



*FILOGEOGRAFÍA Y VARIACIÓN FENOTÍPICA EN EL COLIBRÍ
COLA HENDIDA (Doricha eliza) AVES: TROCHILIDAE.*

*TESIS QUE PRESENTA YUYINI LICONA VERA
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS*

Xalapa, Veracruz, México Agosto 2013.

RECONOCIMIENTOS

El desarrollo de este proyecto de investigación fue posible gracias al apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, a través de la beca de manutención N° 262561 y al financiamiento a través de recursos fiscales, proporcionado por el Instituto de Ecología A.C.

Al Dr. Juan F. Ornelas por haber confiado en mí, por haberme orientado y brindado las facilidades para que culminar este proyecto. Por su amistad y apoyo, muchas gracias!

A los miembros del Comité tutorial y al jurado de tesis, los doctores Adolfo G. Navarro Sigüenza, Carla Gutiérrez Rodríguez, Eduardo Ruíz Sánchez y Blanca E. Hernández, porque sus comentarios y sugerencias enriquecieron mi proyecto de tesis.

A todos los amigos y compañeros que tuvieron la paciencia y disposición de acompañarme durante el trabajo de campo: M.C. Andrés Ortiz, Biól. Román Díaz-Valenzuela, Sr. Eligio Ruíz, Sr. Pedro Flores, Sr. Khul Melchor, M.C. Ana Montes de Oca, M.C Arturo Zavaleta, M.C. María José Pérez Crespo, M.C. Antonio Vázquez. En especial a Irving Chávez Domínguez por su valiosa ayuda en campo y a todo el equipo de Pronatura Veracruz por las facilidades brindadas.

A mis compañeros de generación y compañeros del laboratorio por brindarme su amistad y compartir sus conocimientos y experiencias conmigo: M.C. Andreia Topete Malpica, M.C. Flor del C. Rodríguez Gómez, Dra. Clementina González Zaragoza, M.C. Rosa A. J. Jiménez Barrios, M.C. Antonio Vázquez, M.C. Pablo Minor Montiel, M.C. Ana Montes de Oca, M.C. Erandi Ramírez Aguirre y a la M.C. Cristina Bárcenas Pazos por el trabajo en la secuenciación de muestras.

DEDICATORIA

A mis padres

Con todo mi cariño y admiración, por ser mi ejemplo de lucha y perseverancia, por creer en mí y motivarme, a ustedes papas por siempre mi amor y agradecimiento.

A mis hermanos

Por apoyarme y darme ánimos en los momentos difíciles, por enseñarme que ningún sueño es inalcanzable y por estar conmigo a pesar de la distancia.

A mi compañero de vida

Por acompañarme en este difícil camino y por brindarme incondicionalmente tu amor y comprensión.

A la vida



Aprobación final del documento de tesis de grado:

“Filogeografía y variación fenotípica en el colibrí cola hendida (*Doricha eliza*) Aves:
Trochilidae”

Director

Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez

Comité Tutorial

Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez

Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza

Jurado

Dr. Eduardo Ruíz Sánchez

Dra. Blanca Estela Hernández Baños

DECLARACIÓN

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por Yuyini Licon Vera como estudiante de la carrera de Maestría en Ciencias entre Agosto de 2011 y Agosto del 2013, bajo la supervisión del Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez.

Las investigaciones reportadas en esta tesis no han sido utilizadas anteriormente para obtener otros grados académicos, ni serán utilizadas para tales fines en el futuro.

Candidato: Biól. Yuyini Licon Vera

Director de tesis: Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez



INDICE

RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
<i>Sistema de estudio.....</i>	15
<i>Colecta de muestras y extracción de ADN.....</i>	15
<i>Amplificación, secuenciación y alineación de ADN: mitocondrial y nuclear.....</i>	16
<i>Análisis filogenéticos.....</i>	17
<i>Estimación de tiempos de divergencia: árbol de genes y especies.....</i>	18
<i>Relación entre haplotipos y distancias genéticas.....</i>	19
<i>Estructura poblacional.....</i>	20
<i>Variación genética y pruebas de expansión demográfica.....</i>	20
<i>Modelos de Nicho Ecológico.....</i>	22
<i>Variación morfológica.....</i>	23
RESULTADOS.....	25
<i>Colecta de individuos y secuencias de ADN.....</i>	25
<i>Análisis filogenéticos.....</i>	25
<i>Estimación de tiempos de divergencia: árbol de genes y especies.....</i>	26
<i>Relación entre haplotipos y distancias genéticas.....</i>	27
<i>Estructura poblacional.....</i>	27
<i>Variación genética y pruebas de expansión demográfica.....</i>	28

<i>Modelos de Nicho Ecológico</i>	28
<i>Variación morfológica</i>	29
DISCUSIÓN.....	31
<i>Análisis filogenéticos y estructura poblacional</i>	32
<i>Estimación de tiempos de divergencia: árbol de genes y especies</i>	33
<i>Historia demográfica y Modelos de Nicho Ecológico</i>	34
<i>Variación morfológica</i>	34
<i>Implicaciones en la Conservación</i>	35
CONCLUSIONES.....	36
APÉNDICES.....	36
LITERATURA CITADA.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud utilizando la región la región mitocondrial ND2.....	39
Figura 2. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud utilizando la región el locus nuclear 20454.....	40
Figura 3. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud utilizando la matriz mitocondrial (ND2+ATPasa).....	41
Figura 4. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud utilizando la matriz concatenada (mitocondria+nucleo).....	42
Figura 5. Árbol de especies multiloci para <i>Doricha eliza</i> reconstruido utilizando *BEAST.....	43
Figura 6. Distribución geográfica de los haplotipos de ADN mitocondrial (ND2+ATPasa).....	44
Figura 7. Estructura genética espacial determinada por el método de asignación Bayesiana en STRUCTURE del locus nuclear 20454.....	46
Figura 8. Distribuciones mismatch.....	48
Figura 9. Bayesian skyline plots.....	49
Figura 10. Modelos de Nicho Ecológico.....	50

Figura 11. Gráficas medias morfológicas en hembras de <i>Doricha eliza</i>	51
Figura 12. Gráficas medias morfológicas en machos de <i>Doricha eliza</i>	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Información de individuos colectados a lo largo de la distribución de <i>Doricha eliza</i>	37
Tabla 2. Código variables climáticas de Worldclim, utilizadas en la reconstrucción de los Modelos de Nicho Ecológico.....	38
Tabla 3. Resumen estimación de tiempos de divergencia entre poblaciones de <i>Doricha eliza</i> : árbol de genes y especies.....	43
Tabla 4. Distancias genéticas (D_{xy}) entre especies de los géneros <i>Doricha</i> y <i>Calothorax</i> basadas en ADN mitocondrial.....	45
Tabla 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre poblaciones de <i>Doricha eliza</i> , utilizando la matriz mitocondrial.....	47
Tabla 6. Variación genética y resultados de análisis demográficos para inferir la expansión demográfica en <i>Doricha eliza</i>	47

RESUMEN

El colibrí *Doricha eliza* (Lesson & DeLattre, 1839), una especie endémica de México, cuya distribución incluye sólo dos regiones disyuntas, una a lo largo de la franja norte de la península de Yucatán y otra ubicada en el Veracruz. Su distribución geográfica, representa un excelente modelo para poner a prueba hipótesis sobre la divergencia genética y fenotípica en poblaciones aisladas. Por lo que, en este trabajo se determinó la estructura genética de *Doricha eliza*, utilizando cuatro marcadores moleculares (tres mitocondriales: ND2, ATPasa 6 y ATPasa 8 y uno nuclear: locus 20454) y se evaluó la variación morfológica de 25 individuos. Se realizaron inferencias sobre sus relaciones filogenéticas con otras especies, se estimó el tiempo de divergencia entre las poblaciones y se realizaron modelos de nicho ecológico actuales y paleoclimáticos, para reconstruir la historia evolutiva de *Doricha eliza*. Los resultados indicaron la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados, ésta divergencia es apoyada por los análisis de varianza y estructura poblacional y por algunos rasgos fenotípicos en los machos. Las estimaciones de los árboles de genes y especies, indican que la divergencia en *Doricha eliza*, pudo haber ocurrido en un periodo de intensa actividad climática (entre 0.7 y 0.15 m.a) durante el Pleistoceno tardío. Un aumento en el tamaño efectivo, así como su baja diversidad nucleotídica sugieren una expansión poblacional reciente, tras el Último Glaciar Máximo (~21, 000 años atrás).

INTRODUCCIÓN

La especiación o formación de nuevas especies, es el proceso directamente responsable de la variedad de formas en el planeta (Cracraft, 1988, Gavrillets, 2003), al establecer barreras de flujo génico y aislamiento reproductivo entre poblaciones. Los medios por los cuáles esto ocurre, parecen estar asociados a barreras físicas y ecológicas, que median la distribución de las especies (Pyron y Burbrink, 2010).

Dentro de los tipos de especiación, la alopatría es la forma más común y es típicamente atribuida a la presencia de barreras geográficas que dividen poblaciones, ya sea a través de vicarianza o mediante eventos de dispersión (Mayr, 1942, Perfectti, 2002, Hoskin *et al.*, 2005, Pyron y Burbrink, 2010). La alopatría, puede ser resultado del aislamiento de las poblaciones en áreas divididas ecológicamente, en refugios o por adaptación a áreas geográficamente distintas (Pyron y Burbrink, 2010, Wiens, 2004).

El aislamiento es considerado como el primer paso hacia la especiación (Coyne y Orr, 2004), pues todas las barreras, con el paso del tiempo, reducen la dispersión de las especies, evitando o reduciendo el flujo génico entre sus poblaciones (Panhuis *et al.*, 2001). Esto puede generar diferencias en las características fenotípicas, sexuales y comportamentales, incrementando la tasa de cambio entre poblaciones aisladas (Panhuis *et al.*, 2001).

Los estudios filogeográficos proveen información que permite entender la distribución geográfica de las poblaciones, como producto de procesos históricos y contemporáneos (Avice, 2000). En conjunto, los patrones de variación geográfica de rasgos fenotípicos y genéticos pueden revelar diferenciación y divergencia entre poblaciones que pueden ayudar en la formulación de hipótesis de relaciones filogenéticas y de adaptación ecológica (Lanteri y Confalonieri, 2003).

Los patrones de variación geográfica y genética, se han relacionado con períodos como el Pleistoceno en donde ocurrieron cambios drásticos en la precipitación, temperatura y estacionalidad que modificaron la dinámica y distribución de los conjuntos de vegetación y de los organismos asociados (Barnosky, 2005). En particular, en los bosques secos, los periodos glaciares e interglaciares durante el Pleistoceno tardío (~0.7-0.01 m. a atrás), provocaron eventos de expansión y contracción de los bosques, que favorecieron la especiación, dispersión y diversificación en diferentes grupos de vertebrados y plantas (Prado y Gibbs, 1993, González-Medrano, 1996, Weir, 2006, 2008, Rull, 2008, Pennington *et al.*, 2000, Bryson *et al.*, 2011). Este podría ser el caso del colibrí *Doricha eliza* (Lesson & DeLattre, 1839), una especie endémica de México, que habita en bosques secos, desde su descripción, ha sido colocado en diferentes géneros: *Trochilus* (Lesson y DeLattre, 1839), *Calliphlox* (Reichenbach, 1854) e incluso como parte del género *Calothorax* (Gray, 1848), sin embargo, se desconoce su posición filogenética con respecto a otras especies.

La distribución de *Doricha eliza* se encuentra restringida a dos regiones alopátricas (Veracruz y Yucatán), separadas por 650 km aproximadamente (Ortíz-Pulido *et al.*, 2002). Aunque no se han encontrado diferencias morfológicas, se ha sugerido que las condiciones ambientales en ambas regiones, casi no se sobrelapan (Ortíz-Pulido *et al.*, 2002; Díaz-Valenzuela *et al.*, 2011). En este trabajo, se determinó la posición filogenética de *Doricha eliza* y se exploraron sus patrones de variación genética y fenotípica, mediante mediciones morfológicas y el uso de cuatro marcadores moleculares. Con la finalidad de responder las siguientes preguntas i) ¿Las poblaciones de *Doricha eliza* han divergido genética y fenotípicamente?, ii) ¿Hace cuánto tiempo las regiones en donde se distribuye se encuentran aisladas?, iii) ¿Qué eventos históricos y demográficos dieron origen a la distribución de *Doricha eliza*?

OBJETIVOS

Objetivo general

Examinar los patrones de variación genética y fenotípica en las poblaciones de *Doricha eliza*.

Objetivos particulares

- I. Determinar la posición filogenética de *Doricha eliza*.
- II. Evaluar la variación morfológica y genética entre los individuos de Veracruz y Yucatán.
- III. Estimar el tiempo de divergencia entre las poblaciones del colibrí cola hendida.
- IV. Examinar los procesos históricos y demográficos que pudieron contribuir a la distribución de *Doricha eliza*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio

El colibrí *Doricha eliza* es una endémica de México, se distribuye en el centro de Veracruz y principalmente en la franja norte de la península de Yucatán (Howell y Webb, 1995). Los machos miden entre 9.5 y 10 cm y las hembras son ligeramente más pequeñas (8.5-9 cm). El macho tiene la cola muy larga y bifurcada, la garganta rosa brillante, una línea postocular blanca y la corona de color verde. Las rectrices internas de la cola son verdes y las externas son negruzcas con los bordes internos canela. Por su parte las hembras tienen la cola bifurcada y redondeada, el rostro blanquecino, con una línea auricular blanca y la garganta y la parte interior blanca. Las rectrices internas son verdes y las externas (en general) canela, con una banda subterminal negra y punta blanca. En Veracruz, estos colibríes habitan en matorrales áridos desde 110 a 1480 msnm, en donde anidan de Agosto a Abril. En Yucatán se encuentran principalmente en matorrales áridos, bordes de manglares y áreas verdes al nivel del mar, en donde se reproducen entre Febrero y Marzo de cada año (Howell y Webb, 1995, del Hoyo *et al.*, 1999).

