



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Variación genética de las poblaciones
mexicanas de *Diglossa baritula* (Aves:
Thraupidae) (Wagler, 1832)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALONDRA KARINA TERRONES RAMÍREZ



DIRECTOR DE TESIS:
DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno.

Terrones
Ramírez
Alondra Karina
69943119
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
308138603

2. Datos del Tutor

Dra.
Hernández
Baños
Blanca Estela

3. Datos del Sinodal 1

Dra.
Arizmendi
Arriaga
María del Coro

4. Datos del Sinodal 2

Dr.
Sánchez
González
Luis Antonio

5. Datos del Sinodal 3

M. en C.
Ramírez
Corona
Fabiola

6. Datos del Sinodal 4

M. en C.
Vázquez
López
Alma Melisa

7. Datos del Trabajo Escrito

Variación genética de las poblaciones mexicanas de *Diglossa baritula* (Aves: Thraupidae) (Wagler, 1832)
74p.
2017

*A mis padres Oty y Rafa
¡Ella, la inspiración perfecta para describir al amor,
madre eres tú mi amor más grande!*

¡Mi inmenso orgullo, padre eres el gran hombre de mi vida!

Alo

Nada en la vida es para ser temido, sólo es para ser entendido.
Ahora es el momento de entender más, para que podamos temer menos.

Marie Curie

Are We Magic or Science?

T. R

Music gives a soul to the universe,
wings to the mind,
flight to the imagination
and life to everything.

Platón

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, que me ha brindado una formación académica y personal, por todo lo que he aprendido y todas las experiencias, gracias por tanto.

A la Facultad de Ciencias, a todos los profesores y compañeros que fueron parte de mi camino como estudiante, es un orgullo pertenecer a Ciencias.

Al Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias "Alfonso L. Herrera" que me ha permitido tener un profundo acercamiento con la ciencia.

A la Dra. Blanca, porque desde un principio me recibiste como parte de tu equipo de trabajo y me hiciste sentir comfortable, muchas gracias por todo tu apoyo, tu confianza, tus consejos, tu actitud siempre positiva que contagias, eres admirable. Gracias por ser mi tutora y mi amiga, tengo un gran cariño hacia ti.

A la M en C. Fabiola, Fabi infinitamente gracias por tu paciencia, tu enseñanza, tu entusiasmo, sin tu apoyo todo hubiera sido más difícil. Eres una gran mujer en todo sentido, te respeto, te admiro y te aprecio.

Al Dr. Luis Antonio Sánchez, gracias por ayudarme en algunos análisis de mi tesis, admiro tu inteligencia.

A mis sinodales por sus observaciones y recomendaciones para mejorar mi trabajo escrito.

A mis queridos compañeros y amigos del cubículo, Mary, Anuar, Neto, Meli, Tania, Luz, Vicente y Gavilán, cada uno de ustedes aportó un poco para la realización de mi trabajo, gracias por los buenos momentos. Y a ti Pertusi porque contigo todo era risa y gracias por tu ayuda en los análisis, todos te extrañamos, "yo vaga?, tú che vaguito!"

A Luis Enrique Sánchez "Tapatío" por tu gran ayuda para la realización de los mapas y tu apoyo en las sesiones de taxidermia. Eres un excelente biólogo y amigo.

A Iván Hernández por la elaboración de los dibujos.

A los curadores de las distintas colecciones científicas que me proporcionaron las muestras para realizar este estudio: Dra. Blanca Estela Hernández Baños y Dr. Adolfo G. Navarro Sigüenza (Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" de la Facultad de Ciencias, UNAM), Dra. Patricia Escalante (Colección Nacional de Aves del Instituto de Biología, UNAM) Dr. Paul Sweet y Dr. Brian Smith (Museo Americano de Historia Natural, Nueva York), Dra. Sharon Birks (Museo de Burke, Universidad de Washington), Dra. Donna Dittmann (Museo de Ciencias Naturales de Louisiana, Universidad del estado de Louisiana), Dr. John Bates (Museo Field de Historia Natural, Chicago) y Dr. Town Peterson y Dr. Mark Robbins (Museo de Historia Natural, Universidad de Kansas).

A todos los colectores de mis muestras, considero que este trabajo es producto del esfuerzo de casi 30 años, desde el trabajo de campo como el realizado en las colecciones científicas.

A PAPIIT – DGAPA proyecto IN215614 "Variación genética de las poblaciones mexicanas de *Habia rubica* y *Habia fuscicauda*" por la beca otorgada.

A la Dra. María Eugenia y al Taller de Plantas I y II por permitirme usar el EPOCH.

A la Química Viviana del laboratorio de Biología Molecular y Genómica por permitirme usar el nanodrop.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A ti mamá, debo decir que eres un ejemplo de madre, la mujer más fuerte, inteligente, admirable, bondadosa, hermosa y alegre que conozco, eres mi sol porque le das brillo y calor a mi vida. Es un privilegio tenerte como madre y como amiga, gracias por ser mi madre, por todo tu amor, tus palabras, tus caricias, tus regaños, tus atenciones, tu deliciosa comida, tu gran apoyo. Literalmente tú y papá siempre serán mi pareja favorita. ¡Te amo con mi vida mamita!

A ti papá, eres el ser que más respeto y admiro, con tu amor y sabiduría me has enseñado a aspirar siempre a lo más alto y a mis sueños no renunciar. Te agradezco por enseñarme nobles valores: el amor, respeto, rectitud y justicia, y por tu apoyo incondicional y protección. ¡Siempre contigo, te amo papito!

A mis hermanos Víctor y Óscar, gracias por todos los bellos recuerdos de la infancia, gracias por su complicidad y su amor (a su manera), gracias a ustedes tengo un rostro femenino pero en realidad soy medio ruca. LOS ADORO!

A mis sobrinos Amber Victoria y Óscar Paolo, gracias por enseñarme tanto y por permitir enseñarles lo poco que yo sé. Ser tía es cool! Los amo y siempre estaré para ustedes!

A mis abuelos Victoria Ariza, Cirenio Terrones, Carmen Boyzo y Florencio Ramírez, por ser un fuerte pilar dentro de mi familia. Siempre los recuerdo con amor y ternura.

A mi prima Karen Terrones, en realidad eres como mi hermana querida rata, siempre juntas!

A toda mi familia, a todos mis tíos, primos y sobrinos, por su cariño, las pláticas y las buenas convivencias familiares.

A TODOS mis amigos, a quienes quiero mucho! A mis amigos de Cuerna: Almaraz te considero una excelente mujer en todos los aspectos; Castañeda, mi psicóloga hippie chaira chaca fav tenemos proyectos y viajes en mente babe; Arti e Ivy mis amiguitos de la infancia los quiero un buen; Aline Salmón wera loca eres la mejor. A mis amigos de la prepa: Isabel Montoya, bitch eres mi "best fake friend", gracias por todo lo que hemos vivido juntas físicamente y emocionalmente; Génesis Flores, ese "¿Eres del 408?" cambio mi vida para siempre mi bella confidente; Sofía Soto, baby love fotógrafa geógrafa ahora que recuerdo me falta viajar contigo, vamos a dar el rol amiguica; Carlita Bistock, no entiendo como puedes ser tan exitosa a tan corta edad; Andrea Vargas, mi colega fav estas cañona, Yelni y Luxy es un orgullo tener amigas profesionistas e independientes como uds; Carla Maldonado eres la más divertida y atrevida que conozco; Brayan, Tío, Paquito, Sánchez, Alfred y todos los que son parte de las "Burras Canelas" y la "Chabe's school." A mis amigos de la Facultad mi tropa Pulpirri, definitivamente somos los mejores de Ciencias, gracias por tanta enseñanza y diversión: Tainana, me he vuelto adicta a tu amistad GRACIAS por apoyarme, no sé qué hubiera hecho sin ti; Angy, qué onda con tus mil talentos reina; Marianita, teporocho de mi vida eres muy especial; Violeta, tan querida amiguica; Karen Ruiz te la sabes chuli; y todos los demás Carlita Roots, Bere, Irlanda, Tania Fdez, Tanit, Olinka, Robert, Cosmo, Charly, Rafrito, Abel, Izaakzon, Chuz, Bobmar, Iván Carranza, Lalo Olivos, Hopps, Light, Christian y todos los demás del crew. A mis amigos no mexicanos: Maruja, mi Maru mi parece en pocos meses te volviste una gran amiga, quiero hacer más viajes contigo, los elotes siempre me recuerdan a ti; Cochon, llegaste en el momento perfecto, nuestros proyectos son cool, enseñame tu idioma; Lucas Rocha, amiguiho eres el mejor biólogo.



Diglossa baritula

Iván Hernández

ÍNDICE

Resumen.....	8
Abstract.....	9
I. Introducción.....	10
La posición taxonómica de <i>Diglossa baritula</i>	14
Descripción y aspectos biológicos de <i>Diglossa baritula</i>	18
Justificación.....	22
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	23
Objetivo General.....	23
Objetivos particulares.....	24
II. Métodos.....	24
Trabajo de laboratorio.....	24
Edición de las secuencias.....	29
Análisis de variación y estructura genética.....	29
Medidas de diversidad genética.....	29
Estructura genética.....	29
Reconstrucción filogenética.....	31
Tiempos de divergencia.....	32
Análisis de historia demográfica.....	33
III. Resultados.....	34
Descripción de las secuencias obtenidas.....	34
Variación y estructura genética.....	34
Árboles filogenéticos.....	39
Tiempos de divergencia.....	41
Análisis de historia demográfica.....	43
IV. Discusión.....	43
Relaciones filogenéticas.....	44
Variación y estructura genética, e historia evolutiva.....	46
V. Conclusiones.....	51
VI. Perspectivas.....	52
Literatura citada.....	53
VII. Apéndice.....	67

Resumen

Se estudió la variación genética de las poblaciones del picaflor ventricanelo (*Diglossa baritula*), un complejo endémico de los bosques montanos de Mesoamérica, analizando secuencias de DNA. Actualmente se reconocen tres subespecies delimitadas de acuerdo a los patrones de coloración y a su distribución. Los resultados indican la presencia de dos grupos genéticos de mtDNA, uno correspondiente a la subespecie *D. b. baritula* distribuido desde Jalisco a Oaxaca en México y el otro correspondiente a las subespecies *D. b. montana* - *D. b. parva* distribuidas desde Chiapas en México hasta Nicaragua. La división puede ser explicada como consecuencia del aislamiento de las poblaciones por parte del Istmo de Tehuantepec y hay una correspondencia con las diferencias en coloración. El Istmo de Tehuantepec es una barrera que ha tenido un importante rol en moldear la diversidad de aves de Mesoamérica y así como del resto del continente americano. *D. baritula* está conformado por dos clados filogeográficamente estructurados que divergieron hace aproximadamente 785 000 años. Por lo tanto, la historia de *D. baritula* fue moldeada por la fragmentación del hábitat debido a las fluctuaciones condiciones ambientales en el Pleistoceno. Los presentes resultados reflejan la importancia del Istmo de Tehuantepec y los eventos climáticos del Pleistoceno en generar aislamiento y divergencia poblacional.

Abstract

We investigate genetic variation of populations of the cinnamon-bellied flowerpiercer (*Diglossa baritula*), a species complex endemic to the montane forests of Mesoamerica, by analysing DNA sequences. There are currently three subspecies described on the patterns of coloration and distribution shown. Our results revealed the presence of two mtDNA genetic groups corresponding to subspecies *D. b. baritula* distributed from Jalisco to Oaxaca in Mexico and *D. b. montana* - *D. b. parva* distributed from Chiapas in Mexico to Nicaragua. The lineage split can be explained as a consequence of relative isolation of the populations separated by the Isthmus of Tehuantepec and corresponds to differences in coloration. The Isthmus of Tehuantepec is a barrier that has played an important role in shaping the avian diversity of Mesoamerica, as well as the rest of the western hemisphere. *D. baritula* is made up of two phylogeographically structured clades that probably diverged roughly 785 000 years ago. Therefore, the recent history of *D. baritula* was likely shaped by historical habitat fragmentation due to fluctuating environmental conditions in the Pleistocene. These results highlight the importance of the Isthmus of Tehuantepec and Pleistocene climatic events in driving isolation and population divergence.

I. Introducción

El análisis espacial de los linajes genealógicos a nivel intraespecífico o de especies cercanamente relacionadas es objeto de estudio de la filogeografía (Hillis *et al.*, 1996; Avise, 2000; Morrone, 2013). Tal disciplina además analiza los múltiples procesos microevolutivos que actúan a nivel poblacional (Zink y Barrowclough, 2008) y que moldean la variación genética (Hillis *et al.*, 1996; Morrone *et al.*, 2015), incluyendo la deriva génica, el flujo génico, la mutación y la migración (Burney y Brumfield, 2009). La variación genética dentro y entre poblaciones también está determinada por las características ambientales y del paisaje, por la distribución geográfica y por la demografía en presente y pasado (Burney y Brumfield, 2009; Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013). Por lo tanto, la filogeografía es una ciencia multidisciplinaria que usa la variación genética para aplicarla en un contexto de genealogías de alelos y enlaza esas genealogías con la distribución geográfica, y de esta manera hacer inferencias acerca de los patrones, procesos e historia de las poblaciones.

La diversificación es el resultado de la adición de especies por especiación y la eliminación de especies debido a la extinción. El entendimiento detallado del papel de las causas extrínsecas, intrínsecas, deterministas y estocásticas, y de los factores que generan y sostienen la diversidad biológica neotropical se ha explorado en diversos estudios (Newton, 2003; Edwards *et al.*, 2005; Bazin *et al.*, 2006; Ericson *et al.*, 2006; Fjeldså *et al.*, 2006; Hawkins *et al.*, 2006; Pereira y Baker, 2006; Weir, 2006; Cadena *et al.*, 2007; Weir y Schluter, 2007; Bates *et al.*, 2008; Phillimore y Price, 2008; Kerr *et al.*, 2009; Lanfear *et al.*, 2010; Morlon *et al.*, 2011; Cardillo *et al.*, 2012; Ericson, 2012; Martin *et al.*, 2013; Rabosky *et al.*, 2015).

La variación genética se refiere a la variedad de alelos, genotipos y fenotipos presentes en una especie y la estructura genética hace referencia a cómo está organizada la variación genética en el espacio y tiempo. Para poder establecer la estructura genética es necesario determinar la variación genética de los individuos de cada población (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013). Generalmente las aves neotropicales exhiben una marcada estructura genética que coincide con la presencia de barreras biogeográficas (Hackett, 1995; Cotés-Rodríguez *et al.*, 2008; Navarro-Sigüenza *et al.*, 2008; Kerr *et al.*, 2009; Weir, 2009; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2014), a

diferencia de la avifauna neártica que a menudo cuenta con baja diferenciación genética intraespecífica (Milá *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2011).

La variación genética y geográfica en especies politípicas de tierras altas neotropicales ha sido utilizada para probar hipótesis de adaptación y evolución, y detectar la presencia de linajes previamente no reconocidos (García-Moreno *et al.*, 2004; Pérez-Emán, 2005; Rising *et al.*, 2007; Cotés-Rodríguez *et al.*, 2008; Weir, 2009; Puebla-Olivares *et al.*, 2008; Barrera-Guzmán *et al.*, 2012). En distintos estudios de avifauna montana neotropical, se ha manifestado que factores tales como una topografía compleja, distintos tipos de vegetación, restricción del hábitat, eventos históricos como las fluctuaciones climáticas y las variaciones del nivel del mar durante el Plioceno y Pleistoceno, surgimiento de montañas, barreras riverinas, entre otros, actúan como mecanismos que mantienen a las poblaciones de ciertas especies lo suficientemente aisladas y con bajos niveles de flujo génico a través del tiempo, lo cual se traduce a que en el presente algunas poblaciones cuenten con una estructura genética bien diferenciada (García-Moreno *et al.*, 2004; Pérez-Emán, 2005; Cadena *et al.*, 2007; Bates *et al.*, 2008; Sánchez-González y Navarro-Sigüenza, 2009; Weir, 2009; Barber y Klicka, 2010; Patel *et al.*, 2011).

Para la obtención de inferencias relacionadas con la variación y estructura genética de las poblaciones, así como la filogenia y la filogeografía de las especies, es elemental el uso de marcadores moleculares, como las secuencias de DNA (Hillis *et al.*, 1996; Zink y Barrowclough, 2008). En particular el genoma mitocondrial (mtDNA) es de los principales recursos de datos para estudios evolutivos enfocados en aves (Pacheco *et al.*, 2011) debido a que evoluciona de una manera selectivamente neutra y se puede asumir que los patrones geográficos en mtDNA representan la historia demográfica y la distribución de las poblaciones, y no las respuestas adaptativas a las presiones selectivas (Zink *et al.*, 2006), y porque posee importantes características tales como un modo de herencia maternal y no recombinante, su genoma es haploide, se replica independientemente, sus secuencias tienen una tasa de mutación elevada y un tamaño efectivo poblacional más pequeño en comparación con el DNA nuclear (nDNA) (Hillis *et al.*, 1996; Ballard y Whitlock, 2004; Lovette, 2004; Edwards *et al.*, 2005; Baker, 2008; Zink y Barrowclough, 2008; Balloux, 2010; Nabholz *et al.*, 2009; Petit y Excoffier, 2009; Morrone, 2013).

Dichas propiedades permiten obtener una red de haplotipos con la que se pueden plantear hipótesis acerca de los patrones y procesos históricos como dispersión, vicarianza, expansión de la distribución y colonización (Hillis *et al.*, 1996).

A pesar de que se ha mostrado que los genes mitocondriales tienen una mayor habilidad para resolver relaciones entre poblaciones y especies cercanas (Avice, 2000; Ballard y Whitlock, 2004; Lovette, 2004; Zink *et al.*, 2006; Zink y Barrowclough, 2008; Balloux, 2010; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2013), se ha promovido el uso de múltiples loci de DNA tanto de origen mitocondrial como nuclear para poder esclarecer y fortalecer los resultados provenientes de los genes mitocondriales, y de esta forma asegurar la detección de patrones derivados de eventos a nivel poblacional (Ballard y Whitlock, 2004; Edwards *et al.*, 2005; Bonaccorso y Peterson, 2007; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Zink y Barrowclough, 2008; Petit y Excoffier, 2009; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2010; Balloux, 2010; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2013).

Un enfoque multidisciplinario proporciona una visión más completa sobre los mecanismos que están detrás de los procesos de diversificación. Es indispensable integrar la información adquirida con datos moleculares a diferentes tipos de datos, incluyendo estudios acerca de variación morfológica y fenológica, modelado de nicho ecológico, paleoecología, por mencionar algunos (Barker *et al.*, 2004; García-Moreno *et al.*, 2004; Knowles y Carstens, 2007; Raxworthy *et al.*, 2007).

El grupo de estudio del presente trabajo, *Diglossa baritula* (Aves: Passeriformes, Thraupidae), habita en tierras altas mesoamericanas. Mesoamérica es el área localizada entre las regiones biogeográficas Neártica y Neotropical, su extensión geográfica va desde centro y sur de México hasta norte de Colombia, con tan sólo una representación del 0.7 % de la superficie terrestre cuenta con una gran riqueza biológica y un considerable nivel de endemismo de diferentes grupos taxonómicos (García-Moreno *et al.*, 2006; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Vázquez-Miranda *et al.*, 2009). El territorio mesoamericano es considerado como una importante e interesante área para el estudio de los mecanismos que generan los altos niveles de diferenciación y especiación (García-Moreno *et al.*, 2004; García-Moreno *et al.*, 2006), además,

gracias al entendimiento de estos mecanismos se pueden diseñar estrategias sólidas para la conservación de la biota de este lugar que está fuertemente amenazado (Hernández-Baños *et al.*, 1995; García-Moreno *et al.*, 2004; Orme *et al.*, 2005; García-Moreno *et al.*, 2006; Weir, 2009; Barrera-Guzmán *et al.*, 2012).

En contraste con las tierras bajas neotropicales donde la tasa de diversificación de la fauna parece haber sido más alta a finales del Mioceno y haber disminuido hacia el presente, la diversificación en tierras altas aumentó después del inicio de los ciclos glaciares durante finales del Plioceno y principios del Pleistoceno (Weir, 2006; Cadena *et al.*, 2007). En particular, la amplia diversidad biológica que ha evolucionado en las tierras altas mesoamericanas es debido a su distribución discontinua que está moldeada por el requerimiento de determinadas características ambientales relacionadas con la altitud, temperatura, humedad, entre otras. (Hernández-Baños *et al.*, 1995; García-Moreno *et al.*, 2004; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Sánchez-González y Navarro-Sigüenza, 2009; Barrera-Guzmán *et al.*, 2012). El hecho de que los taxones de elevada altitud estén distribuidos en forma de una serie de poblaciones aisladas propicia a que las poblaciones muestren altos grados de divergencia morfológica y genética (García-Moreno *et al.*, 2004).

