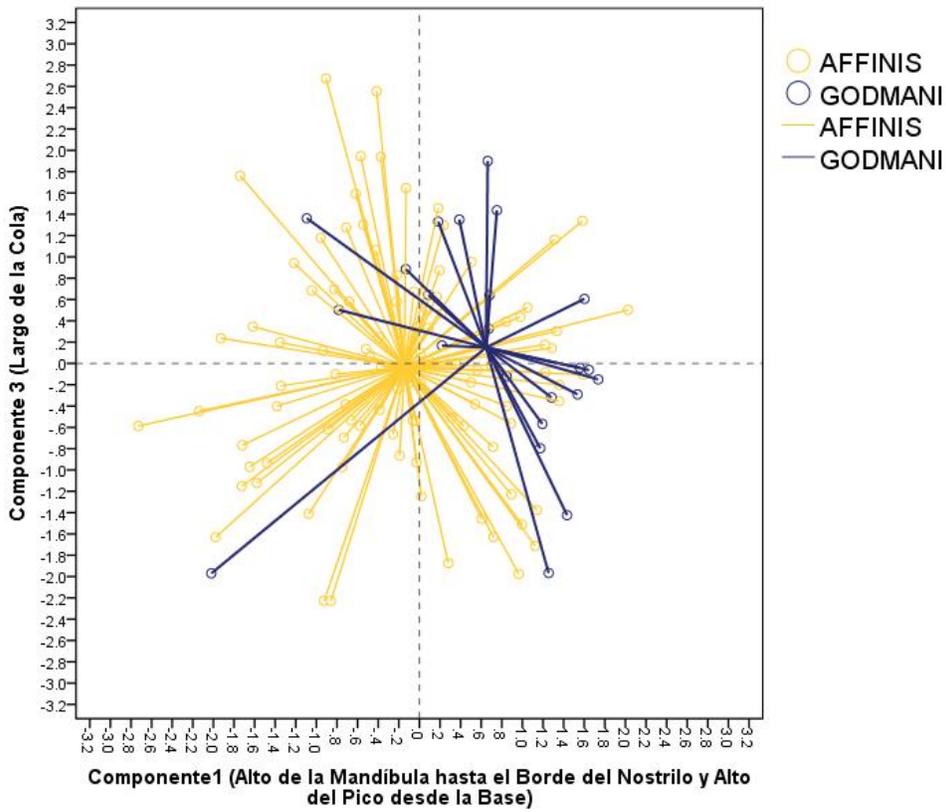


C)

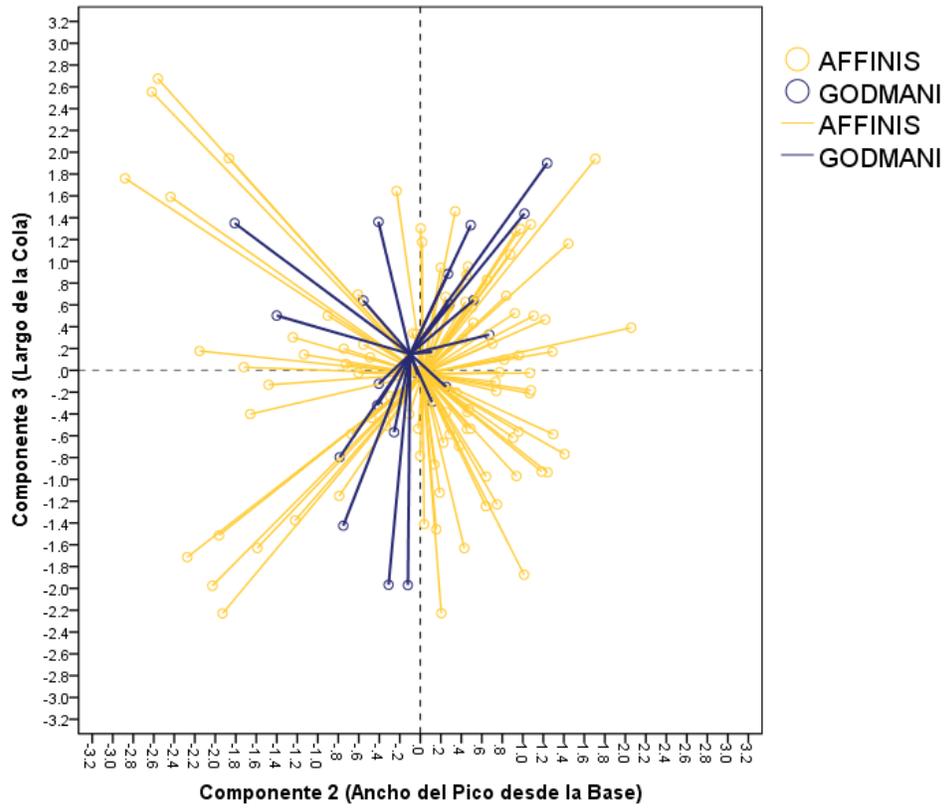
Fig. 11 Gráficos de Análisis de Componentes Principales para Machos. A) Componente 1 versus Componente 2. B) Componente 1 versus Componente 3. C) Componente 2 versus Componente 3. Las líneas representan la unión al centroide de cada grupo.



A)



B)



C)

Fig. 12 Gráficos de Análisis de Componentes Principales para Hembras. A) Componente 1 versus Componente 2. B) Componente 1 versus Componente 3. C) Componente 2 versus Componente 3. Las líneas representan la unión al centroide de cada grupo.

3.3 Modelado de Nicho Ecológico

3.3.1 Modelado de Nicho Ecológico actual y paleodistribuciones

Para ambos linajes se eligió el modelo que presentara un valor de AUC mayor de las veinte réplicas obtenidas para los puntos con los que se modeló. En el caso de *E. a. affinis* un valor de AUC de 0.918 para el modelo elegido y 0.894 en promedio. Mientras que *E. a. godmani* obtuvo un valor promedio de 0.983 de AUC y 0.990 para el mejor modelo obtenido. De las trece variables obtenidas de acuerdo con la prueba de *Jackknife* (Apéndice 4) que realiza MAXENT, las variables con mayor importancia para generar los modelos fueron: la BIO7 que describe el rango de temperatura anual y la BIO 8 que describe la temperatura media del trimestre mes más húmedo para *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, respectivamente.

En las distribuciones obtenidas para ambos linajes se observa una superposición de ambos grupos en el centro de la Vertiente del Pacífico (Desde el Sur de Sinaloa hasta Chiapas) (Fig. 13 a y b), sin embargo, de acuerdo a los registros obtenidos para los análisis realizados en este estudio, ambos linajes tienen como límite de distribución el centro de Guerrero.

En las proyecciones para el Último Máximo Glaciar en la figura 13(a- d), se observa que *E. a. affinis*, muestra una reducción de distribución respecto a la actual, con un hueco en el Istmo de Tehuantepec, y ausencia de predicción en el noreste de México, aunque presenta una expansión potencial de su rango de distribución hacia las Islas del Caribe y Cuba (donde no se encuentra actualmente).

Por otra parte, *E. a. godmani* muestra una reducción de la distribución del nicho ecológico, hacia al Oeste de México, con un hueco en el Istmo de Tehuantepec. Para el Último Interglaciar (Fig. 14 e y f) se observa una expansión de la distribución de *E. a. affinis* y un desplazamiento hacia el centro y oeste de México, además de una amplia distribución hacia Centroamérica. En contraste *E. a. godmani*, muestra una distribución similar a la actual, restringida al centro y sur de la Vertiente del Pacífico en México.

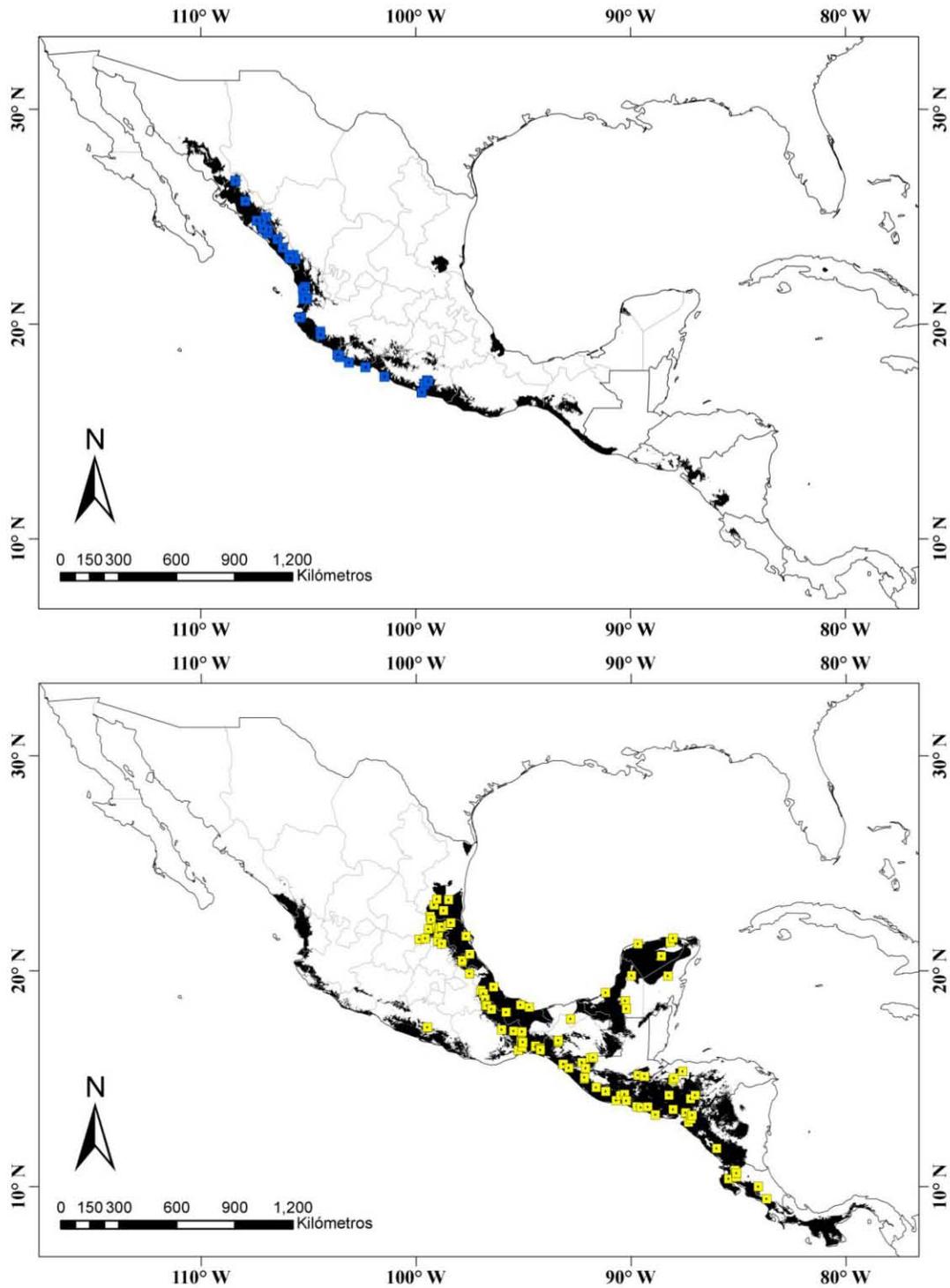


Fig. 13. Distribuciones geográficas obtenidas por medio de Modelo de Nicho Ecológico. A) Área predicha para *E. a. godmani*, cuadros azules indican los puntos de ocurrencia para *E. a. godmani*. B) Área predicha para *E. a. affinis*. Cuadros amarillos indican los puntos de ocurrencia para *E. a. affinis*.