Colecta de muestras y extracción de ADN

Se realizaron visitas a las localidades donde se ha registrado a *Doricha eliza* en Veracruz (El Lencero, Chavarrillo, El Castillo, Cansaburro, Miradores, Playa Juan Ángel, Playa Chalchihuecan) y Yucatán (Río Lagartos y Chixulub). Durante los meses de octubre de 2011 a octubre de 2012. En cada localidad se identificaron sitios de alimentación-refugio y nidificación, donde se colocaron de 7 a 10 redes de niebla (de 12 o 6 metros de largo por 3 metros de ancho y 3 mm de luz) para capturarlos. A los individuos capturados se les quitaron dos rectrices de la cola, de donde posteriormente se extrajo ADN del cálamo, utilizando el protocolo de Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA).

Amplificación, secuenciación y alineación de ADN: mitocondrial y nuclear

Se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un fragmento de la región de Nicotidamida Deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) usando los primers L5216 y H5578 (Sorenson *et al.*, 1999) y dos genes parcialmente sobrelapados ATPasa 6 y ATPasa 8 (en adelante ATPasa), mediante los primers L8929 y H9947 (Eberhard y Bermingham, 2004). Además de un intrón nuclear (locus 20454), utilizando los primers R20454 y 20454 (Backström *et al.*, 2008).

Las reacciones de amplificación para los genes mitocondriales (10-25µl total) típicamente consistieron en 0.72x buffer, 4.0mM MgCl₂, 0.58 Mm de cada dNTP, 0.4 µg/µl de BSA, 0.18 µM de cada primer, 0.04 U de *Taq* (Promega) y 1-2 µl de ADN y las del locus nuclear (20µl) en 0.52x buffer, 3.0-4.0 mM MgCl₂, 0.22 Mm de cada dNTP, 0.4 µg/µl de BSA, 0.20 µM de cada primer, 0.04 U de *Taq* (Promega) y 3 µl de ADN. Las reacciones de PCR fueron realizadas en una termocicladora 2720 (Applied Biosystem) o en una termocicladora c1000 BIORAD bajo los siguientes perfiles de temperatura; para ND2, la desnaturalización se realizó a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos a 94°C por 45 segundos, 47-48°C por 45 segundos, 30 segundos a 72°C y una extensión final de 72°C por 5 minutos. La desnaturalización para ATPasa consistió en 95° C por 2 minutos; 40 ciclos a 92°C por 40 segundos, 47-50°C por un minuto, 2 minutos a 73°C y una extensión final de 73°C por 3 minutos. Mientras que la desnaturalización del locus nuclear se inició a 94° C por 1.30 minutos; 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50-52°C por 30 segundos, 45 segundos a 72°C y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, purificados con el kit de QIAquick (QIAGEN, Inc.) y secuenciados con el kit BigDye terminator (Applied Biosystem), en ambas direcciones, usando los mismos primers que en la PCR. Las secuencias fueron leídas en un secuenciador automático ABI 310 (Applied Biosystem), posteriormente fueron concatenadas y editadas usando el programa SEQUENCHER

v.4.8 (Gene Codes). Los consensos se alinearon manualmente utilizando SE-AL v.2.0a11 (Rambaut, 2002). Finalmente se realizó una matriz para cada gen por separado. Además de una matriz con los tres genes mitocondriales (en adelante matriz mitocondrial) y una con los cuatro genes (en adelante matriz concatenada), que fueron utilizadas para análisis posteriores.

Análisis filogenéticos

Los árboles filogenéticos fueron realizados utilizando análisis de inferencia Bayesiana y máxima verosimilitud en Mr. Bayes v.3.12 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) y RaxML v.7.4.4 (Stamatakis, 2006), respectivamente. Se realizó un análisis con las secuencias amplificadas de ND2, el locus 20454 y la matriz mitocondrial por separado, y otro con la matriz concatenada, en donde cada gen, fue tratado como una partición distinta. En estos análisis, se incluyeron secuencias de tres especies cercanamente relacionadas como grupos externos (*Doricha enicura*, *Calothorax lucifer* y *C. pulcher*) y de otros miembros del clado de las abejas (*Selasphorus platypterus*, *Atthis heloisa*, *Archilochus colubris*, etc.) (McGuire *et al.*, 2007). Estas especies fueron colectadas y/o tomadas de la colección de tejidos del INECOL (No. Cat. PUE. 129), siguiendo los mismos procedimientos de extracción, amplificación y secuenciación utilizados para *Doricha eliza*. Además se incluyeron secuencias de la base de datos de nucleótidos de Genbank (Benson *et al.*, 2005).

Los análisis de inferencia bayesiana, se corrieron por 10,000 000 generaciones usando cuatro cadenas de Markov de Monte Carlo (siglas en inglés MCMC) con un muestreo cada 1000 generaciones. Se descartaron el 10% de los árboles (*burn-in*) y se obtuvo el árbol de probabilidades posteriores que fue visualizado en FigTree v.1.2.3. (Rambaut, 2006). Se consideraron los nodos con $\geq 95\%$ de probabilidades posteriores Bayesianas como bien soportados (Hillis y Bull, 1993).

El análisis de máxima verosimilitud, se realizó con los parámetros por default y 1000 réplicas de *bootstrap*, vía CIPRES (Miller *et al.*, 2010). Los resultados se concatenaron en Mesquite v.2.75., y los valores de *bootstrap* fueron colocados en la topología del árbol de inferencia Bayesiana. Los nodos con un 70% de soporte de *bootstrap*, se consideraron como bien soportados (Felsenstein, 2004).

Estimación de tiempos de divergencia: árbol de genes y especies

Para estimar el tiempo de divergencia o tiempo al ancestro común más reciente (siglas en inglés TMCRA), se realizó un análisis bayesiano con muestreo en BEAST v.1.5.4. Para este análisis, se utilizaron la matriz mitocondrial y la matriz concatenada (en donde se incluyeron a los individuos de *Doricha eliza* y los grupos externos) y los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se ajustaron a las secuencias mitocondriales y nucleares (por separado), en jModeltest v.1.1. (Posada, 2008). Se utilizaron las tasas de divergencia reportadas por Lerner *et al.*, (2011) para las regiones mitocondriales utilizadas (ND2 2.9×10^{-2} por millón de años, ATPasa 6 2.6×10^{-2} y ATPasa 8 1.9×10^{-2}) y para el gen nuclear 1×10^{-3} por millón de años (Lerner *et al.*, 2011).

Las estimaciones del tiempo de divergencia se realizaron bajo el modelo de reloj molecular relajado *lognormal* (Barber y Klicka, 2010) y como *prior* el modelo poblacional constante. Además se incluyeron dos calibraciones secundarias, la primera el tiempo de divergencia estimado (*Basal Split*) entre los dos clados (Norte -Centroamérica y Sudamérica) del grupo de las Abejas (~ 6.10 s/s/l/m.a. $SD \pm 1.0$) (Smith y Klicka, 2010) y el tiempo de divergencia entre el clado de las Esmeraldas y las Abejas (~ 13.97 s/s/m.a. $SD \pm 3.0$) estimado por Ornelas *et al.* (2013). Se usó una topología de UPGMA como árbol de inicio y los valores predeterminados por el programa BEAUTI v.1.5.4. Se realizaron 3 iteraciones con cuatro cadenas independientes (MCMC) por 10 millones de generaciones, muestreando al azar cada 1000 generaciones. El 10%

de los árboles fueron descartados y los resultados de los tiempos de divergencia, se resumieron en un árbol único en el programa TreeAnnotator (Rambaut y Drummond, 2007) que fue visualizado en FigTree v.1.2.3.

Se utilizó *BEAST, que forma parte de la versión 1.6.4 del paquete de BEAST, para estimar el árbol de especies. *BEAST estima el árbol de especies directamente de la secuencia de datos e incorpora la incertidumbre asociada con el árbol de genes, el modelo de sustitución de los nucleótidos y los parámetros asociados con el proceso de coalescencia (Heled y Drummond, 2010). Para este análisis se utilizaron las secuencias de cada gen por separado, las tasas de sustitución reportadas por Lerner *et al.* (2011), el modelo de reloj molecular relajado *lognormal* (Barber y Klicka, 2010) y el modelo de especiación Yule. A partir de esta información, se obtuvo el árbol consenso con los tiempos de divergencia a través de 300,000 árboles, tras eliminar 10% de los árboles obtenidos, se creó un cladograma con las probabilidades posteriores del árbol de especies con Tree Annotator (Rambaut y Drummon, 2007).

Relación entre haplotipos y distancias genéticas

Para estimar las relaciones entre los haplotipos mitocondriales se construyó una red de haplotipos con el algoritmo de parsimonia estadística con el programa TCS.1.2.1 (Clemen *et al.*, 2000) utilizando el 95% de probabilidad de conexión y las secuencias de la matriz mitocondrial. Con dicha matriz, se obtuvo el número de cambios nucleotídicos entre haplotipos para calcular las distancias genéticas corregidas, tomando en cuenta el polimorfismo encontrado dentro los grupos (Nei, 1987). De modo que $D_{xy} = d_{xy} - 0.5 (d_{ix} + d_{iy})$, donde x e y son los grupos que se comparan y d_i el promedio de las distancias genéticas corregidas (Wilson *et al.*, 1985). El análisis de las distancias genéticas se realizó, entre los grupos genéticos de *Doricha eliza* y entre las especies de *Doricha* y *Calothorax*, con fines comparativos.

Estructura poblacional

Para determinar la estructura genética de las poblaciones, primero se estimó la fase gamética de las secuencias nucleares (locus 20454) con sitios heterocigotos, mediante el enfoque Bayesiano implementado en el programa PHASE 2.1 (Stephens *et al.*, 2001). Estos sitios fueron identificados por la presencia de dobles picos en los electroferogramas. Se realizaron tres corridas de 10, 000 iteraciones, y se descartó (*burn-in*) el 10% de los resultados, para cada población por separado. Se evaluó la consistencia de los resultados en todas las iteraciones y se eligieron los pares de haplotipos con las probabilidades más altas (0.70-1.00) para cada individuo. Con dicha información, se realizó una red de haplotipos en el programa TCS.1.2.1 (Clemen *et al.*, 2000), en el que los haplotipos obtenidos y sus frecuencias fueron codificados en una matriz de presencia-ausencia, que fue utilizada para realizar un análisis de agrupamiento Bayesiano en el programa STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000, Falush *et al.*, 2003, 2007; Hubisz *et al.*, 2009). En este análisis se utilizó el modelo de ancestría mezclada o “*admixture model*” (en inglés) y el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas. Se corrieron 10 réplicas para cada K, de K=1 a K=7, esto último tomando en cuenta el número de localidades muestreadas. El “*burn-in*” fue de 500 000 y el número de réplicas de Cadenas de Markov (MCMC) después del “*burn-in*” 1 000 000. Después se seleccionó el número más probable de grupos genéticos mediante el cálculo de ΔK , el cual se basa en la tasa de cambio de la probabilidad logarítmica de los datos entre valores sucesivos de K (Evanno *et al.*, 2005), usando el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt, 2012).

Variación genética y pruebas de expansión demográfica

Se evaluó la variabilidad genética de cada grupo genético con el programa Arlequin v.3.0. (Excoffier *et al.*, 2005), mediante la estimación de la *diversidad de haplotipos* o *diversidad*

genética (h), que expresa la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes en una población; la *diversidad nucleotídica* (π) que determina el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar así como el número *de sitios segregantes* (s), sitios donde las secuencias difieren (Nei y Lei, 1979).

Para estimar la variación genética entre grupos, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), en el que se usó el modelo de evolución molecular obtenido en jModeltest v.3.7 (Posada, 2008) y se estimaron un total de 16,000 permutaciones para determinar la significancia del AMOVA. El AMOVA se corrió agrupando a los individuos en dos grupos de acuerdo con la divergencia observada en los árboles de inferencia Bayesiana. No se pudo realizar un AMOVA sin formar grupos *a priori* debido a que cuatro de las siete localidades muestreadas sólo se encuentran representadas por un individuo cada una.

Posteriormente se realizaron dos pruebas de expansión demográfica para poner a prueba la hipótesis de equilibrio neutral y detectar si se ha producido una expansión poblacional reciente (Martínez *et al.*, 2009). La prueba de neutralidad de F_u (Fu, 1997), que muestra la desviación de la neutralidad en escenarios caracterizados por un exceso de alelos raros y mutaciones recientes. Donde valores significativos y negativos de F_s indican un exceso de mutaciones recientes y rechazan estabilidad en las poblaciones (Fu, 1997). Y la prueba D de Tajima (1989), que compara los parámetros poblacionales de sitios segregantes (s) y el promedio de diferencias pareadas entre los haplotipos muestreados. Valores negativos y significativos de D pueden deberse a expansiones poblacionales recientes, cuellos de botella o heterogeneidad en las tasas de mutación (Tajima, 1989). Para validar la estimación demográfica y la expansión geográfica se utilizaron 16,000 permutaciones en Arlequin v.3.0. (Excoffier *et al.*, 2005).

Además se realizaron distribuciones pareadas de nucleótidos entre haplotipos (distribución “*mismatch*”) en Arlequin v.3.0. (Excoffier *et al.*, 2005). Bajo este enfoque las poblaciones que

han pasado por una expansión demográfica súbita muestran una distribución *Poisson*, mientras que las poblaciones que han estado en equilibrio por un largo tiempo, muestran una distribución bimodal (Slatkin y Hudson, 1991).

Finalmente se utilizó el modelo Bayesiano “*Bayesian skyline plots*” para determinar posibles cambios en el tamaño efectivo (N_e) de las poblaciones con el programa BEAST v.1.5.4 (Drummond y Rambaut, 2007). El análisis se realizó para cada grupo genético por separado y para los dos grupos juntos (concatenado). El análisis concatenado, se ha propuesto para satisfacer el supuesto de panmixia en linajes de divergencia reciente y con poca estructura genética (Ho y Shapiro, 2011).