Al carecer de las condiciones ambientales requeridas por los sistemas montañosos, las tierras de baja elevación actúan como barreras que favorecen la formación de una distribución fragmentada de las tierras altas y de sus especies, lo cual puede generar las condiciones para la especiación alopátrica (García-Moreno *et al.*, 2004; Weir, 2009; Barrera-Guzmán *et al.*, 2012). Uno de los ejemplos más relevantes es el Istmo de Tehuantepec situado al sur de México, es una de las principales barreras biogeográficas que actúa sobre una variedad de taxones neotropicales, de aves (García-Moreno *et al.*, 2004; Sánchez-González *et al.*, 2007; Bonaccorso *et al.*, 2008; Puebla-Olivares *et al.*, 2008; Bonaccorso, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2013; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2014), reptiles (Bryson *et al.*, 2011) y mamíferos (Arellano *et al.*, 2005; León-Paniagua *et al.*, 2007), afectando así, a los eventos de dispersión y colonización (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Barber y Klicka, 2010). Este valle fue formado durante el Mioceno tardío, hace aproximadamente 6 millones de años (Ma), como consecuencia de la superposición de tres eventos tectónicos (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008). Tiene una altitud aproximada de 250 m y alrededor de 200 km de

ancho en su punto más estrecho. Se encuentra entre el océano Atlántico y el océano Pacífico, y está limitado por tres sistemas montañosos: al noroeste por la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre del Sur, y al noreste por tierras altas de Chiapas-Guatemala (Barber y Klicka, 2010; Cortés-Rodríguez *et al*, 2013).

La posición taxonómica de *Diglossa baritula*

El género *Diglossa* pertenece a la familia Thraupidae, que es considerada una de las mayores radiaciones de América. Es la segunda familia más grande de aves, antecedida únicamente por la familia Tyrannidae, representando casi el 4% de todas las especies de aves y aproximadamente el 12% de la avifauna neotropical (Burns, 1997; Fjeldså y Rahbek, 2006; Klicka *et al.* 2007; Barker *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 2014; Burns *et al.*, 2016), es un grupo monofilético que cuenta con 408 especies distribuidas en 105 géneros (Hilty, 2017). Las especies de esta familia poseen una amplia gama de patrones de coloración de plumaje, morfología, comportamientos de forrajeo, vocalizaciones, ecotipos, así como preferencias de hábitat, esta heterogeneidad en distintos aspectos biológicos ha ocurrido en escalas temporal y espacial reducidas (Burns, 1997; Fjeldså y Rahbek, 2006; Barker *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 2014; Burns *et al.*, 2016).

Diglossa es un género neotropical restringido a regiones de alta elevación, es un clado monofilético que cuenta con 18 especies conocidas como “pinchaflores o picaflores” (Fig. 1) debido a que poseen adaptaciones en el pico para alimentarse a través de la extracción del néctar floral sin contribuir en la polinización. Estas adaptaciones incluyen un gancho curvado hacia abajo en la punta de la maxila que se utiliza para sostener la base de corola de una flor tubular, mientras que la afilada mandíbula es usada para perforar la base (Hackett, 1995; Rojas-Nossa, 2007; Mauck y Burns, 2009; Irwin *et al.*, 2010; Rojas-Nossa, 2013; Burns *et al.*, 2014), el néctar es extraído por capilaridad a través de la inserción de la lengua en la perforación (Arizmendi *et al.*, 1996; Schondube y Martínez del Río, 2003; Irwin *et al.*, 2010). Los integrantes de este clado también son denominados “robadores de néctar” o “robamieles” debido a su estrategia de forrajeo altamente especializada (Rojas-Nossa, 2007; Mauck y Burns, 2009; Rojas-Nossa, 2013).

Sin embargo, hay reportes que indican que algunas especies de *Diglossa* pueden contribuir a la polinización: se ha documentado que el daño al tejido floral, por la visita de *D. baritula*, puede atraer a otros polinizadores legítimos (Lyon y Chadeck, 1971); durante el robo de néctar la morfología floral y/o la posición de las flores promueven la adhesión del polen al cuerpo de las aves y de esta manera puede presentarse la polinización (Graves, 1982; Arizmendi, 2001), de hecho Graves (1982) concluyó que *D. brunneiventris* y *D. humeralis* son los principales polinizadores de *Tristerix longebrateatus*; *D. humeralis* y *D. lafresnayii* actúan como polinizadores en forma regular de las flores de *Brachyotum sp.* (Stiles *et al.*, 1992); Rojas-Nossa (2007) observó a las especies de *Diglossa* de la Cordillera Oriental colombiana y determinó que se presenta casi en igual proporción el robo de néctar y la visita legítima. A pesar de las características del pico, los pinchaflores no son nectarívoros obligados, e incluyen frutos, semillas e insectos en su dieta, incluso las especies basales son tanto nectarívoras como frugívoras de igual manera (Schondube y Martínez del Río, 2003).

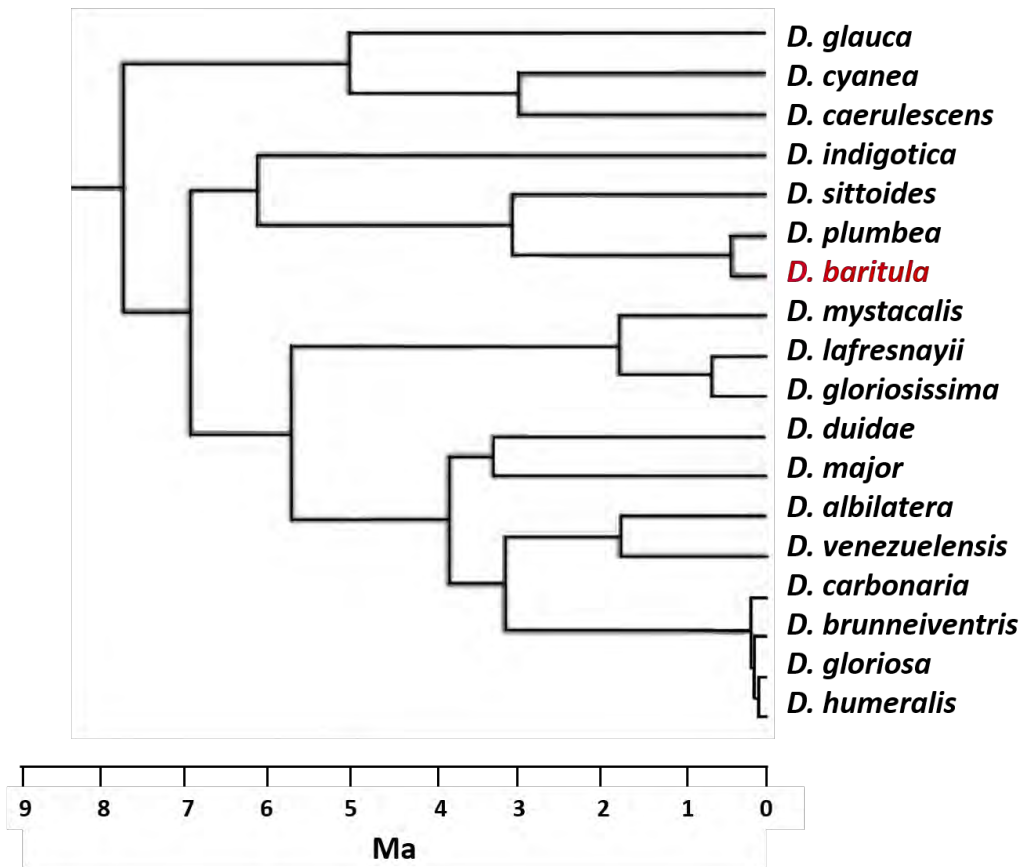


Figura 1. Filogenia del género *Diglossa*, en rojo la especie en estudio, *D. baritula*. Ma: millones de años. Imagen modificada de Barker *et al.*, 2015.

Este género es uno de los linajes dentro de Thraupidae con mayor diversidad morfológica, de patrones de coloración (y presencia o ausencia de dimorfismo sexual), de comportamiento, así como de diferenciación genética (Skutch, 1954; Vuilleumier, 1969; Hackett, 1995; Botero-Delgadillo *et al.*, 2012), y por lo mismo se han realizado diversos tipos de estudios; por ejemplo, considerando que el tamaño del pico varía entre las diferentes especies de *Diglossa*, Schondube y Martínez del Río (2003) desarrollaron un estudio ecológico que consistió en simular la condición frugívora de las especies basales del género modificando el largo del gancho del pico de *D. baritula* en tres tamaños discretos (pequeño, mediano y grande), y se determinó que en los individuos con gancho grande se presenta una eficiencia mayor en la extracción de néctar, mientras que los organismos con gancho reducido son más eficientes en la alimentación de frutos (Schondube y Martínez del Río, 2003; Mauck y Burns, 2009). Hackett (1995) realizó los primeros estudios moleculares de *Diglossa* con datos de aloenzimas y secuencias de mtDNA, y encontraron altos grados de diferenciación dentro varios integrantes del género.

La posición taxonómica del género *Diglossa* ha sido cuestionada y se ha incluido dentro de diferentes familias (Hackett, 1995; Mauck y Burns, 2009). Las primeras taxonomías consideraban a *Diglossa* dentro de las familias Coerebidae (Ridgway, 1902; Vuilleumier, 1969) y Emberizidae (AOU, 1998). Posteriormente Burns y colaboradores (2003) resolvieron la filogenia de la familia Coerebidae a partir de datos de DNA e indicaron que *Diglossa* no pertenece a Coerebidae e incluyeron al género dentro de Thraupidae (Burns *et al.*, 2003). También las especies del género *Diglossa* han estado bajo diferentes posiciones taxonómicas (Hellmayr, 1935; Vuilleumier, 1969; Bock, 1985, Hackett, 1995; Mauck y Burns, 2009) las cuales se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Propuestas taxonómicas para las especies del género *Diglossa*.

Autor	Hipótesis taxonómicas	Tipo de datos utilizados
Cassin (1864) y Sclater (1875)	Incluyeron a las especies en dos géneros, <i>Diglossa</i> y <i>Diglossopsis</i> , este último siendo género monotípico conteniendo sólo a <i>Diglossopsis caerulea</i> que posee el pico más pequeño.	Tamaño del pico

Hellmayr (1935)	Combinó varias especies cercanamente relacionadas, reduciendo el número de especies.	Morfología
Vuilleumier (1969)	Propuso dos rangos de clasificación taxonómica: cuatro "grupos de especies" (<i>major</i> , <i>lafresnayii</i> , <i>albilatera</i> y <i>caerulescens</i>) y cuatro "superespecies" (<i>lafresnayii</i> , <i>carbonaria</i> , <i>baritula</i> y <i>albilatera</i>).	Morfología de pico y lengua, y coloración
Bock (1985)	Retomó el género <i>Diglossopsis</i> donde incluyó a <i>D. caerulescens</i> , <i>D. cyanea</i> y <i>D. glauca</i> .	Morfología de cráneo, lengua y pico
Sibley y Monroe (1990)	Movieron <i>D. indigotica</i> a <i>Diglossopsis</i> .	Hibridación DNA-DNA
Dickinson (2003) y Remsen et al. (2008)	Fusionan a <i>Diglossopsis</i> dentro de <i>Diglossa</i> .	No se especifica

D. baritula ha presentado una serie de arreglos taxonómicos (Hellmayr, 1935; Friedmann et al., 1950; Skutch, 1954; Monroe, 1968; Vuilleumier, 1969; Domínguez-Canseco, 1998; Hilty, 2017), mencionados en la Tabla 2.

Tabla 2. Diferentes posiciones taxonómicas para la especie *D. baritula*.

Autor	Posición taxonómica
Wagler (1832)	Da nombre a la especie <i>D. baritula</i> , que es la especie tipo del género.
Dearborn (1907)	Describió a la subespecie <i>D. b. montana</i> .
Griscom (1932)	Describió una tercera subespecie, <i>D. b. parva</i> .
Hellmayr (1935)	Reporta a <i>D. baritula</i> , <i>D. plumbea</i> y <i>D. sittoides</i> como una sola especie.
Friedmann et al. (1950)	Citan dos subespecies. <i>D. b. baritula</i> (picochueco mexicano) y <i>D. b. montana</i> (picochueco chiapaneco).

Skutch (1954)	Menciona a <i>D. baritula</i> y <i>D. plumbea</i> como una sola especie, con tres subespecies: <i>D. b. baritula</i> , <i>D. b. montana</i> y <i>D. b. plumbea</i> .
Vuilleumier (1969)	Incluye a <i>D. baritula</i> junto con <i>D. plumbea</i> y <i>D. sittoides</i> dentro de la superespecie <i>baritula</i> .
Monroe (1968) e Isler e Isler (1987)	Reportan tres subespecies: <i>D. b. baritula</i> , <i>D. b. montana</i> y <i>D. b. parva</i> .

Descripción y aspectos biológicos de *Diglossa baritula*

Diglossa baritula (Wagler, 1832) conocida como pinchaflor ventricanelo, es una especie mesoamericana que se distribuye desde centro-sur de México hasta Nicaragua (Fig. 2). Es un ave residente que se encuentra restringida a regiones de tierras altas localizadas entre los 1500 a 3500 m donde habita en diversos tipos de hábitats incluyendo bosques de pino, bosques de pino-encino, bosques mesófilo de montaña, ecotonos de bosques, pastizales y jardines en áreas urbanas (Howell y Webb, 1995; Hilty, 2017). Es un ave pequeña de aproximadamente 11 cm y un peso de 6 – 15 g. Posee un pico esbelto con la maxila ligeramente recurvada hacia abajo, se alimenta básicamente de néctar de flores tubulares (p. e. *Byttneria catalpifolia*, *Fuchsia encliandra*, *Lobelia laxiflora*, *Salvia* sp.), además de pequeños frutos (p. e. *Rubus* sp. y *Leandra* sp.), e insectos que captura en el vuelo (Skutch, 1954; Gallo-Corona, 2003; Hilty, 2017).

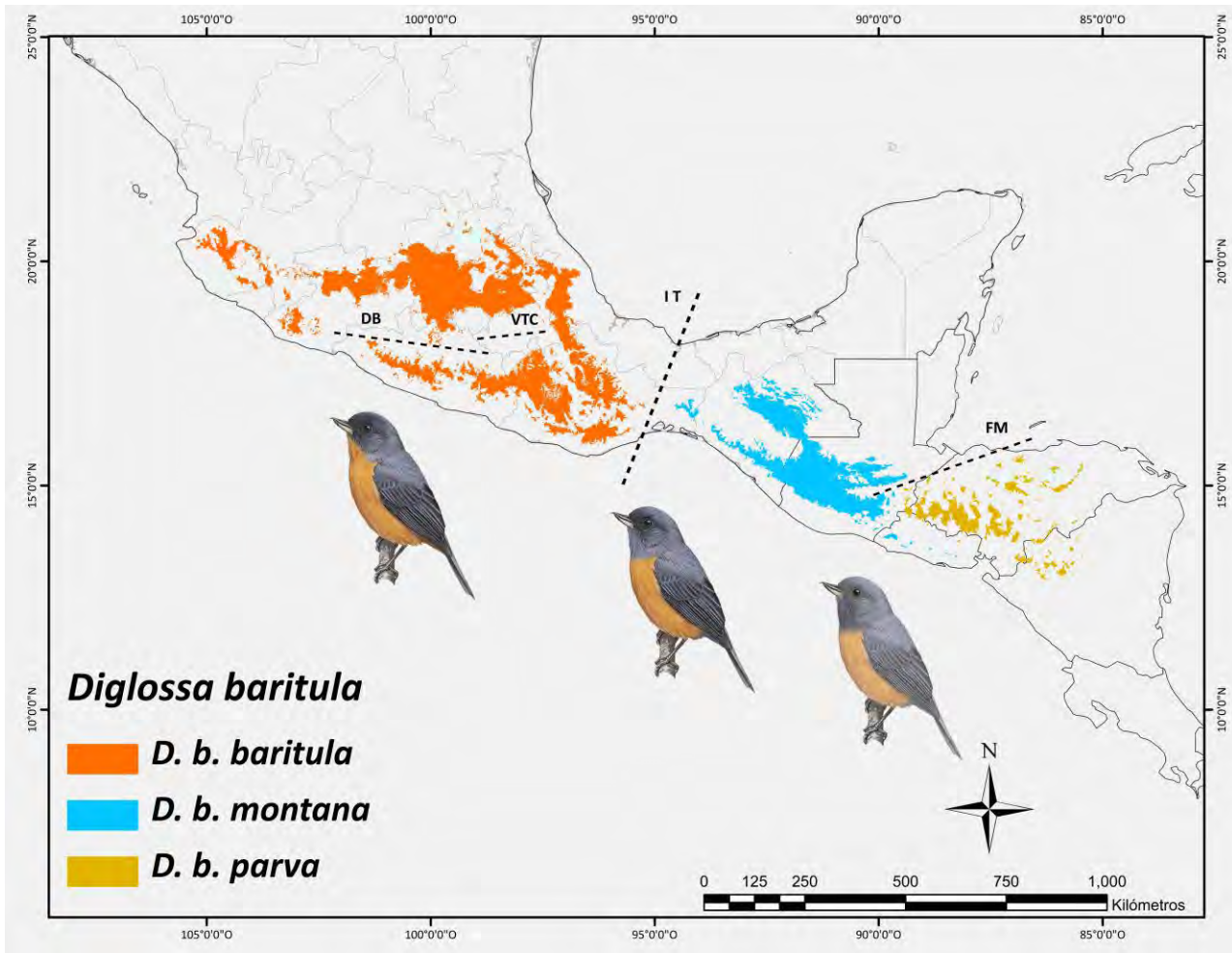


Figura 2. Mapa de la distribución potencial de *D. baritula*, elaborado con MaxEnt v3.3.3 (Elith *et al.*, 2011) y ArcMap 10 (ESRI, 2010). Tres morfotipos con distribución alopatrica, los cuales corresponden a las subespecies: a) en anaranjado *D. b. baritula* distribuida desde sur de Jalisco hasta el Istmo de Tehuantepec, b) en azul *D. b. montana* con distribución en Chiapas (México), Guatemala y El Salvador, y c) en amarillo *D. b. parva* con distribución en centro-oeste de Honduras y centro-norte de Nicaragua. Las líneas punteadas representan las tierras bajas a lo largo de la distribución geográfica, DB: Depresión del Balsas, VTC: Valle de Tehuacán–Cuicatlán, IT: Istmo de Tehuantepec y FM: Falla de Motagua.

Se presenta un marcado dimorfismo sexual (Fig. 3), los machos presentan un plumaje de color que va de azul grisáceo oscuro a gris oscuro en la cabeza, el dorso y la cola (la cabeza con tonalidad más oscura); las plumas cobertoras y las de vuelo están bordeadas de un azul opaco; la parte ventral es de color canela. Las hembras poseen un plumaje color grisáceo oliva en la parte dorsal; las alas y la cola más oscuras que el dorso; la garganta y la parte ventral color canela

más pálido que los machos y con matices color grisáceo oliva (Ridgway, 1902; Howell y Webb, 1995; Hilty, 2017).

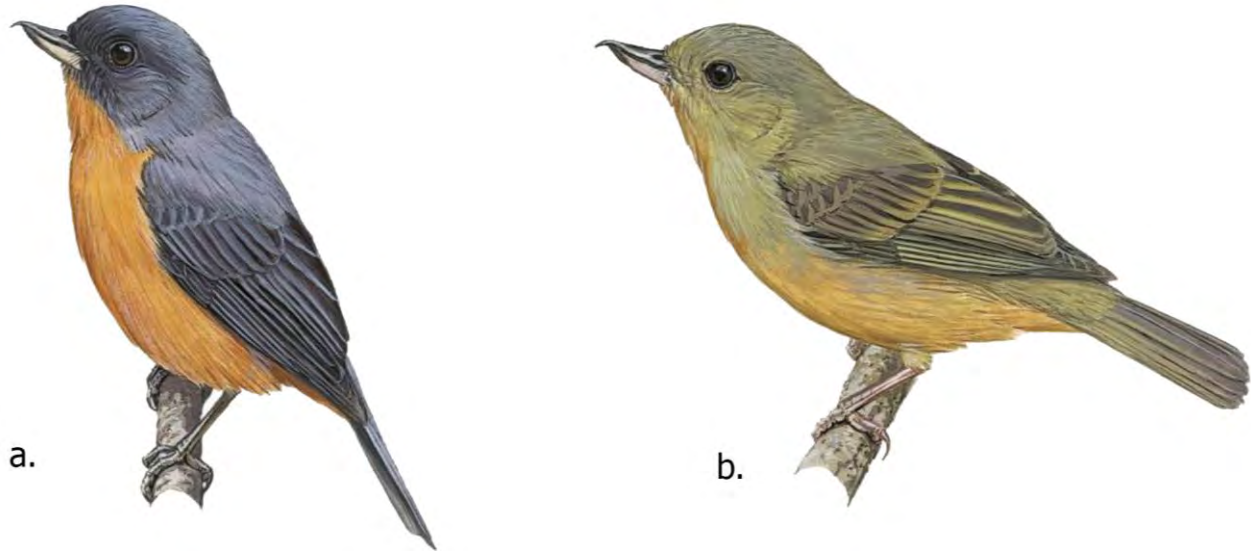


Figura 3. Dimorfismo sexual de *D. baritula*. a) Macho, b) Hembra. Ilustraciones tomadas de Hilty, 2017.

