



*DIVERGENCIA GENÉTICA Y MORFOLÓGICA ENTRE POBLACIONES
MIGRATORIAS Y SEDENTARIAS DE *Selasphorus platycercus* (AVES:
Trochilidae)*

TESIS QUE PRESENTA **ANDREIA MALPICA TOPETE**
PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS

Xalapa, Veracruz, México (2012)



Aprobación final del documento final de tesis de grado:

Divergencia genética y morfológica entre poblaciones migratorias y sedentarias de *Selasphorus platycercus* (AVES: Trochilidae).

	Nombre	Firma
Director	Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez	_____
Comité Tutorial	Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros Solís	_____
	Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga	_____
Jurado	Dr. Diego Santiago Alarcón	_____
	Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza	_____

Reconocimientos

Esta tesis fue posible realizarla gracias al financiamiento de diversas fuentes e instituciones. Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada (371634). Al Instituto de Ecología A.C. por el apoyo de fondos fiscales (20030/10563) de la Red de Biología Evolutiva. La ayuda y financiamiento de las siguientes personas fueron fundamentales para lograr todas las colectas por lo cual quiero agradecerles: A la Dra. Susan Wethington coordinadora del Hummingbird Monitoring Network por la ayuda en las colectas de Arizona. A Fred Engelman del parque nacional Rocky Mountains por las colectas en Colorado. A la Dra. Coro Arizmendi por las colectas de Sinaloa. A los Drs. Ricardo Canales y John Klicka por los tejidos de Nuevo León y Coahuila. Al M.C. Alfonso Langle por las colectas en Jalisco. Al Dr. Carlos Lara por las colectas en Tlaxcala.

Un especial y sincero agradecimiento al Dr. Juan Francisco Ornelas por haberme dado la oportunidad y aceptarme como su estudiante. Por brindarme todas las facilidades para el desarrollo de mi tesis, así como por haberme guiado, apoyado e instruido a lo largo del proceso y además por compartir su experiencia con los colibríes conmigo, muchas gracias!

A los miembros de mi comité tutorial y jurado de tesis, los doctores Alejandro Espinosa de los Monteros, María del Coro Arizmendi, Diego Santiago Alarcón y Adolfo Navarro Sigüenza por todos los comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo. Agradezco también a la Dra. Clementina González también por haber revisado el manuscrito y revisar los análisis de los microsatélites. Al Dr. Ornelas, la M.C. Flor Rodríguez, Dr. Luis García, Dr. Eduardo Ruíz y M.C. Denisse Maldonado Sánchez por la ayuda que me brindaron en el laboratorio y en el análisis de los datos, muchas gracias!. A la M.C. Cristina Bárcenas Pazos por el trabajo en la secuenciación de muestras.

Agradezco a una lista grande de personas que me ayudaron en campo: Ricardo Ramírez, Alfonso Langle e integrantes de la MoSI Neva, Dr. Ornelas, Dr. Carlos Lara, Vanessa Martínez, María José Pérez, Eduardo Ruíz, Flor Rodríguez, Luz Zamudio, Rocío Meneses, Lee Rogers, Rafael Bibriesca, Gabriel López, José Alfredo, Denisse Maldonado, Gerardo Ham y Luis García.

A mis amigos y compañeros del Inecol por acompañarme a lo largo de este proceso, por brindarme su amistad, darme ánimos y apoyarme: Sarita, Denisse, Erandi, Armando, Rosa, Yuyini, Flor, Toño y Gerardo.

Finalmente a los grandes actores de este trabajo, todos los *Selasphorus platycercus* que donaron plumas al proyecto y me llevaron a conocer lugares increíbles.

Dedicatoria

Por dejarme compartir la vida con él, con todo mi amor y admiración

A mi esposo

Al pilar de mi vida que con amor y paciencia siempre me apoya,

A mi madre

Por creer en mi y darme ánimos de seguir adelante,

A mi padre y mi hermano

A la vida

DECLARACIÓN

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por Andreia Malpica Topete como estudiante de la carrera de Maestría en Ciencias entre septiembre de 2010 y agosto del 2012, 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: Andreia Malpica Topete