Modelos de Nicho Ecológico

A través de registros georreferenciados de ejemplares de museo (VERTNET, ORNIS, Atlas de las Aves de México, GBIF) y de observaciones de campo, se obtuvieron un total de 121 registros espacialmente únicos: 51 de Veracruz y 76 de Yucatán. Se obtuvieron además, 19 capas climáticas de la base de datos de WorldClim, con una resolución de 30 arc.-seg. (c.1 km) (Hijmans *et al.*, 2005). Con la información climática (de las 19 variables) de cada registro, se realizó un análisis de correlación de Pearson y un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), con los cuáles se eliminaron las variables altamente correlacionadas ($r > 0.80$). Tras la eliminación de las variables correlacionadas, se utilizaron seis variables climáticas (Bio1, Bio2, Bio3, Bio4, Bio12, Bio14) (Tabla 2) y los registros georreferenciados, para realizar un modelo de nicho ecológico actual y proyecciones climáticas hacia el pasado a través del programa de Máxima Entropía de MAXENT 3.3.3 (Phillips *et al.*, 2004).

El modelo actual se realizó con el 70% de los datos (muestra aleatoria), un límite de convergencia de 10^{-5} y 500 iteraciones. Las predicciones resultantes fueron visualizadas en ArcView v.3.2

(ESRI Inc., Redlands, CA). Posteriormente, se proyectó el modelo obtenido con las condiciones actuales hacia escenarios climáticos del pasado, al Último Interglacial (UIG, ~140-120,000 años atrás) y al Último Glacial Máximo (UGM, ~ 21,000 años atrás). Estos escenarios climáticos fueron desarrollados por el Modelo Paleoclimático de Intercomparación Proyecto Fase II (Braconnot *et al.*, 2007), el Modelo CCSM (Community Climate System Model) y el modelo para la búsqueda interdisciplinaria del clima MIROC (Hasumi y Emori, 2004) con una resolución espacial de 30 arc.-min. Los valores de probabilidad en los modelos se expresaron en una escala de 0 a 1. En donde valores cercanos a 0 indican condiciones poco habitables y valores cercanos a 1, indican condiciones aptas para la especie.

Variación morfológica

Se tomaron seis medidas morfológicas (mm), para las hembras (n=11) (longitud total, largo pico, ancho pico, base pico, cuerda alar, largo cola) y siete para los machos (n=11) (longitud total, ancho pico, base pico, largo pico, cuerda alar, largo rectriz (r5) derecha e izquierda), de todos los individuos colectados, con un vernier de precisión de 0.1mm. La longitud total (LT) fue medida como la distancia de la punta del pico a la pluma de la cola más larga, el largo del pico (LP) como la distancia desde la base del cráneo a la punta del pico, la base (BP) y ancho del pico (AP) a la altura de las narinas, la cuerda alar (CA) desde la unión carpal a la punta de la primaria más larga (sin aplanar), la longitud de la cola (LC) (en el caso de las hembras), desde la glándula uropigial a la punta de la rectriz más larga y el largo de las rectrices externas (r5) derecha e izquierda (LRI y LRD) (para los machos) desde la base de la rectriz hasta la punta de la pluma. Todas las medidas fueron tomadas por YLV. Las medidas de dos machos juveniles (n=2) capturados en Yucatán, fueron descartadas de los análisis para eliminar posibles diferencias en las medidas debido a la edad de los individuos.

Para examinar las diferencias en la variación morfológica se realizó un análisis de varianza múltiple (MANOVA), tomando como factor fijo el grupo (ej. hembras y machos) y como variables dependientes las medidas morfológicas. Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza de una vía no paramétrico (prueba Kruskal-Wallis), para cada variable por separado. Las pruebas se realizaron para cada sexo, debido al dimorfismo presente en *Doricha eliza*, usando SPSS v.17. Mac.

RESULTADOS

Colecta de individuos y secuencias de ADN

Un total de 25 individuos, de 7 localidades (5 de Veracruz y 2 de Yucatán), fueron colectados durante las temporadas reproductivas de 2011 y 2012 (Tabla 1). Se obtuvo una matriz de 350 pb para ND2 y 797 pb para ATPasa, la matriz con ambos genes (matriz mitocondrial) consistió en 1077 pb, con 11 sitios polimórficos.

La matriz del locus nuclear 20454 con 502 pb, tuvo cinco sitios informativos, tres de los cuales fueron polimórficos. Finalmente, la matriz concatenada con los cuatro genes consistió en 1578 pb.

Análisis filogenéticos

La topología del árbol de probabilidades posteriores con las secuencias de ND2 (HKY+G, distribución gamma=0.2670) (Fig. 1), muestra al clado de las abejas como un grupo monofilético (PP=1.0/BS=100), dentro del cual el grupo de los colibríes cola hendida o “*Sheartails*” compuesto por *C.lucifer*, *C.pulcher*, *D.eliza*, *D.enicura* (PP=1.0/BS=75) se encuentra fuertemente soportado. El género *Calothorax*, representa el grupo hermano del género *Doricha*, y las relaciones entre *Calothorax pulcher* y *C. lucifer* no se encuentran resueltas, mientras que la divergencia entre los grupos de Veracruz y Yucatán de *Doricha eliza* se encuentra bien soportada (PP=0.96/BS=88).

El análisis de inferencia Bayesiana para el locus 20454 (HKY+G, distribución gamma=0.0170), apoya la monofilia del grupo de las Abejas (PP=1.0/BS=88), sin embargo las relaciones al interior de este clado no se muestran resueltas, en donde los individuos de *Doricha eliza*, de Veracruz y Yucatán, junto con *Doricha enicura*, *Calothorax lucifer*, *Calothorax pulcher*,

Archilochus colubris, *Atthis heloisa*, *Selasphorus platycercus*, *Tilmatura dupontii*, forman una politomía (Fig. 2).

El árbol generado por inferencia Bayesiana para la matriz mitocondrial (ND2 + ATPasa) (GTR+I), mostró al grupo de las abejas y al de los colibríes cola hendida como bien soportados (PP=1.0/BS=100). En este último, *C. lucifer* y *C. pulcher* forman dos clados hermanos (PP=1.0/BS=100), cercanamente relacionados con *Doricha eliza*. Los grupos de Yucatán y Veracruz de *Doricha eliza*, forman dos grupos genéticos bien soportados (PP=1.0/BS=94), cuyo grupo hermano es la especie *Doricha enicura* (PP=1.0/BS=98) (Fig. 3).

La matriz particionada (ND2+ATPasa+núcleo) con los modelos de evolución HKY+G (gamma=0.190), HKY+G (gamma=0.1550) y HKY+G (gamma=0.0170), mostró una topología muy similar a la del árbol de la región mitocondrial con valores de soporte altos para el clado de las abejas (PP=1.0/BS=100), para el clado “*Calothorax*” (PP=1.0/BS=100) y para el clado que soporta la divergencia genética en *Doricha eliza* (PP=1.0/BS=95). Los árboles de Máxima Verosimilitud mostraron una topología similar, por lo que los valores de *bootstrap* se muestran en el árbol de probabilidades posteriores (Fig. 4).

Estimación tiempos de divergencia: árbol de genes y árbol de especies

Los clados presentes en los árboles de genes y especies, tuvieron la misma topología que los árboles filogenéticos Bayesianos y de Máxima Verosimilitud. El árbol de genes mitocondrial, produjo tiempos de divergencia similares a los del árbol de especies, sugiriendo que los grupos genéticos divergieron alrededor de 1.5 y 0.2 millones de años aprox. (Tabla 3, Fig. 5). En contraste, el árbol de genes multiloci produjo una estimación de ~0.7 millones de años (Tabla 3). A pesar de las diferencias en las medias de las estimaciones, los HPD de las tres estimaciones se

sobrelapan, sugiriendo que los clados de Veracruz y Yucatán se separaron durante los periodos glaciares durante el Pleistoceno tardío.

Relación entre haplotipos y distancias genéticas

En la red de haplotipos de ADN mitocondrial, se identificaron dos grupos genéticos conectados entre sí por dos pasos mutacionales. El primero formado por cinco haplotipos, todos pertenecientes a individuos de Veracruz, en donde el haplotipo más frecuente (H1), se encontró en las localidades “Lencero”, “Miradores” y “Chavarrillo”. Mientras que el resto de los haplotipos fueron únicos para las localidades de Xalapa (H2), el Lencero (H3, H4) y Actopan (H5) (Tabla 1, Fig. 6). El segundo grupo genético, estuvo compuesto por cinco haplotipos, todos de Yucatán. El haplotipo más común (H6) estuvo presente en 10 individuos: cinco de “Río Lagartos” y cinco de “Chicxulub”, el segundo más común (H7), por dos individuos de Río Lagartos, y el resto de los haplotipos, se encontraron en un individuo cada uno (H7, H8, H9, H10) (Tabla 1, Fig. 6). Los resultados no mostraron haplotipos compartidos entre grupos, como lo muestra la distribución geográfica de los haplotipos (Fig. 6).

El análisis de distancias genéticas realizado con la matriz mitocondrial mostró que el porcentaje de divergencia entre las secuencias de Veracruz y Yucatán es de 0.35% ($D_{xy}= 0.0035$). Y el porcentaje de divergencia entre las especies de *Doricha* y *Calothorax* oscila entre 0.35% y 3.48% (Tabla 4).

Estructura poblacional

La red de haplotipos (no mostrada) del locus 20454 reveló la existencia de ocho haplotipos, (Tabla 1) uno de ellos, compartido por individuos ambas poblaciones, sin embargo, la evaluación estricta de los valores de verosimilitud para cada K, soportó la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados (K=2; loglikelihood -94.06) (Fig. 7), valores más pequeños o más

altos de K incrementaron la varianza y mostraron valores más bajos de probabilidades posteriores.

Variación genética y pruebas de expansión demográfica

El análisis de varianza molecular, mostró que el mayor porcentaje de la variación (81.02%) es explicado por la variación entre grupos y solo el 18.9% por la variación al interior de los grupos (Tabla 5). La F_{ST} de 0.810 $p < 0.001$, indica alta diferenciación entre grupos genéticos (Tabla 5). Además se encontraron niveles altos de diversidad haplotípica (h) de entre 0.56-0.66, esto refleja la presencia de haplotipos diferentes en Veracruz y Yucatán (Tabla 6). La diversidad nucleotídica (π) oscila entre 0.0006-0.0007, indicando pocas mutaciones entre las secuencias de la misma población (Tabla 6).

Las pruebas de expansión demográfica D de Tajima y F_s , mostraron valores bajos negativos y significativos, como resultado de una expansión poblacional. De forma similar, el análisis de *mismatch*, mostró valores de SSD significativos, en donde las distribuciones de cada grupo genético por separado y la de las dos juntos, tienen una distribución unimodal, indicando expansión poblacional reciente (Tabla 6, Fig. 8).

El análisis Bayesiano “*Skyline-plot*” para Veracruz y Yucatán por separado, no sugiere un aumento en el tamaño efectivo (N_e) en los últimos 4000 mil años (Fig. 9). Sin embargo el análisis de los dos grupos juntos, muestra un ligero incremento en el N_e después del Último Máximo Glaciar ~21 000 años atrás.

Modelos de Nicho Ecológico

Todos los modelos de nicho ecológico, presentaron un área bajo la curva ROC cercanos a uno ($AUC > 0.98$), indicando que los modelos fueron mejores que las predicciones al azar ($0.5 =$ debidas al azar, $1 =$ probabilidad máxima). Los modelos se muestran en una escala de color,

de acuerdo con su probabilidad. Tonalidades oscuras muestran una mayor probabilidad de ser ocupados por la especie y a la inversa.

El modelo de nicho ecológico, no muestra áreas de posible conectividad (con $p > 0.50$) entre Veracruz y Yucatán (Fig. 10a), en donde las predicciones para la población de Yucatán se restringen a la zona costera del norte de la Península, mientras que las áreas habitables para la población de Veracruz se encuentran principalmente en el centro del estado (Figs. 10a).

Las proyecciones hacia el Último Interglaciario (UIG) (~140-120 000 años) no indican condiciones habitables en Veracruz y por el contrario sugieren la existencia de áreas ecológicamente habitables en Guerrero, Oaxaca y Guatemala (Fig. 10), donde actualmente se encuentran especies cercanamente emparentadas a *Doricha eliza*. Por otra parte, los modelos paleoclimáticos no sugieren la expansión del área disponible ($p > 0.5$) para las poblaciones de *D. eliza*, durante el Último Glaciar Máximo (UGM) (~21 000 años) en ambos escenarios climáticos (Figs. 10c).

Variación morfológica

La MANOVA realizada agrupando las seis medidas morfológicas, no mostró diferencias significativas entre las hembras de Veracruz y Yucatán (Wilk's Lambda= 0.5312, $p > 0.05$), asimismo, los análisis de varianza molecular del largo (Kruskal-Wallis $H=0.32$, $p > 0.05$), ancho (Kruskal-Wallis $H=0.80$, $p > 0.05$) y base del pico (Kruskal-Wallis $H=1.48$, $p > 0.05$), la longitud total (Kruskal-Wallis $H=0.006$, $p > 0.05$), la cuerda alar (Kruskal-Wallis $H=0.80$, $p > 0.05$) y el largo de la cola (Kruskal-Wallis $H=0.16$, $p > 0.05$) no revelaron diferencias significativas entre grupos, como lo sugieren además, las medias aritméticas de las medidas tomadas en las hembras (Fig. 11).

La MANOVA efectuada para las siete medidas morfológicas de los machos fue significativa (Wilk's Lambda=0.046, $p < 0.05$), siendo el largo de la rectriz izquierda (r_5) la variable que

resultó significativamente diferente entre grupos (Kruskal-Wallis $H=7.5$, $p<0.01$). Las rectrices de los machos de Veracruz, son en promedio más grandes, que las de los machos de Yucatán (Fig. 12).