Se han reconocido tres subespecies de acuerdo a su distribución geográfica y diferenciación discreta en el patrón de coloración del plumaje de los machos (Ridgway, 1902; Monroe, 1968; Clements *et al.*, 2016; Hilty, 2017) (Tabla 3, Figs. 2 y 4).

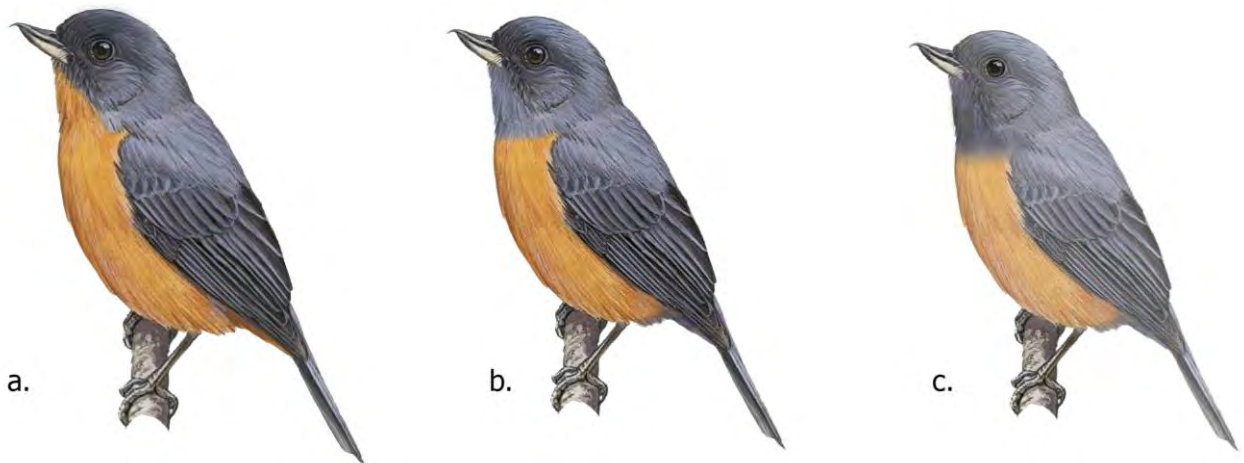


Figura 4. Tres morfotipos dentro del complejo *D. baritula* con diferencias en el patrón de coloración. a) *D. b. baritula*, b) *D. b. montana* y c) *D. b. parva*. Ilustraciones modificadas de Monroe, 1968 y Hilty, 2017.

Tabla 3. Descripción y distribución geográfica de las tres subespecies de *D. baritula*.

Subespecie	Distribución geográfica	Diferenciación en el patrón de coloración
<i>D. b. baritula</i> (Wagler, 1832)	Desde sur de Jalisco hasta el Istmo de Tehuantepec.	El color canela intenso en la parte ventral se extiende desde la garganta hasta las plumas cobertoras de la cola. La cabeza es más oscura.
<i>D. b. montana</i> (Dearborn, 1907)	Sur de México (Chiapas), Guatemala y El Salvador.	La garganta tiene una coloración gris pizarra que se extiende hacia el inicio del pecho. La parte ventral color canela intenso. Las plumas cobertoras ventrales de la cola están ligeramente teñidas de color canela.
<i>D. b. parva</i> (Griscom, 1932)	Centro-oeste de Honduras y centro-norte de Nicaragua.	Es similar a <i>D. b. montana</i> pero la garganta es color gris oscuro. Las plumas cobertoras ventrales de la cola están ligeramente teñidas de color canela. En general, la coloración del plumaje es más pálido.

La monofilia del clado conformado por la especie en estudio, *D. baritula* y sus dos especies hermanas más cercanas, *D. plumbea* y *D. sittoides*, planteada desde la clasificación de Vuilleumier en 1969, fue confirmada con base en diversos tipos de datos. Hackett (1995) analizaron datos de coloración del plumaje, características de aloenzimas, secuencias de mtDNA y sus áreas de distribución disyuntas.

Por otro lado, la gran mayoría de trabajos realizados con *D. baritula* han sido investigaciones ecológicas y conductuales, principalmente debido al hecho de que *D. baritula* generalmente realiza una extracción de néctar de flores que son polinizadas por colibríes (Arizmendi *et al.*, 1996; Schondube *et al.*, 2003; Rojas-Nossa, 2007; Rojas-Nossa, 2013). Lyon y Chadeck (1971) observaron que las flores perforadas por *D. baritula* favorece la visita de abejorros polinizadores del género *Bombus*. Hernández y Toledo (1979) determinaron que *D. baritula* juega un papel importante en el agotamiento de néctar de *Erythrina leptorrhiza* debido a que observaron una alta proporción de orificios en las flores de la planta, además observaron que

la agresión entre colibríes y *D. baritula* es mínima y en la mayoría de los casos se ignoran. Martínez del Río y Eguiarte (1987) observaron a *D. baritula* visitando el agave *Agave salmiana*, *D. baritula* defendía las inflorescencias de sus conoespecíficos pero no de colibríes. Arizmendi y colaboradores (1996) encontraron que no hay efecto significativamente negativo por parte de *D. baritula* sobre el éxito reproductivo de *Salvia mexicana* y *Fuchsia microphylla* y que *D. baritula* puede ser considerado como un comensal o incluso un polinizador poco eficiente, sin embargo, este resultado no puede ser generalizado para todas las especies de plantas que visita *D. baritula*. Domínguez-Canseco (1998) encontró que la medida de la cuerda alar permite diferenciar hembras de machos, y que *D. baritula* visita plantas que presentan flores con estambres expuestos y/o que forman inflorescencias muy compactas, en este tipo de flores se ha observado a aves del género actuar como polinizador. Arizmendi (2001) encontró polen de *Psittacanthus ramiflorus*, *Cirsium jaliscoense*, *Byttneria catalpifolia* y *Calliandra grandifolia* en la cabeza del ave, por lo que determinó que *D. baritula* pueda actuar, de manera indirecta, como un polinizador. Gallo-Corona (2003) y Schondube y Martínez del Río (2003) modificaron experimentalmente el tamaño del gancho de la maxila y determinaron que entre más pequeño sea el gancho disminuye la habilidad para acceder y extraer el néctar. Gallo-Corona (2003) hizo un estudio comparativo entre *D. baritula* y el colibrí *Eugenes fulgens* y encontró que la extracción de néctar por parte *D. baritula* disminuye en flores tubulares que tienen engrosamiento en el tejido, lo cual dificulta perforar la base de la corola, o flores que presentan alcaloides, donde observó que *D. baritula* manifiesta una conducta de repulsión, en contraste, *E. fulgens* si es capaz de extraer néctar de dichas flores. Schondube y colaboradores (2003) observaron que los machos de *D. baritula* presentan ciclos bianuales de reproducción y muda, mientras las hembras sólo lo hacen una vez por año.

Justificación

Al tomar en cuenta que *D. baritula* es una especie residente que habita en tierras altas mesoamericanas, las cuales tienen un significativo potencial para la identificación de taxones divergentes, y que las tres subespecies actualmente propuestas presentan diferencias en coloración del plumaje, *D. baritula* representa un excelente modelo para la búsqueda de un

patrón de variación genética y la presencia de más de un linaje evolutivo dentro sus poblaciones a lo largo de su distribución geográfica.

Este es el primer estudio genético que se hace para las poblaciones de *D. baritula* y los resultados obtenidos permiten tener una primera perspectiva acerca de la presencia de un patrón de variación genética en las poblaciones de la especie; la reconstrucción filogenética permite hacer inferencias acerca de la historia evolutiva, así como de eventos de dispersión y vicarianza; además los datos a partir de mtDNA proporcionan estimaciones de tiempos de eventos de divergencia.

Hipótesis

Con base en la distribución geográfica discontinua y en la existencia de los tres morfotipos dentro del complejo de *D. baritula*, se espera una congruencia entre el patrón de variación genética y la variación geográfica de las tres subespecies, asimismo se espera encontrar altos niveles de estructura genética debido a un escaso intercambio genético entre las poblaciones montanas, aisladas por las tierras bajas.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar y analizar la variación genética que se presenta dentro y entre las poblaciones mexicanas de *Diglossa baritula* empleando secuencias de DNA (mtDNA: ND2 y nDNA: ACO1-I9), de tal forma que se pueda determinar si el patrón de variación genética corresponde con el patrón de variación geográfica de los tres morfotipos presentes dentro del complejo.

Objetivos particulares

- a) Determinar el nivel de estructura genética de las poblaciones a partir de mtDNA.
- b) Obtener una reconstrucción filogenética mediante el análisis de secuencias de nDNA y mtDNA.
- c) Obtener los tiempos de divergencia de los diferentes grupos genéticos encontrados.
- d) Identificar si existen diferentes unidades evolutivas con datos moleculares.
- e) Generar una hipótesis acerca de la historia evolutiva.

II. Métodos

Trabajo de laboratorio

Para el presente estudio se utilizaron 51 individuos de *D. baritula* (grupo interno) de 26 localidades representando la mayor parte de su área de distribución geográfica (Fig. 5, Anexo 1). En los análisis filogenéticos, además se incluyó un grupo externo conformado por 12 especies del género *Diglossa* y 2 especies del género hermano, *Catamenia*. Las muestras de tejido (hígado, corazón y músculo) fueron obtenidas de siete instituciones científicas, tanto nacionales como de Estados Unidos de América: Colección de tejidos del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias Alfonso L. Herrera, UNAM; Colección Nacional de Aves del Instituto de Biología, UNAM; Museo Americano de Historia Natural, Nueva York; Museo de Burke, Universidad de Washington; Museo de Ciencias Naturales de Louisiana, Universidad del estado de Louisiana; Museo Field de Historia Natural, Chicago; Museo de Historia Natural, Universidad de Kansas (Anexo 1). La mayoría de las muestras fueron procesados para la realización del actual estudio, sin embargo,

también se utilizaron un total de 17 secuencias de la base de datos de GenBank (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (Anexo 2).

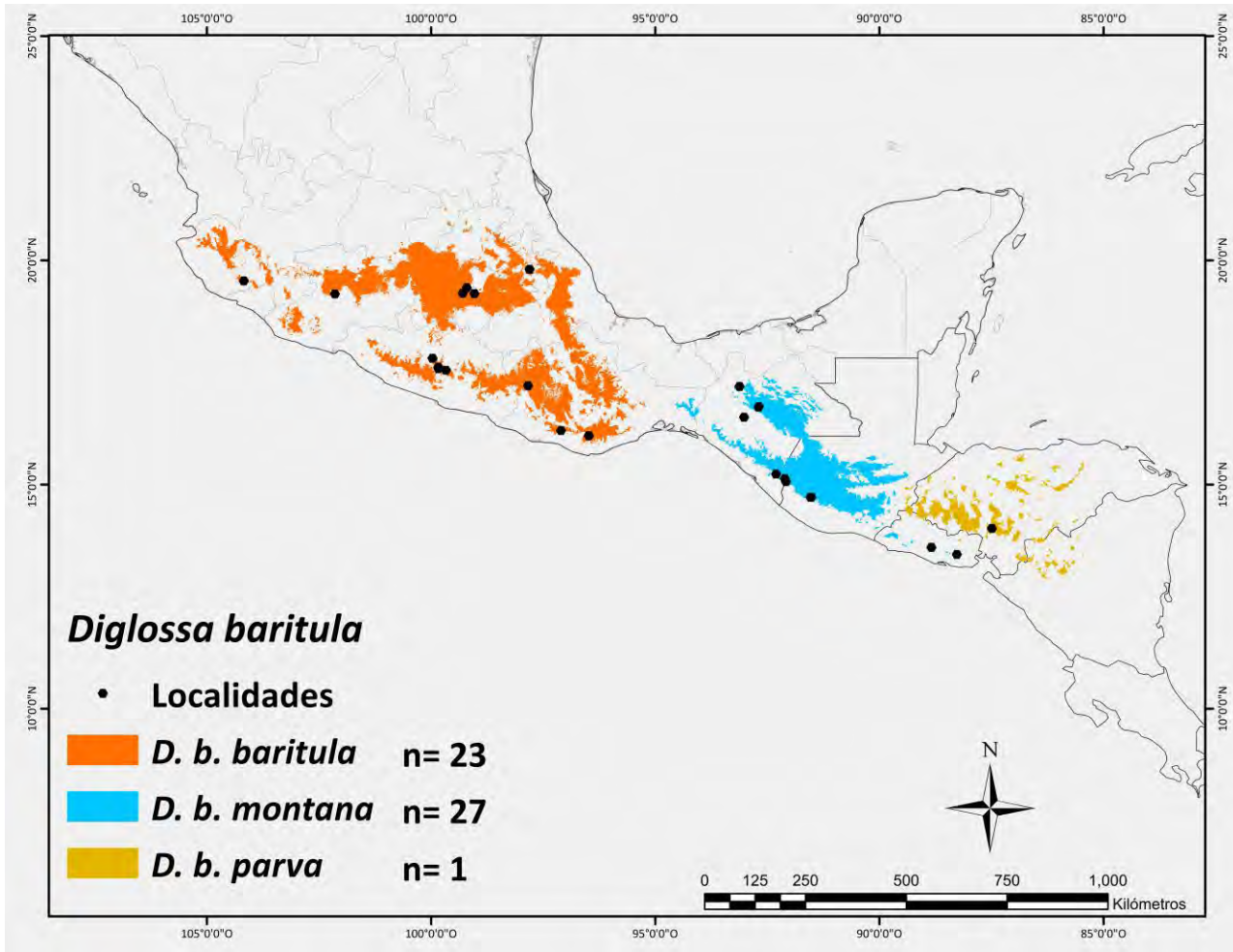


Figura 5. Mapa de las diferentes localidades de muestreo de *D. baritula*, elaborado con MaxEnt v3.3.3 (Elith *et al.*, 2011) y ArcMap 10 (ESRI, 2010). En anaranjado la distribución potencial de *D. b. baritula*, en azul la distribución potencial de *D. b. montana* y en amarillo la distribución potencial de *D. b. parva*. Los puntos en negro representan las localidades de colecta. n= número de individuos por cada subespecie.

Extracción de DNA. La obtención de DNA a partir de muestras de tejido se llevó a cabo utilizando diferentes métodos de extracción. Algunas muestras extrajeron mediante el protocolo NaCl y cloroformo, otras fueron trabajadas con el kit QiagenDNAeasy™ Blood & Tissue (www.qiagen.com) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, y finalmente, las muestras que fueron obtenidas de las colecciones científicas de Estados Unidos de América

fueron extraídas con el kit Epicentre (www.epibio.com) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Se elaboraron geles de calidad con el fin de verificar la obtención y calidad de DNA obtenido, realizando electroforesis en gel de agarosa al 1%. El gel de agarosa se preparó añadiendo 0.74 g de agarosa en 75 mL de buffer TBE 1X. Se cargó 2 μ L de cada muestra en las celdas de gel junto con 2.5 μ L de colorante y una celda fue cargada con el marcador molecular "100 pb Ladder marca AXYGEN." Se aplicó una carga de 100 voltios durante una hora. La tinción se realizó con la adición de Bromuro de Etidio durante 20 minutos. El gel fue observado bajo luz UV en un transluminador.

Cuantificación de DNA. Para tener un registro exacto de la concentración y calidad de DNA obtenido de cada extracción se cuantificó el DNA obtenido mediante nanodrop y EPOCH.

Amplificación de genes por PCR. Se trabajó con dos tipos de genes: DNA mitocondrial de herencia materna, nicotinamida deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) y DNA nuclear de herencia biparental, el intrón nuclear nueve del gen ligado al sexo aconitasa 1 (ACO1-I9). Para la amplificación del gen ND2 se usaron los *primers* externos L5219 y H6313, y los *primers* internos L5758 y H5766; mientras que para ACO1-I9 fueron utilizados los *primers* externos ACO1-I9F y ACO1-I9R y los *primers* internos ACO1-I9IntF y ACO1-I9IntR (Tabla 4). Ambos genes han sido empleados en trabajos previos para resolver relaciones de parentesco en especies de la familia Thraupidae (p. e. Mauck y Burns, 2009; Sedano y Burns, 2010; Burns *et al.*, 2014).

Tabla 4. *Primers* utilizados en este trabajo.

Marcador molecular	Localización en el genoma	Primer	Secuencia	Fuente
ND2	Mitocondria	L5219 (F)	CCCATACCCCGAAAATGATG	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
		H6313 (R)	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
		L5758 (FI)	GGNGGNTGAATRGGNYTNAAYCARAC	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
		H5766 (RI)	RGAKGAGAARGCYAGGATYTTKCG	Sorenson <i>et al.</i> , 1999
ACO1-I9	Cromosoma Z	ACO1-I9F (F)	CTGTGGGAATGCTGAGAGATTT	Friesen <i>et al.</i> , 1999
		ACO1-I9R (R)	CTGCAGCAAGGCACAACAGT	Friesen <i>et al.</i> , 1999
		ACO1-I9IntF (FI)	CCTCTGTGGTAAMCACAAAGCA	Barker <i>et al.</i> , 2008
		ACO1-I9IntR (RI)	GCAGACCCAAACACAAGTTACAA	Barker <i>et al.</i> , 2008

F: *Forward*, R: *Reverse*, FI: *Forward* interno, RI: *Reverse* interno

La amplificación de DNA fue efectuada mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), de acuerdo con los siguientes protocolos:

- 1) Kit de PCR "Vivantis." 9.5875 μL de agua inyectable estéril, 1.25 μL de buffer 10X (KCl [500 mM], Tris-HCl [100 mM] y Tritón 0.1 %), 0.375 μL de MgCl_2 [50 mM], 0.1 μL de dNTPs [10 mM] (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.25 μL de *primer Forward* [10 mM], 0.25 μL de *primer Reverse* [10 mM], 0.1 μL de Taq Polimerasa Vivantis y 0.5–2 μL de DNA.
- 2) Kit de PCR "Phire Hot Start II." 6.6 μL de agua inyectable estéril, 10 μL de buffer 2xPCR, 1 μL de *primer Forward* [10mM], 1 μL de *primer Reverse* [10mM], 0.4 μL de Taq Polimerasa, 2 μL de DNA 35 [ng/ μL].

Las amplificaciones fueron realizadas en termocicladores Techne Flexigen y MultiGene OptiMax de acuerdo con los siguientes programas:

1) Kit de PCR "Vivantis DNA amplification product "

- Gen ND2. Desnaturalización a 94°C por 10 minutos; 35 ciclos de: una desnaturalización a 94°C por 1 minuto, un alineamiento a 54°C por 1 minuto y una extensión de oligonucleótidos a 72°C por 2 minutos; y una extensión final a 72°C por 10 minutos.
- Gen ACO1-I9. Desnaturalización a 95°C por 15 minutos; 35 ciclos de: una desnaturalización a 95°C por 45 segundos, un alineamiento a 55°C por 45 segundos y una extensión de oligonucleótidos a 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

2) Kit de PCR "Phire Hot Start II"

- Genes ND2 y ACO1-I9. Aquellas muestras que no se lograron amplificar con el kit "Vivantis DNA amplification product" se trabajaron con el kit "Phire Hot Start II", el programa consistió en: desnaturalización a 98°C por 5 minutos; 40 ciclos de: una desnaturalización de 98°C por 30 segundos, un alineamiento a 52°C por 30 segundos, extensión de oligonucleótidos a 72°C por 1 minuto; y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Para comprobar que las amplificaciones hayan sido exitosas se realizó electroforesis de los productos de PCR en geles de agarosa al 1% con buffer TBE 1X, el procedimiento fue hecho de la misma manera que se realizaron los geles de calidad antes mencionados, la única diferencia fue que una celda fue cargada con el marcador molecular "100 pb Ladder marca AXYGEN" con el fin de determinar el tamaño del fragmento de DNA.