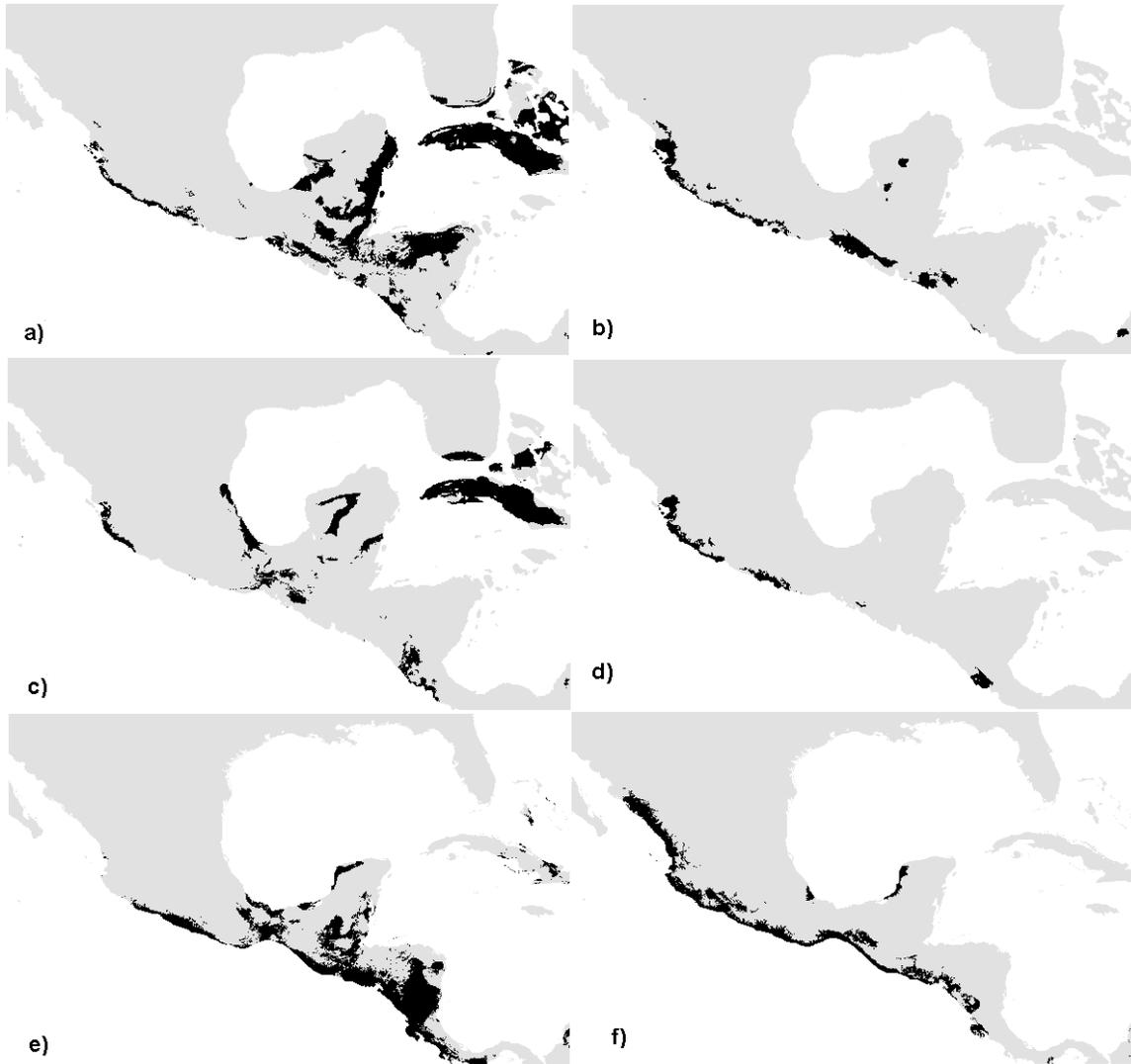


Fig. 14. Paleodistribuciones obtenidas por la proyección de Nicho Ecológico para *E. a. affinis* (izquierda) y *E. a. godmani* (derecha). Último Máximo Glaciar (~22,000) para el escenario MIROC (a) y el escenario CCSM (c). Último Interglaciar (~120, 000 -140, 000) e y f.

3.3.2 Superposición de Nicho Ecológico

En el Análisis de Componentes Principales, se rescata el 95.359% de la variación total, y en la gráfica de los componentes (Fig. 15), observamos que en el espacio ambiental existe una superposición de ambos linajes, además de que el linaje *E. a. affinis* presenta un espacio ambiental mayor a diferencia de *E. a. godmani*, que podría decirse que tiene un espacio ambiental restringido. Las variables ambientales que aportaron más información a los componentes fueron (>0.7): BIO 1, BIO 6, BIO 8, BIO 9, BIO 10, y BIO 11 para el

componente 1, BIO 12 para el componente 2 y BIO 14 para el componente 3. Todas estas relacionadas con temperatura, a excepción de la BIO 12 que representa la precipitación anual (Cuadro 15) y BIO 14 que representa la precipitación del mes más seco.

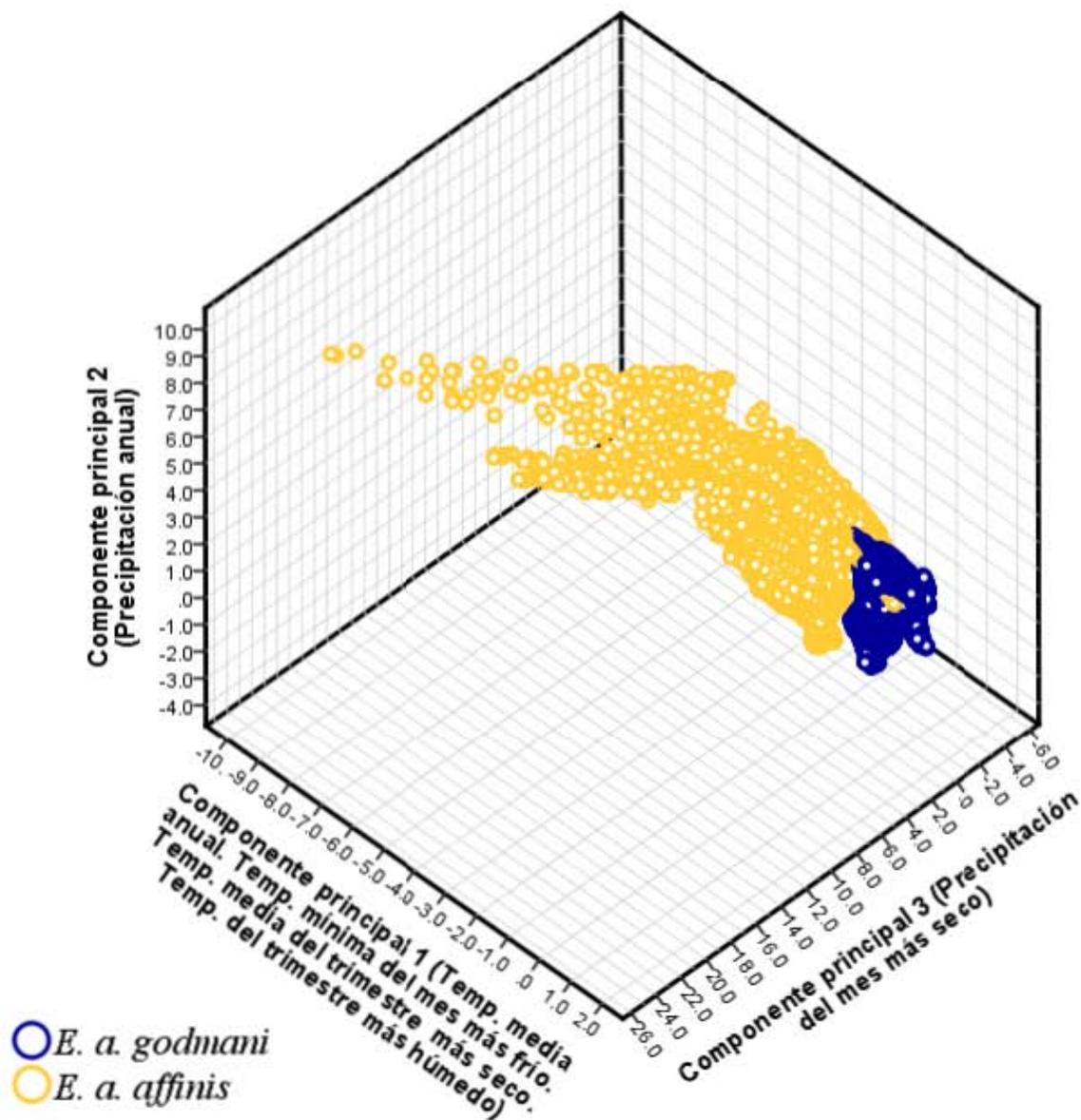


Fig. 15. Distribución de casos en el espacio ambiental, generado por los tres componentes con mayor porcentaje de variación 95.359% y las variables con mayor contribución para cada componente se marcan en negritas en el cuadro 14.

Cuadro 14.

Valores de Eingenectores (APC).

Componente	1	2	3
BIO1 Temp. media anual	0.952	0.300	-0.015
BIO4 Temp. estacional	-0.292	0.684	0.606
BIO5 Temp. máxima del mes más cálido	0.722	0.638	0.182
BIO6 Temp. mínima del mes más frío	0.971	-0.074	-0.180
BIO7 Rango de temperatura anual	-0.551	0.674	0.390
BIO8 Temp. media del trimestre del año más húmedo	0.846	0.491	0.158
BIO9 Temp. media del trimestre del año más seco	0.962	0.232	-0.003
BIO10 Temp. media del trimestre del año más húmedo	0.861	0.484	0.144
BIO11 Temp. media del trimestre del año más seco	0.971	0.081	-0.195
BIO12 Precipitación anual	0.617	-0.723	0.087
BIO14 Precipitación del mes más seco	0.272	-0.687	0.648
BIO16 Precipitación del trimestre del año más húmedo	0.666	-0.622	-0.036
BIO17 Precipitación del trimestre del año más seco	0.274	-0.695	0.645
% Varianza	54.304	83.723	95.359

Cuadro 15.

Estadísticos descriptivos para las variables ambientales con mayor importancia de acuerdo al Análisis de Componentes Principales.

	<i>Euphonia affinis godmani</i>				<i>Euphonia affinis affinis</i>			
	Media	Máx.	Mín.	SD	Media	Máx.	Mín.	SD
BIO1 (°C)	25.73	29.2	21	1.54	20.03	28.80	11.30	4.44
BIO6 (°C)	14.03	21.8	7.1	4.08	9.40	21.60	-5.80	6.01
BIO7 (°C)	21.75	32.6	12.5	5.24	20.83	32.80	9.30	4.71
BIO8 (°C)	28.48	32.6	23	1.69	21.21	30.10	1.20	4.18
BIO9 (°C)	24.76	29.4	19.2	1.98	18.74	29.00	0.90	4.76
BIO10 (°C)	28.92	32.6	23.5	1.52	22.11	31.50	2.40	4.33
BIO11 (°C)	22.14	28.3	16.3	3.42	17.50	27.80	0.40	4.94
BIO12 (mm)	950	2374	197	437.54	1231.06	5581.00	155.00	840.08
BIO14 (mm)	1	2	0	0.42	12.41	238.00	0.00	20.54

Los valores observados de superposición de nicho ecológico, indican una superposición moderada entre los dos nichos ecológicos de acuerdo con los valores de $I = 0.5$ y $D = 0.25$. En la figura 16 se observan los histogramas de frecuencias obtenidos para la prueba de Identidad 16 A) para los valores de I y 16 B) para los valores de D , con sus respectivos valores observados de I y D en un recuadro rojo. En ambos histogramas el valor observado, es menor a los valores representados en los histogramas de frecuencia que fueron obtenidos al azar, por lo que se considera que los nichos ecológicos para cada especie son lo suficientemente distintos de los nichos ecológicos obtenidos al azar. Los resultados de la prueba de fondo se observan en la figura 17, 17 A) para los valores de I y 17 B) para los valores de D . De la misma forma que en la prueba de identidad se indica en un rectángulo rojo los valores observados de I y D . Los resultados de este análisis se interpretan como sigue: valores más bajos o más altos a la distribución de histograma de frecuencias se interpretarán como diferencias significativas entre el nicho ecológico de una especie y el fondo ambiental de la otra, mientras que si los valores observados caen dentro de los histogramas de frecuencias, no habrá evidencia de diferencias significativas en los valores. De acuerdo con los resultados obtenidos para los valores observados de I y D para la prueba de fondo ambiental (Fig. 17), se rechazan las diferencias entre los nichos ecológicos obtenidos para cada especie y el fondo ambiental en el que están sumergidas.