Director de tesis: Dr. J. Francisco Ornelas Rodríguez

ÍNDICE

Resumen	10
Introducción	11
Materiales y métodos	15
Especie de estudio	15
Trabajo de campo	16
Trabajo de laboratorio	19
Variación morfológica	19
ADN mitocondrial	20
Extracción, amplificación y secuenciación de ADN	20
Variación y diferenciación genética	21
Relaciones entre haplotipos	22
Pruebas de expansión demográfica	23
Estimaciones de flujo génico histórico	24
Tiempo al ancestro común mas reciente (TMCRA)	25
Microsatélites	26
Amplificación y genotipificación de microsatélites	26
Variación genética y equilibrio Hardy-Weinberg	27
Estructura genética poblacional y flujo génico contemporáneo	27
Cambios demográficos en el tamaño de la población	28
Resultados	29
Variación morfológica	29
ADN mitocondrial	32
Variación y diferenciación genética	32
Relaciones entre haplotipos	36
Pruebas de expansión demográfica	38
Estimaciones de flujo genético histórico	40
Tiempo al ancestro común mas reciente (TMRCA)	42
Microsatélites	43
Variación genética y equilibrio de Hardy-Weinberg	43
Estructura genética poblacional y flujo génico contemporáneo	44

Cambios demográficos en el tamaño de la población	48
Discusión	49
Diferenciación genética entre poblaciones migratorias y sedentarias.....	49
El efecto del Pleistoceno en la distribución de <i>Selasphorus platycercus</i>	52
Diferenciación morfológica entre poblaciones migratorias y sedentarias	56
Conclusiones	58
Literatura citada	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localidades de colecta de <i>Selasphorus platycercus</i>	18
Figura 2. Medidas morfológicas colectadas: A) largo de la cola, B) culmen expuesto, C) peso, D) cuerda alar	19
Figura 3. Evaluación de la dispersión de los componentes PC1 (tamaño) y PC2 (peso).....	30
Figura 4. Resultado del análisis de varianza múltiple (MANOVA) para las cuatro medias morfológicas colectadas para <i>Selasphorus platycercus</i>	31
Figura 5. Filograma consenso de inferencia Bayesiana para <i>S. platycercus</i>	37
Figura 6. Red de haplotipos median-joining para <i>Selasphorus platycercus</i>	38
Figura 7. Distribuciones mismatch por grupo M-1 & M-2, S-1 _N , S-1 _C , S-2.....	40
Figura 8. Árbol de estimación de tiempos de divergencia utilizando el gen ND2.....	43
Figura 9. A) Árbol UPGMA basado en distancias F_{ST} para los cuatro grupos, B) Análisis de Coordenadas Principales (PCA) para los microsatélites	46
Figura 10. Asignación de individuos de <i>Selasphorus platycercus</i> a grupos genéticos (K) mediante el método de asignación Bayesiana en STRUCTURE.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades, grupos, latitud, longitud y altitud de individuos de <i>Selasphorus platycercus</i> colectados.....	18
Tabla 2. Número de individuos analizados para el ADNmt (n), número de haplotipos por localidad (H), número de sitios segregantes (S), diversidad genética (h) y diversidad nucleotídica (π).....	32
Tabla 3. Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVA).....	34
Tabla 4. Valores de F_{ST} pareadas para todas las localidades de colecta basados en ADNmt (debajo de la diagonal) y microsatélites (arriba de la diagonal)	35
Tabla 5. Pruebas de neutralidad y expansión demográfica.	39
Tabla 6. Número de inmigrantes (Nm) por generación entre grupos de <i>Selasphorus platycercus</i> estimados para la mitocondria	41
Tabla 7. Número de individuos analizados para los microsatélites (NSSR), número promedio de alelos por locus (PA/locus), riqueza alélica (RA), Número de alelos privados (AP), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He).....	45
Tabla 8. Valores de F_{ST} pareadas entre grupos basados en ADNmt (debajo de la diagonal) y microsatélites (arriba de la diagonal)	45

Tabla 9. Número de inmigrantes (Nm) por generación entre grupos de <i>Selasphorus platycercus</i> estimados para los microsatélites.....	48
Tabla 10. Pruebas de cuello de botella y expansión poblacional calculadas para microsatélites	49

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Localidad y lista de haplotipos por localidad, la frecuencia de cada haplotipo está dentro del paréntesis.....	68
---	----