Secuenciación de DNA. Los productos de PCR fueron enviados a purificar y secuenciar, en ambos sentidos (*Forward* y *Reverse*), en su gran mayoría a MacroGen Inc (Korea), y el resto en el servicio de secuenciación del Instituto de Biología de la UNAM (México).

Edición de las secuencias

El ensamblaje de las secuencias, *Forward* y *Reverse*, se realizó en el programa Sequencher v4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA), donde fueron revisadas y editadas de tal forma que no se presentaran ambigüedades, como codones de paro, y los sitios variables fueron visualizados en el cromatograma para confirmar la correcta asignación de las bases nucleotídicas. Todos los fragmentos de DNA fueron recortados a la misma longitud. Las secuencias se alinearon en el programa MAFFT v6.86 (Katoh y Toh, 2008), se guardaron las matrices en diferentes formatos para su posterior uso en los diferentes análisis con ayuda de los programas ClustalX v2.1 (Thompson *et al.*, 1994) y Mesquite v3.2 (Madison y Madison, 2017). Con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) se realizaron los estimados de sitios conservados, sitios variables y sitios informativos.

Análisis de variación y estructura genética

Medidas de diversidad genética

Para analizar y describir a las poblaciones en función de su variación genética se emplearon diversos estimados a partir de secuencias de ND2. Se calcularon los índices de diversidad haplotípica (h), índice que mide la probabilidad de que tomados dos haplotipos aleatoriamente en una muestra éstos sean diferentes; diversidad nucleotídica (π), una medida de las diferencias de pares de bases de nucleótidos por sitio entre los haplotipos en una muestra (Pérez-Emán *et al.*, 2010); y el número de haplotipos (#hap) con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009).

Estructura genética

Las poblaciones fueron definidas con referencia en la red de haplotipos (Fig. 6) y en las reconstrucciones filogenéticas que se presentan más adelante (Figs. 9 y 10). Se definieron dos

grupos: "Grupo Oeste-IT" que son las poblaciones presentes al oeste del Istmo de Tehuantepec y "Grupo Este-IT" que representa a las poblaciones distribuidas al este del Istmo de Tehuantepec.

Con el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) se calcularon los valores de F_{ST} entre y dentro de las poblaciones presentes a cada lado del Istmo de Tehuantepec. La significancia fue determinada a través de 10000 permutaciones. F_{ST} examina los niveles de divergencia genética entre poblaciones tomando en cuenta las diferencias en las frecuencias haplotípicas y la divergencia haplotípica, tiene un mínimo teórico de 0 (sin divergencia genética) y un máximo teórico de 1 (fijación de alelos alternativos) (Hartl y Clark, 1997; Zink *et al.*, 2006). El nivel de flujo génico (Nm) entre Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT fue evaluado con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009), Nm hace referencia a la migración, es decir, el número de individuos que se mueven y reproducen en una población diferente a la de nacimiento (Morrone, 2013).

Con el objetivo de determinar el nivel de diferenciación en las poblaciones y corroborar si la distribución geográfica tiene alguna influencia sobre el patrón de distribución de la variación genética, se probó una hipótesis *a priori* (Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT) con un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992). Este análisis prueba la estructura genética mediante análisis jerárquico de varianza, usa la frecuencia de los haplotipos y el número de mutaciones entre ellos para probar la significancia de los componentes de la varianza dentro de las poblaciones, entre poblaciones dentro de grupos y entre grupos (Excoffier *et al.* 2005; Klicka *et al.*, 2011). Se utilizaron las secuencias de ND2 y fue realizado por medio de programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Los valores de significancia para AMOVA tomaron en cuenta el número de mutaciones entre haplotipos, y fueron llevados a cabo a través de 10000 permutaciones.

Con los datos del número de los haplotipos presentes, sus relaciones y sus frecuencias obtenidos mediante el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009), con el fin visualizar la diversidad genética y determinar si haplotipos particulares muestran distribuciones geográficas restringidas o asociaciones geográficas a lo largo del área de distribución de la especie se construyeron las redes de haplotipos bajo el algoritmo *Median Joining* (MJ), el enfoque MJ sigue

el criterio de máxima parsimonia (MP) que construye las conexiones entre los haplotipos con el mínimo número de pasos mutacionales entre dos secuencias y estima de mejor manera las relaciones evolutivas entre secuencias cuando las divergencias son recientes (Bandelt *et al.*, 1999). El análisis fue realizado para el gen ND2 y para el intrón ACO1-I9 por medio del programa computacional Network v5.0 (Bandelt *et al.*, 1999)

Se realizó un análisis en el programa *Structure* v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) para inferir estructuración genética, estimar el número de subpoblaciones genéticamente distintas y comparar los resultados con los otros métodos que requieren de definir grupos *a priori*, ya que este análisis no necesita grupos predefinidos. *Structure* es un programa de asignación bayesiana que aplica un algoritmo para asignar los individuos al número de agrupamiento genético (K) más probable, a partir de sus genotipos, y simultáneamente, estima las frecuencias alélicas de los individuos por medio de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), construidas con el método de "Gibbs sampling" (Pritchard *et al.*, 2000; Evanno *et al.*, 2005; Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013). El análisis fue elaborado implementando un modelo con admixia correlacionando las frecuencias alélicas sin información sobre el origen de cada individuo. Se exploraron los valores para $K=1$ a $K=3$, con 10 corridas independientes para cada K , el análisis consistió de un millón de réplicas de MCMC para calcular el mejor número de agrupaciones K . Para determinar el número exacto de agrupaciones genéticas K se calculó el estadístico *Delta K* de acuerdo a Evanno *et al.* (2005).

Reconstrucción filogenética

Para los análisis filogenéticos se utilizaron dos enfoques: Máxima verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Se crearon tres matrices, una para el gen mitocondrial (ND2: 870 pb), unas para datos concatenados (ND2: 870 pb y ACO1-I9: 732 pb) y otra para el intrón nuclear (ACO1-I9: 732 pb). Se incluyó el grupo interno, y el grupo externo para enraizar las filogenias (Anexos 1 y 2). La matriz de secuencias concatenadas se hizo por medio del programa Mesquite v3.2 (Madison y Madison, 2017).

De manera previa a la obtención de las topologías filogenéticas se determinaron los modelos evolutivos de sustitución nucleotídica que mejor se ajusta a cada gen bajo el criterio de información de Akaike (AIC: Akaike, 1973), el gen ND2 fue particionado por codón y el gen ACO1-I9 fue analizado completo. Se determinó cuál es la mejor estrategia de partición para cada set de datos mediante el programa PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012).

Se construyeron los arboles de máxima verosimilitud por medio del programa RAxML v8.2.4 (Stamatakis, 2014), bajo el modelo GTR+GAMMA. La topología con el gen ND2 se particionó por posición del codón, para el árbol de secuencias concatenadas la partición se asignó de acuerdo a la determinada con PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012) y ACO1-I9 se analizó completo. El soporte de los nodos se determinó con 10000 réplicas *bootstrap* no paramétrico.

En el programa MrBayes v3.2.3 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), se infirieron las relaciones filogenéticas, de acuerdo a los siguientes parámetros: se emplearon cuatro cadenas, tres calientes y una fría en el análisis de Cadenas de Monte Carlo Markov Metropolis (MCMC), durante 10 millones de generaciones, con un muestreo de los árboles cada 1000 generaciones. La topología para el gen ND2 se particionó por posición del codón, en la de datos concatenados se empleó la partición determinada por PartitionFinder v1.1.1 (Lanfear *et al.*, 2012) con sus respectivos parámetros y ACO1-I9 se analizó completo. Con el programa Tracer v1.6 (Drummond y Rambaut, 2014) se evaluó la convergencia de las cadenas, se verificó que los valores de ESS (Effective Sample Size) fueran mayores a 200 y fue visualizado el *burn-in*. Se usó un *burn-in* descartando el 25% de los árboles obtenidos. El árbol final fue visualizado en Fig Tree v1.2.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Tiempos de divergencia

Los tiempos de divergencia se determinaron utilizando el gen ND2, bajo un enfoque bayesiano y asignando su respectivo modelo evolutivo, por medio del programa BEAST v1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012). Se empleó un reloj relajado no correlacionado, es decir, no se asumió divergencia constante en todas las ramas, sino que se le asignó una función de probabilidad

lognormal (Li y Drummond, 2012), y se usó un modelo de especiación Yule. Se asignaron cuatro puntos de calibración incluyendo la media y sus respectivos intervalos de confianza: 1) divergencia entre el género *Diglossa* y el género hermano *Catamenia*, 2) último ancestro común de *Diglossa*, 3) divergencia entre *D. baritula*, *D. plumbea* y *D. sittoides* y 4) divergencia entre *D. baritula* y *D. plumbea* (Barker *et al.*, 2015), bajo una distribución normal. El análisis fue hecho realizando dos corridas independientes de 30 millones de generaciones cada una, y un muestreo cada 3000 generaciones. Con el programa Tracer v1.6 (Drummond y Rambaut, 2014) se evaluó la convergencia de los parámetros estimados y se verificó que los valores de ESS fueran mayores a 200, y además fue visualizado el *burn-in*. Se eliminó el 25% de los datos como *burn-in* por medio de LogCombiner v1.8.2 (Drummond y Rambaut, 2012). Se usó TreeAnnotator v1.8.2 (Rambaut and Drummond, 2012) para resumir la información obtenida de los árboles restantes bajo el criterio de máxima credibilidad y para obtener la media de los tiempos de divergencia con intervalos de densidad posterior superiores a 95%. El árbol final fue visualizado en Fig Tree v.1.2.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Análisis de historia demográfica

Con el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) se realizaron los estadísticos *D* de Tajima (Tajima, 1989) y *F_s* de Fu (Fu, 1997) para detectar desviaciones de un tamaño poblacional constante. Estas pruebas de neutralidad pueden ser utilizadas para comprobar si los patrones de mutación observados en el mtDNA son consistentes con un modelo de equilibrio neutral de evolución molecular (Ballard y Whitlock, 2004). La significancia se evalúa por simulaciones coalescentes bajo un modelo de sitios infinitos (Excoffier *et al.*, 2005) y fue examinada a través de 20000 réplicas.

III. Resultados

Descripción de las secuencias obtenidas

Del grupo interno se obtuvieron 51 secuencias del gen ND2 de una longitud de 870 pb (pares de bases), y del intrón ACO1-I9 fueron obtenidas 38 secuencias de un tamaño de 732 pb. Tal como se esperaba, principalmente debido a su naturaleza y origen, los fragmentos de mtDNA y nDNA difirieron en el número de sitios variables, número de sitios invariables y número de sitios parsimoniosamente informativos. El gen ND2 fue el que presentó mayor cantidad de sitios variables (52) e informativos (30), en contraste el fragmento ACO1-9 tan solo cuenta con 4 sitios variables de los cuales 1 es informativo. Además, también hay diferencia en su respectivo modelo de sustitución (Tabla 5).

Tabla 5. Número de bases amplificadas por gen, valores de sitios variables, sitios invariables, sitios informativos, y el mejor modelo de sustitución.

Gen	Total (pb)	Sitios variables	Sitios invariables	Sitios informativos	Modelo evolutivo
ND2	870	52	816	30	Gen completo: TRN + G
					P1: GTR + I + G
					P2: GTR + I + G
					P3: GTR
ACO1-I9	732	4	728	1	GTR + I + G

P1: posición 1 del codón, P2: posición 2 del codón, P3: posición 3 del codón.

Variación y estructura genética

Los valores de diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica y número de haplotipos para las poblaciones se muestran en la Tabla 6. Se presenta mayor diversidad haplotípica en el Grupo Oeste-IT, con valor de 0.96443, respecto al Grupo Este-IT que tiene una diversidad haplotípica de

0.71429, y la diversidad haplotípica total es de 0.90824. De igual forma, los valores de diversidad nucleotídica y el número de haplotipos son mayores en el grupo Oeste-IT (Tabla 6).

Tabla 6. Estimados de diversidad haplotípica (h), diversidad nucleotídica (π) y número de haplotipos (#hap) obtenidos a partir del gen ND2.

	n	h	π	#hap
Grupo Oeste-IT	23	0.96443	0.00483	15
Grupo Este-IT	28	0.71429	0.00178	11
Total	51	0.90824	0.00949	26

Grupo Oeste-IT: población distribuida al oeste del Istmo de Tehuantepec, Grupo Este-IT: población distribuida al este del Istmo de Tehuantepec. n: número de individuos.

Los valores de F_{ST} fueron altos: 0.79967 para el grupo interno en general, 0.79285 para el grupo Oeste-IT y 0.79936 para el grupo Este-IT, sugiriendo que las poblaciones se diferencian de manera significativa ($P < 0.0001$). El valor de Nm fue de 0.12, lo cual revela bajo flujo génico entre las poblaciones presentes a cada lado del Istmo de Tehuantepec (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de índice de fijación F_{ST} y flujo génico (Nm) para las poblaciones de *D. baritula*, a partir del gen ND2.

	F_{ST}	Valor de P	Nm
Grupo Oeste-IT	0.79285	<0.0001	
Grupo Este-IT	0.79936	<0.0001	
Total	0.79967	<0.0001	0.12

Los resultados de AMOVA de los conjuntos de haplotipos con el gen ND2 (Tabla 8) confirman alto grado de estructura poblacional con la mayor parte de la variación genética de la

especie explicada por diferencias entre Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT (79.97%). La variación dentro de estos dos grupos fue relativamente pequeña (20.03%).

Tabla 8. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de *D. baritula*, a partir del gen ND2.

	g. l.	s. m.	Componentes de Varianza	% de variación	Valor de P
Entre poblaciones	1	139.095	5.45355	79.97	<0.0001
Dentro de poblaciones	49	66.944	1.36621	20.03	<0.0001
Total	50	206.039	6.81976		

g.l.: grados de libertad, s.m.: suma de cuadrados.

La red de haplotipos construida para el gen ND2 indica una considerable estructura genética, así como estructuración geográfica. Se obtuvieron un total de 26 haplotipos y valor de diversidad haplotípica (h) de 0.90824 dentro de los 51 individuos de *D. baritula* analizados (Fig. 6). En general, se recuperan dos principales haplogrupos que se corresponden con la distribución geográfica como se menciona a continuación: hay 15 haplotipos que agrupan a los individuos de la subespecie *D. b. baritula* que habitan al oeste del Istmo de Tehuantepec (Grupo Oeste-IT), se presenta una separación de 8 mutaciones respecto a los 11 haplotipos de las subespecies *D. b. montana* y *D. b. parva* que se distribuyen al este del Istmo de Tehuantepec (Grupo Este-IT) (Fig. 7). Cada uno de los dos grupos de haplotipos presenta el distintivo patrón en forma de estrella con varios haplotipos únicos alrededor, en el caso del Grupo Este este patrón es más evidente. Se identifican haplotipos que sólo se encuentran presentes en el Grupo Oeste-IT y otros sólo dentro del Grupo Este-IT, por lo que ambos haplogrupos no comparten haplotipos. Por otro lado, la red de haplotipos obtenida para ACO1-I9 no refleja estructura filogeográfica y se muestra un único haplogrupo en forma de estrella donde hay un haplotipo de alta frecuencia que se encuentra rodeado por haplotipos únicos (Anexo 4).

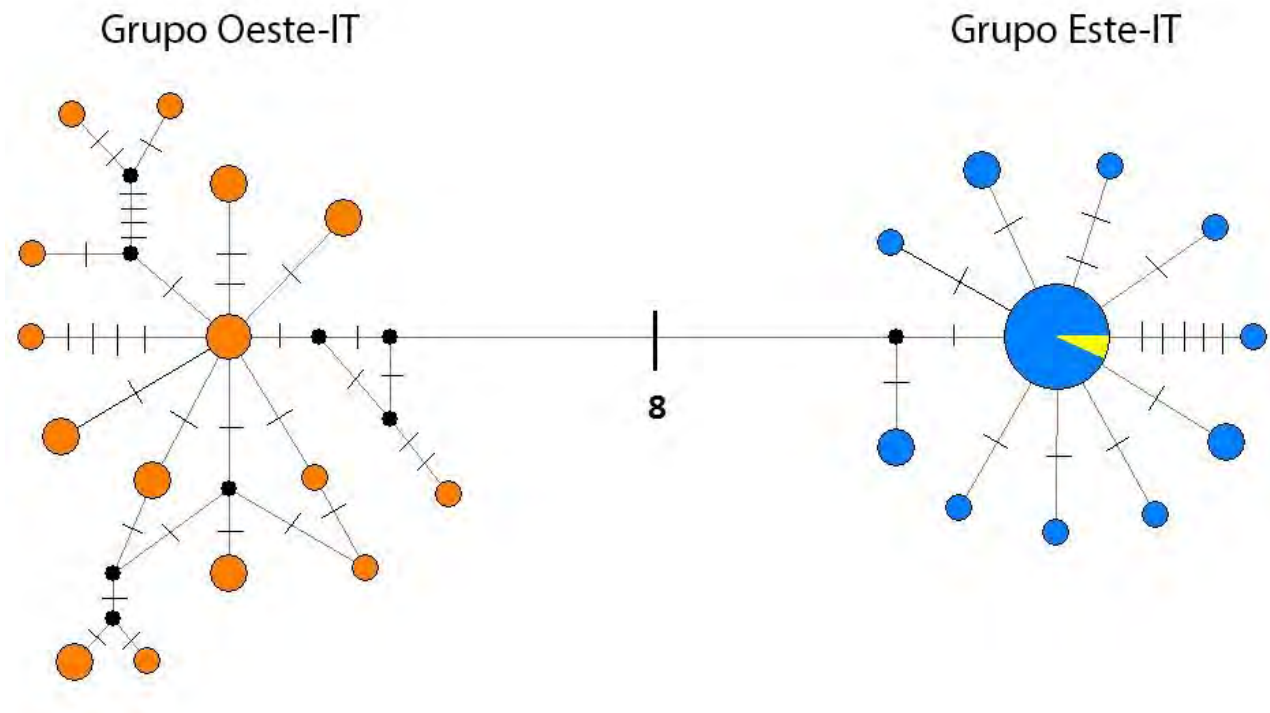


Figura 6. Red de Haplotipos a partir del gen mitocondrial ND2. En anaranjado se representan los haplotipos de *D. b. baritula*, en azul los haplotipos de *D. b. montana* y en amarillo *D. b. parva*. En número se indica los pasos mutacionales entre *D. b. baritula* y *D. b. montana*/*D. b. parva*. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos dentro de cada haplotipo. Dentro de los haplogrupos se indica cada paso mutacional con una línea.