Los resultados de APC, la prueba de identidad y la prueba de fondo ambiental, sugieren que el nicho ecológico de *E. a. affinis* y su tolerancia a las variables climáticas es mucho mayor respecto a *E. a. godmani*, mientras que esta última parece tener un nicho ecológico más restringido.

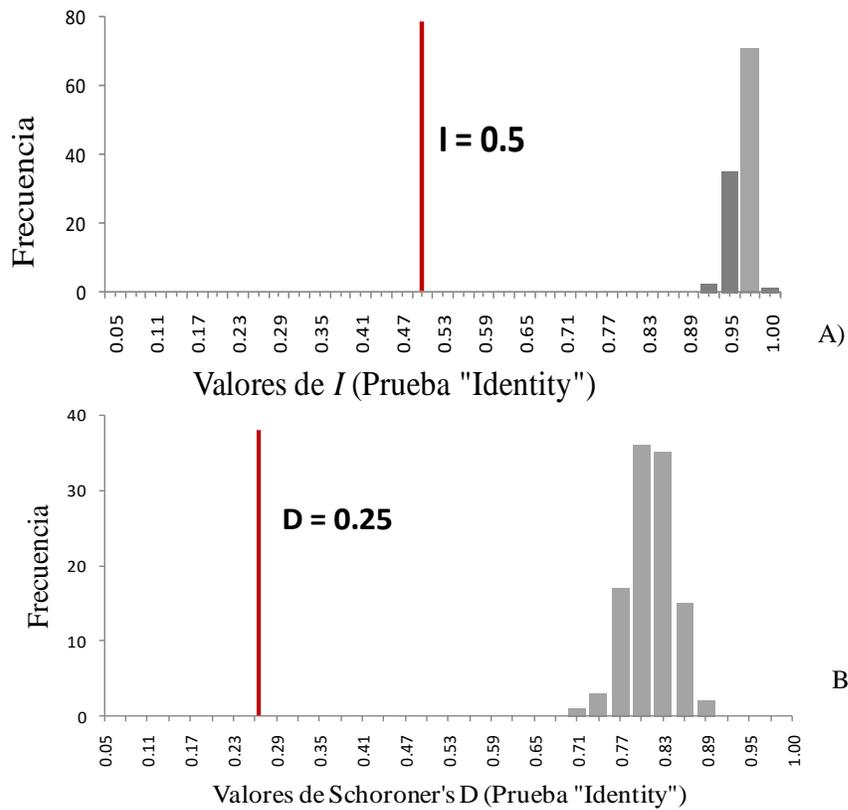


Fig. 16. Prueba de identidad de Nicho Ecológico. A) Valor de I se indica con el rectángulo rojo ($I=0.5$), los histogramas indican las frecuencias de los valores aleatorios obtenidos. B) Valor de D se indica con el rectángulo rojo ($D=0.25$), los histogramas indican las frecuencias de los valores aleatorios obtenidos.

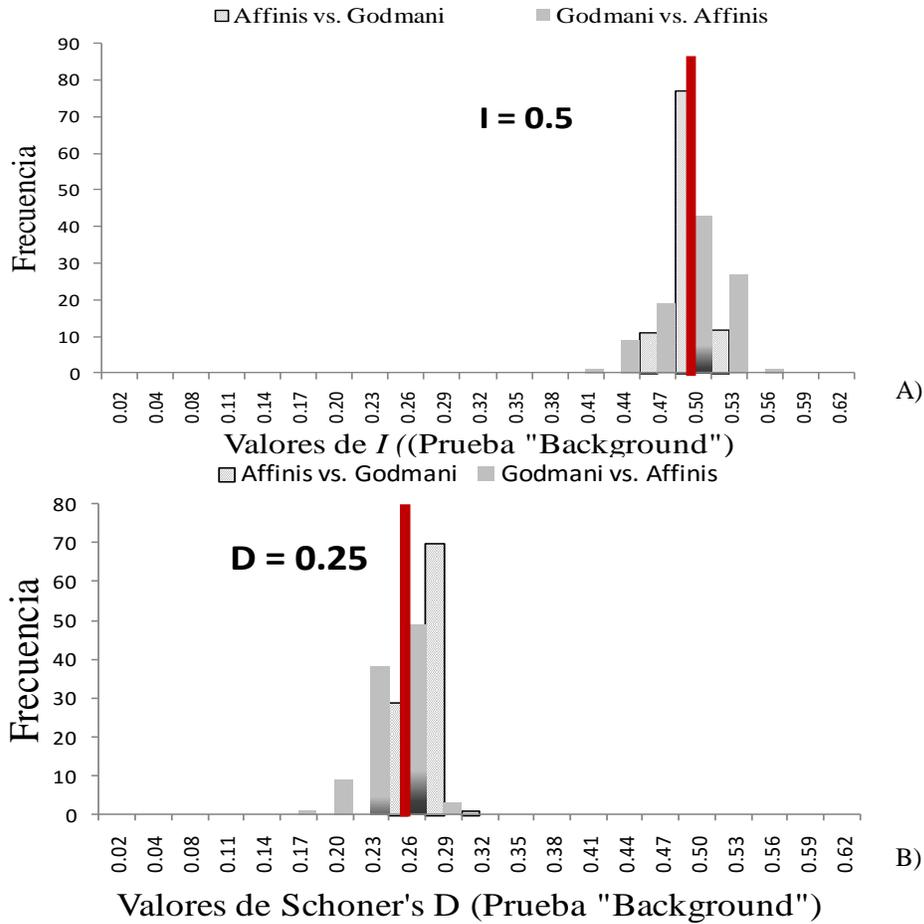


Fig. 17. Prueba de fondo (*Background*). En la figura 16 (A) En el histograma se observan las frecuencias de los valores del índice I obtenidos de forma aleatoria de la comparación del nicho ecológico y el fondo, el valor de I está indicado con el rectángulo rojo ($I=0.5$). (B) En el histograma se observan las frecuencias de los valores del índice D obtenidos de forma aleatoria de la comparación del nicho ecológico y el fondo (background), el valor de D está indicado con el rectángulo rojo ($D=0.25$).

IV. Discusión

Los resultados de este trabajo aportan evidencia de dos linajes evolutivos independientes dentro de *Euphonia affinis*: *E. affinis* y *E. godmani*, distribuidos en el este de México y Centroamérica, y en el oeste de México, respectivamente. En lo que respecta a la subespecie *E. a. olmecorum* descrita por Dickerman en 1982 (Hilty 2014), no se encuentra evidencia que soporte este subgrupo a nivel genético, morfológico y ecológico.

De acuerdo con los datos multilocus, la divergencia de los dos linajes ocurrió en el Plioceno tardío e inicios del Pleistoceno ~2.9 Ma con un intervalo de 4.34 a 1.34 Ma, posiblemente a causa de la reducción de los bosques tropicales durante los periodos glaciares (Gentry 1982, Smith y Klicka 2010).

En lo que respecta a los datos morfométricos de acuerdo a los análisis univariados existen diferencias significativas en seis de los siete caracteres tomados en machos, mientras que en hembras cuatro de los siete caracteres muestran diferencias significativas. Lo que complementa la diferenciación morfológica del patrón de plumaje previamente reportada: *E. affinis* con las plumas cobertoras subcaudales en color amarillo y *E. godmani* con las plumas cobertoras subcaudales en color blanco (Ridgway y Friedman 1901, AOU 1998, Howell and Webb 1995, Hilty 2011).

A nivel ecológico se encontró que el linaje que habita el Oeste de México presenta un Nicho Ecológico más limitado respecto al linaje del Este, de acuerdo al análisis de componentes principales y a los nichos ecológicos obtenidos existe una superposición de ambos nichos, sin embargo, existen áreas geográficas y características ambientales que no comparten. De acuerdo a la prueba de identidad ambos linajes presentan diferencias significativas para predecir el nicho ecológico de la otra, aunque de acuerdo a la prueba de fondo ambiental no es posible distinguir el nicho ecológico de ambos linajes del fondo ambiental en que se encuentran sumergidos.

4.1 Relaciones filogenéticas

Los resultados filogenéticos, basados en genes nucleares y en el gen mitocondrial ND2, aportan evidencia de la separación de *E. godmani* y *E. affinis*. A diferencia de ODC, MUSK y ND2, los genes nucleares GAPDH y BRM no muestran una monofilia recíproca entre los grupos *E. godmani* y *E. affinis*. Dicha discordancia en las genealogías puede deberse a una repartición incompleta de linajes (*incomplete lineages sorting*), ya que, debido a eventos estocásticos en los linajes, homoplasia, tiempos de divergencia y/o diferencias de las tasas de mutación en los genes, las filogenias de los diferentes genes no siempre convergerán en una sola filogenia para los organismos (McCracken y Sorenson 2005; Martínez-Castilla 2007).

De acuerdo a los resultados, *Euphonia a. affinis* y *E. a. godmani*, representan dos linajes evolutivamente independientes, que pueden considerarse dos especies, como ha sido considerada previamente por Ridgway y Friedman (1901) en su libro Aves de Norteamérica, y por Navarro-Sigüenza y Peterson (2004) en su propuesta taxonómica de aves de México bajo el Concepto Evolutivo de Especie. Al comparar las distancias genéticas entre *E. a. affinis* y *E. a. godmani* para el gen ND2 es alta y puede ser equiparable con las especies filogenéticamente más cercanas, en el caso de los genes nucleares, ODC y MUSK aportan evidencia de una distancia genética igual o equiparable a la las especies más cercanas al complejo de *E. affinis* y *E. godmani*, mientras que los genes BRM y GAPDH, no presentan una distancia genética significativa. Sin embargo, la distancia genética encontrada entre *E. a. affinis* y *E. a. godmani* puede ser considerado suficiente para distinguir entre dos especies y es similar al encontrado en otras aves distribuidas en México y Centroamérica (McCormack *et al.* 2008; Arbeláez-Cortés y Navarro-Sigüenza 2013; Zamudio-Beltrán y Hernández-Baños 2015).

Respecto a las relaciones filogenéticas, con otras especies de la subfamilia Euphoniinae, el clado formado por *E. affinis* y *E. godmani*, se encuentran cercanamente relacionado con *E. chlorotica*, *E. luteicapilla* y *E. finschi*, y de acuerdo con las distancias genéticas, la especie más cercana filogenéticamente es *E. chlorotica*, como ha sido sugerido por Hilty (2010). Ridgway y Friedman (1901) describen una similitud morfológica en el

patrón de plumaje de *E. godmani* con *E. minuta*, no obstante en la filogenia obtenida, *E. minuta* se encuentra fuera del clado formado por *E. affinis*, *E. godmani*, *E. chlorotica*, *E. luteicapilla* y *E. finschi*.

4.2 Historia biogeográfica

El género *Euphonia* es un género de distribución Neotropical, con la mayor diversidad de especies en Sudamérica. Con base a análisis multilocus, se determinó que los géneros *Chlorophonia* y *Euphonia* forman la subfamilia Euphoninae, dentro de Fringillidae (Yuri y Mindell 2002; Zuccon *et al.* 2012), sin embargo, las relaciones filogenéticas entre los géneros aún no están determinadas, y es probable que la clasificación actual describa grupos parafiléticos y polifiléticos (Yuri y Mindell 2002; Zuccon *et al.* 2012).

Actualmente se desconoce la historia biogeográfica de la subfamilia Euphoninae, sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo el origen temporal de la subfamilia Euphoninae se ubica en el Mioceno medio aproximadamente hace 9.3969 Ma con un intervalo de 6.03-12.72 Ma. Es probable que su origen geográfico sea Sudamericano, con eventos posteriores de dispersión hacia Norteamérica a través de la compleja formación del Istmo de Panamá. Esto es similar a lo reportado en otros taxa distribuidos actualmente en el límite norte de la región Neotropical y el Caribe (Ej. Greenbaum *et al.* 2011; Barker *et al.* 2015). Aproximadamente hace ~ 6 Ma, la migración de aves de Sudamérica hacia Norteamérica aumentó considerablemente (Smith y Klicka 2010; Bacon *et al.* 2015), y conforme el Istmo de Panamá fue cerrando, los eventos de dispersión aumentaron, así como la formación de distintos linajes, promovidos por eventos de vicarianza asociados a la formación de tierra firme, vulcanismo, oscilaciones de nivel del mar y clima (Bacon *et al.* 2015). Siendo Mesoamérica un área de alta diversidad biológica al ser una zona de transición de la biota Neártica-Neotropical, además de una compleja historia y estructura geológica (Morrone 2010; Bryson *et al.* 2011).