Resumen

El proceso de variación genética subespecífica en linajes migratorios no ha sido extensivamente estudiado, aunado a esto, los modelos de especiación tradicionales no abordan adecuadamente como ocurren los procesos de especiación en los linajes migratorios a pesar de la heteropatría entre las poblaciones divergentes. En este trabajo utilicé como sistema de estudio a *Selasphorus platycercus*, un colibrí con una distribución desde los Estados Unidos hasta Guatemala, donde a lo largo de ésta se han propuesto dos subespecies (*Selasphorus platycercus platycercus* y *S. p. guatemalae*). A su vez existen dos tipos de comportamiento migratorio divergente: los migratorios de larga distancia que se encuentran en los Estados Unidos y los sedentarios en México y Guatemala. Se ha propuesto que las glaciaciones del Pleistoceno, en especial el Último Glacial Máximo (UGM), han jugado un papel importante en la evolución del comportamiento migratorio en las aves. Tomando en cuenta la divergencia en el comportamiento migratorio de *Selasphorus platycercus*, en este trabajo utilicé secuencias de ADN de dos genes mitocondriales (ND2 y Región Control), ocho loci de microsatélites y cuatro medidas morfológicas de 105 individuos (provenientes de poblaciones migratorias y sedentarias a lo largo de su distribución) para explorar si la divergencia comportamental corresponde también a una divergencia a nivel genético y morfológico, y si las glaciaciones durante el Pleistoceno afectaron la actual distribución y evolución en la migración de *Selasphorus platycercus*. Con ambos marcadores genéticos encontré dos grupos genéticos bien diferenciados que corresponden a las dos subespecies propuestas, las cuales se encuentran geográficamente aisladas y se piensa que no ocurren en simpatria durante el invierno. Una menor estructuración genética se encontró con los marcadores mitocondriales entre las poblaciones migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus* que en la actualidad se piensa ocurren heteropátricas. Tal estructuración no se recuperó con los microsatélites, donde el flujo génico contemporáneo probablemente homogeneiza las diferencias genéticas. Los análisis de expansión poblacional sugieren que el crecimiento poblacional en los migratorios ocurrió entre los 20,000 – 40,000 años atrás, lo que corresponde a un periodo interglacial del Pleistoceno tardío, por lo que se piensa que el Pleistoceno ha jugado un papel importante en la evolución de la migración en *Selasphorus platycercus*. Se encontraron diferencias morfológicas en rasgos asociados a la migración entre poblaciones migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus*, así como diferencias morfológicas entre subespecies.

Introducción

La divergencia genética puede ser el resultado del aislamiento por barreras o distancia geográfica, donde el intercambio de material genético entre poblaciones es limitado (Mayr & O'Hara 1986; Fjeldsa° & Lovett 1997; Roy 1997; Moritz *et al.* 2000), la divergencia genética también puede ocurrir aún en presencia de niveles bajos de flujo génico, siendo factores como la selección natural la que promueve la diferenciación (Endler 1977; Gentry 1989; Smith *et al.* 1997; Schneider & Moritz 1999; Schneider *et al.* 1999).

Los patrones de variación geográfica inter e intra-específica en rasgos genéticos y morfológicos, pueden ayudar a revelar patrones de diferenciación y divergencia entre especies y entre poblaciones de la misma especie (Avice 2000; Schlutler 2000; McCormack & Smith 2008, Rolshausen *et al.* 2009), así como aportar evidencia para probar hipótesis de relaciones filogenéticas y adaptaciones ecológicas (Avice 2000; Weir *et al.* 2009).

Generalmente los procesos de especiación han sido abordados desde la perspectiva de cómo las poblaciones divergentes están distribuidas geográficamente (Winker 2010). Varios estudios de divergencia genética en aves se han explicado bajo un modelo de especiación alopátrica (Bonaccorso *et al.* 2008; Chavarría-Pizarro *et al.* 2010), donde el aislamiento y por lo tanto los bajos niveles de flujo génico promueven la diferenciación. En aves se ha demostrado que las regiones montañosas, los cambios históricos climáticos y geológicos así como las discontinuidades del hábitat han funcionado como barreras aislando las poblaciones y promoviendo la diversificación genética (McCormack *et al.* 2008; Bonaccorso *et al.* 2008; Moritz *et al.* 2000).