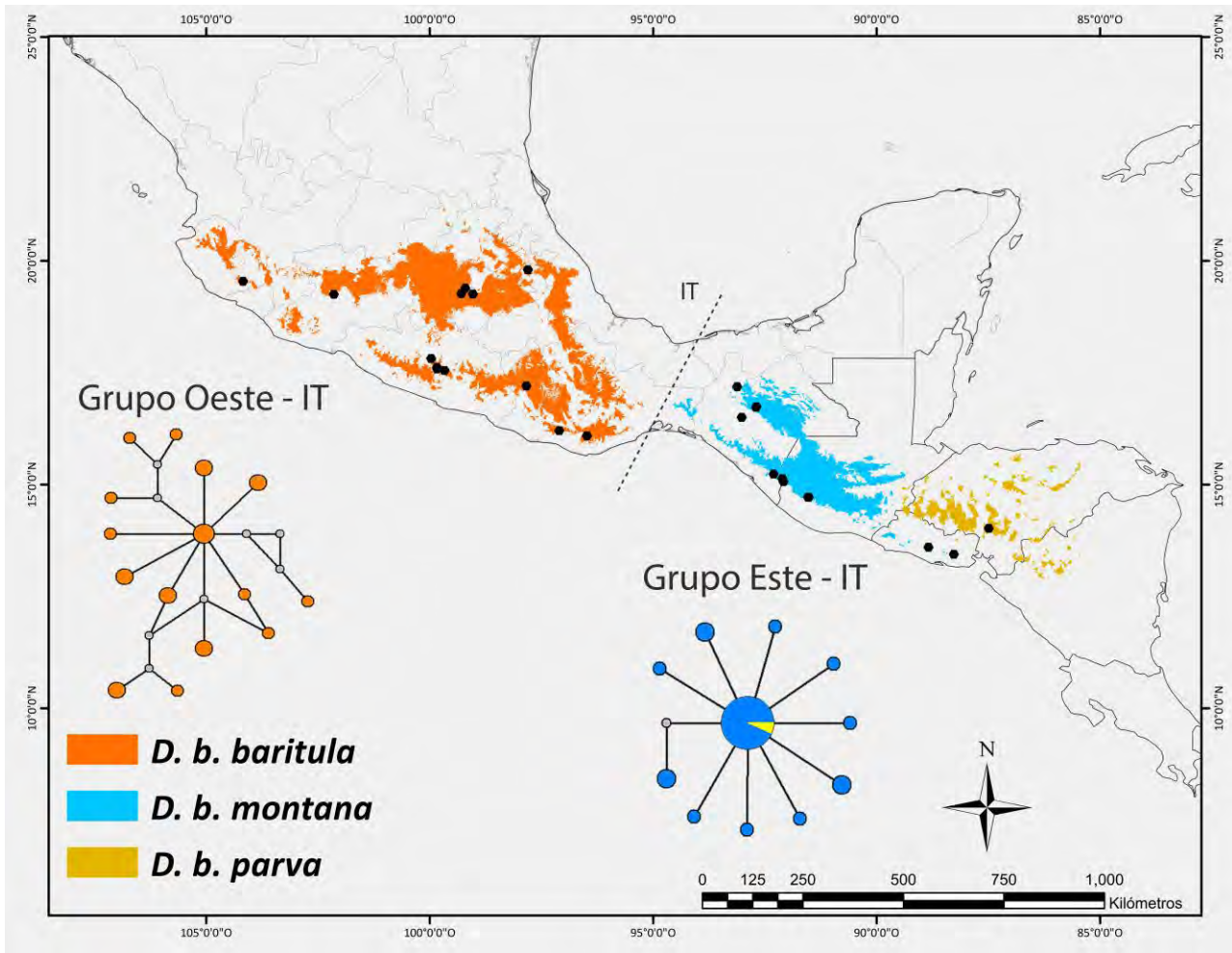


Figura 7. Distribución geográfica de los haplotipos de ND2. En anaranjado el haplogrupo perteneciente al Grupo Oeste-IT, en azul/amarillo el haplogrupo del Grupo Este-IT.

El análisis de asignación bayesiana en *Structure* para $K=3$ corroboró subestructura poblacional, evidenciando la existencia de dos principales grupos genéticos (proporción de las barras en color rojo y verde) y un tercer grupo genético hipotético (proporción de las barras en color azul). Se agrupan los individuos distribuidos al oeste del Istmo de Tehuantepec (Grupo Oeste-IT), y, por otro lado, se agrupan los individuos habitantes al este del Istmo de Tehuantepec (Grupo Este-IT) (Fig. 8). Sin embargo, el análisis para $K=2$ evidencia de manera más clara una división en dos principales grupos genéticos (Anexo 5). Los resultados obtenidos de *Structure* son consistentes con la información obtenida a partir de los análisis de la red de haplotipos y las reconstrucciones filogenéticas.

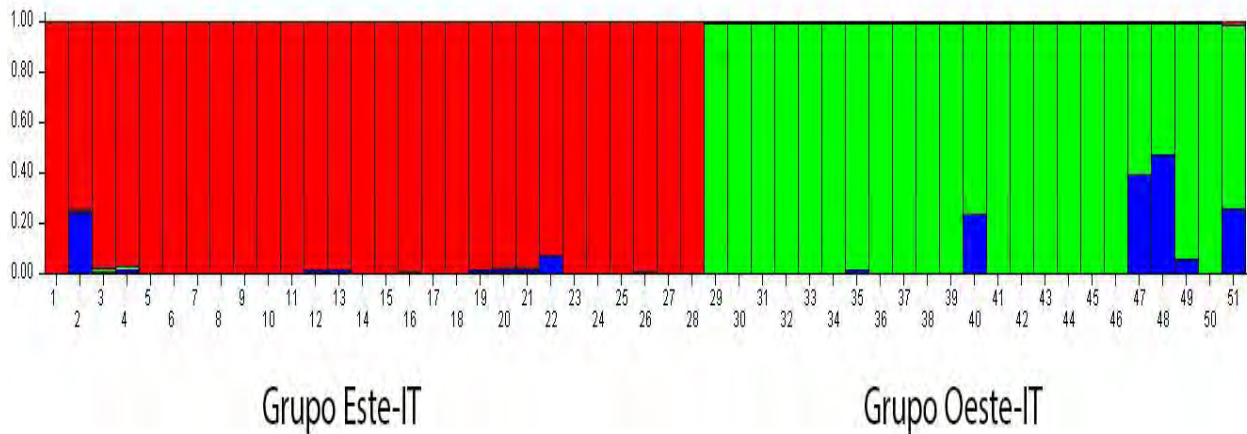


Figura 8. Estructura genética determinada por un análisis de asignación bayesiana para el gen ND2, obtenido mediante *Structure* (Pritchard *et al*, 2000) mostrando los *clusters* recuperados para $K=3$. Cada color representa un agrupamiento genético diferente: el verde es el *cluster* que integra al Grupo Oeste-IT, el rojo representa al *cluster* perteneciente al Grupo Este-IT y el azul representa un tercer *cluster* hipotético. Cada columna representa a un solo individuo y la probabilidad de pertenecer a un determinado *cluster* genético se indica por el porcentaje de cada uno de los colores.

Árboles filogenéticos

Los árboles filogenéticos reconstruidos a partir de secuencias de ND2 (Fig. 9) y de datos concatenados (Fig. 10) bajo los criterios de Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana convergen en la misma topología general con diferencias menores en las ramas terminales. El complejo *D. baritula* es un grupo monofilético, que está compuesto de dos clados principales, patrón consistente con los análisis de la red de haplotipos y *Structure*. Sin embargo, el nodo que da origen a estos dos clados tiene un soporte con niveles relativamente bajos de réplicas *bootstrap* y probabilidad posterior (PP) (ND2: *bootstrap* = 66 y PP = 0.72, datos concatenados: *bootstrap* = 71 y PP = 0.76). En la topología se observa una segregación de los dos clados por parte del Istmo de Tehuantepec: por un lado, uno de los clados incluye a los individuos de las poblaciones de *D. b. baritula* habitantes al oeste de esta barrera (Grupo Oeste-IT); mientras que el otro clado está integrado por los individuos de las poblaciones pertenecientes a las subespecies *D. b. montana* y *D. b. parva* que son residentes al este del Istmo de Tehuantepec (Grupo Este-IT).

A pesar del valor relativamente bajo del nodo que da origen a los dos clados principales, cada uno de estos clados generalmente tienen un soporte alto. En el caso del árbol con el gen ND2: Grupo Oeste-IT tiene un *bootstrap* de 71 y una PP de 0.97, y Grupo Este-IT tiene un *bootstrap* de 87 y una PP de 1; y en la reconstrucción con datos concatenados: Grupo Oeste-IT un *bootstrap* de 78 y una PP de 0.99, y Grupo Este-IT un *bootstrap* de 90 y una PP de 0.99.

En contraste, las reconstrucciones filogenéticas obtenidas para ACO1-19 muestran un patrón de ramificación inestable con clados no resueltos, se aprecia una politomía y todos los integrantes de *D. baritula* junto con la especie hermana más cercana, *D. plumbea*, forman un grupo monofilético (Anexo 6).



Figura 9. Reconstrucción filogenética obtenida mediante Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud para el gen mitocondrial ND2. En número los valores de soporte, *bootstrap* se indica a la izquierda de la diagonal y probabilidad

posterior se indica a la derecha de la diagonal. En anaranjado son los individuos de *D. b. baritula*, en azul son los individuos de *D. b. montana* y en amarillo es el individuo de *D. b. parva*.

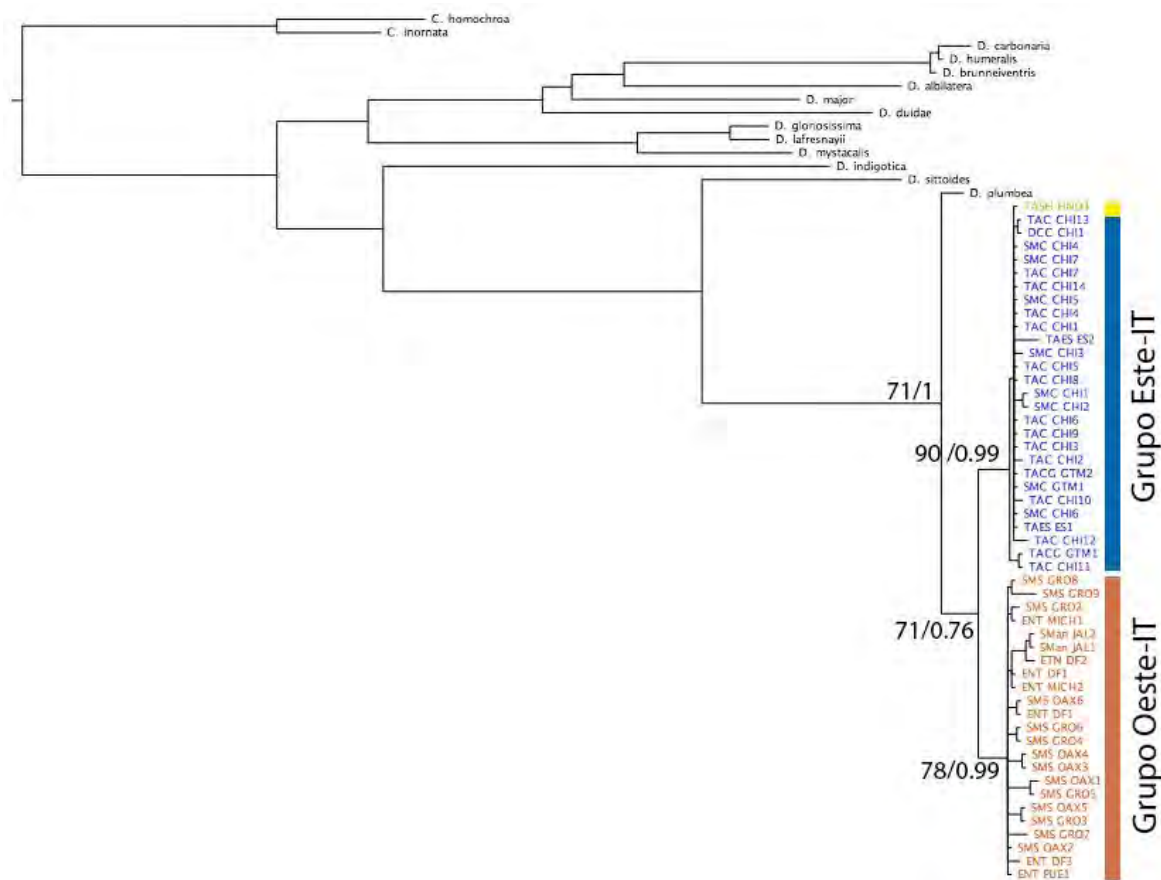


Figura 10. Reconstrucción filogenética obtenida mediante Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud para genes concatenados. En número los valores de soporte, *bootstrap* se indica a la izquierda de la diagonal y probabilidad posterior se indica a la derecha de la diagonal. En anaranjado son los individuos de *D. b. baritula*, en azul son los individuos de *D. b. montana* y en amarillo es el individuo de *D. b. parva*.

Tiempos de divergencia

La estimación de tiempos de divergencia muestra que la separación entre *D. baritula* y su especie hermana, *D. plumbea*, ocurrió hace aproximadamente 0.832 Ma (95% HDP= 0.581 - 0.886). Se evidencia la presencia de dos grupos principales (Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT) dentro de *D. baritula*, cuya divergencia ocurrió aproximadamente hace 0.785 Ma (95% HDP= 0.530 - 0.849) durante el Pleistoceno (Fig. 11). La topología resultante del programa BEAST es

similar a las reconstrucciones filogenéticas obtenidas a partir de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud con el gen ND2. Se muestra el árbol que contiene al grupo interno, y las dos especies hermanas más cercanas, *D. plumbea* y *D. sittoides* (Fig. 11), el árbol que incluye todas las especies utilizadas en este análisis se muestra en el Anexo 7.

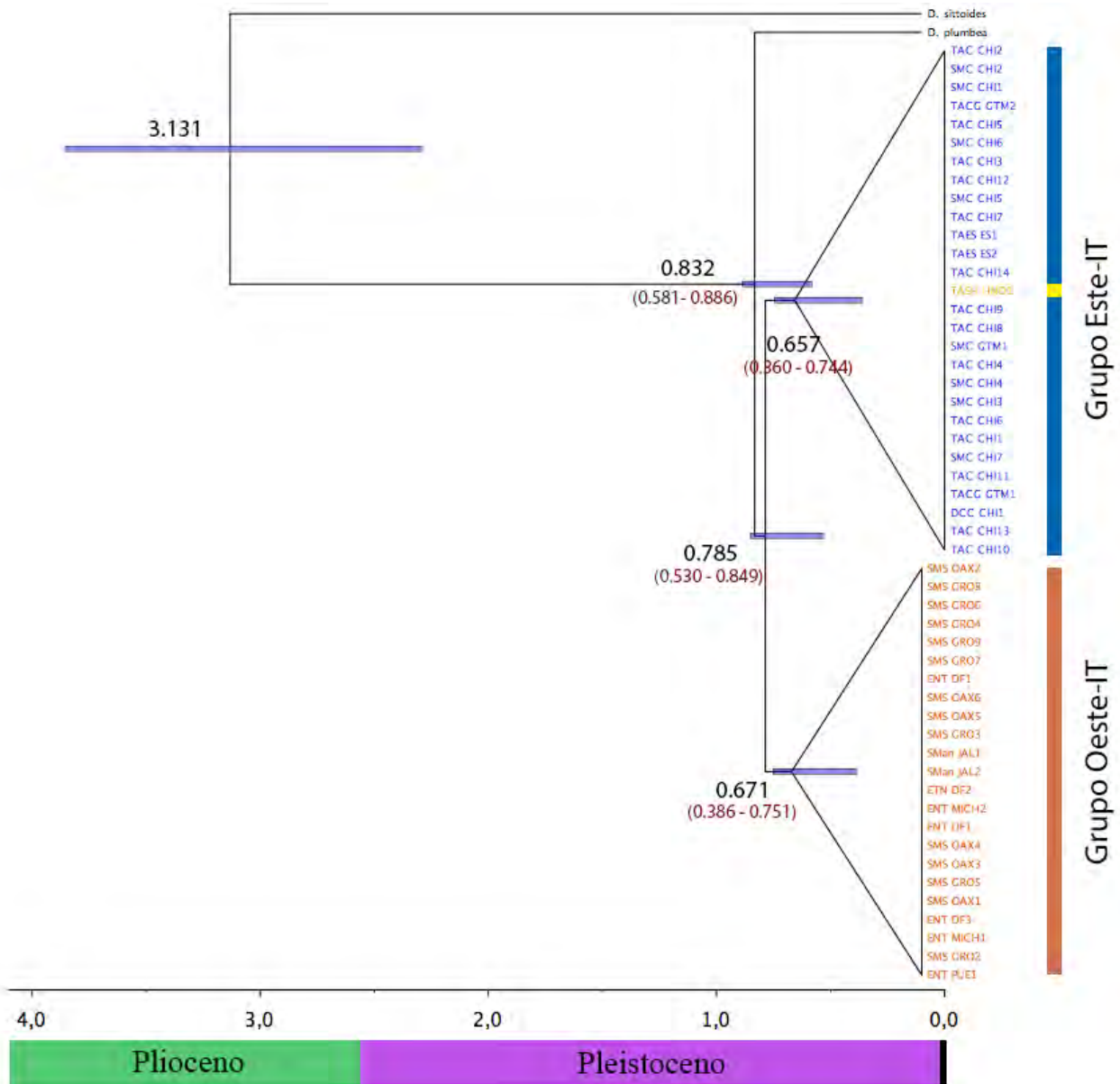


Figura 11. Tiempos de divergencia estimados en BEAST (Drummond *et al.*, 2012) para los grupos que conforman a *D. baritula*.

Análisis de historia demográfica

Los estadísticos D y F_s difieren significativamente de cero (Tabla 9), estos valores negativos y significativos podrían indicar una reciente expansión poblacional en los dos grupos filogeográficamente estructurados.

Tabla 9. Pruebas de neutralidad, D de Tajima y F_s de Fu, a partir de ND2.

	D	Valor P	F_s	Valor P
Grupo Oeste-IT	-1.69468	0.0256	-6.35989	0.004
Grupo Este-IT	-2.24242	0.0023	-6.02651	0.0003

IV. Discusión

Los distintos análisis a partir de datos mitocondriales y datos concatenados convergen en un resultado general: Las poblaciones de *Diglossa baritula* son un clado monofilético integrado por dos grupos evolutivamente independientes (Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT) con altos niveles de variación y estructura genética que tienen una correspondencia geográfica. El patrón de variación genética está acorde con la distribución geográfica discontinua, actuando el Istmo de Tehuantepec como la principal barrera geográfica que interviene en la segregación de las poblaciones pertenecientes a cada extremo de la barrera. A pesar de que *D. baritula* es una especie de reciente divergencia (Mauck y Burns, 2009; Barker *et al.*, 2015; Fig. 11), el gran aporte de variación y estructura genética por parte del gen ND2 y el reducido flujo genético indican que los dos grupos que integran a la especie se encuentran aislados genéticamente.

El ND2 es un marcador mitocondrial que se ha utilizado exitosamente en varios estudios filogeográficos (p. e. Dacosta y Klicka, 2008; Bonaccorso, 2009; Milá *et al.*, 2009; Burns *et al.*,

2014; Burns *et al.*, 2016) y tiene la tasa de evolución más alta respecto a los otros genes mitocondriales (Pacheco *et al.* 2011), hecho que hace a este gen ideal para estudios de diversidad genética en especies recientemente divergentes, tal como lo es *D. baritula* (Mauck y Burns, 2009; Barker *et al.*, 2015). También se utilizó el intrón nuclear ACO1-I9, para contrastar o corroborar lo encontrado con el gen mitocondrial y además se ha establecido que es un gen nuclear de gran utilidad en estudios filogenéticos debido a que al ser un marcador ligado al cromosoma Z tiene un tamaño poblacional efectivo teóricamente más bajo respecto a marcadores autosómicos y por tanto puede ser sensible a subestructura poblacional (p. e. Barker *et al.*, 2008; Barker *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 2014; Barker *et al.*, 2015), estudios previos ya habían utilizado este gen (p. e. Burns *et al.*, 2014) y se muestra que éste da información útil en los análisis filogenéticos. Para *D. baritula*, el gen ACO1-I9 solo presentó 4 sitios variables, y un sitio informativo, esto tal vez se debe a que al ser un fragmento de nDNA tiene un tiempo de coalescencia más largo y una tasa de mutación más lenta (Newton, 2003; Zink y Barrowclough, 2008; Nabholz *et al.*, 2009). Debido al bajo aporte de variación genética por parte de ACO1-I9 principalmente se discute los resultados obtenidos con ND2 y datos concatenados.

Relaciones filogenéticas

Tanto la inferencia bayesiana (IB) como el análisis de máxima verosimilitud (ML), basados en mtDNA y secuencias concatenadas, recuperan la misma topología general, indicando que el complejo *D. baritula* es un grupo monofilético conformado por dos clados que representan al Grupo Oeste-IT y al Grupo Este-IT. Los valores de soporte del nodo que origina a estos dos clados pueden ser justificados debido al hecho de que *D. baritula* es una especie de reciente divergencia (Mauck y Burns, 2009; Barker *et al.*, 2015; Fig. 11) y debido al poco intercambio genético entre las poblaciones del Grupo Oeste-IT y las poblaciones del Grupo Este-IT ($Nm = 0.12$). Sin embargo, se ha manifestado que en el caso de soporte a través de réplicas *bootstrap*, un clado puede ser considerado con alto soporte si cuenta con un *bootstrap* mayor a 70 (Hillis y Bull, 1993; Mauck y Burns, 2009; Barrera-Guzmán *et al.*, 2012). El hecho de que *D. baritula* sea un grupo monofilético refleja que todos los alelos de las poblaciones de *D. baritula* tienen un ancestro común más cercano entre sí respecto a los alelos de su especie hermana *D. plumbea*.

La monofilia recíproca del mtDNA es una etapa en el continuo de la divergencia genética que dos poblaciones sufren después del aislamiento (Arbeláez-Cortés *et al.*, 2010). De acuerdo a los resultados, es evidente que dentro de *D. baritula* existen dos grupos recíprocamente monofiléticos, un clado representa a la subespecie *D. b. baritula* (Grupo Oeste-IT), y el otro integra a las subespecies *D. b. montana* y *D. b. parva* (Grupo Este-IT).