Dentro de *E. affinis*, la divergencia entre los linajes *E. a. godmani* (O-México) y *E. a. affinis* (E- México y CA), ocurrió hace ~2.9 Ma (1.34-4.34 Ma). La presencia de un linaje evolutivamente independiente entre Oeste y Este en las tierras bajas de México y

Centroamérica es un patrón repetido en diversos grupos biológicos, con orígenes temporales diferentes y vinculados a las fluctuaciones climáticas durante el Mioceno, Plioceno y Pleistoceno algunos ejemplos son: anfibios (Ej Greenbaum *et al.* 2011), reptiles (Ej. Ruane *et al.* 2014), mamíferos (Ej. Castañeda-Rico *et al.* 2014), plantas (Ej. de-Nova *et al.* 2012) y aves (Ej. Arbeláez-Cortés y Navarro-Sigüenza 2013).

Para *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, el periodo de divergencia está situado entre el Plioceno tardío e inicios de Plesitoceno (2.9 Ma.). A diferencia del Mioceno tardío y Plioceno temprano (~7- 3.5 Ma), periodos de tiempo caracterizados por un aumento en la temperatura global, el Plioceno tardío (~3 Ma), presentó un enfriamiento global y continuo, predecesor de las oscilaciones climáticas del Pleistoceno, caracterizadas por periodos glaciares e interglaciares (Zachos *et al.* 2001). Durante el avance de los glaciares a latitudes más bajas que los polos, las especies que habitan las zonas templadas se expandieron hacia zonas con altitudes más bajas (Ej. Moreno-Letelier *et al.* 2014), mientras que la vegetación de las zonas tropicales redujo su distribución geográfica. Por ejemplo, los bosques tropicales perennifolios se vieron afectados por periodos menos húmedos que promovieron su reducción geográfica, lo que probablemente propició la especiación de especies vegetales (Gentry 1982), y en la fauna que habita dichos bosques, por ejemplo en especies de aves (Smith y Klicka 2010). Por otra parte los Bosques Tropicales Caducifolios, que se caracterizan por una temporada húmeda y otra de sequía, también mostraron una reducción y fragmentación de su distribución geográfica. En México y Centroamérica la reducción de los Bosques Tropicales Caducifolios ha sido asociada a una mayor diversidad de especies vegetales, así como un mayor número de endemismos (Ej. Willis *et al.* 2014), la fragmentación de los bosques tropicales caducifolios de las tierras bajas de México y Centroamérica, también se ha asociado a la estructura genética en las poblaciones de algunas aves que habitan este tipo de vegetación en México (Ej. Arbeláez-Cortés 2014). De acuerdo a la literatura, *E. a. affinis* y *E. a. godmani* se distribuyen en el Bosque tropical Caducifolio, los límites del Bosque Tropical Perennifolio y el Bosque de galería (Hilty 2011, Howel and Web 1998), por lo que probablemente sus poblaciones se fragmentaron durante los periodos glaciares que se presentaron a partir del final del Plioceno y durante todo el Pleistoceno. Esto coincide con las proyecciones de nicho ecológico hacia el

Pleistoceno, donde se observa que durante el último máximo glacial, la distribución de ambos linajes *E. a. affinis* y *E. a. godmani* muestran una reducción y fragmentación de su distribución geográfica. Probablemente la separación de ambos linajes, fue el resultado de la fragmentación de sus poblaciones en los periodos de enfriamiento global durante el Plioceno tardío y el Pleistoceno.

De acuerdo a los resultados de modelado de nicho ecológico la distribución geográfica actual de *E. a. godmani* parece estar limitada al Oeste de México, condición que se acentúa en los periodos glaciares, donde también se observa una ausencia de predicción a la altura del Istmo de Tehuantepec. El Istmo de Tehuantepec ha sido una causa repetida en el surgimiento de linajes evolutivamente independientes en especies distribuidas a lo largo de México y Centroamérica, siendo una barrera geográfica tanto para las poblaciones de tierras altas (Barber y Klicka 2010), como en especies de tierras bajas con linajes evolutivamente independientes en el Norte y Sur del Istmo (Ej. Mulcahy *et al.* 2006, Greenbaum *et al.* 2011) y en el Este – Oeste del Istmo (Vázquez-Miranda *et al.* 2009), una de las razones por las que se le ha atribuido ser una barrera para las especies que se distribuyen en las tierras bajas es el aumento del nivel del mar a la altura del Istmo de Tehuantepec hace ~ 2.8 Ma, dentro de las oscilaciones del nivel del mar durante finales del Plioceno e inicios del Pleistoceno (Mulcahy *et al.* 2006), periodo que coincide con la divergencia de los linajes evolutivamente independientes *E. a. affinis* y *E. a. godmani*. Por lo que si bien el Istmo de Tehuantepec no representa la principal causa de divergencia, pudo haber complementado el aislamiento de las poblaciones del Oeste de México y Este de México Centroamérica.

Para *E. a. affinis* y *E. a. godmani* el índice de fijación genética F_{ST} (> 0.8) que se obtiene en tres de los cuatro genes nucleares utilizados (ODC, MUSK y BRM) y el gen mitocondrial ND2, nos informa sobre una separación de las poblaciones, además que las redes de haplotipos muestran una correspondencia geográfica de los haplotipos (*E. godmani*: oeste y *E. affinis*: este de México y Centroamérica), a excepción del gen GAPDH, con el que ambos linajes comparten haplotipos. La baja resolución a nivel interespecífico del gen GAPDH coincide con sus bajos valores de diversidad de

nucleotídica y haplotídica, y pocos caracteres informativos, además de ser un resultado similar al encontrado en otros estudios de aves a nivel interespecífico (Cortés-Rodríguez *et al.* 2013; Arbeláez-Cortés y Navarro-Sigüenza 2013; Pavlova *et al.* 2014). A pesar de la evidencia encontrada de dos linajes evolutivamente independientes a nivel genético, es preciso señalar la limitante de este trabajo para describir los linajes evolutivamente independientes en la evidencia a nivel genético. Debido a que se cuenta con sólo cuatro muestras del linaje del Oeste, que provienen de su distribución más norteña, por lo que habría que complementar el muestreo del linaje *E. a. godmani* hacia el sur de su distribución (Guerrero y Oaxaca), donde con base en los resultados de modelado de nicho ecológico podría encontrarse una posible zona de hibridación entre *E. a. affinis* y *E. a. godmani*.

La evidencia de linajes evolutivos independientes para el este y oeste de las tierras bajas de México y Centroamérica, reafirma las provincias biogeográficas propuestas para la Costa del Pacífico Mexicano y el Golfo de México con base a entomofauna (Morrone 2006) y con los dos grupos de avifaunas propuestos para el Bosque Tropical Caducifolio desde México hasta Panamá, divididos por el Este y Oeste del Istmo de Tehuantepec (Ríos-Muñoz y Navarro-Sigüenza 2012). Por lo que las tierras bajas representan una región de alta diversidad y endemismo, con alta probabilidad de linajes crípticos aún no descritos (Weir 2006).

4.3 Variación morfológica

Los resultados de las ANOVA de una vía muestran diferencias significativas para seis de las siete medidas tomadas, entre los linajes genéticos *E. a. affinis* y *E. a. godmani*. Estos caracteres son: Cuerda alar, Alto de la Mandíbula hasta el borde del Nostrilo, Alto y Ancho del Pico desde la base, los cuales presentan en promedio dimensiones mayores para *E. a. godmani*, mientras que el Largo del Culmen desde la Base y el Largo de la Cola, presentan en promedio dimensiones mayores para *E. a. affinis*. Ridgway y Friedman (1901) reportan medias menores en individuos de Honduras para *E. a. affinis*, lo que coincide parcialmente con los resultados de este trabajo, siendo *E. a. affinis* de menor tamaño en 4 de los siete caracteres tomados, respecto a *E. a. godmani*.

La variación geográfica en caracteres morfométricos ha sido estudiada en varias especies de aves y en algunos ejemplos ha resultado útil para robustecer hipótesis taxonómicas generadas con caracteres genéticos (Sánchez-González *et al.* 2007), sin embargo, en otros estudios los caracteres morfométricos no permiten distinguir categorías dentro de la distribución de los taxones, ni corroborarlas con los grupos genéticos encontrados (Toews e Irwin 2008, Ornelas *et al.* 2016). En el caso de las tierras bajas de México y Centroamérica se han encontrado discontinuidades en algunas especies de aves, por ejemplo en el análisis genético, morfológico y ecológico del colibrí ermitaño *Phaetornis longirostris* (Arbeláez-Cortés y Navarro-Sigüenza 2013), se encuentra un patrón genético y morfológico similar al de los resultados de este trabajo, mostrando diferencias morfométricas significativas en los individuos del Oeste de México y los individuos del Este de México. Para el vireo dorado (*Vireo hypochryseus*) ave endémica de la Costa Oeste de México se encontró una clina en los caracteres morfométricos que va de Norte a Sur, siendo los individuos del norte más grandes respecto a los del sur, con los individuos de mayor tamaño distribuidos en las Islas Marías (Arbeláez-Cortés *et al.* 2014). Otro ejemplo de las tierras bajas es el obtenido para la especie *Turdus rufopalliatu*s (Aves: Turdidae), habitante de las tierras bajas de México, con mayores dimensiones morfométricas para el linaje genético de las Islas Marías (Montaño-Rendón *et al.* 2015).

En este estudio los caracteres morfométricos resultan útiles para apoyar la hipótesis obtenida con el análisis de datos genéticos, al presentar diferencias significativas en los análisis univariado en seis caracteres y apoya la presencia de dos unidades morfológicas dentro de *E. affinis*, que han sido previamente descritas con base en su patrón de coloración donde *E. a. affinis* presenta las plumas cobertoras subcaudales en color amarillo y *E. godmani* las plumas cobertoras subcaudales en color blanco, patrón observado en todos los ejemplares de los que se obtuvieron los rasgos morfométricos, dicho patrón de plumaje y su distribución geográfica han servido como argumento para que ambos grupos sean elevados en su categoría taxonómica, de subespecie a especie utilizando el concepto evolutivo de especie (Navarro-Sigüenza y Peterson 2004).

4.4 Similitud de Nicho Ecológico

Para el análisis de superposición y similitud de Nicho Ecológico se rescatan las siguientes observaciones:

-Cada linaje se modeló en el mismo espacio geográfico y de acuerdo a los resultados se observa que la capacidad de predecir el nicho ecológico y la distribución geográfica del otro linaje es limitada en particular para *E. a. godmani*, ya que, predice su distribución geográfica y sólo una pequeña área de la distribución de *E. a. affinis*. En cambio, el modelo de nicho ecológico de *E. a. affinis* predice su propia distribución geográfica y una importante porción de la distribución de *E. a. godmani*, a la altura del centro de la vertiente del Pacífico. Esto se comprueba con la prueba de Identidad, que compara que mide la capacidad de una especie para predecir la distribución y el nicho ecológico de la otra (Warren *et al.* 2010). En los resultados de este trabajo, el valor observado de I (0.05) y D (0.25) indican una superposición moderada de nicho ecológico, y con diferencias significativas entre los nichos ecológicos obtenidos al azar y el nicho ecológico real de cada linaje.

-Por otro lado la prueba de fondo ambiental, nos muestra que no es posible indicar una diferencia del nicho ecológico entre *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, respecto al fondo ambiental en el que están sumergidos respectivamente.

-En el gráfico de análisis de componentes principales se observa que las características climáticas que contiene cada nicho ecológico se superponen, sin embargo, ambos linajes tienen áreas donde los puntos no se superponen, además de que los puntos para *E. a. godmani*, se distribuyen en una pequeña área del gráfico, mientras que los puntos para *E. a. affinis* presentan una distribución mayor dentro del gráfico.