A su vez, el modelo de especiación por simpatría explica que la diferenciación inicia con una población panmíctica, donde por selección disruptiva ocurren cambios evolutivos en los patrones de apareamiento, resultando en un aislamiento entre subconjuntos de las poblaciones descendientes (Bolnick & Fitzpatrick 2007; Rice & Salt 1990). Sin embargo, Winker (2010) señala que los modelos de especiación anteriores no abordan adecuadamente cómo es que los linajes migratorios han podido divergir a pesar de su alta movilidad y de ser propensos al flujo génico. Debido a la alta movilidad de las especies migratorias la probabilidad de poblaciones alopátricas multigeneracionales es baja, y la simpatría estacional durante las migraciones es común entre las poblaciones potencialmente diferenciadas. Como las aves migratorias pueden ocurrir alopátricas y simpátricas durante su ciclo de vida Winker (2010) propone el término heteropatría para este tipo de distribución y propone el modelo de

especiación Heteropátrico para tratar de explicar como se da el proceso de divergencia en especies migratorias.

A pesar de que la migración es una estrategia relativamente común, pues más de la mitad de aves de Norte América y norte de México son migrantes Neártico-Neotropicales (338 de 650 especies, Rappole 1995), los efectos de la migración estacional sobre el cambio evolutivo de linajes son poco conocidos en términos tanto de la diferenciación (cladogénesis) como de la especialización (anagénesis) (Winker 2006). Al parecer, los niveles de diferenciación subespecífica entre aves migratorias es en promedio menor que las no migratorias (llamado Montgomery's rule), lo cual podría llevar a la conclusión de que la migración estacional disminuye la diferenciación (Montgomery 1896). Sin embargo, la migración de larga distancia puede ser una innovación que expone a los linajes a nuevos ambientes y a una heterogeneidad ambiental mayor (Winker 2000) permitiéndoles radiar en nuevos ambientes a pesar de ser propensos al flujo génico. Con esta suposición ha surgido la pregunta de si ¿los cambios divergentes en el comportamiento migratorio podrían a menudo iniciar la especiación? (Irwin 2009).

El caso de *Selasphorus platycercus* (Trochilidae) en el cual se han propuesto dos subespecies, las cuales tienen distribución discontinua y además donde a lo largo de su distribución se encuentran poblaciones con distintos tipos de comportamiento migratorio (i.e. algunas poblaciones realizan migraciones de larga distancia mientras que otras son sedentarias o residentes de todo el año), es un sistema atractivo para investigar los procesos de diferenciación genética y morfológica intra-específica. La subespecie *S. p. platycercus*, comprende poblaciones de individuos migratorios de larga distancia las cuales migran a México durante el invierno, así como poblaciones de individuos sedentarios que ocurren todo el año en México (Calder & Calder 1992). La subespecie *S. p. guatemalae* (Griscom 1932) comprende poblaciones de individuos sedentarios que se encuentran aislados geográficamente en Chiapas y Guatemala, la cual difiere en tamaño y coloración de la subespecie *S. p. platycercus* (Griscom 1932) así como en los ciclos de muda y periodo reproductivo (Calder & Calder 1992, Wagner 1948). Según Howell & Webb (1995) durante las migraciones las poblaciones de migratorios ocurren en cierta simpatria con las poblaciones sedentarias de México pero no con las de Guatemala, lo cual contrasta con lo propuesto por del Hoyo (1999) y Calder & Calder (1992), quienes proponen que las poblaciones migratorias llegan hasta Guatemala. Sin embargo, los mapas y descripciones del rango de distribución en aves son estáticos, haciendo difícil elucidar donde y en que extensión las poblaciones se encuentran en

simpatría durante las migraciones (Winker 2010), en particular en el caso de *Selasphorus platycercus* donde la diferenciación fenotípica entre migratorios y sedentarios no es evidente.