DISCUSIÓN

Análisis filogenéticos y estructura poblacional

Los resultados de los análisis de inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud (ND2), en donde fueron incluidos representantes de los géneros *Calothorax* (2 spp.), *Doricha* (2), *Atthis* (1) y *Tilmatura* (1), soportan la monofilia del clado de las Abejas (*Bees*), lo que coincide con lo propuesto por McGuire *et al.* (2007). En todos los análisis (mitocondriales y concatenados), los colibríes cola hendida “*Sheartails*” forman un grupo monofilético bien soportado compuesto por dos géneros hermanos *Doricha* y *Calothorax*, como había sido sugerido con base en su similitud morfológica y distribución geográfica (Ridgway, 1919, Johnsgard, 1997, Ortíz-Pulido *et al.*, 2002). Además, los árboles filogenéticos sugieren la divergencia genética en *Doricha eliza*. Esta divergencia es apoyada por los análisis de estructura y varianza poblacional.

Los análisis de estructura poblacional con el marcador nuclear muestran un haplotipo compartido entre las poblaciones de *Doricha eliza*, esto puede deberse a la retención de polimorfismos ancestrales (Freelang y Boag, 1999) en las poblaciones debido a la baja tasa mutacional de los genes nucleares, al sorteo incompleto de linajes o incluso eventos de migración (Freelang y Boag, 1999). Lo que se ha observado, en linajes de divergencia reciente (Masta y Madisson, 2002) como los encontrados en *Doricha eliza*. No obstante, la herencia biparental y el haplotipo compartido entre poblaciones, los análisis en STRUCTURE apoyan la divergencia de las poblaciones y sugieren la existencia de dos grupos genéticos (K=2).

Por su parte, el análisis de varianza molecular con las secuencias mitocondriales, sugiere la fijación de diferentes alelos en los grupos, probablemente como resultado de su aislamiento geográfico y/o la ausencia de flujo génico entre ellos (Cicero y Johnson, 1992), como se ha observado en otros grupos de especies (Milá *et al.*, 2007, Bonaccorso *et al.*, 2007, González *et*

al., 2011, Barrera-Guzmán *et al.*, 2012). Además la distancia genética (mitocondrial) encontrada entre Veracruz y Yucatán ($D_{xy} = 0.0035$, 35%), es similar a la existente entre las dos especies del género *Calothorax*: *C. lucifer* y *C. pulcher* ($D_{xy} = 0.0046$, 0.46%) muy cercanas filogenéticamente a *Doricha eliza*, como lo sugieren nuestros análisis filogenéticos.

Estimación de tiempos de divergencia: Árbol de genes y especies

La estimación del árbol de genes de ADN mitocondrial es temporalmente más cercana a la del árbol de especies, en contraste con el árbol de genes combinado. Aunque los árboles basados en un solo gen, son menos precisos en comparación con los árboles de genes combinados, en donde se reconstruyen partes diferentes de la historia evolutiva de las especies (McCormack *et al.*, 2010), las estimaciones calibradas dependen de la tasa de sustitución de los genes, y la inclusión de genes nucleares con tasas de mutación lentas pueden realizar sobre estimaciones en linajes que han divergido recientemente (Carstens y Knowles, 2007). Por otro lado, el tiempo de divergencia del árbol de especies fue más cercano al presente en comparación con los árboles de genes. No obstante, ninguna de las estimaciones es teóricamente comparable, pues los árboles de genes se encuentran inmersos en el árbol de especies (Heled y Drummond, 2010) y los árboles de especies toman en cuenta además de la tasa mutacional de los genes, las relaciones ancestrales, el tamaño poblacional y los tiempos de divergencia entre especies (Heled y Drummond, 2010). A pesar de dichas diferencias, los HPD de todas las estimaciones, se sobrelapan, indicando que la divergencia sucedió entre 0.7 y 0.15 millones de años, durante el Pleistoceno tardío, como se ha observado en otros grupos de aves (Avice y Walker, 1998, Johnson y Cicero, 2004, Zink y Klicka, 2006, McCormack *et al.*, 2010, Barrera-Guzmán *et al.*, 2012). Durante dicho periodo se registró una intensa actividad climática, en el que ocurrieron ciclos interglaciares y glaciares consecutivos hace 0.7-0.01 millones de años (Webb y Bartlein, 1992). Durante los interglaciares

las condiciones de aridez, favorecieron la expansión de los ecosistemas secos y semidesérticos (Riddle *et al.*, 2000) y durante los periodos glaciares (Pleistoceno tardío), las zonas secas se contrajeron, formando islas de vegetación que pudieron haber incrementado las tasas de especiación en grupos de organismos como *Doricha eliza* asociados a estos ecosistemas. Este patrón de expansión y contracción, ha sido frecuentemente evocado para explicar procesos de especiación, a través de vicarianza (Riddle *et al.*, 2000, Weir, 2006, McCormack *et al.*, 2010). No obstante, la hipótesis de un evento de dispersión a larga distancia, no debería ser descartada en especies como *Doricha eliza* que habitan en lugares susceptibles a eventos climáticos como huracanes. Las oscilaciones climáticas del Pleistoceno, incluyeron cambios en la circulación atmosférica que incrementaron la velocidad y magnitud de los vientos e intensificaron las tormentas (Webb y Bartlein, 1992), lo que pudo facilitar la dispersión de individuos. Estos eventos pudieron ocurrir de forma repetida durante fenómenos climáticos diferentes, lo que con el paso del tiempo pudo favorecer el establecimiento y reproducción de *Doricha eliza*.

Historia demográfica y modelos de nicho ecológico

El inicio de la divergencia en el colibrí cola hendida, es apoyado por los modelos de nicho ecológico, en donde las condiciones climáticas de Veracruz no son predichas y las de Yucatán se reducen a una pequeña área, durante el Último Interglaciario (~120-140 000 años). Por otra parte los modelos con los dos escenarios climáticos MIROC y CCSM, sugieren la contracción de las poblaciones durante el Último Máximo Glaciar, como se ha observado en otras especies de bosques secos y desérticos (Rebernick *et al.*, 2010, Smith *et al.*, 2011, Graham *et al.*, 2013). Los resultados de las pruebas de expansión, las estimaciones de los *skylineplots* para los grupos juntos y la baja diversidad genética de las poblaciones, soportan la hipótesis de una expansión post-

glaciar (~10 mil años a la fecha), tras la cual, las poblaciones de Veracruz y Yucatán, alcanzaron su distribución actual.

Variación morfológica

El análisis morfológico, no sugiere diferencias en el pico, cuerda alar y longitud total, en machos y hembras. Dichos análisis concuerdan parcialmente con el estudio de Ortíz-Pulido *et al.* (2002), sin embargo nuestros resultados sugieren diferencias en la longitud de la rectriz izquierda (r5) de los machos, lo que podría representar un indicio de la divergencia morfológica entre grupos. Si bien estas diferencias pueden ser un resultado secundario del aislamiento reproductivo, también pueden estar guiadas por presiones de selección sexual (Coyne y Orr, 2004). Pues se sabe que los machos del clado de las Abejas, grupo al que pertenece *Doricha eliza*, se caracterizan por presentar un despliegue muy elaborado en el cual las rectrices de la cola, emiten sonidos durante el cortejo (Clark *et al.*, 2011). Análisis experimentales en este grupo de colibríes, han determinado que pequeños cambios en el tamaño y en general, en las características de las rectrices, afectan el modo de aleteo y la frecuencia de los sonidos que son emitidos y de esta forma la selección a través de las hembras puede modificar la morfología de los machos (Clark *et al.*, 2011), de este modo el aislamiento prezigótico, puede favorecer la divergencia fenotípica y propiciar la especiación (Coyne y Orr, 2004) en grupos geográficamente aislados como los encontrados en *Doricha eliza*. No obstante, los resultados obtenidos deben ser tomados con cautela, dado el número de individuos que fueron medidos. Futuros trabajos acerca del despliegue reproductivo en los machos, podrían apoyar o rechazar esta hipótesis.

Implicaciones en la conservación

La divergencia genética encontrada con los análisis mitocondriales y nucleares, sugiere que los grupos han estado separados por un tiempo relativamente corto. Sin embargo, ha permitido la

acumulación de diferencias genéticas y fenotípicas entre grupos, probablemente como producto de su aislamiento geográfico y la aparente ausencia de flujo génico. Estas diferencias, así como su restringida distribución geográfica muestran la imperante necesidad de conservar su diversidad genética y sus sitios de reproducción, ya que las áreas donde habitan están siendo severamente transformadas por actividades como el turismo, la creación de conjuntos habitacionales y el cambio de uso de suelo, entre otras.

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados indican que las poblaciones de Veracruz y Yucatán de *Doricha eliza* son genéticamente diferentes y que los machos de ambas poblaciones presentan diferencias en el tamaño de las rectrices externas de la cola. Estas diferencias sugieren el reconocimiento de las poblaciones de *Doricha eliza* como unidades evolutivas diferentes y resaltan su importancia como reservorios de diversidad genética, lo que aunado a su restringida distribución, hacen prioritarias acciones para su conservación.

APÉNDICES

Tabla 1. Información de individuos colectados a lo largo de la distribución de *Doricha eliza*.

N°	Clave	Sexo	Hmit	Hnuc	Estado	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud msnm
1	VER01Len	H	H1	H1,H1	Veracruz	El Lencero	19°29'0.61" N	96°49'39.8" W	910
2	VER02Len	H	H1	H1,H1	Veracruz	El Lencero	19°29'0.61" N	96°49'39.8" W	910
3	VER03Mir	H	H1	H1,H1	Veracruz	Miradores	19°27'47.4" N	96°47'11.9" W	916
4	VER04Xal	-	H2	H1,H1	Veracruz	Jalapa	-	-	-
5	VER06Cha	H	H1	H1,H2	Veracruz	Chavarrillo	19°26'10" N	96°48'11.7" W	872
6	VER07Len	M	H3	H1,H2	Veracruz	El Lencero	19°29'0.61" N	96°49'39.8" W	910
7	YUC08RLa	H	H6	H7,H7	Yucatán	Río Lagartos	21°35'17.6" N	88°09'14.2" W	9
8	YUC09RLa	H	H9	H7,H8	Yucatán	Río Lagartos	21°34'55.9" N	88°09'24.5" W	12
9	YUC10RLa	H	H7	H7,H7	Yucatán	Río Lagartos	21°34'55.9" N	88°09'24.5" W	12
10	YUC11RLa	H	H7	H7,H7	Yucatán	Río Lagartos	21°34'55.9" N	88°09'24.5" W	12
11	YUC12RLa	H	H9	H7,H7	Yucatán	Río Lagartos	21°35'17.6" N	88°09'14.2" W	9
12	YUC13RLa	H	H10	H7,H7	Yucatán	Río Lagartos	21°35'17.6" N	88°09'14.2" W	9
13	YUC14RLa	Mj	H6	H1,H1	Yucatán	Río Lagartos	21°34'55.9" N	88°09'24.5" W	12
14	YUC15RLa	M	H6	H4,H4	Yucatán	Río Lagartos	21°34'55.9" N	88°09'24.5" W	12
15	YUC16RLa	M	H6	H7,H7	Yucatán	Río Lagartos	21°34'55.9" N	88°09'24.5" W	12
16	YUC17Chi	H	H6	H7,H7	Yucatán	Chicxulub	21°17'38.4" N	89°36'37.4" W	0
17	YUC18Chi	M	H8	H1,H7	Yucatán	Chicxulub	21°17'38.4" N	89°36'37.4" W	0
18	YUC19Chi	Mj	H6	H7,H8	Yucatán	Chicxulub	21°17'38.4" N	89°36'37.4" W	0
19	YUC20Chi	M	H6	H7,H8	Yucatán	Chicxulub	21°17'38.4" N	89°36'37.4" W	0
20	YUC21Chi	M	H6	H1,H1	Yucatán	Chicxulub	21°17'38.4" N	89°36'37.4" W	0
21	YUC22Chi	M	H6	H1,H1	Yucatán	Chicxulub	21°17'38.4" N	89°36'37.4" W	0
22	VER23Len	M	H4	H3,H4	Veracruz	El Lencero	19°29'0.61" N	96°49'39.8" W	910
23	VER24Len	M	H1	H5,H5	Veracruz	El Lencero	19°29'0.61" N	96°49'39.8" W	910
24	VER25Len	M	H1	H1,H6	Veracruz	El Lencero	19°29'0.61" N	96°49'39.8" W	910
25	VER26Act	M	H5	H1,H1	Veracruz	Actopan	19°33'6.0" W	96°22'41.0" W	20

Tabla 2. Código variables climáticas (19) de Worldclim, utilizadas en la reconstrucción de los modelos de nicho ecológico.