Con base a los puntos anteriores se argumenta evidencia de que los nichos ecológicos de las dos unidades genéticas y morfológicas comparadas (*E. a. affinis* y *E. a. godmani*) presentan similitudes, sin embargo no son equivalentes, siendo el nicho ecológico de *E. a. godmani* más restringido que el nicho de *E. a. affinis*, es probable que la no equivalencia entre ambos nichos sea producto de la restricción ecológica de *E. a. godmani*,

debido la especificidad de sus condiciones climáticas, en comparación a la amplitud de condiciones que presenta *E. a. affinis*. Resultados similares al análisis de variación de nicho ecológico para el complejo de especies *Cardellina pusilla* (Ruiz-Sánchez *et al.* 2015) para dos linajes genéticos previamente documentados dentro del complejo y que divergieron hace 2.3 millones de años según los datos genéticos (Irwin *et al.* 2011).

La evaluación de la similitud de los nichos ecológicos entre especies cercanas filogenéticamente se ha realizado con varios objetivos como: evaluar los límites de especie (Raxworthy *et al.* 2007), robustecer las hipótesis generadas con datos genéticos para límites de especie (Ruiz-Sánchez *et al.* 2015) e integrar el modelado de nicho ecológico en el análisis de los procesos de la especiación (Peterson y Holt 2003, Brook *et al.* 2006; Wooten y Gibbs 2012, Hua y Wiens 2013). En el caso de los linajes encontrados para *Euphonia affinis* el nicho ecológico conserva varias similitudes como ha sido reportado en varios grupos filogenéticamente emparentados (Pyron *et al.* 2009, McCormack *et al.* 2010), sin embargo las diferencias presentes probablemente sean producto de la distribución geográfica asimétrica y de la especificidad de características ambientales dentro del linaje del Oeste de México, similar a lo encontrado en otras especies (Graham *et al.* 2004, Arbeláez-Cortés y Navarro-Sigüenza 2013, Ruiz-Sánchez *et al.* 2015).

V. Conclusiones

1) Datos genéticos multilocus, aportan evidencia de dos linajes evolutivos independientes dentro de *Euphonia affinis*: *E. a. affinis* y *E. a. godmani*, distribuidos en el este de México-CA y en el oeste de México, respectivamente, hace 2.9 (1.34-4.3 Ma). La divergencia de dichos linajes se atribuye a los cambios climáticos y de la vegetación tropical durante el final del Plioceno y principios del Pleistoceno.

2) A nivel morfológico existen dos unidades diferenciadas por el color de las plumas cobertoras subcaudales, amarillas para *E. affinis* y blanco para *E. godmani*, y en seis caracteres morfométricos: Cuerda alar, Alto de la Mandíbula hasta el borde del Nostrilo, Alto y Ancho del Pico desde la base, Largo del Culmen desde la Base y el Largo de la Cola,

3) *E. godmani* tiene un nicho ecológico más restringido que *E. affinis* en el presente y en las proyecciones del Último Máximo Glaciar. Ambos grupos se superponen en dimensión geográfica y ambiental en el presente, no obstante no se encuentra evidencia de una equivalencia total del nicho ecológico, probablemente por la distribución geográfica y ambiental asimétrica de ambos linajes.

5) *Euphonia affinis* y *Euphonia godmani* representan linajes evolutivos independientes a nivel genético, morfológico y presentar una asimetría ecológica y geográfica. Ambos grupos presentan una distancia genética similar a la encontrada en sus especies más cercanamente emparentadas, sin embargo a nivel genético es necesario complementar el muestreo en la zona de la vertiente del Pacífico a la altura de Guerrero y Oaxaca, para corroborar o desechar la existencia de híbridos y robustecer la hipótesis de dos linajes genéticos. Ambos linajes presentan diferencias significativas en tres niveles: genéticos, morfológicos y ecológicos, por lo que se propone considerarlas dos especies de acuerdo a la integración de tres tipos de rasgos (Padiál *et al.* 2010, Queiroz 2011).

VI. Literatura citada

American Ornithologist's Union. (1998). Check-list of North American Birds. 7a. edición. Washington D C.

American Ornithologist's Union. (2003). Forty-Fourth Supplement to the American Ornithologists' Union Check-List of North American Birds. Banks Richard C., Cicero Carla, Dunn Jon L. Kratter W. Andrew, Rasmussen P. C., Remsen J. V., Rising D. J. y Stotz D. F. *The Auk* 120: 923-931.

Arbeláez-Cortés, E., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2013). Molecular evidence of the taxonomic status of western Mexican populations of *Phaethornis longirostris* (Aves: Trochilidae). *Zootaxa*, 3716(1), 81–97.

Arbeláez-Cortés, E., Milá, B. y Navarro-Sigüenza, A. G. (2014). Multilocus analysis of intraspecific differentiation in three endemic bird species from the northern Neotropical dry forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70: 362–377.

Bacon, C. D., Silvestro, D., Jaramillo, C., Smith, B. T., Chakrabarty, P., y Antonelli, A. (2015). Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(19), 6110–5.

Bandelt H. J., P. Foster y A.Röhl. (1999). Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16:37-48.

Barber, B. R., y Klicka, J. (2010). Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 277(1694), 2675–2681.

Barker, F. K., Burns, K. J., Klicka, J., Lanyon, S. M., y Lovette, I. J. (2015). New insights into New World biogeography: An integrated view from the phylogeny of blackbirds, cardinals, sparrows, tanagers, warblers, and allies. *The Auk*, 132(2), 333–348.

Brook, S., Kozak, K. H., y Wiens, J. J. (2006). Does niche conservatism promote

- speciation? A case study in North American salamanders. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 60(12), 2604–2621.
- Bryson, R. W., García-Vázquez, U. O., y Riddle, B. R. (2011). Phylogeography of Middle American gophersnakes: Mixed responses to biogeographical barriers across the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, 38(8), 1570–1584.
- Castañeda-Rico, S., León-Paniagua, L., Vázquez-Domínguez, E., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2014). Evolutionary diversification and speciation in rodents of the Mexican lowlands: the *Peromyscus melanophrys* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 454–63.
- Clements, J. F., T. S. Schulenberg, M. J. Iliff, B.L. Sullivan, C. L. Wood, and D. Roberson. 2011. The Clements checklist of birds of the world: Version 5.0. <http://avibase.bsc-eoc.org/species.jsp?lang=EN&avibaseid=D16EDD90115A5DAC&sec=summary>
- Collar N. J., Newton I. (2010). Family Fringillidae (finches). En: Del Hoyo, J. Elliot, A. Christie D. A. (Eds.) Handbook of the Birds of the World, Weavers to New World Wablers, Vol. 15 Lynx Edicions, Barcelona. 440-417 pp.
- Cortés-Rodríguez, N., Jacobsen, F., Hernandez-Baños, B. E., Navarro-Sigüenza, A. G., Peters, J. L., y Omland, K. E. (2013). Coalescent analyses show isolation without migration in two closely related tropical orioles: The case of *Icterus graduacauda* and *Icterus chrysater*. *Ecology and Evolution*, 3(13), 4377–4387.
- Cracraft J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*. 1: 159-187.
- De Queiroz, K. (2005). Different species problems and their resolution. *BioEssays*, 27(12), 1263–1269.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–86.

- De Queiroz, K. (2011). Branches in the lines of descent: Charles Darwin and the evolution of the species concept. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 19–35.
- de-Nova, J. A., Medina, R., Montero, J. C., Weeks, A., Rosell, J. A., Olson, M. E., Magallón, S. (2012). Insights into the historical construction of species-rich Mesoamerican seasonally dry tropical forests: The diversification of *Bursera* (Burseraceae, Sapindales). *New Phytologist*, 193(1), 276–287.
- Dickerman, R.W. (1981) Geographic variation in the Scrub Euphonia. Occas. Pap. Museum of Zoology Louisiana State University. 59: 1-6.
- Drummond A. J. y Rambaut A. (2007). BEAST: Bayesian Evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Excoffier L. G. y S. Schneider. (2006). Arlequín vr. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Fjeldsa J., Zuccon D., Irestedt M., Johansson U.S. Ericson P.G.P. (2003). *Sapayoa aenigma*: a New World representative of Old World suboscines. *Proceedings of the Royal Society London* 270: 238-241.
- Fjeldsa J., Irestedt M., Ericson P. G. P. y Zuccon D. (2010). The Cinnamon Ibon *Hypocryptadius cinnamomeus* is a forest canopy sparrow. *Ibis* 152: 747-760.
- Frith, C. B., y Frith, D. W. (1983). A systematic review of the hornbill genus *Anthrococeros* (Aves, Bucerotidae). *Zool. J. Linn. Soc.*, 78(1), 29–71.
- Gentry A. (1982). Neotropical Floristic Diversity: Phytogeographical Connections Between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an Accidental of the Andean Orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 69 (3): 557-593.
- Gill F. y Donsker D. (Eds.) (2016). IOC World Bird List v6.1. [http : // www.worldbirdnames.org /](http://www.worldbirdnames.org/)
- González, C., Ornelas, J. F., y Gutiérrez-Rodríguez, C. (2011). Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological

- divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 38.
- Grant, P. R. (1972). Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society*, 4(1), 39–68.
- Graham C. H., Ron S. R., Santos, J. C., Schneider, C. J. y Moritz, C. (2004). Integrating phylogenetics and environmental niche models to explore speciation mechanisms in Dendrobatid Frogs. *Evolution*, 58 (8): 1781-1793.
- Greenbaum, E., Smith, E. N., y de S, R. O. (2011). Molecular systematics of the Middle American genus *Hypopachus* (Anura: Microhylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 265–277.
- Gu, L., Liu, Y., Que, P., y Zhang, Z. (2013). Quaternary climate and environmental changes have shaped genetic differentiation in a Chinese pheasant endemic to the eastern margin of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 67(1), 129–139.
- Hackett S. J., Kimball R. T., Reddy S., Bowie R. C., Braun E. L., Braun M. J., Chojnowski J. L., Cox W. A., Han K. L., Moore W. S., Sheldon F. H., Steadman D. W., Witt C. C. y Yuri T. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320: 1763-1768.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hall S. K. (2005). Do nine-primaried passerines have nine or ten primary feathers? The evolution of a concept. *Journal Ornithology* 146: 121-126.
- Helbig, A. J., Knox, A. G., Parkin, D. T., Sangster, G., y Collinson, M. (2002). Guidelines for assigning species rank. *Ibis*, 144(3), 518–525.

- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones and A. Jarvis. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978.
- Hilty S. (2011). Family Thraupidae (Tanagers). En *Handbook of the birds of the world* 2013 (Eds.) del Hoyo J., A. Elliot, J. Sargatal. Barcelona: Lynx. 220-221 pp.
- Howell S. N. G. y S. Webb. (1995). *A guide to the Birds of Mexico and Northern Central America*. Oxford University Press, Oxford. Pp. 851.
- Huelsenbeck J. P. y F. Ronquist. (2002). Mr. Bayes, a program for the Bayesian inference of phylogeny. v.2.0b.
- Hua, X., y Wiens, J. J. (2013). How does climate influence speciation? *The American Naturalist*, 182(1), 1–12.
- Irwin D. E., Irwin J. H. y Smith T. B. (2011). Genetic variation and seasonal migratory connectivity in Wilson's warblers (*Wilsonia pusilla*): species-level differences in nuclear DNA between western and eastern populations. *Molecular Ecology* 20: 3102-3115.
- Kimball R.T., Braun E. L., Barker F. K., Bowie R.C.K., Braun M. J., Chojnowsk J. L., Hackett S. J., Han K. L., Harshman J., Heimer-Torres V., Holznagel W. Huddleston C. J., Mark B. D., Miglia K. J., Moore W.S., Reddy S., Sheldon F. H., Smith J. V., Witt C.C. y Yuri T. (2009). A well tested set of primers to amplify regions spread across the avian genome. *Molecular Phylogenetics Evolution*. 50: 654-660.
- Köhler, J., Koscinski, D., Padial, J. M., Chaparro, J. C., Handford, P., Lougheed, S. C. and De la Riva, I. (2010), Systematics of Andean gladiator frogs of the *Hypsiboas pulchellus* species group (Anura, Hylidae). *Zoologica Scripta*, 39: 572–590.
- Librado P. and J.Rozas. (2009). DnaSP v5: software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1455.