La distribución geográfica (heteropátrica) y la diferencia en el comportamiento migratorio son características que pueden sugerir al menos dos escenarios para *Selasphorus platycercus*. El primero en donde el aislamiento genético entre las poblaciones con comportamientos migratorios diferentes es poco probable debido al comportamiento migratorio de larga distancia de *S. p. platycercus*, ocurriendo las poblaciones en simpatría durante una época del año. Wagner (1948) sugirió que *S. p. guatemalae* (sedentaria) y probablemente las poblaciones sedentarias de México de *S. p. platycercus* anidan de septiembre a diciembre, lo cual coincidiría con la época en que la población migratoria se encuentra en México, por lo tanto, potencialmente podría haber intercambio génico entre las poblaciones y por lo tanto poca diferenciación genética entre ellas. Contrario a la época de anidación que propuso Wagner (1948) lo cual se basa en observaciones aisladas, se ha observado que al menos las poblaciones sedentarias de Tlaxcala, tienen su época reproductiva durante la primavera-verano (C. Lara Universidad de Tlaxcala, comm. pers). Lo anterior nos lleva al segundo escenario, donde las poblaciones migratorias y sedentarias ocurren en simpatría durante la temporada invernal, sin embargo al utilizar territorios de reproducción dispares, el flujo génico entre ellas se vería reducido, aumentando así la diferenciación genética entre ellas.

Finalmente, bajo cualquiera de los dos escenarios, se esperaría encontrar que las poblaciones sedentarias de la subespecie *S. p. guatemalae* que ocurren en Chiapas y Guatemala, formen un grupo genéticamente aislado ya que según Howell & Webb (1995) las poblaciones migratorias no llegan a esas latitudes. También la distancia que hay entre las poblaciones sedentarias del centro-sur de México y las poblaciones sedentarias de Guatemala, están separadas por al menos 500 km por lo que se piensa que siendo sedentarias las dos poblaciones es poco probable que haya intercambio génico entre éstas.

Sobre el papel que las glaciaciones han jugado en la evolución de la migración, estudios anteriores han propuesto que el retroceso de los hielos permitió la colonización de latitudes mayores desde poblaciones sureñas (Milá *et al.* 2000; Taberlet *et al.* 1998; Hewitt *et al.* 2004). Al principio del proceso cuando las aves estaban confinadas a latitudes menores pudieron ser residentes o migratorios de distancias cortas. Sin embargo, en los últimos 2.5 millones de años han ocurrido más de 20 glaciaciones sucesivas que han variado en severidad, así que durante este periodo, los sistemas migratorios han estado en flujo continuo y muchas poblaciones han pasado por fases alternativas de migración y sedentarismo (Berthold 1999).

Estudios más puntuales sobre la diferenciación genética entre poblaciones migratorias y sedentarias, han encontrado resultados contrastantes. Milá *et al.* (2000) encontraron que las poblaciones migratorias y sedentarias de *Oporornis tolmiei* han divergido genéticamente y que ésta divergencia data del Pleistoceno. En contraste, Pérez-Tris *et al.* (2004) encontraron poca diferenciación genética entre poblaciones sedentarias y migratorias de *Sylvia atricapilla*, aunque sí encontraron diferencias genéticas entre poblaciones que utilizan rutas migratorias distintas. Mientras que Davis *et al.* (2006) encontraron poca diferenciación genética entre poblaciones de *Dendroica caerulescens*, las cuales se distribuyen de manera discontinua y además migran a partes distintas, sugiriendo que existe flujo génico entre ellas. Sobre la evolución de la migración en poblaciones de migratorios en los sistemas anteriores, parece estar relacionado con expansiones poblacionales después del último glacial máximo (UGM).

En el contexto anterior, me interesa saber si las poblaciones migratorias y sedentarias de *Selasphorus platycercus* forman grupos genéticamente diferenciados y si esa diferenciación genética concuerda con la diferencia en el comportamiento de migración. Aunado a lo anterior me interesa saber si existen también diferencias morfológicas entre las poblaciones migratorias y sedentarias. Se espera que los individuos con comportamiento migratorio divergente difirieran morfológicamente en ciertos rasgos asociados a la migración, esperando que las poblaciones migratorias tuvieran alas más largas, cola más corta y cuerpos más pequeños (Winkler & Leisler 1992; Tellería *et al.* 1999).

De encontrar divergencia genética entre las dos subespecies y/o poblaciones migratorias y sedentarias de *Selasphorus platycercus* estimaré cuál es el tiempo en el que estos grupos se separaron, así como también trataré de explicar cómo eventos climáticos y/o geográficos históricos pudieron haber moldeado la estructura genética actual. Pocos estudios han trabajado con sistemas que incluyan poblaciones tanto residentes como migratorias y que además tengan una distribución Neártico-Neotropical, enfocándose en especies o poblaciones con distribuciones en latitudes norteñas, haciendo difícil poner a prueba la “hipótesis de expansión del Pleistoceno” (Milá *et al.* 2007a). Esta hipótesis sugiere que después de las glaciaciones del Pleistoceno hubo expansiones de rangos de distribución para colonizar nuevos ambientes en latitudes más norteñas de su distribución durante los periodos interglaciales, sugiriendo que de esta forma pudo haber evolucionado la migración (Milá *et al.* 2007a; Milá *et al.* 2000; Avise & Walker 1998; Avise *et al.* 1998).