Clave	Descripción capa climática
Bio 1	Temperatura media anual
Bio 2	Rango de temperatura diurno medio (Temp. Máxima – Temp. Mínima)
Bio 3	Isotermalidad (Bio2 / Bio7) (* 100)
Bio 4	Estacionalidad de temperatura (desviación estándar * 100)
Bio 14	Precipitación del mes más seco

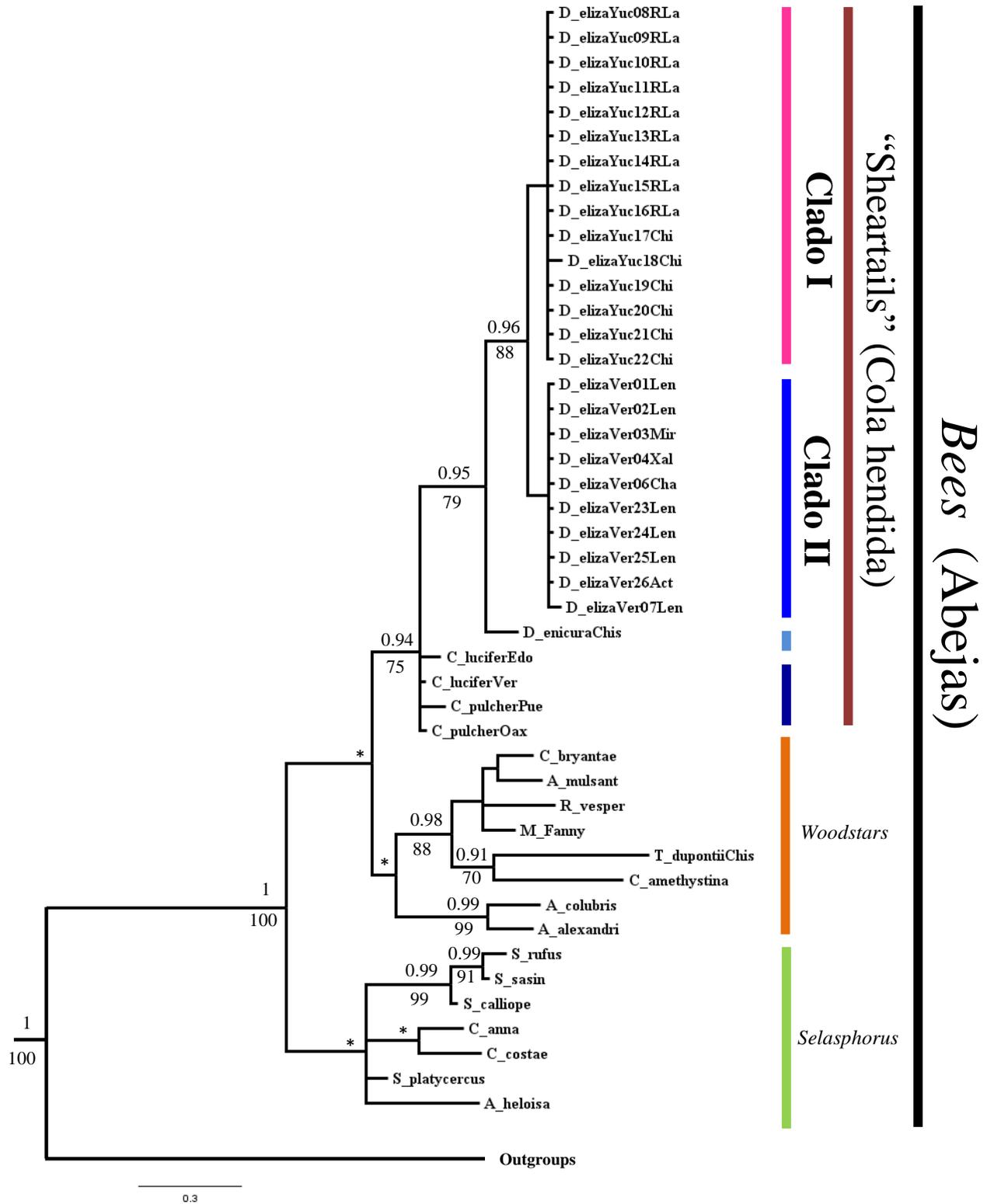


Figura 1. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, utilizando la región mitocondrial ND2. Se muestran (*arriba*) los valores de probabilidades posteriores de MrBayes y (*abajo*) los valores de bootstrap de Máxima Verosimilitud. Los valores menores a 0.70/70 se encuentran representados por un asterisco.

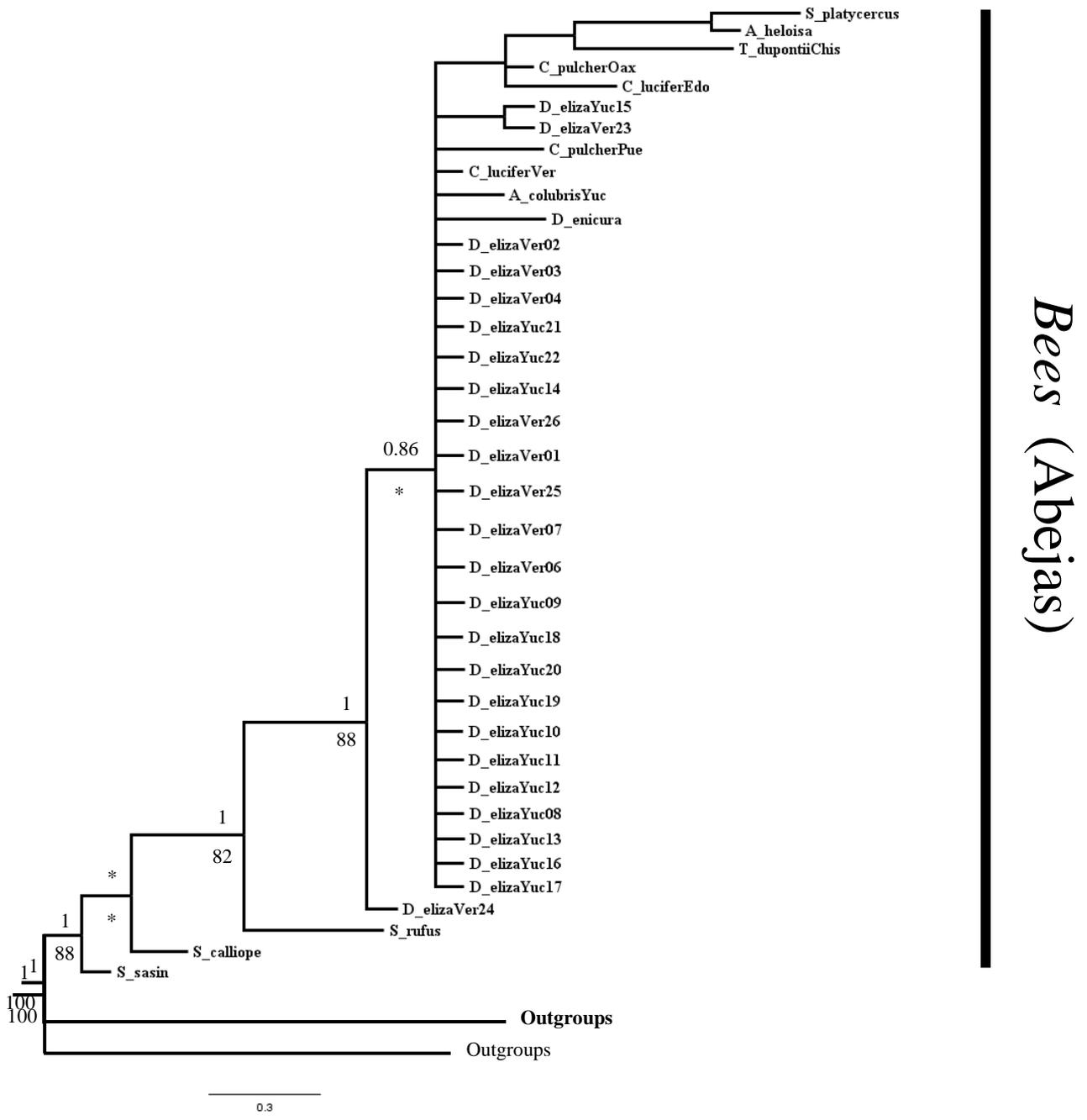


Figura 2. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud, utilizando el locus 20454. Se muestran (*arriba*) los valores de probabilidades posteriores de MrBayes y (*abajo*) los valores de bootstrap de Máxima Verosimilitud.

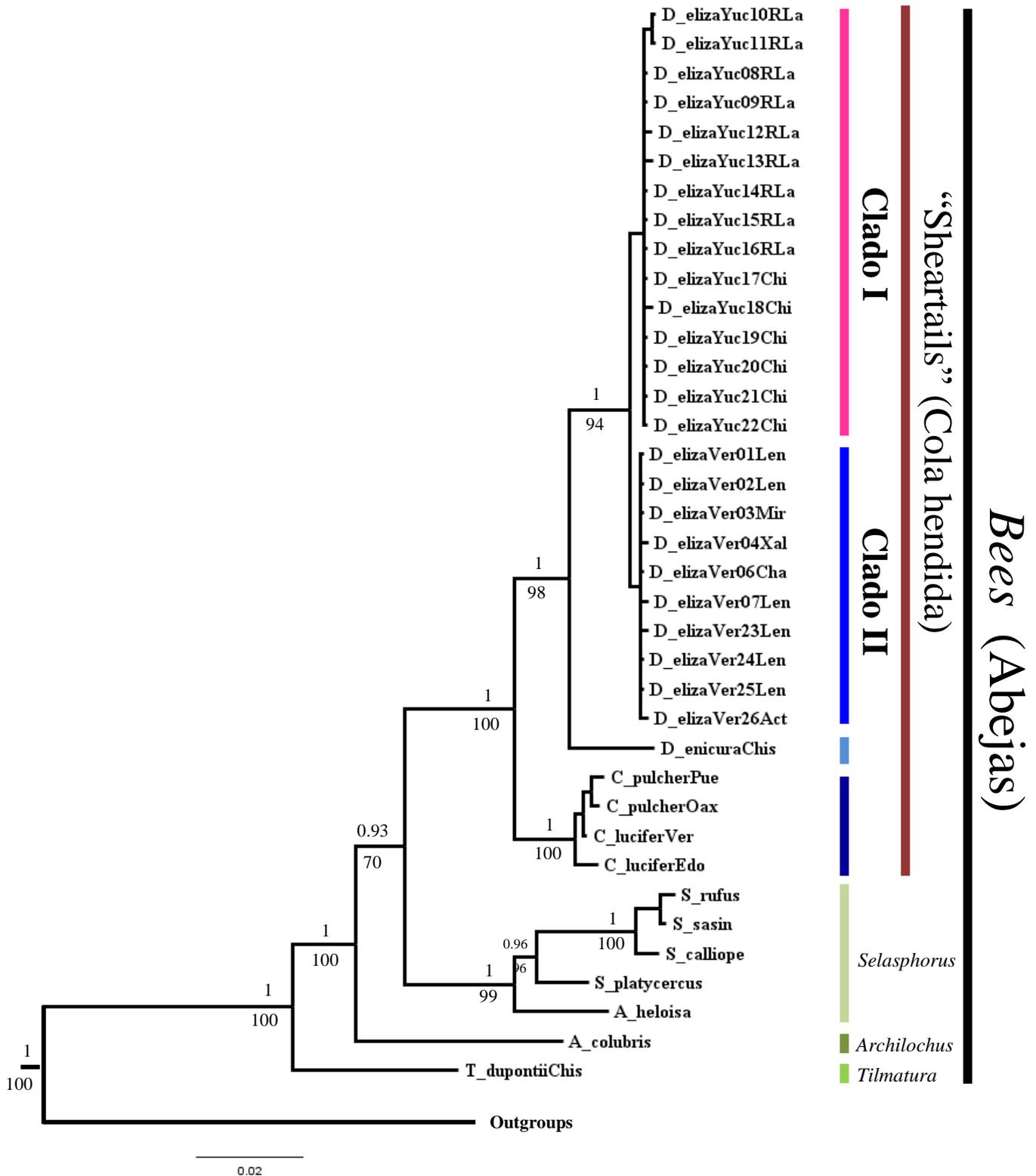


Figura 3. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud utilizando la matriz mitocondrial (ND2 y ATPasa 6,8). Se muestran (*arriba*) los valores de probabilidades posteriores de MrBayes y (*abajo*) los valores de bootstrap de Máxima Verosimilitud.

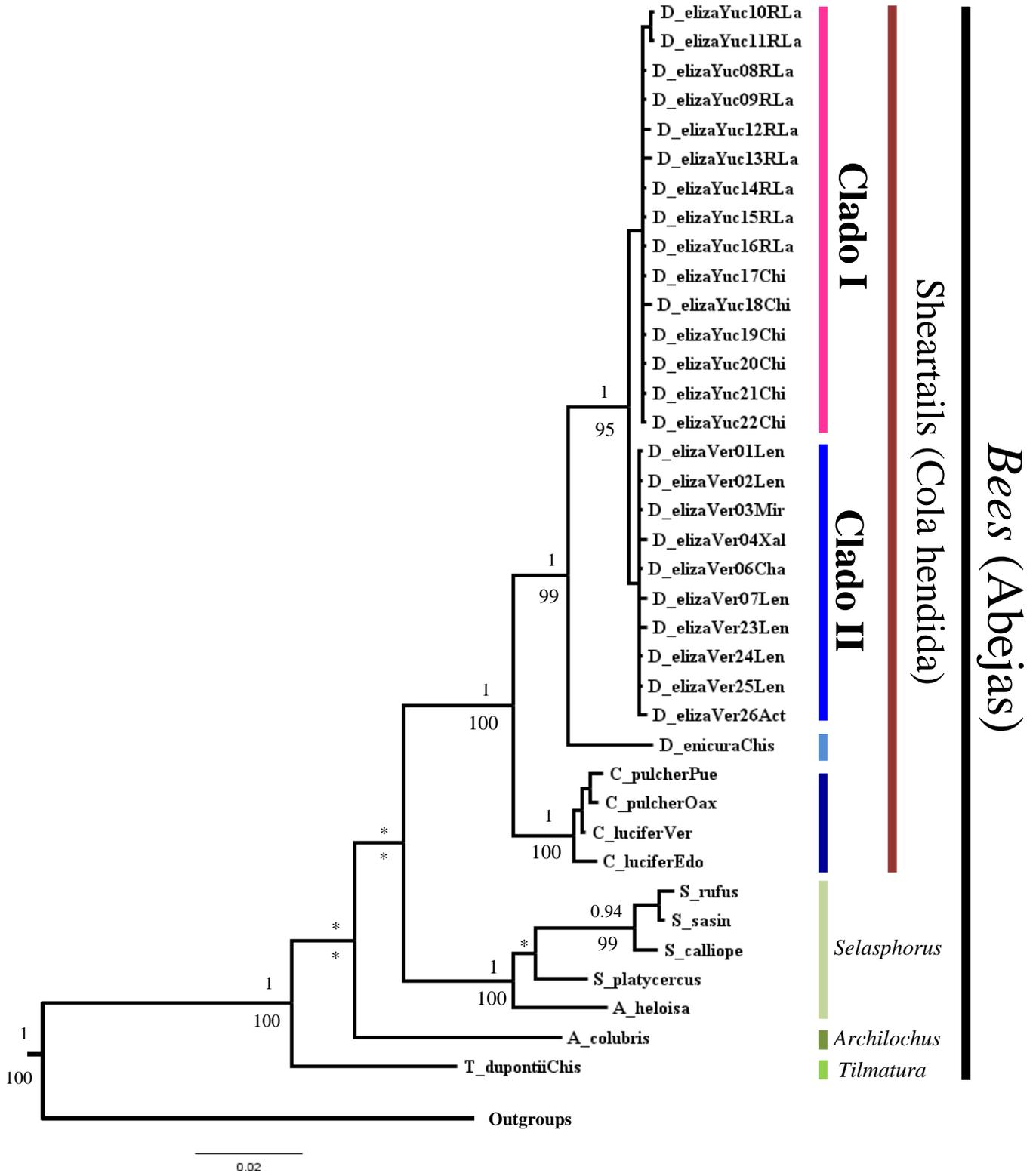


Figura 4. Relaciones filogenéticas obtenidas por inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud utilizando la matriz concatenada (mitocondria + núcleo). Se muestran (*arriba*) los valores de probabilidades posteriores de MrBayes y (*abajo*) los valores de bootstrap de Máxima Verosimilitud. Los nodos con soportes menores a 0.70/70 se encuentran representados por un asterisco.