- Lifjeld J. T., Laskemoen T., Marthinsen G., García del Rey E., Calabuig P., Gohli J., Johanssen L. E., Johansen A. y Stensrud E. Allopatric speciation and sperm evolution in the blue chaffinch *Fringilla teydea*. Unpublished.
- Martínez Castilla L. (2007). Reconstrucción de la Historia de cambio de los caracteres. En: Ecología Molecular. Luis E. Eguiarte, Valeria Souza y Xitlali Aguirre (Compiladores). 2007. SEMARNAT, CONABIO, UNAM, INECO. 87-160pp.
- Mayr E. (1942). Systematics and the Origen of Species. Columbia University Press, Nueva York.
- McCormack, J. E., Peterson, A. T., Bonaccorso, E., y Smith, T. B. (2008). Speciation in the highlands of Mexico: Genetic and phenotypic divergence in the Mexican jay (*Aphelocoma ultramarina*). *Molecular Ecology*, 17(10), 2505–2521.
- McCormack, J. E., Zellmer, A. J., y Knowles, L. L. (2010). Does niche divergence accompany allopatric divergence in *Aphelocoma* jays as predicted under ecological speciation?: Insights from tests with niche models. *Evolution*, 64(5), 1231–1244.
- McCracken, K., y Sorenson, M. (2005). Is homoplasy or lineage sorting the source of incongruent mtdna and nuclear gene trees in the stiff-tailed ducks (*Nomonyx-Oxyura*). *Systematic Biology*, 54(1), 35–55.
- Montaño-Rendón, M., Sánchez-González, L. A., Hernández-Alonso, G., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2015). Genetic differentiation in the Mexican endemic Rufous-backed Robin, *Turdus rufopalliatu*s (Passeriformes: Turdidae). *Zootaxa*, 4034(3), 495–514.
- Moreno-Letelier, A., Mastretta-Yanes, A., y Barraclough, T. G. (2014). Late Miocene lineage divergence and ecological differentiation of rare endemic *Juniperus blancoi*: Clues for the diversification of North American conifers. *New Phytologist*, 203(1), 335–347.
- Morrone, J. J. (2006). Biogeographic Areas and Transition Zones of Latin America and the

Caribbean Islands Based on Panbiogeographic and Cladistic Analyses of the Entomofauna. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 467–494.

Morrone, J. J. (2010). Fundamental biogeographic patterns across the Mexican transition zone: An evolutionary approach. *Ecography*, 33(2), 355–361.

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

Navarro-Sigüenza Adolfo G., A. Townsend Peterson, E. L. M. y H. B. D. (2001). Species Limits in Mesoamerican *Aulacorhynchus* Toucanets. *The Wilson Bulletin*, 113(3), 263–272.

Navarro-Sigüenza A. G. y A. T. Peterson (2004). An alternative species taxonomy of the birds of Mexico. *Biota Neotropica* 4:1-32.

Olsson U., P. J. Leader, G. J. Carey, A. A. Khan, L. Svensson y P. Alström. (2013). New insights into the intricate taxonomy and phylogeny of the *Sylvia curruca* complex. 67: 72-85.

Ornelas, J. F., González, C., Hernández-Baños, B. E., y García-Moreno, J. (2016). Molecular and iridescent feather reflectance data reveal recent genetic diversification and phenotypic differentiation in a cloud forest hummingbird. *Ecology and Evolution*, 6(4).

Rathbun N. A., A. S. Grunst, M. L. Grunst, J. K. Hubbard, R. J. Safran, R. A. Gonser y E. M. Tuttle. (2015). Quantitative color variation within and across morphs of the polymorphic White-throated Sparrow. *The Auk*. 132: 92-104.

Ridgway R. y Friedmann H. (1901). The birds of North and Middle America: a descriptive catalogue of the higher groups, genera, species and subspecies of birds known to occur in North America, from the Arctic lands to the Isthmus of Panama, the West Indies and

other islands of the Caribbean sea, and the Galapagos Archipelago. *Bulletin (United States National Museum, Washington)*, 21-22 y 24-25 pp.

Ridgely R.S. y Tudor G. (2009). *Field Guide to the Songbirds of South America: The Passerines (Mildred Wyatt-World Series in Ornithology)*. University of Texas. Texas, E.U. A. 586-590 pp.

Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., y Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 16.

Pavlova, A., Selwood, P., Harrison, K. A., Murray, N., Quin, B., Menkhorst, P., Sunnucks, P. (2014). Integrating phylogeography and morphometrics to assess conservation merits and inform conservation strategies for an endangered subspecies of a common bird species. *Biological Conservation*, 174, 136–146.

Peterson, A. T., y Holt, R. D. (2003). Niche differentiation in Mexican birds: Using point occurrences to detect ecological innovation. *Ecology Letters*, 6(8), 774–782.

Phillimore, A. B., y Owens, I. P. F. (2006). Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology? *Proceedings of the Royal Society: B Biological Sciences*, 273(1590), 1049–1053.

Pyron, R. A. y Burbrink F. T. (2009). Lineage diversification in a widespread species: roles for niche divergence and conservatism in the common kingsnake, *Lampropeltis getula*. *Molecular Ecology*, 18:3443-3457.

Rathbun, N. A., Grunst, A. S., Grunst, M. L., Hubbard, J. K., Safran, R. J., Gonser, R. A., y Tuttle, E. M. (2015). Quantitative color variation within and across morphs of the polymorphic White-throated Sparrow. *The Auk*, 132(1), 92–104.

Raxworthy, C. J., Ingram, C. M., Rabibisoa, N., y Pearson, R. G. (2007). Applications of Ecological Niche Modeling for Species Delimitation: A Review and Empirical Evaluation Using Day Geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology*, 56(6), 907–923.

- Ríos-Muñoz, C., y Navarro-Sigüenza, A. (2012). Patterns of species richness and biogeographic regionalization of the avifaunas of the seasonally dry tropical forest in mesoamerica. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 47(August 2014), 171–182.
- Rivera, P. C., Di Cola, V., Martínez, J. J., Gardenal, C. N., y Chiaraviglio, M. (2011). Species delimitation in the continental forms of the genus *Epicrates* (serpentes, boidae) integrating phylogenetics and environmental niche models. *PLoS ONE*, 6(9).
- Rodríguez-Gómez, F., y Ornelas, J. F. (2015). At the passing gate: past introgression in the process of species formation between *Amazilia violiceps* and *A. viridifrons* hummingbirds along the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, 42(7), 1305–1318.
- Ruane, S., Bryson, R. W., Pyron, R. A., y Burbrink, F. T. (2014). Coalescent species delimitation in Milksnakes (Genus *Lampropeltis*) and impacts on phylogenetic comparative analyses. *Systematic Biology*, 63(2), 231–250.
- Ruiz-Sánchez, A., Renton, K., Landgrave-Ramírez, R., Mora-Aguilar, E. F., y Rojas-Soto, O. (2015). Ecological niche variation in the Wilson's warbler *Cardellina pusilla* complex. *Journal of Avian Biology*, 46(5), 516–527.
- Ruiz-Sanchez, E., y Sosa, V. (2010). Delimiting species boundaries within the Neotropical bamboo Otatea (Poaceae: Bambusoideae) using molecular, morphological and ecological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(2), 344–356.
- Sánchez-González, L. A., Navarro-Sigüenza, A. G., Peterson, A. T., y García-Moreno, J. (2007). Taxonomy of *Chlorospingus ophthalmicus* in Mexico and northern Central America. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*, 127(1), 34–49.
- Sibley C.G. y Ahlquist J. E. (1982). The relationships of the Hawaiiin honeycreepers as indicated by DNA-DNA hybridization. *Auk* 99: 130-140.
- Smith, B. T., Escalante, P., Hernández Baños, B. E., Navarro-Sigüenza, A. G., Rohwer, S.,

- y Klicka, J. (2011). The role of historical and contemporary processes on phylogeographic structure and genetic diversity in the Northern Cardinal, *Cardinalis cardinalis*. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 136.
- Smith, B. T., y Klicka, J. (2010). The profound influence of the late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of new world birds. *Ecography*, 33(2), 333–342.
- Smith B. T., Bryson R. W. Jr., Chua V., Africa L. and Klicka J. (2013). Speciation history of North American Haemorrhous finches (Aves: Fringillidae) inferred from multilocus data. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 66: 1055-1059.
- Sorenson M. D. (1999). Avian mtDNA primers [http:// people.bu.edu/ MSOREN/ Bird.mt.Primers.pdf](http://people.bu.edu/MSOREN/Bird.mt.Primers.pdf).
- Stephens, M., Smith, N., and Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68, 978--989.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. Filipinski A. y Kumar, S. (2013) MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 5. *Molecular Biology and Evolution*: 30 2725-2729.
- Thompson J.D., Higgins D.G. y Gibson T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*.
- Toews, D. P. L., y Irwin, D. E. (2008). Cryptic speciation in a Holarctic passerine revealed by genetic and bioacoustic analyses. *Molecular Ecology*, 17(11), 2691–2705.
- Topfer T., Haring E., Birkhead T. R., Lopes R. J., Severinghaus L. T. Martens J. y Packert M. (2011). A molecular phylogeny of bullfinches *Pyrrhula brinsson* (Aves: Fringillidae). *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 58: 271-282.

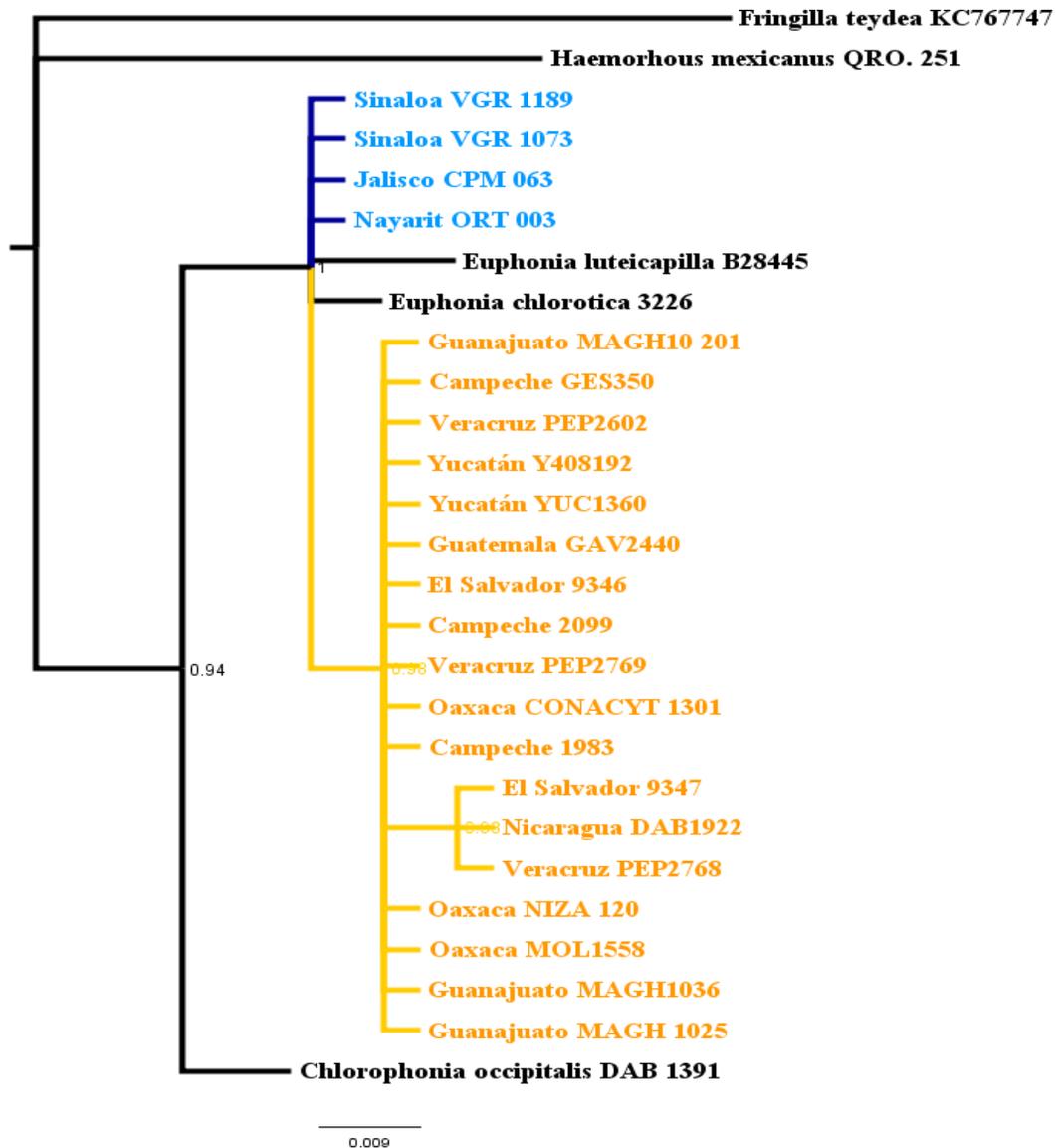
- Townend, J. (2002). Practical Statistics for Environmental and Biological Scientist. *John Wiley & Sons*. 276pp.
- Warren, D. L., Glor, R. E., y Turelli, M. (2008). Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*, 62(11), 2868–2883.
- Warren, D. L., Glor, R. E., y Turelli, M. (2010). ENMTools: A toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, 33(3), 607–611.
- Weller, A.-A. (2000). A new hummingbird subspecies from southern Bolívar, Venezuela, with notes on biogeography and taxonomy of the *Saucerottia viridigaster-cupreicauda* species group. *Ornitología Neotropical*, 11, 143–154.
- Weir J. T. (2006). Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and Highland neotropical birds. *Evolution*. 60: 842-855.
- Wiens, J. J. (2004). Speciation and Ecology Revisited: Phylogenetic Niche Conservatism and the Origin of Species. *Evolution Orr and Smith Schluter*, 58(1), 193–197.
- Wiens, J. J., y Graham, C. H. (2005). Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36(1), 519–539.
- Wiley E. O. (1978). The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*. 27: 17-26.
- Willis, C. G., Franzone, B. F., Xi Z. y Davis, C. C. (2011). The establishment of Central American migratory corridors and the biogeographic origins of seasonally dry tropical forests in Mexico. *Frontiers in Genetics*, 5:433.
- Wooten, J. A., y Gibbs, H. L. (2012). Niche divergence and lineage diversification among closely related *Sistrurus* rattlesnakes. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(2), 317–