Uno de los aspectos importantes de mencionar es que sólo se utilizó una muestra de la subespecie *D. b. parva*, por lo que la deficiente representación, explicaría la inclusión de esta subespecie dentro de *D. b. montana*. De manera que este trabajo refleja la importancia de un buen muestreo a nivel intraespecífico en estudios filogenéticos, es crucial que exista una adecuada representación de individuos en toda el área de distribución geográfica, y que, además estén bien representadas todas las subespecies y poblaciones alopátricas existentes.

A diferencia de las topologías filogenéticas a partir de ND2 y secuencias concatenadas, los arboles obtenidos a partir de únicamente ACO1-I9 no muestran definición filogenética, por lo que este gen por sí solo no es capaz de resolver las relaciones intraespecíficas de *D. baritula*, incluso la especie hermana *D. plumbea* se integra al grupo interno (Anexo 6). Este resultado puede ser debido a la reciente divergencia entre *D. plumbea* y *D. baritula* (Barker *et al.*, 2015; Fig. 11), y a una lenta tasa de evolución de ACO1-I9 la cual se ve reflejada en el bajo número de sitios variables y sitios informativos (Tabla 5).

Los genes mitocondriales pueden revelar la estructura y la variación de manera más detallada, y una mejor definición filogenética (García-Moreno *et al.*, 2004; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Zink y Barrowclough, 2008; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2011). Algunos estudios (Ej. Arbeláez-Cortés *et al.*, 2010) hacen referencia a que, en estudios filogeográficos de especies recientemente divergentes, es justificable el uso exclusivo de fragmentos de mtDNA, por ser indicadores más sensibles a diferencia de los genes nucleares que no son capaces de recuperar las recientes divisiones filogeográficas. La inclusión de más genes de mtDNA podría aclarar las relaciones dentro las poblaciones a cada lado del Istmo de Tehuantepec.

Variación y estructura genética, e historia evolutiva

El gen ND2 proporcionó evidencia de significantes niveles de diferenciación genética dentro del complejo *D. baritula*, a tal grado que se aprecia un patrón dicotómico en los distintos análisis.

A pesar de que los valores de π fueron bajos, los de h fueron altos (Tabla 5), este patrón podría estar asociado con una reciente diversificación (Li y Sadler, 1991; Arbeláez *et al.*, 2010) de la especie *D. baritula* (Mauck y Burns, 2009; Barker *et al.*, 2015) y de sus poblaciones.

Los valores de F_{ST} y los porcentajes de variación (AMOVA) indican una considerable estructura genética. Es probable que la fragmentación alopatrica haya afectado la estructura filogeográfica de *D. baritula*. Las poblaciones del este del Istmo de Tehuantepec están diferenciadas genéticamente de las poblaciones del oeste de la barrera. Hay más variación genética entre las poblaciones a cada lado de la barrera, es decir, entre Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT, que en las poblaciones del mismo lado de la barrera. Se presenta un reducido intercambio genético que propicia la diferenciación de las poblaciones, tal diferenciación podría representar las primeras etapas de proceso de especiación (González *et al.*, 2011).

La red de haplotipos para ND2 muestra fuerte estructura filogeográfica, presentándose dos principales haplogrupos, uno correspondiente al Grupo Oeste-IT y otro al Grupo Este-IT, y no hay haplotipos que son compartidos entre ambos lados del Istmo de Tehuantepec. Ambos haplogrupos tienen un patrón en forma de estrella, esto es más notable en el haplogrupo correspondiente al Grupo Este-IT, donde hay un haplotipo de alta frecuencia que comparten la gran mayoría de los individuos y de este haplotipo se derivan muchos haplotipos de baja frecuencia. El patrón de estrella puede estar asociado a una reciente expansión demográfica (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2013), lo cual se demuestra con los valores negativos y significativos obtenidos en las pruebas de neutralidad (Tabla 9). Por otro lado, la red de haplotipos para ACO1-19 no refleja estructura filogeográfica. El análisis *Structure* asignó a todos los individuos dentro de su respectivo agrupamiento genético, de manera que también se revela un distintivo patrón

dicotómico, este resultado puede ser debido a la alta diferenciación genética entre el Grupo Oeste-IT y el Grupo Este-IT.

El escenario general de historia demográfica muestra que los Grupos Oeste-IT y Este-IT no han sido estables a través del tiempo y se presenta una evidencia de expansión demográfica para ambos grupos (Tabla 9). El rechazo a la hipótesis de neutralidad probablemente signifique que la selección natural está operando sobre el gen ND2 y/o el tamaño poblacional no ha sido constante a través del tiempo. Sin embargo, los valores negativos de D y F_s deben ser interpretados con precaución debido a que es difícil distinguir entre la contribución que aporta la historia demográfica y la de la selección natural, por ejemplo, los patrones de variación genética de una región de DNA neutral que está ligada a un sitio que ha sufrido una reciente sustitución adaptativa o un barrido selectivo son similares a los de una población en expansión (Ballard y Whitlock, 2004). El desarrollo de otras pruebas, tales como skyline plots, puede aportar mayor evidencia de la historia demográfica.

Los presentes resultados sustentan, una vez más, la idea de que los sistemas montañosos neotropicales son un laboratorio natural de divergencia poblacional (Weir, 2009), y el planteamiento de que hay mayor estructura genética en poblaciones mesoamericanas, en comparación con las presentes en otras áreas geográficas (p. e. El Neártico) (Hackett, 1995; García-Moreno et al., 2006; Navarro-Sigüenza *et al.*, 2008; Kerr *et al.*, 2009; Weir, 2009; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2014).

Al haber un limitado número de fósiles de aves (Nahum, *et al.*, 2003; García-Moreno, 2004; Near y Sanderson, 2004; Clarke *et al.*, 2005; Ericson *et al.*, 2006; Pereira y Baker, 2006; Cracraft y Barker, 2009; Morlon *et al.*, 2011), generalmente se recurre a utilizar secuencias de DNA para estimar tiempos de divergencia, y se emplea la generalizada tasa de divergencia de secuencias de 2% por millón de años para genes mitocondriales (Johns y Avise, 1998; Nahum *et al.*, 2003; García-Moreno, 2004; Lovette, 2004; Pereira y Baker, 2006; Weir y Schluter, 2008; Weir, 2009). Sin embargo, en el presente estudio se determinó no optar por esta opción debido a que ya se ha establecido que existe una gran variación en las tasas de mutación entre los genes

mitocondriales, y dentro de los diferentes grupos de aves (Sanderson, 2003; García-Moreno, 2004; Pereira y Baker, 2006; Baker, 2008; Weir y Schluter, 2008; Lanfear *et al.*, 2010; Nam *et al.*, 2010; Pacheco *et al.*, 2011), por ejemplo, dentro del genoma mitocondrial de aves, el gen ND2 es el que tiene la tasa de evolución más rápida, mientras el gen COI (citocromo c oxidasa subunidad 1) es el que evoluciona a una tasa más lenta (Pacheco *et al.*, 2011).

La divergencia de las secuencias mide los tiempos de coalescencia, el punto en el que los haplotipos comienzan a divergir (Weir, 2009). Se usó la divergencia de las secuencias de ND2 para estimar los tiempos de divergencia de los dos clados presentes al interior de *D. baritula*, es decir, la divergencia entre Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT (hace 0.785 Ma, 95% HDP = 0.530 - 0.849), así como la divergencia de entre *D. baritula* y *D. plumbea* (hace 0.832 Ma, 95% HDP = 0.5811 - 0.8866), ambos eventos llevados a cabo durante el Pleistoceno. Debido a que se calculó el reloj molecular únicamente con los datos de secuencias de un gen mitocondrial (Fig. 11), las estimaciones de tiempo deben ser interpretadas con precaución. Sin embargo, estas estimaciones de tiempo son consistentes con los recientes tiempos de divergencia de poblaciones de especies con similar distribución que *D. baritula* y/o que el Istmo de Tehuantepec actúa como barrera geográfica, por ejemplo, *Chlorospingus ophthalmicus* (García-Moreno *et al.*, 2004), *Basileuterus belli*, *Atlapetes albinucha*, *Picoides villosus* (Barber y Klicka, 2010).

El género *Diglossa* es reconocido como un grupo de aves que representa a una de las radiaciones que han acumulado especies durante los últimos millones de años, algunos ejemplos de especies que han divergido hace menos de un millón de años son: *D. humeralis*, *D. gloriosa*, *D. brunneiventris*, *D. carbonaria*, *D. plumbea* y *D. baritula* (Mauck y Burns, 2009; Campagna *et al.*, 2012; Barker *et al.*, 2015, Fig 1). El género tiene una distribución neotropical, el mayor número de especies habita en Sudamérica, los nodos basales y la mayoría de los nodos incluyen el norte de los Andes como parte de su distribución, de tal manera que se ha identificado un origen biogeográfico andino para el linaje *Diglossa*. Se han planteado dos grandes eventos de dispersión: uno desde el norte de los Andes a los tepuyes de Venezuela; y otro desde el norte de los Andes hacia Centroamérica (Hackett, 1995; Mauck y Burns, 2009). Este segundo evento de dispersión

mencionado puede explicar la presencia de las únicas dos especies con distribución mesoamericana, *D. baritula*, y su especie hermana, *D. plumbea*.

La actual distribución en forma de parches discontinuos de las poblaciones de *D. baritula*, puede deberse en gran parte a las oscilaciones climáticas durante el Pleistoceno (Hackett, 1995; García-Moreno *et al.*, 2004b; Mauck y Burns, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2013). Dichas fluctuaciones entre ciclos glaciares e interglaciares han generado períodos alternos de aislamiento y continuidad de las tierras altas debido a sus repetidas series de desplazamientos verticales y horizontales, las especies residentes de tierras altas al responder a los cambios ecolimáticos han tenido un gran impacto, ya que las poblaciones han presentado sucesivas oportunidades tanto de divergir en aislamiento como de llevar a cabo flujo genético cuando son reconectadas (Hackett, 1995; Klicka y Zink, 1997; Drovetski, 2003; García-Moreno *et al.*, 2004b; García-Moreno *et al.*, 2006; Zink y Klicka, 2006; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Puebla-Olivares *et al.*, 2008; Barber y Klicka, 2010; Patel *et al.*, 2011; Barrera-Guzmán *et al.*, 2012; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2013). Al tomar en cuenta que *D. baritula* es una especie residente restringida a tierras altas, resulta evidente que estas fluctuaciones climáticas han sido un factor relevante sobre la historia evolutiva de la especie.

Por un lado, durante los periodos glaciares, los bosques montanos de Sudamérica y Centroamérica disminuyeron en elevación (1000 metros o más) y por tanto han presentado una distribución más continua, respecto a la actualidad, lo cual se traduce a la presencia de una ruta de dispersión para las especies montanas (Hackett, 1995; García-Moreno *et al.*, 2004b; Weir, 2009; Barber y Klicka, 2010). El ancestro de *D. baritula* extendió su distribución hacia el norte, desde Sudamérica hacia Centroamérica, y *D. baritula* ha alcanzado una distribución mesoamericana. Ahora bien, en el transcurso de los periodos interglaciares, los bosques montanos retornan a altitudes elevadas y su conexión se reduce o se pierde causando eventos vicariantes, donde los taxones y poblaciones que se encontraban en contacto durante el periodo glacial, durante el interglacial tienden a separarse, y en consecuencia a diferenciarse (Hackett, 1995; Weir, 2009; Barber y Klicka, 2010).

Diversos estudios han corroborado la importancia de grandes eventos vicariantes (por ejemplo, el levantamiento andino) en la diversificación neotropical. Sin embargo, cada vez se presenta mayor reconocimiento que la dispersión a través de barreras preexistentes también ha jugado un papel crucial, (García-Moreno *et al.*, 2006; Bates *et al.*, 2008). El Istmo de Tehuantepec es una actual barrera geográfica para la poblaciones de *D. baritula*, los dos grupos que conforman a *D. baritula* son producto de uno o incluso varios eventos de dispersión a través del valle, seguido de una separación geográfica, por la influencia de las cambiantes condiciones climáticas durante el Pleistoceno. La existencia de más un linaje evolutivamente independiente dentro de una especie con distribución a ambos lados del Istmo de Tehuantepec es patrón que se ha encontrado en diversos grupos de animales de Mesoamérica, tanto aves (García-Moreno *et al.*, 2004a; García-Moreno *et al.*, 2004b; Sanchez-Gonzalez *et al.*, 2007; Bonaccorso *et al.*, 2008; Puebla-Olivares *et al.*, 2008; Bonaccorso, 2009; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2013; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2014), reptiles (Bryson *et al.*, 2011) y mamíferos (Sullivan *et al.*, 2000; Arellano *et al.*, 2005; León-Paniagua *et al.*, 2007), afectando así, a los eventos de dispersión y colonización (Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Barber y Klicka, 2010).

La identificación de barreras potenciales al flujo genético tiene implicaciones importantes para investigaciones ecológicas, de conservación y evolutivas (Arbeláez *et al.*, 2010). El Istmo de Tehuantepec es una barrera que actualmente lleva a cabo una segregación filogeográfica del complejo *D. baritula*, lo cual está promoviendo una marcada estructura y divergencia poblacional, a diferencia de otras regiones de baja altitud que no intervienen en la diferenciación poblacional, incluyendo la Depresión del Balsas, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, y la de Falla de Motagua (Fig. 2).

En ocasiones no hay una relación de correspondencia entre divergencia genética y fenotípica (Omland *et al.*, 2000; Cortés-Rodríguez *et al.*, 2008; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2010; Barber y Klicka, 2010; Barrera-Guzmán *et al.*, 2012), sin embargo, en el caso de *D. baritula* se cumple un discreto patrón de coloración que está en congruencia con los dos grupos: la subespecie correspondiente al Grupo Oeste-IT presenta un patrón de coloración que difiere al encontrado en las subespecies del Grupo Este-IT, se presentan tenues diferencias en la coloración

de la garganta y las plumas cobertoras de la cola (Fig. 4). En poblaciones alopátricas que están diferenciadas genéticamente, la deriva, la selección ecológica o ambas, pueden inducir cambios en las características implicadas en la elección de pareja, por ejemplo, la coloración del plumaje, promoviendo el aislamiento reproductivo (González *et al.*, 2011). La diferenciación en coloración junto con la diferenciación genética en *D. baritula*, es posible que indique que los dos grupos están pasando por un proceso de divergencia. Sin embargo, no se puede descartar que las diferencias en coloración del plumaje pueden reflejar la plasticidad fenotípica en lugar de la variación genética subyacente. Evidentemente hace falta el complemento de distintos tipos de estudios para definir si estos dos grupos son dos especies crípticas.

Se reconocen las limitaciones de usar pocos loci y un bajo número de muestras para inferir procesos y eventos poblacionales y fechar dichos eventos. Sin embargo, este enfoque fue exploratorio y es el primer estudio genético que se hace para las poblaciones de *D. baritula*, y los resultados obtenidos son una hipótesis basal que guiará la implementación de diferentes métodos en futuros estudios sobre la especie. Se requieren datos complementarios que confirmen los presentes resultados, incluyendo el estudio de caracteres clave para el reconocimiento de pareja en aves como cuantificación de coloración de plumaje y de vocalizaciones; así como datos de morfometría, modelado de nicho ecológico, la adición de fragmentos de mtDNA y estudios de secuenciación de nueva generación.

V. Conclusiones

- 1) La considerable variación genética evidencia una clara división en dos grupos genéticos, Grupo Oeste-IT y Grupo Este-IT, la cual tiene una correspondencia geográfica.
- 2) El patrón filogeográfico indicó que el Istmo de Tehuantepec es la barrera geográfica que ha reducido el intercambio genético entre las poblaciones presentes a cada lado de esta barrera.

- 3) La segregación de los dos grupos genéticos, ocurrió hace 0.785 Ma, por lo tanto, hubo una influencia por parte de los cambios climáticos del Pleistoceno.

- 4) Este es el primer estudio genético que se hace para *D. baritula*, y los resultados obtenidos son una hipótesis base para formular preguntas evolutivas y ecológicas, y de esta forma realizar estudios complementarios (p. e. coloración de plumaje, morfometría, vocalización, y secuenciación de nueva generación).

VI. Perspectivas

Los resultados de los diferentes análisis abren la posibilidad de un esfuerzo futuro que podría enfocarse en diferencias fenotípicas y su posible papel como mecanismo de aislamiento reproductivo, tales como coloración del plumaje y vocalización. Sólo mediante el desarrollo de una base amplia y comparativa de estudios se podrán aclarar si los dos grupos genéticos encontrados están evolucionando separadamente.

Es indispensable contar con muestreo más amplio de *D. b. parva*, con el fin de aclarar su posible incorporación con las poblaciones de *D. b. montana*.

Complementar los datos genéticos con un mayor número de genes, principalmente de origen mitocondrial, o en el mejor de los casos con secuenciación de nueva de generación.

Literatura citada

- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. En: Petrov, B.N., Csaki, F. (Eds.), Second International Symposium on Information Theory. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 267–281.
- AOU. American Ornithologist's Union. (1998). Check-list of North American Birds. 7a. edición. Washington DC.
- 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(1): 362–377.
- Arbeláez-Cortés, E., Nyári, Á. S., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2010). The differential effect of lowlands on the phylogeographic pattern of a Mesoamerican montane species (*Lepidocolaptes affinis*, Aves: Furnariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 658-668.
- Arellano, E., González-Cozátl, F. X., y Rogers, D. S. (2005). Molecular systematics of Middle American harvest mice *Reithrodontomys* (Muridae), estimated from mitochondrial cytochrome b gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2), 529–540.
- Arizmendi, M. C., Dominguez, C. a., y Dirzo, R. (1996). The Role of an Avian Nectar Robber and of Hummingbird Pollinators in the Reproduction of Two Plant Species. *Functional Ecology*, 10(1), 119-127.
- Arizmendi, M. del C. (2001). Multiple ecological interactions: nectar robbers and hummingbirds in a highland forest in Mexico. *Canadian Journal of Zoology*, 79(6), 997–1006.
- Avise, J. C. (2000). Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Baker, A. J. (2008). Speciation in Birds. *The Condor*, 110(2), 396–398.
- Ballard, J. W. O., y Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), 729–744.
- Balloux, F. (2010). The worm in the fruit of the mitochondrial DNA tree. *Heredity*, 104(5), 419–420.
- Bandelt, H. J., Forster, P., y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific

phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 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), 2675–81.
- 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.
- Barker, F. K., Cibois, A., Schikler, P., Feinstein, J., y Cracraft, J. (2004). Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 11040–11045.
- Barker, F. K., Vandergon, A. J., y Lanyon, S. M. (2008). Assessment of species limits among yellow-breasted meadowlarks (*Sturnella* spp.) using mitochondrial and sex-linked markers. *The Auk*, 125(4), 869–879.
- Barrera-Guzmán, A. O., Milá, B., Sánchez-González, L. A., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2012). Speciation in an avian complex endemic to the mountains of Middle America (*Ergaticus*, Aves: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(3), 907–920.
- Bates, J. M., Cadena, C. D., Tello, J. G., y Brumfield, R. T. (2008). Diversification in the Neotropics: Phylogenetic patterns and historical processes. *Ornitología Neotropical*, 19, 427–432.
- Bazin E Glémin S, G. N. (2006). Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. *Science*, 312, 570–572.
- Bonaccorso, E. (2009). Historical biogeography and speciation in the Neotropical highlands: Molecular phylogenetics of the jay genus *Cyanolyca*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50(3), 618–632.
- Bonaccorso, E., Navarro-Sigüenza, A. G., Sánchez-González, L. A., Townsend Peterson, A., y García-Moreno, J. (2008). Genetic differentiation of the *Chlorospingus ophthalmicus* complex in Mexico and Central America. *Journal of Avian Biology*, 39(3), 311–321.
- Bonaccorso, E., y Townsend Peterson, A. (2007). A multilocus phylogeny of New World jay genera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(2), 467–476.
- Botero-Delgadillo, E., Bayly, N., y Gómez-Montes, C. (2012). Ciclos de muda en *Diglossa albilatera* (Thraupidae) y evidencia de un patrón en la adquisición del dicromatismo sexual en el

género *Diglossa*. *Boletín SAO*, 21(1), 1–7.