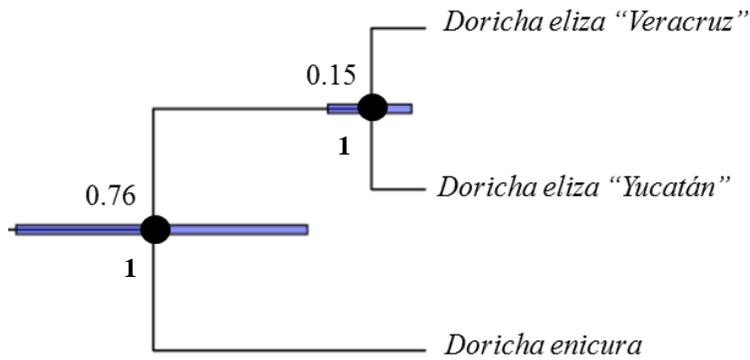


Figura 5. Árbol de especies multiloci reconstruido utilizando *BEAST. Las barras indican los HPD de los tiempos de divergencia al 95%, (*arriba*) media de las estimaciones en millones de años (*abajo*) valores de probabilidades posteriores.

Tabla 3. Resumen estimaciones tiempos de divergencia entre las poblaciones de *Doricha eliza*: árbol de genes y especies.

	TMCRA	HPD 95%
Árbol genes (mitocondria)	0.22	0.35-0.10
Árbol genes (mit + nuc)	0.70	1.22-0.24
Árbol especies (mit + nuc)	0.15	0.03-0.20

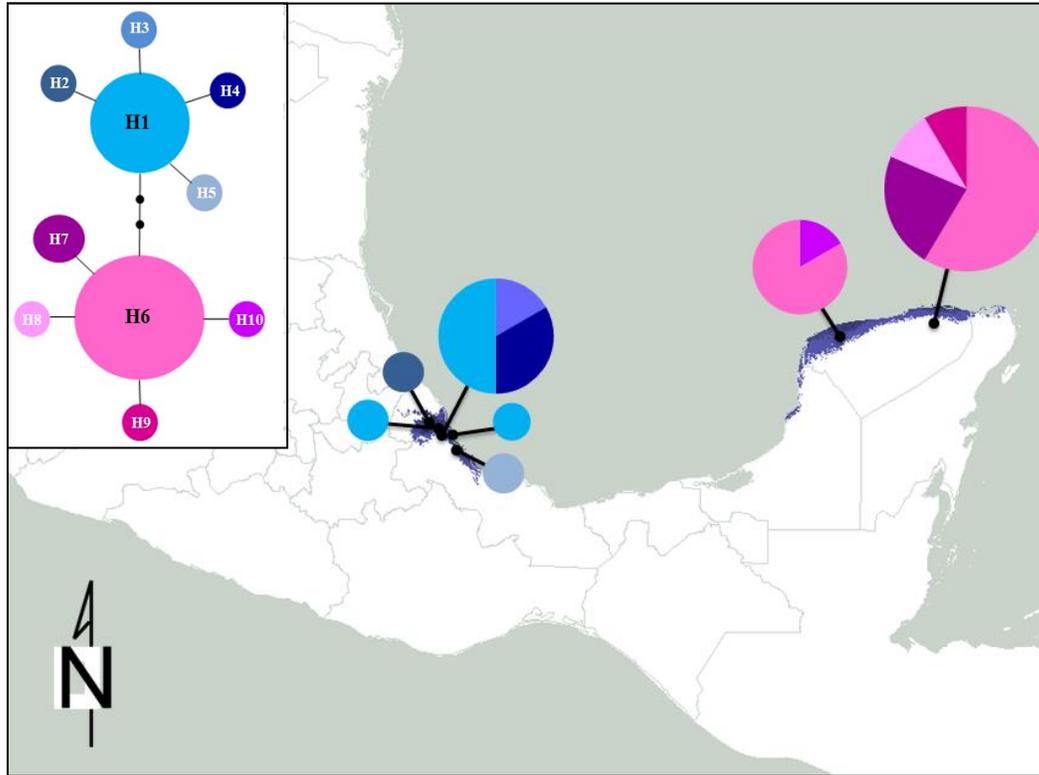


Figura 6. Distribución geográfica de los haplotipos de ADN mitocondrial (ND2+ATPasa). En el recuadro de la esquina superior izquierda se muestra la red de haplotipos de parsimonia estadística. En el mapa, los círculos representan los haplotipos encontrados en las poblaciones de Veracruz (*tonos azules*) y los de Yucatán (*tonos rosa*). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos, los puntos negros representan haplotipos no muestreados y las líneas son cambios mutacionales entre haplotipos.

Tabla 4. Distancias genéticas (D_{xy}) entre especies de los géneros *Doricha* y *Calothorax*, basadas en una secuencia de 1077 pb de ADN mitocondrial.

<i>X</i>	<i>Y</i>	D_{xy}	%
<i>Veracruz</i>	<i>Yucatán</i>	0.0035	0.35
<i>Veracruz</i>	<i>D. enicura</i>	0.0262	2.62
<i>Veracruz</i>	<i>C. lucifer</i>	0.0343	3.43
<i>Veracruz</i>	<i>C. pulcher</i>	0.0347	3.47
<i>Yucatán</i>	<i>D. enicura</i>	0.0272	2.72
<i>Yucatán</i>	<i>C. lucifer</i>	0.0333	3.33
<i>Yucatán</i>	<i>C. pulcher</i>	0.0337	3.37
<i>D. enicura</i>	<i>C. lucifer</i>	0.0348	3.48
<i>D. enicura</i>	<i>C. pulcher</i>	0.0362	3.62
<i>C. lucifer</i>	<i>C. pulcher</i>	0.0046	0.46

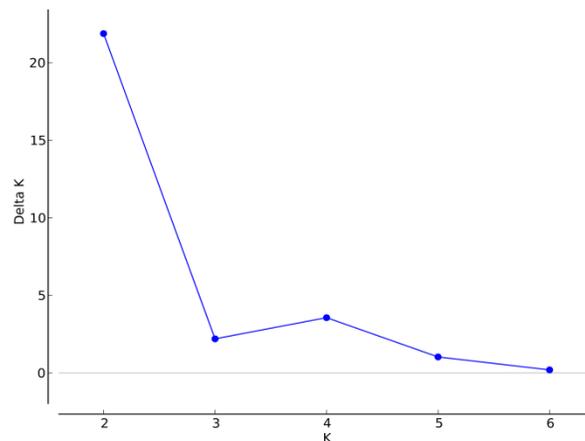
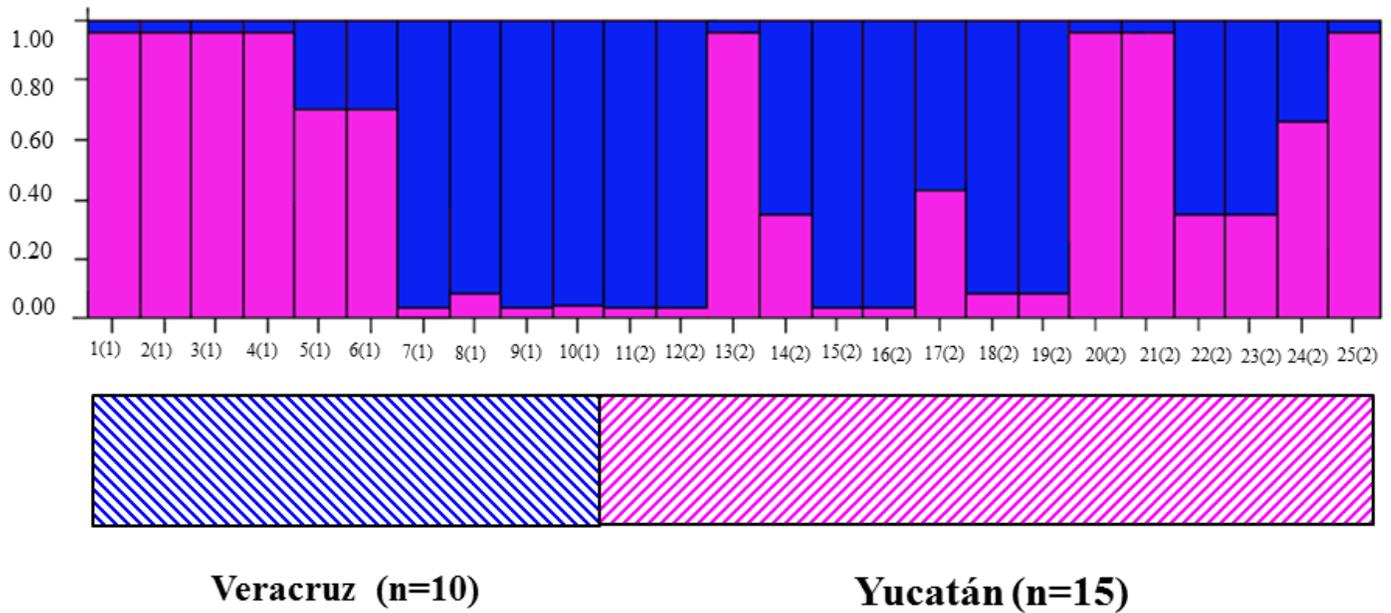


Figura 7. Estructura genética espacial determinada por el método de asignación Bayesiana en STRUCTURE del locus nuclear 20454. A) Asignación de probabilidades posteriores de 25 individuos de *Doricha eliza* en un número óptimo de $K=2$. Cada individuo es representado por una línea vertical dividida en secciones de color, cuya longitud es proporcional a la probabilidad de pertenencia estimada para cada grupo, los número en la parte inferior representa el número de individuo y el número dentro del paréntesis la población 1=Veracruz, 2=Yucatán. B) Valores de ΔK para cada K ($K=1$ a $K=7$) calculados de acuerdo con Evanno *et al.*, 2005 (eje de las X).

Tabla 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) entre las poblaciones de Veracruz y Yucatán de *Doricha eliza*, utilizando los marcadores mitocondriales.

Fuente de variación	d.f.	SC	Componente de variación	% Fuente variación	Índice de Fijación
Entre grupos	1	18.47	1.51027	81.02	
Dentro grupos	23	8.14	0.35391	18.98	$F_{ST}= 0.810^{***}$
Total	24				

*** $P < 0.001$

Tabla 6. Variación genética y análisis demográficos para inferir la expansión demográfica en los grupos genéticos de *Doricha eliza*. De derecha a izquierda, se muestran el número de individuos (n), el número de haplotipos por población (H), la diversidad haplotídica (h) y la diversidad nucleotídica (π), incluyendo la D de Tajima, F_s de Fu y las diferencias en la suma de cuadrados (SSD) o distribución mismatch.

Población	N	H	h	π	D	F_s	SSD
Veracruz	10	5	0.666 ± 0.163	0.0007 ± 0.0006	-1.6670^*	-2.8472^{***}	0.0311^*
Yucatán	15	5	0.561 ± 0.143	0.0006 ± 0.005	-1.5181^*	-2.6765^{***}	0.0170^*
Ambas	25	10	0.796 ± 0.064	0.0020 ± 0.0013	-0.8057	-3.260^{**}	0.0337^*