- Yuri, T., y Mindell, D. P. (2002). Molecular phylogenetic analysis of Fringillidae, “New World nine-primaried oscines” (Aves: Passeriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(2), 229–243.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., y Billups, K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292(5517), 686–693.
- Zamudio-Beltrán, L. E., y Hernández-Baños, B. E. (2015). A multilocus analysis provides evidence for more than one species within *Eugenes fulgens* (Aves: Trochilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 90, 80–84.
- Zink, R. M. (2004). The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 271(1539), 561–4.
- Zink, R. M. (2015). Genetics, morphology, and ecological niche modeling do not support the subspecies status of the endangered Southwestern Willow Flycatcher (*Empidonax traillii extimus*). *The Condor*, 117(1), 76–86.
- Zuccon, D., Prys-Jones, R., Rasmussen, P. C., y Ericson, P. G. P. (2012). The phylogenetic relationships and generic limits of finches (Fringillidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(2), 581–596.

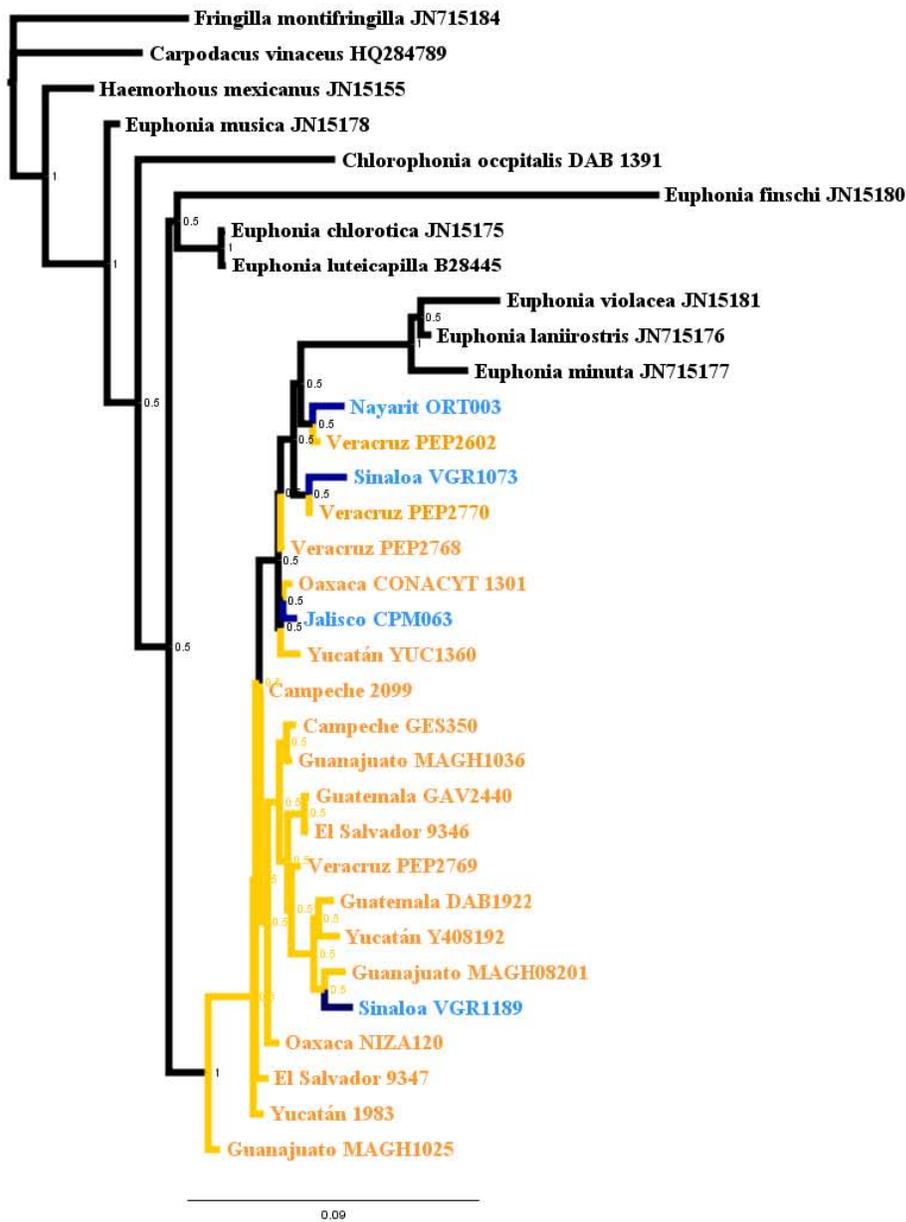
VI. Apéndices

APÉNDICE I.

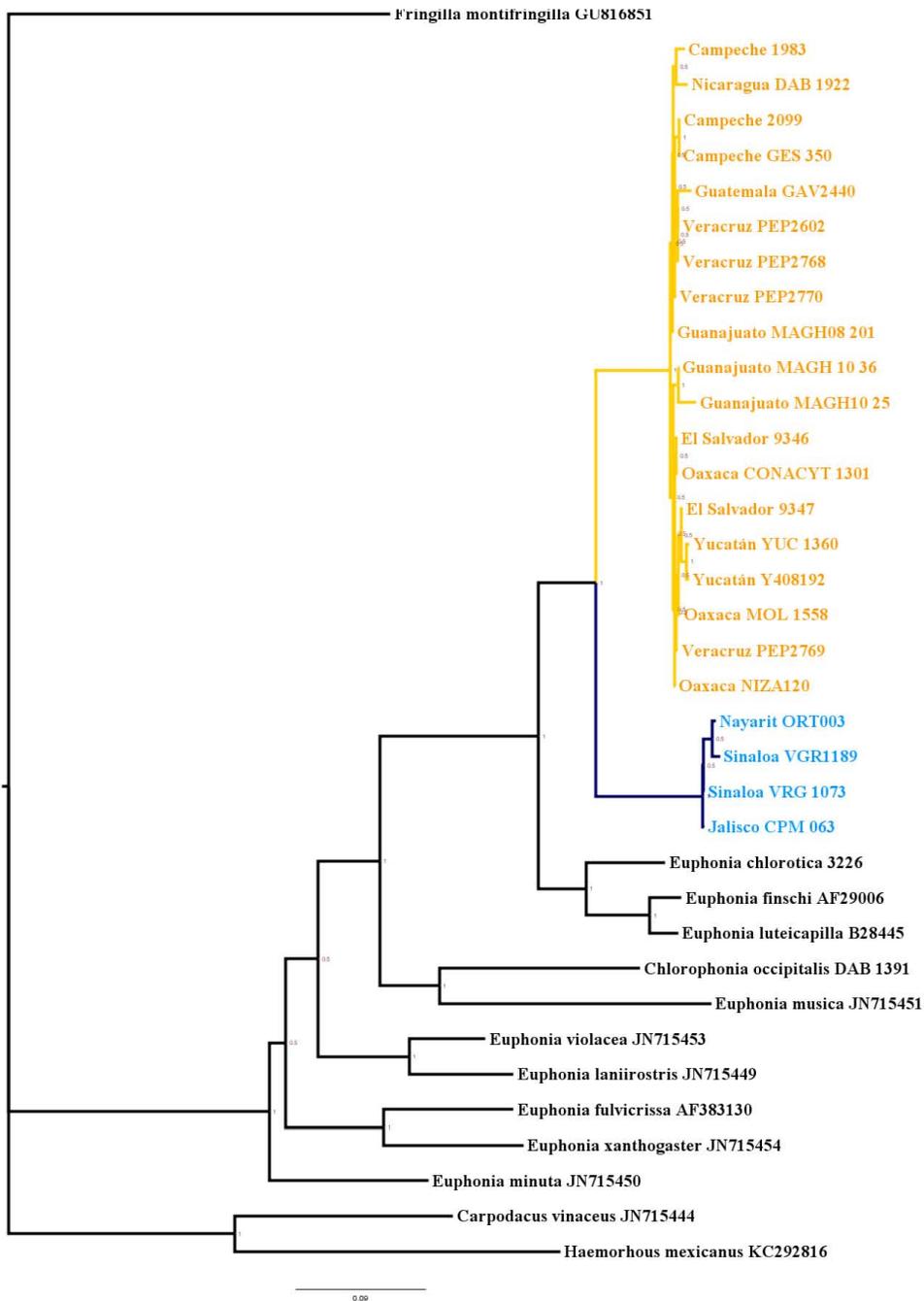
Hipótesis filogenética obtenida por el método Inferencia Bayesiana para el BRM. Ramas en color azul: *E. godmani*. Ramas en color amarillo: *E. affinis*.