- Bryson, R. W., Murphy, R. W., Lathrop, A., y Lazcano-Villareal, D. (2011). Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: A case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *Journal of Biogeography*, 38(4), 697–710.
- Burney, C. W., y Brumfield, R. T. (2009). Ecology predicts levels of genetic differentiation in neotropical birds. *The American Naturalist*, 174(3), 358–368.
- Burns, K. J. (1997). Molecular systematics of tanagers (Thraupinae): evolution and biogeography of a diverse radiation of neotropical birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(3), 334–348.
- Burns, K. J., Hackett, S. J., y Klein, N. K. (2003). Phylogenetic relationships of Neotropical honeycreepers and the evolution of feeding morphology. *Journal of Avian Biology*, 34(4), 360–370.
- Burns, K. J., Shultz, A. J., Title, P. O., Mason, N. A., Barker, F. K., Klicka, J., y Lovette, I. J. (2014). Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 75(1), 41–77.
- Burns, K. J., Unitt, P., y Mason, N. A. (2016). A genus-level classification of the family Thraupidae (Class Aves: Order Passeriformes). *Zootaxa*, 4088(3), 329–354.
- Cadena, C. D., Klicka, J., y Ricklefs, R. E. (2007). Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: Molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush-finches (Aves, Emberizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(3), 993–1016.
- Campagna, L., Benites, P., Loughheed, S. C., Lijtmaer, D. a., Di Giacomo, a. S., Eaton, M. D., y Tubaro, P. L. (2012). Rapid phenotypic evolution during incipient speciation in a continental avian radiation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1734), 1847–1856.
- Cardillo, M., Orme, C. D. L., Owens, I. P. F., Ecology, S., y Sep, N. (2012). Testing for Latitudinal Bias in Diversification Rates : An Example Using New World Birds. *America*, 86(9), 2278–2287.
- Clarke, J. a, Tambussi, C. P., Noriega, J. I., Erickson, G. M., y Ketcham, R. a. (2005). Definitive fossil evidence for the extant avian radiation in the Cretaceous. *Nature*, 433(7023), 305–308.
- Clements, J. F., T. S. Schulenberg, M. J. Iliff, D. Roberson, T. A. Fredericks, B. L. Sullivan, and C. L.

Wood. 2016. The eBird/Clements checklist of birds of the world: v2016
<http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/>

Cortés-Rodríguez, N., Hernández-Baños, B. E., Navarro-Sigüenza, A. G., y Omland, K. E. (2008). Geographic Variation and Genetic Structure in the Streak-Backed Oriole: Low Mitochondrial Dna Differentiation Reveals Recent Divergence. *The Condor*, 110(4), 729–739.

Cortés-Rodríguez, N., Hernández-Baños, B. E., Navarro-Sigüenza, A. G., Townsend Peterson, A., y García-Moreno, J. (2008). Phylogeography and population genetics of the Amethyst-throated Hummingbird (*Lampornis amethystinus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), 1–11.

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., y Barker, F. K. (2009). Passeriformes. In *The Time tree of Life*. Oxford University Press, New York, USA. pp. 423–431.

Dacosta, J. M., y Klicka, J. (2008). The Great American Interchange in birds: A phylogenetic perspective with the genus *Trogon*. *Molecular Ecology*, 17(5), 1328–1343.

Domínguez-Canseco, L. (1998). Historia natural del ladrón del néctar *Diglossa baritula* (Aves: Emberizinae). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Drovetski, S. V. (2003). Plio-Pleistocene climatic oscillations, Holarctic biogeography and speciation in an avian subfamily. *Journal of Biogeography*, 30(8), 1173–1181.

Drovetski, S. V., Semenov, G., Drovetskaya, S. S., Fadeev, I. V., Red'kin, Y. A., y Voelker, G. (2013). Geographic mode of speciation in a mountain specialist Avian family endemic to the Palearctic. *Ecology and Evolution*, 3(6), 1518–1528.

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., y Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969–1973.

Edwards, S. V., Kingan, S. B., Calkins, J. D., Balakrishnan, C. N., Jennings, W. B., Swanson, W. J., y Sorenson, M. D. (2005). Speciation in birds: genes, geography, and sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 6550–6557.

- Elith, J., Phillips, S. J., Hastie, T., y Dudí, M. (2011). A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributios*, 17, 43-57.
- Ericson, P. G. P. (2012). Evolution of terrestrial birds in three continents: Biogeography and parallel radiations. *Journal of Biogeography*, 39(5), 813–824.
- Ericson, P. G. P., Anderson, C. L., Britton, T., Elzanowski, A., Johansson, U. S., Källersjö, M., y Mayr, G. (2006). Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biology Letters*, 2(4), 543–7.
- ESRI. (2010). ArcMap Version 10. Environmental Systems Research Institute (ESRI). Redlands, California, USA.
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G., y Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47–50.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., y Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491.
- Fjeldså, J., Rahbek, C., y Fjeldsa, J. (2006). Diversification of tanagers, a species rich bird group, from lowlands to montane regions of South America. *Integrative and Comparative Biology*, 46(1), 72–81.
- Friedmann, H., Griscom, L. Moore, R. T. (1950). Distributional Check-List of the Birds of Mexico. *Pacific Coast Avifauna*, 29, 1–102.
- Friesen, V. L., Congdon, B. C., Kidd, M. G., y Birt, T. P. (1999). Polymerase chain reaction (PCR) primers for the amplification of five nuclear introns in vertebrates. *Molecular Ecology*, 8, 2141-2152.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925.
- Gallo-Corona, S. F. (2003). El robador de néctar *Diglossa baritula* (Thraupidae) y el colibrí *Eugenes fulgens* (Trochilidae). Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara.
- García-Moreno, J. (2004). Is there a universal mtDNA clock for birds? *Journal of Avian Biology*,

35(6), 465–468.

- García-Moreno, J., Cortés, N., García-Deras, G. M., y Hernández-Baños, B. E. (2006). Local origin and diversification among *Lampornis* hummingbirds: A Mesoamerican taxon. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(2), 488–498.
- García-Moreno, J., Navarro-Sigüenza, A. G., Peterson, A. T., y Sánchez-González, L. A. (2004). Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(1), 186–196.
- Garrido-Garduño, T., y Vázquez-Domínguez, E. (2013). Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(3), 1031–1054.
- 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.
- Graves, G. (1982). Pollination of a *Tristerix mistletoe* (Loranthaceae) by *Diglossa* (Aves, Thraupidae). *Biotropica* 14(4), 316-317.
- Hackett, S. J. (1995). Molecular systematics and zoogeography of flowerpiercers in the *Diglossa barirula* complex. *Auk*, 112(1), 156–170.
- Hartl, D. L., y A.G. Clark. (1997). Principles of Population Genetics. 3a. edición. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hawkins, B. A., Diniz-Filho, J. A. F., Jaramillo, C. A., y Soeller, S. A. (2006). Post-Eocene climate change, niche conservatism, and the latitudinal diversity gradient of New World birds. *Journal of Biogeography*, 33(5), 770–780.
- Hellmayr C.E. (1935). Catalogue of birds of the Americas and the adjacent islands. Zoology Series 13. Chicago (IL): Field Museum Natural History Publications.
- Hernández-Baños, B. E., Peterson, a. T., Navarro-Sigüenza, A. G., y Escalante-Pliego, B. P. (1995). Bird faunas of the humid montane forests of Mesoamerica: biogeographic patterns and priorities for conservation. *Bird Conservation International*, 5(1995), 251–277.
- Hernández H. M. y V. M. Toledo. (1979). The role of nectar robbers and pollinators in the reproduction of *Erythrina leptorhiza*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 66(3), 512-

520.

- Hillis, D. M., y Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42(2), 182–192.
- Hillis, D. M., Mable, B. K., y Moritz, C. (1996). *Molecular Systematics*. 2a edición. Sinauer Associates. Massachusetts.
- Hilty, S. (2017). Cinnamon-bellied Flowerpiercer (*Diglossa baritula*). En: del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. y de Juana, E. (eds.). *Handbook of the Birds of the World Alive*. Lynx Ediciones, Barcelona.
- Howell, S. N. G. y Webb, S. (1995). *A guide to the birds of Mexico and northern Central America*. Oxford University Press. Oxford.
- Irwin, R. E., Bronstein, J. L., Manson, J. S., y Richardson, L. (2010). Nectar Robbing: Ecological and Evolutionary Perspectives. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41(1), 271–292.
- Johns, G. C., y Avise, J. C. (1998). A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, 15(11), 1481–1490.
- Katoh, K., y Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), 286–298.
- Keith Barker, F., Burns, K. J., Klicka, J., Lanyon, S. M., y Lovette, I. J. (2013). Going to extremes: Contrasting rates of diversification in a recent radiation of new world passerine birds. *Systematic Biology*, 62(2), 298–320.
- Kerr, K. C. R., Lijtmaer, D. A., Barreira, A. S., Hebert, P. D. N., y Tubaro, P. L. (2009). Probing evolutionary patterns in neotropical birds through DNA barcodes. *PLoS ONE*, 4(2).
- Klicka, J., Spellman, G. M., Winker, K., Chua, V., y Smith, B. T. (2011). A phylogeographic and population genetic analysis of a widespread, sedentary North American bird: The Hairy Woodpecker (*Picoides villosus*), 128, 346–362.
- Klicka, J., y Zink, R. M. (1997). The Importance of Recent Ice Ages in Speciation: A Failed Paradigm. *Science*, 277(5332), 1666–1669.
- Knowles, L. L., y Carstens, B. C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56(6), 887–95.

- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., y Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695–1701.
- Lanfear, R., Ho, S. Y. W., Love, D., y Bromham, L. (2010). Mutation rate is linked to diversification in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47), 20423–20428.
- León-Paniagua, L., Navarro-Sigüenza, A. G., Hernández-Baños, B. E., y Morales, J. C. (2007). Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(3), 653–664.
- Li, W. L. S., y Drummond, A. J. (2012). Model averaging and Bayes factor calculation of relaxed molecular clocks in Bayesian phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*, 29(2), 751–761.
- Li, W., y Sadler, L. A. (1991). Low Nucleotide Diversity in Man. *Genetics Society of America*, 129, 513-523.
- Librado, P., y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- Lovette, I. (2004). Mitochondrial dating and mixed support for the “2% rule” in birds. *The Auk*, 121(1), 1–6.
- Maddison, W. P. y D.R. Maddison. 2017. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. v3.2 <http://mesquiteproject.org>.
- Martin, P. R., Mckay, J. K., y Url, S. (2013). Latitudinal Variation in Genetic Divergence of Populations and the Potential for Future Speciation. *Evolution*, 58(5), 938–945.
- Martínez del Río C. y Eguiarte L. E. (1987). Bird Visitation to *Agave salmiana*: Comparisons among Hummingbirds and Perching Birds. *American Ornithological Society*, 89, 357-363.
- Mauck, W. M., y Burns, K. J. (2009). Phylogeny, biogeography, and recurrent evolution of divergent bill types in the nectar-stealing flowerpiercers (Thraupini: *Diglossa* and *Diglossopsis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 98(1), 14–28.
- Mayr, E. (1942) Systematics and the Origin of Species. Columbia Univ. Press, New York.
- Milá, B., McCormack, J. E., Castañeda, G., Wayne, R. K., y Smith, T. B. (2007). Recent postglacial

range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 274(1626), 2653–60.

Milá, B., Wayne, R. K., Fitze, P., y Smith, T. B. (2009). Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *glyphorynchus spirurus*, a neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology*, 18(14), 2979–2995.

Monroe, B. L., JR. (1968). A Distributional Survey of the Birds of Honduras. Ornithological Monographs.

Morlon, H., Parsons, T. L., y Plotkin, J. B. (2011). Reconciling molecular phylogenies with the fossil record. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(39), 16327–32.

Morrone, J. J. (2013). Sistemática, fundamentos, métodos, aplicaciones. 1a. edición. *Facultad de Ciencias*, UNAM, México.

Morrone, J. J., y Magaña, P. (2015). Evolución biológica. 1a. edición. *Facultad de Ciencias*, UNAM, México.

Nabholz, B., Glemin, S., y Galtier, N. (2009). The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 54.

Nahum, L. A., Pereira, S. L., de Campos Fernandes, F. M., Matioli, S. R., y Wajntal, A. (2003). Diversification of Ramphastinae (Aves, Ramphastidae) prior to the Cretaceous/Tertiary boundary as shown by molecular clock of mtDNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, 26(4), 411–418.

Nam, K., Mugal, C., Nabholz, B., Schielzeth, H., Wolf, J. B. W., Backström, N., y Ellegren, H. (2010). Molecular evolution of genes in avian genomes. *Genome Biology*, 11(6), 68.

Navarro-Sigüenza, A. G., y Peterson A. T. 2004. An alternative species taxonomy of the birds of México. *Biota Neotropical*, 4(2) 1-32.

Navarro-Sigüenza, A. G., Townsend Peterson, A., Nyari, A., García-Deras, G. M., y García-Moreno, J. (2008). Phylogeography of the *Buarremon* brush-finch complex (Aves, Emberizidae) in Mesoamerica. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47(1), 21–35.

Near, T. J., y Sanderson, M. J. (2004). Assessing the quality of molecular divergence time estimates by fossil calibrations and fossil-based model selection. *Philosophical Transactions*

of the Royal Society of London. *Series B, Biological Sciences*, 359(1450), 1477–83.

- Newton, I. (2003). *Speciation and biogeography of birds*. Academic Press, Amsterdam.
- Omland, K. E., Tarr, C. L., Boarman, W. I., Marzluff, J. M., y Fleischer, R. C. (2000). Cryptic genetic variation and paraphyly in ravens. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267(1461), 2475–2482.
- Orme, C. D. L., Davies, R. G., Burgess, M., Eigenbrod, F., Pickup, N., Olson, V. a, y Owens, I. P. F. (2005). Global hotspots of species richness are not congruent with endemism or threat. *Nature*, 436(7053), 1016–1019.
- Pacheco, M. A., Battistuzzi, F. U., Lentino, M., Aguilar, R. F., Kumar, S., y Escalante, A. A. (2011). Evolution of modern birds revealed by mitogenomics: Timing the radiation and origin of major orders. *Molecular Biology and Evolution*, 28(6), 1927–1942.
- Patel, S., Weckstein, J. D., Patané, J. S. L., Bates, J. M., y Aleixo, A. (2011). Temporal and spatial diversification of *Pteroglossus aracaris* (AVES: Ramphastidae) in the neotropics: Constant rate of diversification does not support an increase in radiation during the Pleistocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58(1), 105–115.
- Pereira, S. L., y Baker, A. J. (2006). A mitogenomic timescale for birds detects variable phylogenetic rates of molecular evolution and refutes the standard molecular clock. *Molecular Biology and Evolution*, 23(9), 1731–1740.
- Pérez-Emán, J. L. (2005). Molecular phylogenetics and biogeography of the Neotropical redstarts (*Myioborus*; Aves, Parulinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(2), 511–528.
- Pérez-Emán, J. L., Mumme, R. L., y Jabłonński, P. G. (2010). Phylogeography and adaptive plumage evolution in central american subspecies of the slate-throated redstart (*Myioborus miniatus*). *Ornithological Monographs*, 67(1), 90-102.
- Petit, R. J., y Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(7), 386–393.
- Phillimore, A. B., y Price, T. D. (2008). Density-dependent cladogenesis in birds. *PLoS Biology*, 6(3), 0483–0489.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P., y Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modeling*, 190, 231–259.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using

multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.

Puebla-Olivares, F., Bonaccorso, E., de los Monteros, A. E., Omland, K. E., Llorente-Bouesquets, J. E., Peterson, A. T., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2008). Speciation in the Emerald Toucanet (*Aulacorhynchus prasinus*) complex. *The Auk*, 125(1), 39–50.

Rabosky, D. L., Title, P. O., & Huang, H. (2015). Minimal effects of latitude on present-day speciation rates in New World birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20142889.

Rambaut A, Suchard M. A., Xie D. y Drummond A. J. (2014). Tracer v1.6 <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

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. *Syst Biol*, 56(6), 907–923.

Ridgway, R. (1902). The Birds of North and Middle America, part 2. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.

Rising, J. D., Barrowclough, G., Gill, F., Johnson, N., Mayr, E., Monroe, B., & Storer, R. (2007). Subspecies and their significance in contemporary ornithology. *Ornithological Monographs*, (63), 45–54.

Rojas-Nossa, S. V. (2007). Estrategias de extracción de néctar por pinchaflores (Aves: *Diglossa* y *Diglossopsis*) y sus efectos sobre la polinización de plantas de los altos Andes. *Ornitología Colombiana*, 5(3), 21–39.

Rojas-Nossa, S. V. (2013). Asociación entre el robo de néctar y las características florales en una comunidad montana de los Andes colombianos. *Revista Ecosistemas*, 22(2), 107–112.

Ronquist, F., y Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12), 1572–1574.

Sánchez-González, L. A., y Navarro-Sigüenza, A. G. (2009). History meets ecology: A geographical analysis of ecological restriction in the Neotropical humid montane forests avifaunas. *Diversity and Distributions*, 15(1), 1–11.

Sanchez-Gonzalez, 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.

- Sanderson, M. J. (2003). Evolution and Divergence Times in the Absence of a Molecular Clock. *Evolution*, 19(2), 301–302.
- Schondube, J. E., y Martínez del Río, C. (2003). The flowerpiercers' hook: an experimental test of an evolutionary trade-off. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 270(1511), 195–8.
- Schondube, J. E., Santana C., E., y Ruán-Tejeda, I. (2003). Biannual cycles of the Cinnamon-bellied Flowerpiercer. *Biotropica*, 35(2), 250–261.
- Sedano, R. E., y Burns, K. J. (2010). Are the Northern Andes a species pump for Neotropical birds? Phylogenetics and biogeography of a clade of Neotropical tanagers (Aves: Thraupini). *Journal of Biogeography*, 37(2), 325–343.
- Skutch, A. F. (1954). Life Histories of Central American Birds. Families Fringillidae, Thraupidae, Icteridae, Parulidae and Coerebidae. *Pacific Coast Avifauna*, 31(31), 1–448.
- 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.
- Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T., y Mindell, D. P. (1999). Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(2), 105–114.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313.
- Stiles, F. G., Ayala, A. V., y Girón, M. (1992). Polinización de las flores de *Brachyotum* (Melastomataceae) por dos especies de *Diglossa* (Emberizidae). *Caldasia*, 17(1), 47–54.
- Sullivan, J., Arellano, E., y Rogers, D. S. (2000). Comparative Phylogeography of Mesoamerican Highland Rodents: Concerted versus Independent Response to Past Climatic Fluctuations. *The American Naturalist*, 155(6), 755–768.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595.
- 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*, 22(22), 4673–4680.
- Vázquez-Miranda, H., Navarro-Sigüenza, A. G., y Omland, K. E. (2009). Phylogeography of the Rufous-Naped Wren (*Campylorhynchus rufinucha*): speciation and hybridization in Mesoamerica. *The Auk*, 126(4), 765–778.
- Vuilleumier, F. (1969). Systematic and Evolution in *Diglossa* (Aves: Coerebidae). *American Museum of Natural History*. 2381, 1-44.
- Weir, J. T. (2006). Divergent Timing and Patterns of Species Accumulation in Lowland and Highland Neotropical Birds. *Evolution*, 60(4), 842–855.
- Weir, J. T. (2009). Implications of genetic differentiation in neotropical montane forest birds. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(3), 410–433.
- Weir, J. T., y Schluter, D. (2007). The Latitudinal Gradient in Recent Speciation and Extinction Rates of Birds and Mammals. *Science*, 315(5818), 1574–1576.
- Weir, J. T., y Schluter, D. (2008). Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*, 17(10), 2321–2328.
- Zink, R. M., y Barrowclough, G. F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17(9), 2107–2121.
- Zink, R. M., Drovetski, S. V., y Rohwer, S. (2006). Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(3), 679–686.
- Zink, R. M., y Klicka, J. (2006). the Tempo of Avian Diversification: a Comment on Johnson and Cicero. *Evolution*, 60(2), 411-412.

VII. Apéndice

Anexo 1. Información de los ejemplares utilizados en este estudio.