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

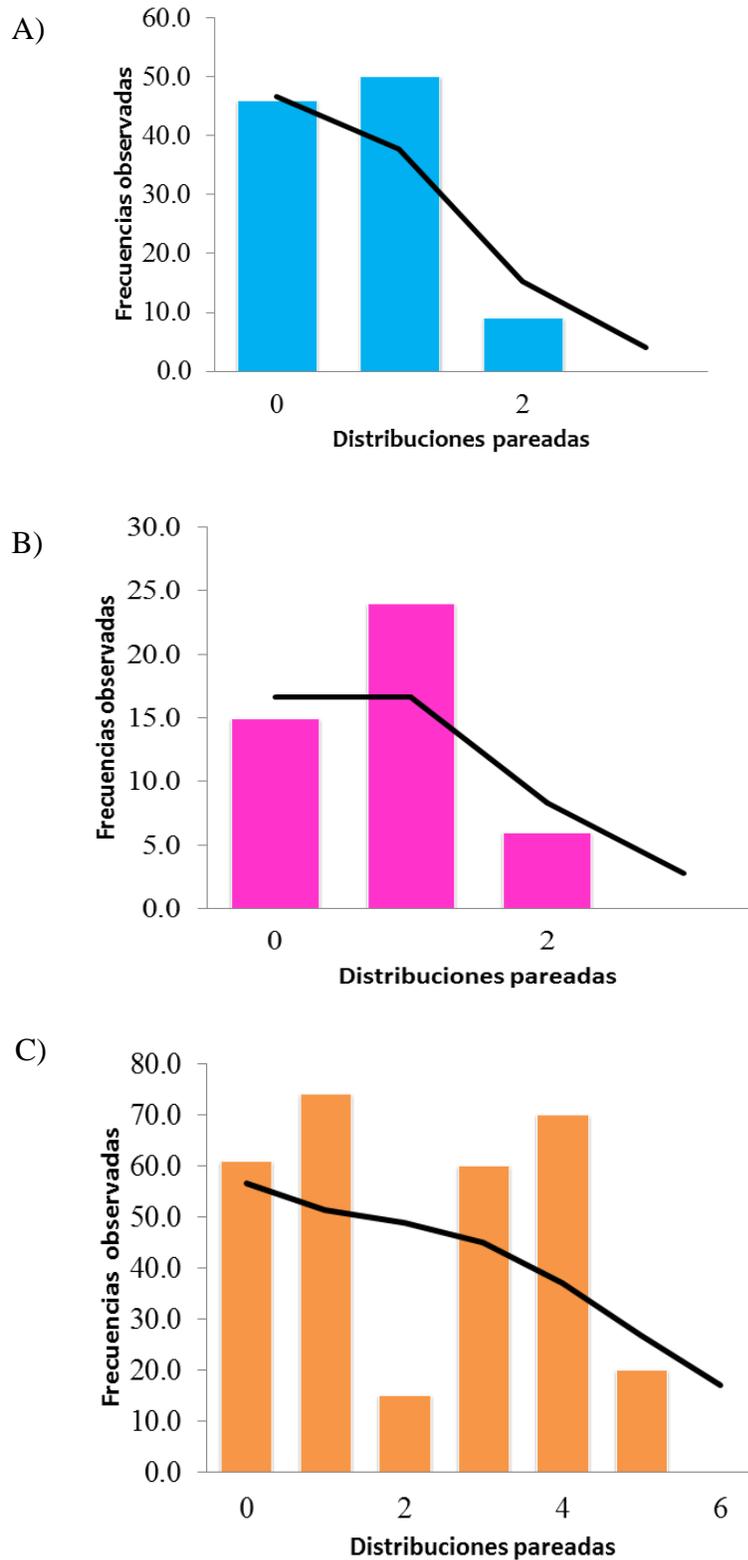


Figura 8. Distribuciones mismatch. A) Veracruz, B) Yucatán, C) Ambas poblaciones. El histograma representa las frecuencias observadas y la línea negra, las frecuencias esperadas bajo un modelo de expansión.

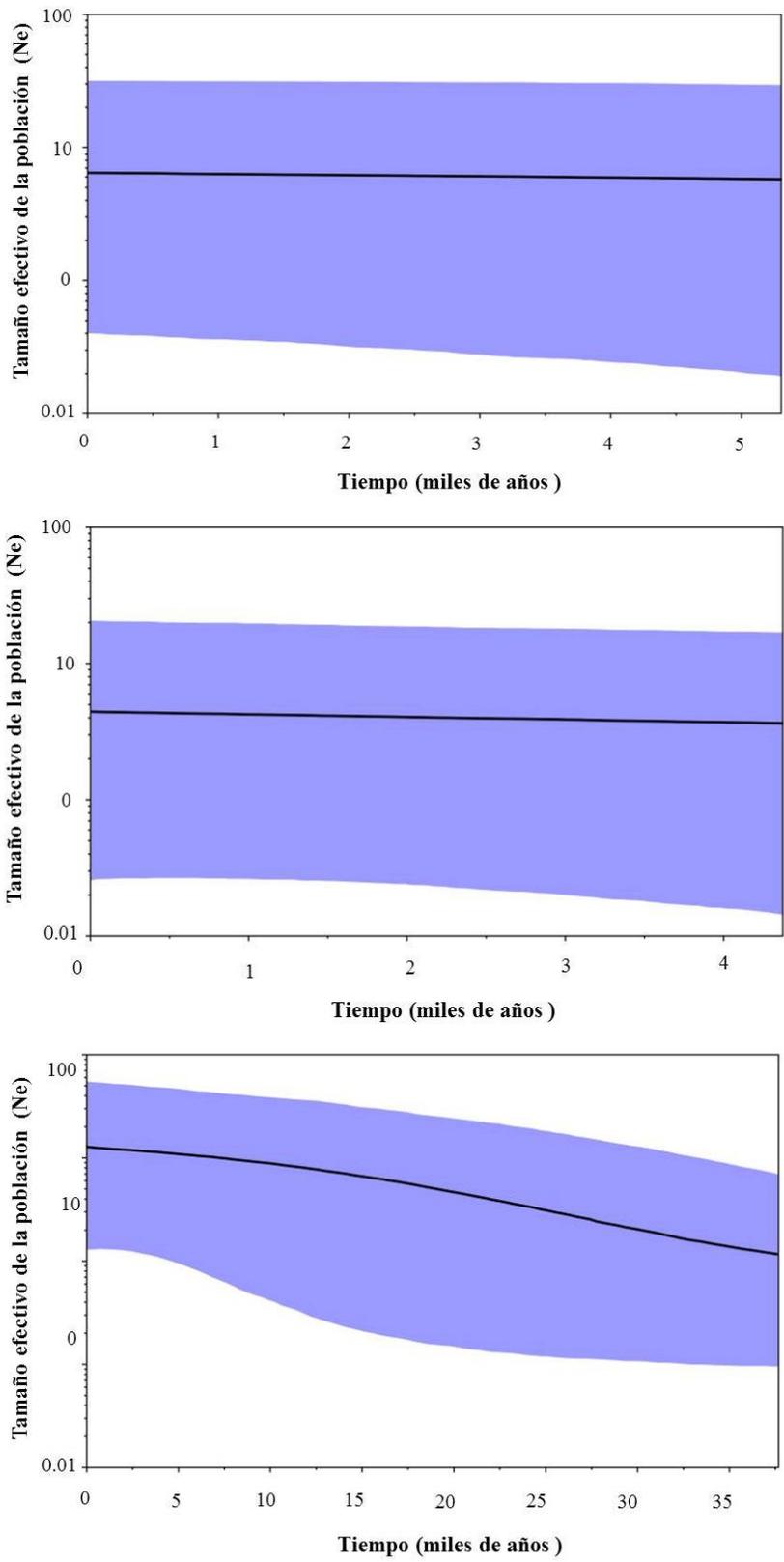


Figura 9. Bayesian skyline plots a) Veracruz, b) Yucatán, c) Ambos grupos genéticos. La línea negra representa la media estimada y el fondo azul los intervalos de confianza al 95%.

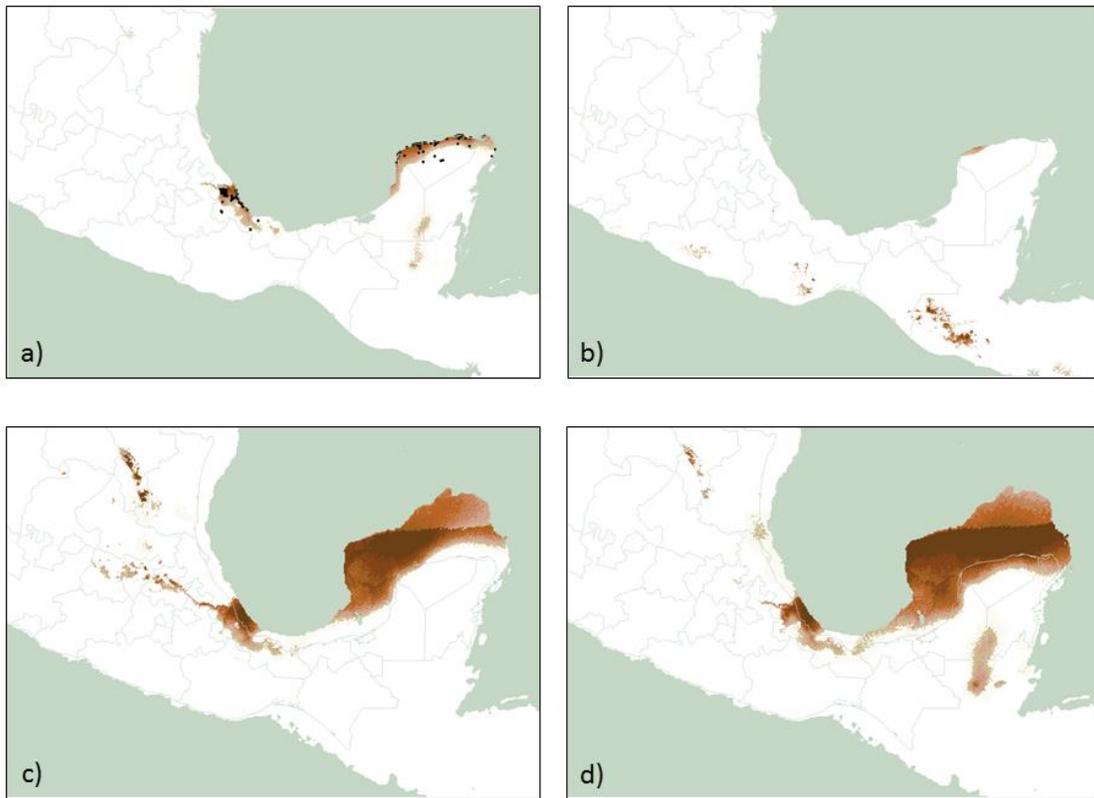


Figura 10. Modelos de nicho ecológico. a) Condiciones actuales, los puntos negros representan a las localidades donde se ha registrado a *Doricha eliza* en Veracruz y Yucatán, b) Predicción Último Interglaciario, c) Predicción Último Glaciario Máximo (CCSM), d) Predicción Último Glaciario Máximo (MIROC).

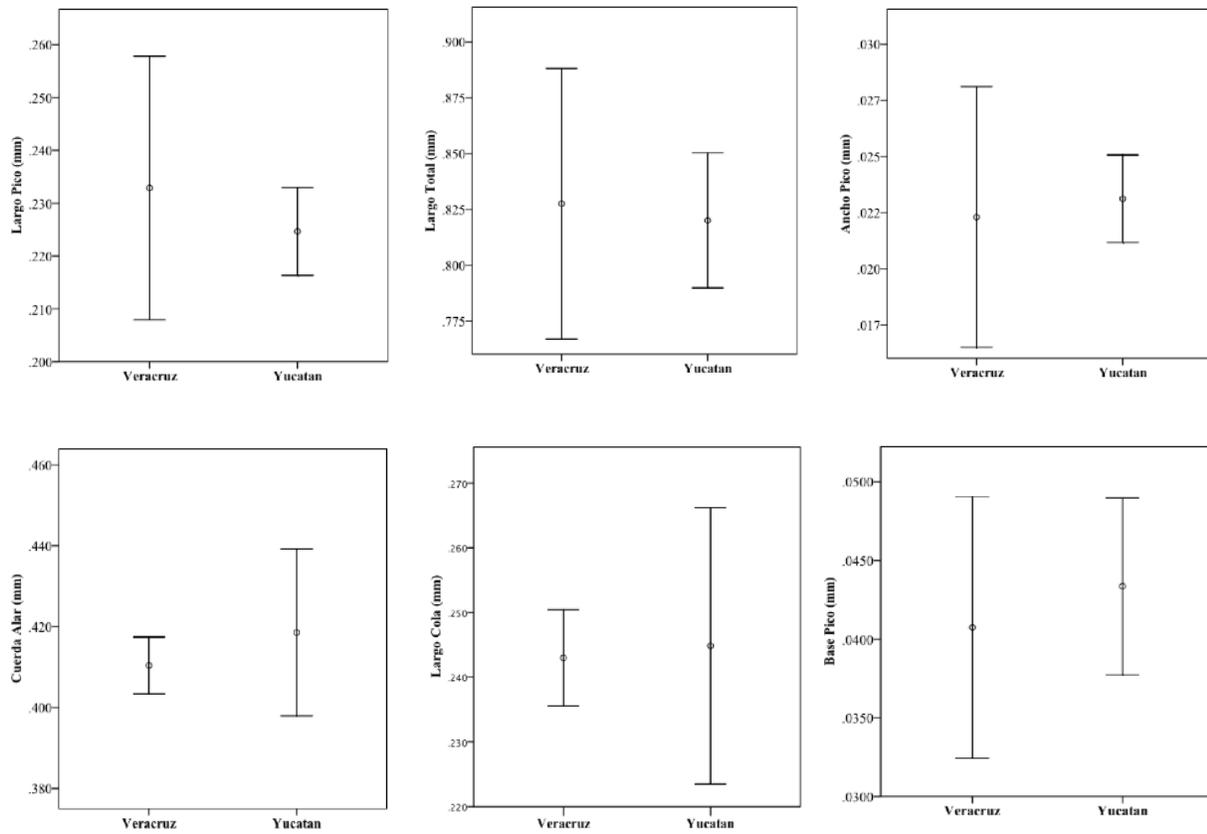


Figura 11. Gráficas comparación medidas morfológicas en hembras de ambos grupos de *Doricha eliza*. Las barras corresponden al intervalo de confianza al 95%.