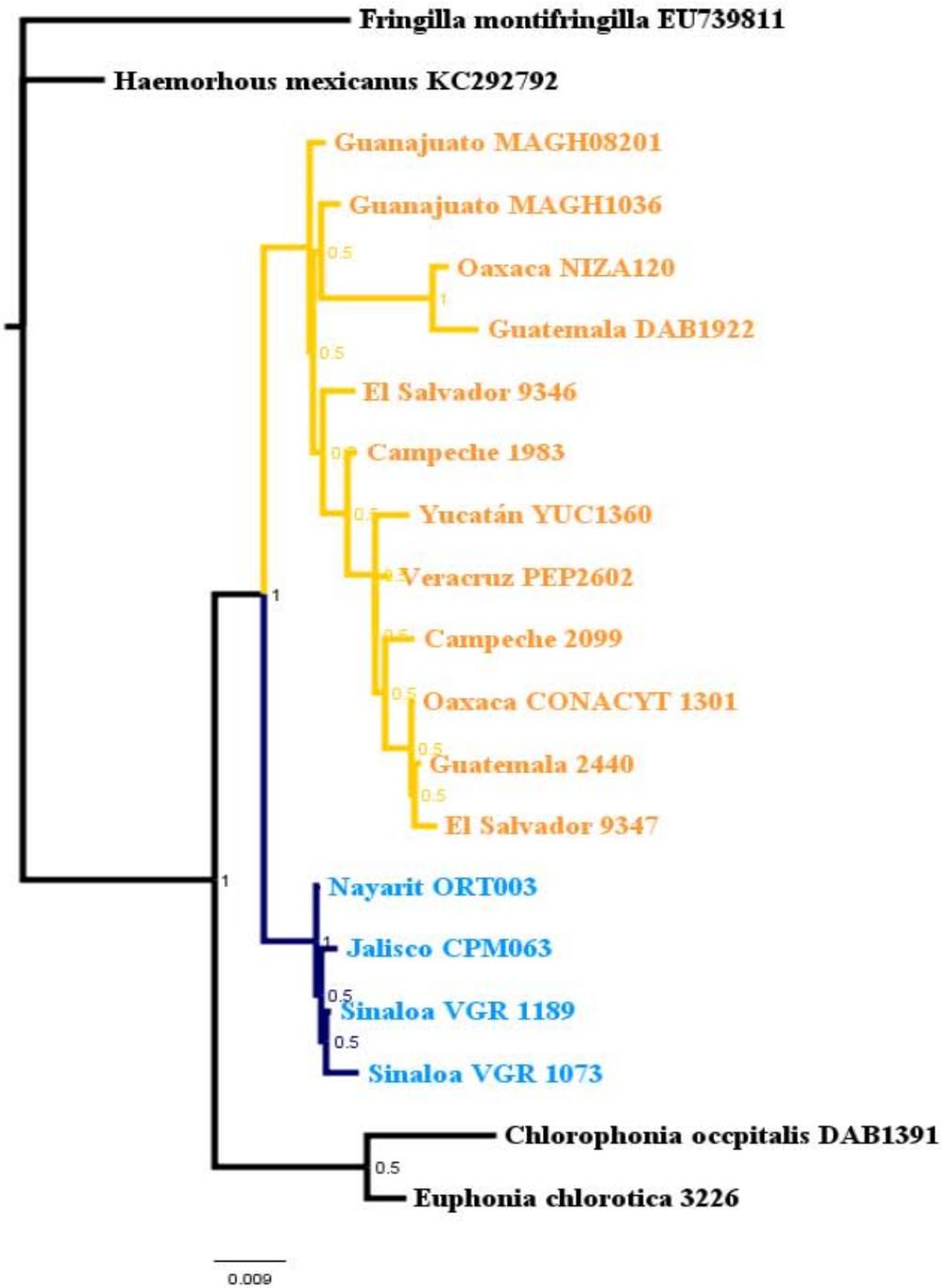
APÉNDICE I. Hipótesis filogenética obtenida por el método Inferencia Bayesiana para el GAPDH. Ramas en color azul: *E. godmani*. Ramas en color amarillo: *E. affinis*.



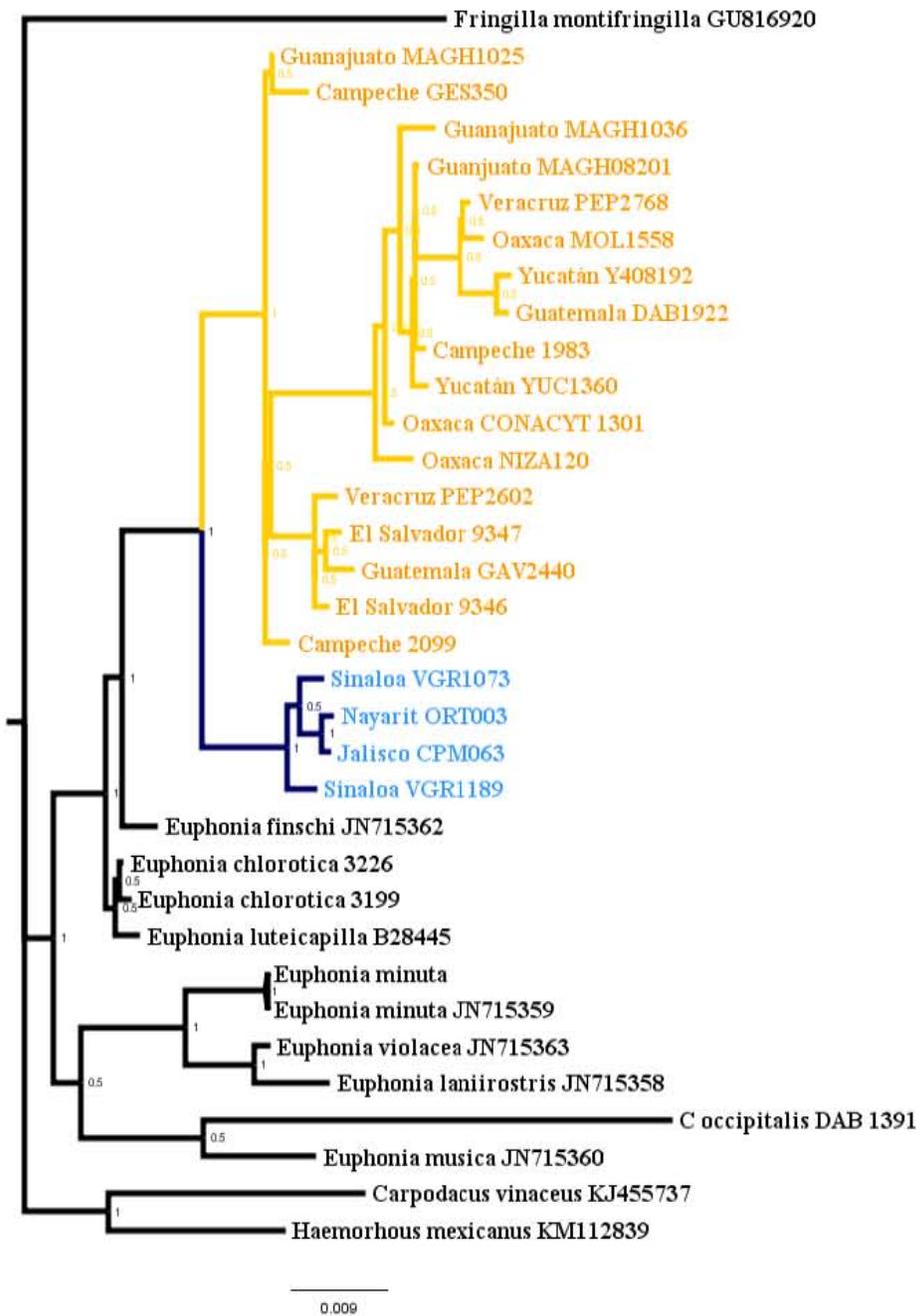
APÉNDICE I. Hipótesis filogenética obtenida por el método Inferencia Bayesiana para el ND2. Ramas en color azul: *E. godmani*. Ramas en color amarillo: *E. affinis*.



APÉNDICE I. Hipótesis filogenética obtenida por el método Inferencia Bayesiana para el MUSK. Ramas en color azul: *E. godmani*. Ramas en color amarillo: *E. affinis*.

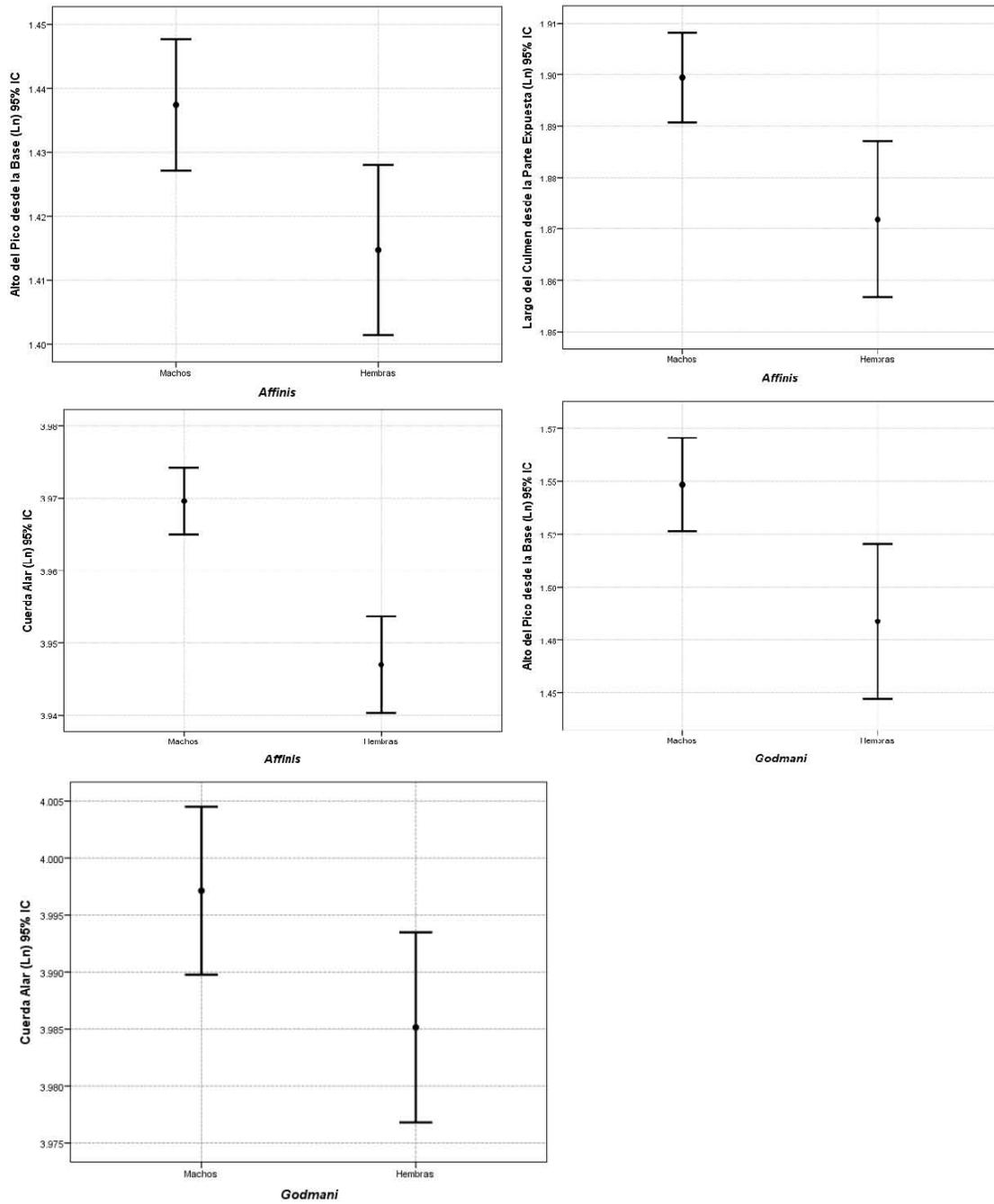


APÉNDICE I. Hipótesis filogenética obtenida por el método Inferencia Bayesiana para el ODC. Ramas en color azul: *E. godmani*. Ramas en color amarillo: *E. affinis*.



APÉNDICE 3

ANOVA y diagramas de intervalo de confianza al 95% para encontrar diferencias entre hembras y machos dentro de los linajes genéticos *E. a. godmani* y *E. a. affinis*.



APÉNDICE 3. ANOVA y diagramas de intervalo de confianza al 95% para encontrar diferencias entre hembras y machos dentro de los linajes genéticos *E. a. godmani* y *E. a. affinis*.

ANOVA para comparar machos y hembras, sólo se muestran los caracteres con diferencias significativas, dentro de cada linaje.							
Unidad	Carácter	Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Gl	Media de los cuadrados	F	Valor de <i>P</i>
<i>Affinis</i>	CA	Entre grupos	0.039	1	0.039	31.568	0.000
		Dentro de grupos	0.413	331	0.001		
		Total	0.452	332			
	APB	Entre grupos	0.037	1	0.037	6.898	0.009
		Dentro de grupos	1.664	312	0.005		
		Total	1.700	313			
	LCPE	Entre grupos	0.058	1	0.058	11.203	0.001
		Dentro de grupos	1.681	326	0.005		
		Total	1.739	327			
<i>Godmani</i>	CA	Entre grupos	0.003	1	0.003	4.067	0.047
		Dentro de grupos	0.054	82	0.001		
		Total	0.057	83			
	APB	Entre grupos	0.073	1	0.073	10.348	0.002
		Dentro de grupos	0.553	78	0.007		
		Total	0.626	79			