Especie	No. de Catálogo	Institución	Clave asignada	País	Estado/ Dto.	Municipio/ Localidad	Ecorregión
<i>D. b. baritula</i> *	FMNH 393877	FMNH	SMan JAL1	MX	JAL	Las Joyas	SMan
<i>D. b. baritula</i> *	LSUMZ 21952	LSUMZ	SMan JAL2	MX	JAL	Las Joyas	SMan
<i>D. b. baritula</i> *	MM 422	CNA/IB	ENT MICH1	MX	MICH	Nuevo Parangaricutiro	ENT
<i>D. b. baritula</i> *	MM 458	CNA/IB	ENT MICH2	MX	MICH	Nuevo Parangaricutiro	ENT
<i>D. b. baritula</i> *	AHC 099	MZFC	ENT PUE1	MX	PUE	Chopilco Alto	ENT
<i>D. b. baritula</i> *	ATP2002 18	MZFC	ENT DF1	MX	DF	Ajusco	ENT
<i>D. b. baritula</i> *	PEP 2407	CNA/IB	ENT DF2	MX	DF	Dinamos	ENT
<i>D. b. baritula</i> *	PEP 2408	CNA/IB	ENT DF3	MX	DF	Dinamos	ENT
<i>D. b. baritula</i> *	GMS 1238	MZFC	SMS GRO1	MX	GRO	Carrizal de Bravo	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	JK04 386	MZFC	SMS GRO2	MX	GRO	Carrizal de Bravo	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	JK04 176	MZFC	SMS GRO3	MX	GRO	Carrizal de Bravo	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOLGRO 105	MZFC	SMS GRO4	MX	GRO	Omiltemi	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOLGRO 143	MZFC	SMS GRO5	MX	GRO	Omiltemi	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOLGRO 193	MZFC	SMS GRO6	MX	GRO	Carrizal de Bravo	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOLGRO 243	MZFC	SMS GRO7	MX	GRO	Carrizal de Bravo	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOLGRO 244	MZFC	SMS GRO8	MX	GRO	Carrizal de Bravo	SMS

<i>D. b. baritula</i> *	MOLGRO 245	MZFC	SMS GRO9	MX	GRO	Carrizal de Bravo	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	INECOL 073	MZFC	SMS OAX1	MX	OAX	Chichahuaxtla	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	INECOL 074	MZFC	SMS OAX2	MX	OAX	Chichahuaxtla	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOL13 213	MZFC	SMS OAX3	MX	OAX	San Miguel Suchixtepec	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOL15 131	MZFC	SMS OAX4	MX	OAX	San Miguel Suchixtepec	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	MOL15 134	MZFC	SMS OAX5	MX	OAX	San Miguel Suchixtepec	SMS
<i>D. b. baritula</i> *	TONA10 4	CNA/IB	SMS OAX6	MX	OAX	San Juan Lachao	SMS
<i>D. b. montana</i> *	MOL13 014	MZFC	TAC CHI1	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MOL13 038	MZFC	TAC CHI2	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MOL13 080	MZFC	TAC CHI3	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MOL13 081	MZFC	TAC CHI4	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MOL13 093	MZFC	TAC CHI5	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MOL13 131	MZFC	TAC CHI6	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	BEHB08 14	MZFC	TAC CHI7	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	BEHB08 46	MZFC	TAC CHI8	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MOL13 008	MZFC	TAC CHI9	MX	CHI	San Nicolás Buenavista	TAC
<i>D. b. montana</i> *	ZRH 031	MZFC	TAC CHI10	MX	CHI	Tapalapa	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MFOR 737	MZFC	TAC CHI11	MX	CHI	Tapalapa	TAC
<i>D. b. montana</i> *	MFOR 744	MZFC	TAC CHI12	MX	CHI	Tapalapa	TAC

<i>D. b. montana*</i>	ZRH 698	MZFC	TAC CHI13	MX	CHI	Tapalapa	TAC
<i>D. b. montana*</i>	ZRH 954	MZFC	TAC CHI14	MX	CHI	Tapalapa	TAC
<i>D. b. montana*</i>	BRB 782	CNA/IB	DCC CHI1	MX	CHI	Teopisca	DCC
<i>D. b. montana*</i>	CRGA 24	MZFC	SMC CHI1	MX	CHI	Motozintla	SMC
<i>D. b. montana*</i>	CRGA 45	MZFC	SMC CHI2	MX	CHI	Motozintla	SMC
<i>D. b. montana*</i>	BONA 50	MZFC	SMC CHI3	MX	CHI	Volcán Tacaná	SMC
<i>D. b. montana*</i>	BONA 70	MZFC	SMC CHI4	MX	CHI	Volcán Tacaná	SMC
<i>D. b. montana*</i>	BONA 86	MZFC	SMC CHI5	MX	CHI	Volcán Tacaná	SMC
<i>D. b. montana*</i>	EAGT 830	MZFC	SMC CHI6	MX	CHI	Motozintla	SMC
<i>D. b. montana*</i>	EAGT 841	MZFC	SMC CHI7	MX	CHI	Motozintla	SMC
<i>D. b. montana*</i>	BMM 866	MZFC	SMC GTM1	GTM	QTZ	Volcán Tacaná	SMC
<i>D. b. montana*</i>	UWBM 105929	UWBM	TACG GTM1	GTM	QTZ	Quetzaltenango	TACG
<i>D. b. montana*</i>	UWBM 110015	UWBM	TACG GTM2	GTM	QTZ	Quetzaltenango	TACG
<i>D. b. montana*</i>	KU 7680	KU	TAES ES1	ES	SV	Tepetitlán	TAES
<i>D. b. montana*</i>	KU 4921	KU	TAES ES2	ES	SS	Volcán San Miguel	TAES
<i>D. b. parva*</i>	LSUMZ 60978	LSUMZ	TASH HND1	HND	FM		TASH

Grupo hermano

<i>D. plumbea*</i>	AMNH DOT3653	AMNH	<i>D. plumbea</i>	CR	SJ	Cerro de la Muerte	
<i>D. sittoides*</i>	LSUMZ B22814	LSUMZ	<i>D. sittoides</i>	BOL	LP	Cerro Asunta Pata	
<i>D. indigotica</i>	IAvH BT7532	IAvH	<i>D. indigotica</i>	COL	ANT	Yarumal	
<i>D. mystacalis</i>	FMNH 433931	FMNH	<i>D. mystacalis</i>	PER	CZC	Paucartambo	

<i>D. gloriosissima</i>	IAvH BT7531	IAvH	<i>D. gloriosissima</i>	COL	ANT	Bolívar
<i>D. lafresnayii</i>	LSUMZ B351	LSUMZ	<i>D. lafresnayii</i>	PER	CJM	Cerro Chinguela
<i>D. duidae</i>	AMNH DOT 9754	AMNH	<i>D. duidae</i>	VEN	AMZ	Cerro Yutaje
<i>D. major</i>	FMNH 339722	FMNH	<i>D. major</i>	VEN	BLV	Santa Elena
<i>D. albilatera</i>	AMNH DOT5023	AMNH	<i>D. albilatera</i>	VEN	ARA	El Junquito
<i>D. carbonaria</i>	LSUMZ 106752	LSUMZ	<i>D. carbonaria</i>	BOL	CCB	Cochabamba
<i>D. brunneiventris</i>	AMNH DOT2892	AMNH	<i>D. brunneiventris</i>	BOL	LP	Franz Tamayo
<i>D humeralis</i>	USNM B3015	USNM	<i>D humeralis</i>	ECU	df	df
Grupo externo						
<i>C. homochroa</i>	LSUMZ B426	LSUMZ	<i>C. homochroa</i>	PER	PIU	Cruz Blanca
<i>C. inornata</i>	MBM 6465	MBM	<i>C. inornata</i>	ARG	TUC	df

FMNH: Field Museum Natural History, LSUMZ: Louisiana State University Museum of Natural Science, CNA/IB: Colección Científica de Aves del Instituto de Biología (UNAM), MZFC: Museo de Zoología de la Facultad de ciencias (UNAM), UWBM: University of Washington Burke Museum, KU: Kansas University, AMNH: American Museum of Natural History, IAvH: Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, USNM: National Museum of Natural History (Smithsonian Institution), MBM: University of Nevada Las Vegas. MX: México, GTM: Guatemala, ES: El Salvador, HND: Honduras, CR: Costa Rica, BOL: Bolivia, COL: Colombia, PER: Perú, VEN: Venezuela, ECU: Ecuador, ARG: Argentina. JAL: Jalisco, MICH: Michoacán, PUE: Puebla, DF: Distrito Federal, GRO: Guerrero, OAX: Oaxaca, CHI: Chiapas, QTZ: Quetzaltenango, SV: San Vicente, FM: Francisco Morán, SJ: San José, LP: La Paz, ANT: Antioquia, CZC: Cuzco, CJM: Cajamarca, AMZ: Amazonas, BLV: Bolívar, ARA: Aragua, CCB: Cochabamba, df: dato faltante, PIU: Piura, TUC: Tucumán. SMan: Sierra de Manantlán, ENT: Eje Neovolcánico Transversal, SMS: Sierra Madre del Sur, TAC: Tierras Altas de Chiapas, DCC: Depresión Central de Chiapas, SMC: Sierra Madre de Chiapas, TACG: Tierras Altas Centrales de Guatemala, TAES: Tierras Altas de El Salvador, TASH: Tierras Altas del Sur de Honduras. *: tejidos procesados en este estudio.

Anexo 2. Secuencias obtenidas de la base de datos de GenBank.

Especie	No. de acceso	No. de acceso	Referencia
	ND2	ACO1-I9	
<i>D. baritula</i>	EF529848		Klicka <i>et al.</i> , 2007; Mauck & Burns, 2009
	EU647927	x	
<i>D. sittoides</i>	EU647938	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. indigotica</i>	EU647944	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. mystacalis</i>	EU647935	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. gloriosissima</i>	EU647932	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. lafresnayii</i>	EU647934	JN809947	Mauck y Burns, 2009, Shultz y Burns, 2013
<i>D. duidae</i>	EU647931	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. major</i>	AF290118	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. albilatera</i>	EU647926	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. carbonaria</i>	EU647930	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. brunneiventris</i>	EU647929	x	Mauck y Burns, 2009
<i>D. humeralis</i>	EU647933	x	Mauck y Burns, 2009
<i>C. homochroa</i>	JN810432	JN809926	Shultz y Burns, 2013, Klicka <i>et al.</i> , 2007
<i>C. inornata</i>	EF529875	x	Klicka <i>et al.</i> , 2007

x: secuencias no disponibles en GenBank.

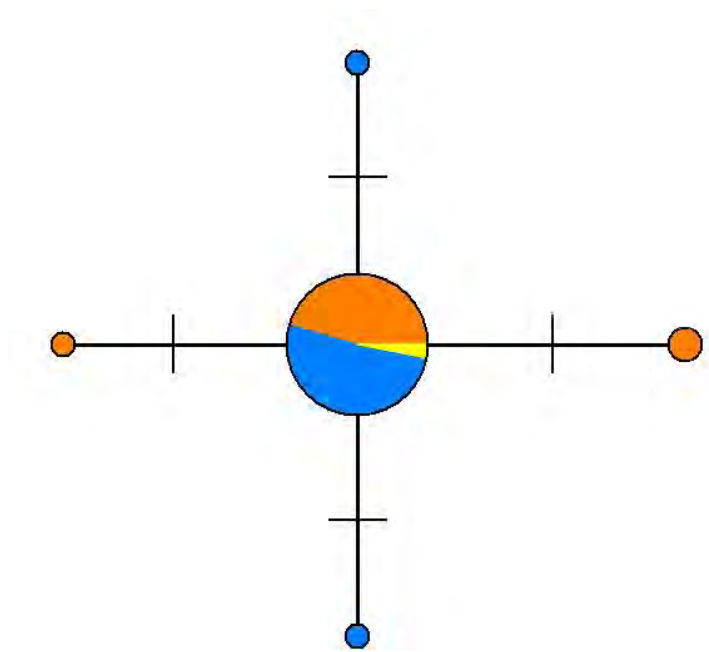
Anexo 3. Extracción de DNA por el método de NaCl-cloroformo.

Se colocó aproximadamente 50 mg de tejido en un mortero, se añadió 410 µL de buffer de lisis y 90 µL de SDS 10%, se homogenizó el tejido en partículas finas con ayuda de un pistilo, todo el contenido se colocó en un microtubo de 1.5 mL y se añadió 20 µL de Proteinasa K. Se incubó a 65°C durante 3 horas, mezclando con vórtex cada 30 minutos. Se adicionó 200 µL de NaCl saturado (6M) y se agitó vigorosamente por inversión durante 10 minutos (no vórtex). Se incubó en baño de hielo por 10 minutos. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos, se transfirió todo el sobrenadante en un microtubo limpio, se adicionó 350 µL de cloroformo: alcohol

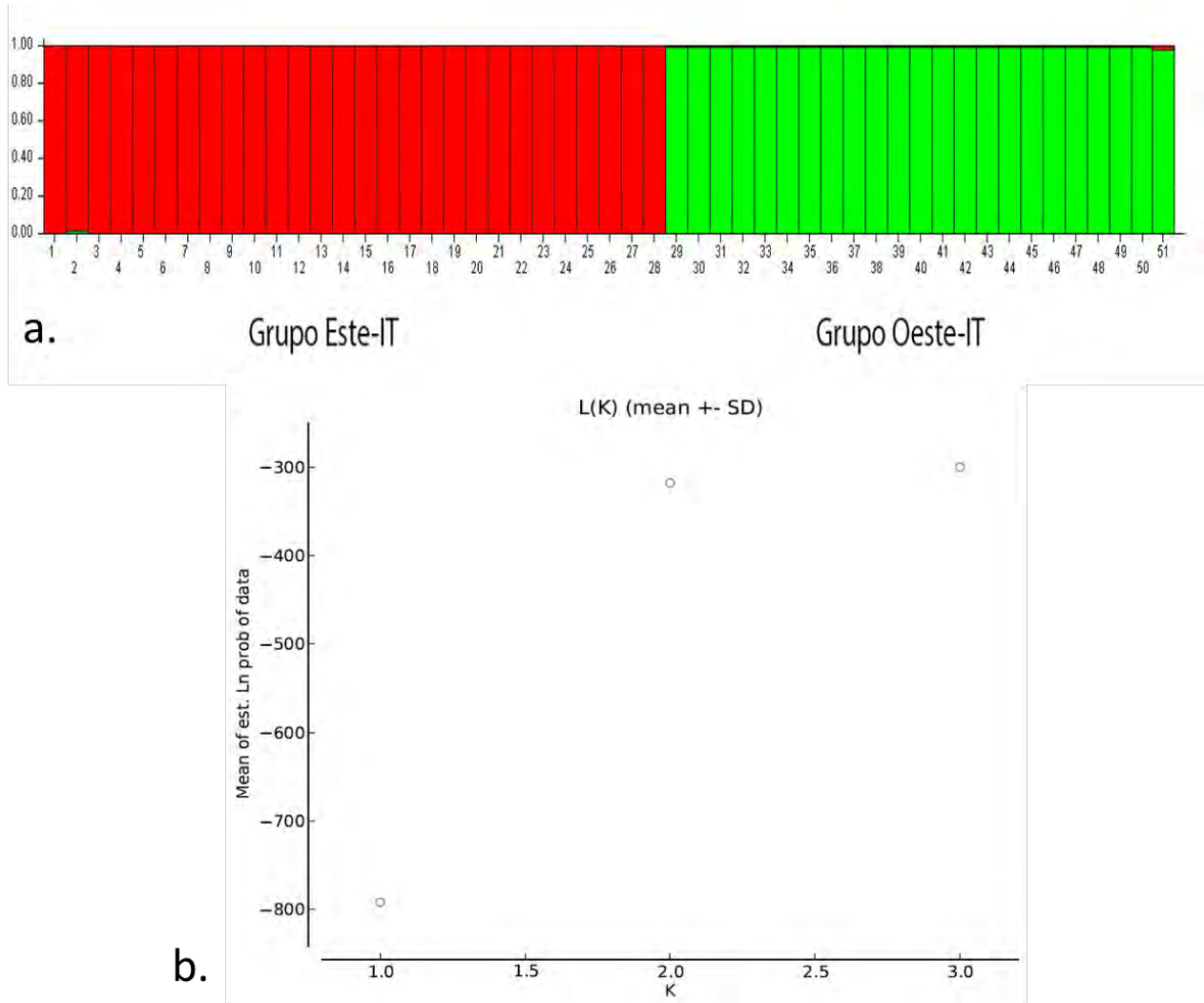
isoamílico (24:1) y se agitó vigorosamente por inversión durante 10 minutos (no vórtex). Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos y se transfirió todo el sobrenadante a un tubo limpio, se adicionó 800 μL (ó 2 volúmenes de lo colectado) de isopropanol 100% frío y se mezcló un par de veces por inversión y se dejó toda la noche a -20°C .

Al siguiente día se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos y se decantó el isopropanol. Se adicionó 500 μL de etanol 70% frío y se agitó por inversión un par de veces. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos y se decantó el etanol. Las muestra se secaron a temperatura ambiente durante un día y finalmente se disolvió el DNA en TE (30 – 100 μL de acuerdo a la concentración de DNA).

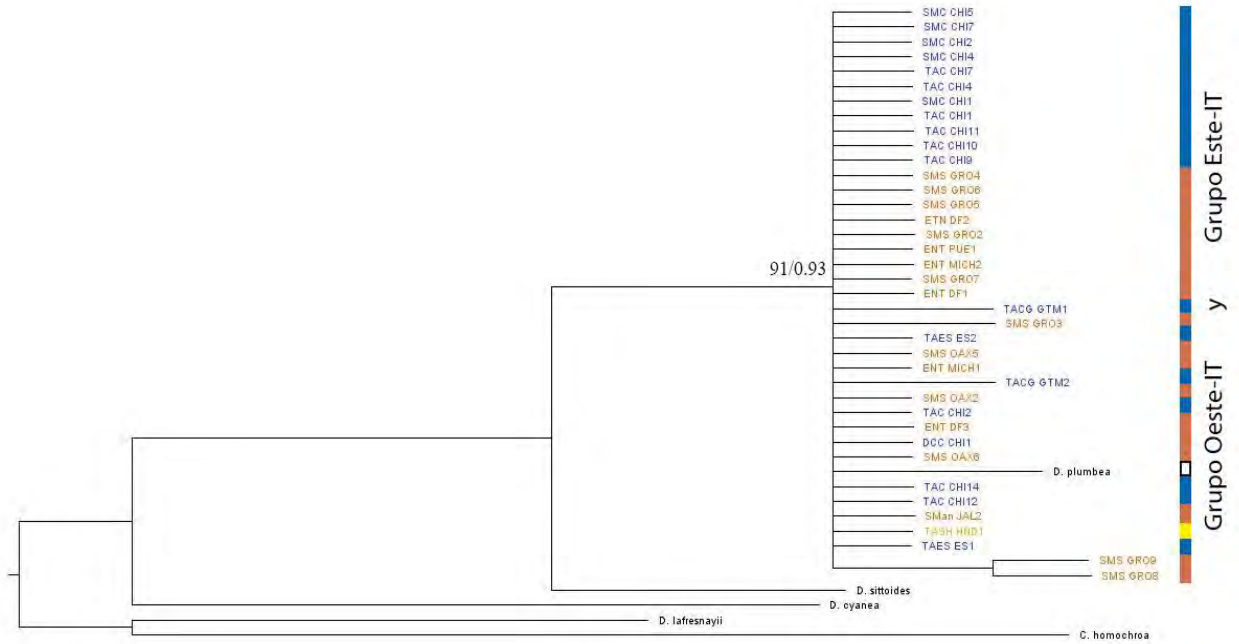
Anexo 4. Red de Haplotipos a partir del gen mitocondrial ND2. En anaranjado se representan los individuos de *D. b. baritula*, en azul los individuos de *D. b. montana* y en amarillo los de *D. b. parva*. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos dentro de cada haplotipo. Dentro de los haplogrupos se indica cada paso mutacional con una línea.



Anexo 5. a) Análisis de asignación bayesiana para ACO1-I9 obtenido mediante *Structure* (Pritchard *et al*, 2000) mostrando los *clusters* recuperados para $K=2$. Cada color representa un agrupamiento genético diferente: el verde es el *cluster* que integra al Grupo Oeste-IT y el rojo representa al *cluster* perteneciente al Grupo Este-IT. Cada columna representa a un solo individuo y la probabilidad de pertenecer a un determinado *cluster* genético se indica por el porcentaje de cada uno de los colores. b) Grafica que muestra el mejor número de agrupamientos genéticos K .



Anexo 6. Reconstrucción filogenética obtenida mediante Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud para ACO1-19. En número los valores de soporte, *bootstrap* se indica a la izquierda de la diagonal y probabilidad posterior se indica a la derecha de la diagonal. En anaranjado son los individuos de *D. b. baritula*, en azul son los individuos de *D. b. montana* y en amarillo es el individuo de *D. b. parva*.



Anexo 7. Tiempos de divergencia estimados en BEAST (Drummond *et al.*, 2012) para los grupos que conforman a *D. baritula*, y las especies hermanas utilizadas para calibrar el reloj molecular.