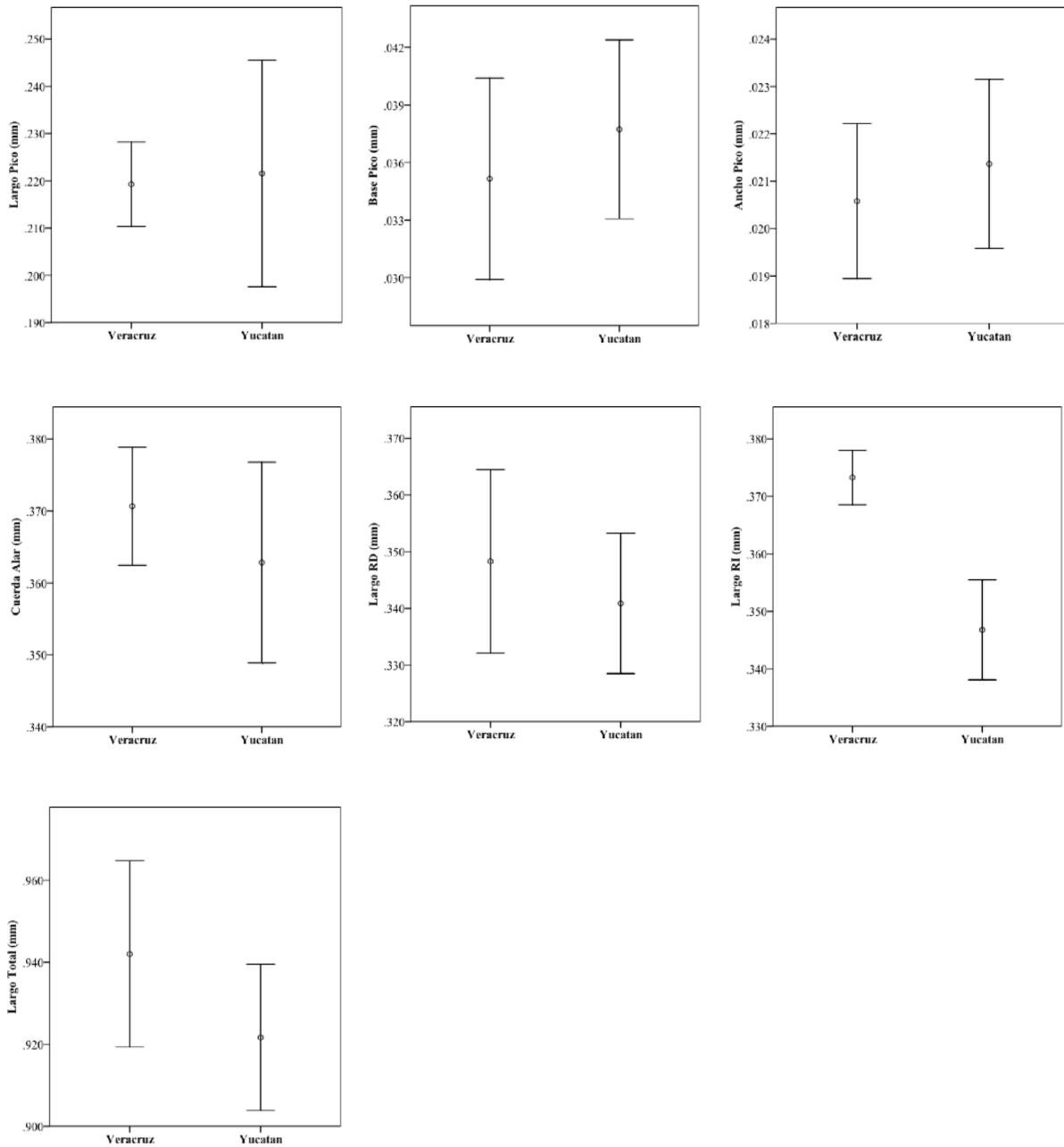


Figura 12. Gráficas comparación medidas morfológicas en machos de ambos grupos genéticos en *Doricha eliza*. Las barras corresponden al intervalo de confianza al 95%.

LITERATURA CITADA

- Avise JC, Walker D. 1998. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proc R Soc Lond B*, 265:457-463.
- Avise JC. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.
- Backström N, Fagerberg S y Ellegren H. 2008. Genomics of natural bird population: a gene based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Molecular Ecology*, 17:964-980.
- Barber BR, Klicka J, 2010. Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences*, 277: 2675–2681.
- Barnosky AD. 2005. Effects of quaternary climatic change on speciation in mammals. *Journal of Mammalian Evolution*, 12: 247-264.
- Barrera-Guzmán AO, Milá B., Sánchez-González LA, Navarro-Sigüenza AG. 2012. Speciation in an avian complex endemic to the mountains of Middle America (*Ergaticus*, Aves: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62: 907-920.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. Gen Bank. 2005. *Nucleic Acids. Res*, 33, D34-D38.
- Bonaccorso E, Peterson A. 2007. A multilocus phylogeny of the New World jay genera. *Mol Phylo Evol*, 42:467-476.
- Braconnot P, Otto-Bliesner B, Harrison S, Joussaume S, Peterchmitt JY, Abe-Ouchi A, Crucifix M, Driesschaert E, Fichefet Th, Hewitt CD, Kageyama M, Kitoh A, Loutre MF, Marti O, Merkel U, Ramstein G, Valdes P, Weber L, Yu Y, and Zhao Y. 2007. Results of PMIP2

- coupled simulations of the Mid-Holocene and Last Glacial Maximum – Part 2: feedbacks with emphasis on the location of the ITCZ and mid- and high latitudes heat budget, *Clim Past*, 3: 279–296. <http://www.clim-past.net/3/279/2007/>.
- Bryson RV, García-Vázquez UO, Riddle BR. 2011. Phylogeography of Middle American gophersnakes: mixed responses to biogeographical barriers across the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, 38:1570-1584.
- Carstens BC, Knowles LL. 2007. Estimating species phylogeny from gene-tree probabilities despite incomplete lineage sorting: an example from *Melanoplus* grasshoppers. *Syst Biol*, 56:400-411.
- Cicero C, Johnson NK. 1992. Genetic Differentiation between Populations of Hutton's Vireo (Aves: Vireonidae) in Disjunct Allopatry. 1992. *The Southwestern Naturalist*, 37 (4): 344-348.
- Clark CJ, Elias OD, Prum RO. 2011. Aeroelastic Flutter Produces Hummingbird Feather Songs. *Science*, 333:1430-1433.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: a computer program to estimate genealogies. *Molecular Ecology*, 9:1657-1659.
- Coyne A y Orr HA. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates Sunderland, MA, 545 pp.
- Cracraft J, Prum OR. 1988. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. *Evolution*, 42(3): 603-620.
- del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J. 1999. Handbook of the World. Vol 5. Barn-owls to Hummingbird. Lynx Editions, Barcelona.
- Díaz-Valenzuela R, Lara-Rodríguez N, Ortíz-Pulido R, González-García F. y Ramírez-Bautista A. 2011. Some aspects of the reproductive biology of the mexican sheartail (*Doricha eliza*) in central Veracruz. *The Condor*, 113(1):177-182.

- Drummond, AJ, Rambaut A. 2007. "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7:214.
- Earl DA, vonHoldt BM. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implanting the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4:359-361.
- Eberhard JR y Bermingham E. 2004. Phylogeny and biogeography of the *Amazona ochrocephala* (Aves: Psittacidae) complex. *Auk*, 121:318-332.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14:2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S: Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. 2005. *Evol Bioinform*, 1:47-50.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567–1587.
- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2007. Inference of population structure using multilocus data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574–578.
- Felsenstein, J. 2004. Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.
- Freelang JR, Boag PT. 1999. The mitochondrial and nuclear genetic homogeneity of the phenotypically diverse Darwin's ground finches. *Evolution*, 53(5):1553-1563.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147:915-925.
- Gavrilets S. 2003. Perspective: Models of speciation: What have learned in 40 years? *Evolution*, 57(10): 2197-2215.
- González C, Ornelas JF, Gutiérrez-Rodríguez C. 2011. Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the

- wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *Evolutionary Biology*, 11 (38): 1471-2148.
- González-Medrano F. 1996. Algunos aspectos de la evolución de la vegetación de México, *Bol Soc Bot*, 58: 129-136.
- Graham MR, Jaeger JR, Prendini L, Riddle BR. 2013. Phylogeography of the Arizona hairy scorpion (*Hadrurus arizonensis*) supports a model of biotic assembly in the Mojave Desert and adds a new Pleistocene refugium. *J Biogeogr*, 1-15.
- Hasumi H, Emori S. 2004. K-1 coupled GCM (MIROC) description, K-1 Tech. Rep. 1, *Clim Syst Res*, Kashiwa, Japan.
- Heled J y Drummond A. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol Biol Evol*, 27:570-580.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones, PG, Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol*, 25:1965-1978.
- Hillis DM, Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. *Syst Biol*, 42: 182-192.
- Ho WYS, Shapiro B. 2011. Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11:423-434.
- Hoskin, CJ, Higgie M, McDonald KR, Moritz C. 2005. Reinforcement drives rapid allopatric speciation. *Nature*, 437(27): 1353-1356.
- Howell, S. N. G. y Webb S. 1995. A guide to birds of Mexico and northern Central America. Oxford University Press, Oxford, UK. 851 pp.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology*, 9: 1322–1332.

- Huelsenbeck JP, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. 2001. *Bioinformatics*, 17:754-755.
- Johnsgard PA. 1997. The hummingbirds of North America. Smithsonian Institution Press.
- Johnson NK, Cicero K. 2004. New mitochondrial dna data affirm the importance of Pleistocene speciation in north american birds. *Evolution*, 58(5):1122-1130
- Kirkpatrick M y Barton NH. 1997. Evolution of a Species' Range. 1997. *The American Naturalist*, 150: 1-23.
- Lanteri AA, Confalonieri VA. 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Llorente Bousquets J., Morrone JJ. (Eds). Introducción a la Biogeografía en Latinoamérica: Conceptos, teorías, métodos y aplicaciones. Vol II, Facultad de Ciencias, UNAM, México, pp 185–193.
- Lerner RLH, Meyer M, James HF, Hofreiter M, Fleischer RC. 2011. Multilocus resolution and timescale in the Extant Adaptive Radiation of Hawaiian Honeycreepers. *Current Biology*, 21: 1838-1844.
- Masta SE, Maddison WP. 2002. Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *PNAS*, 99(7):4444-4447.
- Mayr E. 1942. Systematics and the Origin of Species. New York. Columbia University Press.
- McCormack JE, Heled J, Delaney KS, Peterson AT, Knowles LL. 2010. Calibrating divergence times on species tree versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma* Jays. *Evolution*, 65(1): 184-202.
- McGuire JA, Witt CC, Altshuler DL, Remsen Jr JC. 2007. Phylogenetic Systematics and Biogeography of Hummingbirds: Bayesian and Maximum Likelihood Analyses of Partitioned Data and Selection of an Appropriate Partitioning Strategy. 2007. *Syst Biol*, 56(5): 837-856.

- Milá B, Smith BT, Wayne KR. 2007. Speciation and rapid phenotypic differentiation in the yellow-rumped warbler *Dendroica coronata* complex. *Molecular Ecology*, 16, 159-173.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, Pp. 1 - 8.
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Nat Acad Sci, USA* 76, 5269–5273.
- Ornelas JF, González C, Espinosa de los Monteros A, Rodríguez-Gómez F, García-Feria, LM. 2013. In and out of Mesoamerica: temporal divergence of *Amazilia* hummingbirds pre-dates the orthodox account of the completion of the Isthmus of Panama. *J Biogeogr*, 41:168-181.
- Ortíz-Pulido R, Townsend PA, Robbins MB, Díaz R, Navarro-Sigüenza A y Escalona-Segura G. 2002. The Mexican Sheartail (*Doricha eliza*): morphology, behavior, distribution, and endangered status. *Willson Bull*, 114(2): 153-160.
- Panhuis TM, Butlin R, y Tregenza T. 2001. Sexual selection and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 364-371.
- Pennington RT, Prado DA, Pendry C. 2000 Neotropical seasonally dry forests and Pleistocene vegetation changes. *J Biogeogr*, 27, 261–273.
- Perfectti F. 2002. Especiación: modos y mecanismos. Pp. 307-321. En: Soler M (Ed). *Evolución, la base de la biología*,. Proyecto Sur de Ediciones, S.L., Madrid.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2005. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190:231-259.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol*, 25: 1253-1256.

- Prado DE y Gibbs PE. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forests of South America. *Ann Missouri Bot Gard*, 80: 902-927.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Pyron AR y Burbrink FT. 2010. Hard and soft allopatry: physically and ecologically mediated modes of geographic speciation. *J Biogeography*, 37: 2005-2015.
- Rambaut A, Drummond AJ. 2007. Tracer v1.4. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rambaut A. 2002. Se-Align Sequence Alignment Editor, v2.0a11. *Oxford*: Department of Zoology, University of Oxford.294X.2002.01637.x.
- Rambaut A. 2006. FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rebernick CA, Schneeweiss GM, Bardy KE, Schönswetter P, Villaseñor JL, OberMayer R, Stuessy TF, Weiss-Schneeweiss H. 2010. Multiple Pleistocene refugia and Holocene range expansion of an abundant southwestern American desert plant species (*Melampodium leucanthum*, Asteracea). *Molecular Ecology*, 19: 3421-3443.
- reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, 68:978-989.
- Riddle BR, Hafner DJ, Alexander LF. 2000. Phylogeography and Systematics of the *Peromyscus eremicus* species group and the historical biogeography of North American Warm Regional Deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17: 145-160.
- Ridgway R, y Friedmann H. 1919. The birds of North and Middle America: a descriptive catalogue of the higher groups, genera, species, and subspecies of birds known to occur in North America, from the Arctic lands to the Isthmus of Panama, the West Indies and other islands of the Caribbean sea, and the Galapagos Archipelago. Vol. 50, No. 8. Govt. Print. Off.

- Rull V. 1998. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology*, 17:2722-2729
- Slatkin M, Hudson RR. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555-562.
- Smith BT, Escalante P, Hernández-Baños BE, Navarro-Singüenza AG, Rohwer S, 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(136): 1471-2148.
- Smith BT, Klicka J. 2010. The profound influence of the Late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of New World birds. *Ecography*, 33:333-342.
- Sorenson MD, Ast JC, Dimcheff DE, Yuri T, Mindell DP (1999) Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol Phylogenet Evol* 12: 105–114.
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22:2268-2690.
- Stephens M, Smith N, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype
- Tajima F. 1989. Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.
- Webb IT, Bartlein P.1992. Global changes during the last 3 million years: climatic controls and biotic responses. *Annu Rev Ecol Syst*, 23: 141-173.
- Weir JT, Schluter D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*, 17:2321-2328.
- Weir JT.2006. Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland neotropical birds. *Evolution*, 60(4): 842-855.

Wiens JJ. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species. *Evolution*, 58: 193-197.

Zink RM, Klicka J. 2006. The tempo of avian diversification: a comment on Johnson and Cicero. *Evolution*, 60:411-412.