En resumen los objetivos de este trabajo fueron: i) describir y comparar la variación morfológica entre poblaciones migratorias y sedentarias de *Selasphorus platycercus*, ii) describir y comparar la variación genética entre poblaciones sedentarias y migratorias de *S.*

platycercus, iii) establecer si existe una relación entre la divergencia fenotípica y genética entre poblaciones sedentarias y migratorias de *S. platycercus*, iv) y explicar la influencia que las glaciaciones tuvieron en la evolución de la migración de *S. platycercus*.

Para contestar lo anterior utilicé datos morfológicos, dos genes mitocondriales (Región Control y ND2) así como ocho loci de microsatélites. El uso de marcadores moleculares con herencia uni y biparental así como con diferentes tasas de mutación es importante porque permite hacer inferencias en diferentes escalas de tiempo, lo cual no se logra al utilizar un solo un marcador (González *et al.* 2011). También, los marcadores moleculares con diferente tipo de herencia nos puede dar información más confiable y completa sobre los diferentes eventos que han afectado la historia evolutiva de *Selasphorus platycercus* a diferentes escalas de tiempo y que podrían explicar las diferencias en la estructura genética actual.

Materiales y métodos

Especie de estudio

Selasphorus platycercus es un colibrí de tamaño mediano (3-4 g) que se distribuye principalmente en bosques de pino-encino. Taxonómicamente se han propuesto dos subespecies: *Selasphorus platycercus platycercus* y *Selasphorus platycercus guatemalae*. El rango de distribución de la subespecie *S. p. platycercus* durante la anidación comprende una pequeña parte de la Sierra Nevada (este-centro de California y Nevada), las montañas Rocosas (Colorado, Utah, Wyoming, Nuevo México, Arizona y oeste de Texas), la Sierra Madre Oriental en México (Nuevo León, Coahuila y Tamaulipas), Eje Neovolcánico transversal (Distrito Federal, Tlaxcala, Hidalgo y Morelos). La distribución de la subespecie *S. p. guatemalae* comprende las montañas de Guatemala y sur de México en Chiapas. *Selasphorus platycercus* es más abundante en prados subalpinos y habitats arbustivos con bosques cercanos (Calder & Calder 1992), bosques riparios, bosques áridos de pino-encino entre los 1500-2500 msnm. Se alimenta del néctar de flores como *Penstemon*, *Ipomopsis*, *Castilleja*, *Salvia*, *Delphinium*, *Lonicera*, *Silene*, *Aquilegia*, *Robinia*, *Iris missouriensis*, y agaves entre otras, aunque también se sabe que se alimentan de pequeños insectos (del Hoyo *et al.* 1999).

En cuanto al comportamiento migratorio, *Selasphorus platycercus platycercus* representa las poblaciones migratorias de larga distancia de Estados Unidos y sedentarias del noreste y centro de México, mientras que *Selasphorus platycercus guatemalae* representan las poblaciones sedentarias de Chiapas y Guatemala (Griscom 1932). La subespecie *S. p. guatemalae* es más pequeña que *S. p. platycercus*, aunque no se reporta en qué proporción

(Pyle 1997, Griscom 1932), además, los machos de *S. p. guatemalae* tienen mayor cantidad de marrón en los axilares y en las partes bajas del cuerpo, y las hembras tienen más marcas color bronce en la garganta cuando se compara con *S. p. platycercus* (Pyle 1997).

Sobre el comportamiento de migración no se sabe con exactitud cómo es la ruta ni las fechas en que las poblaciones del norte migran hacia el sur. Se ha sugerido una ruta de migración elíptica (que va hacia el sur por el este y regresan al norte por el oeste), similar a la propuesta para *Selasphorus rufus* la cual ha sido basada en los patrones de clima y fenología floral (Phillips 1975).

Según Howell y Webb (1995), las poblaciones migratorias y sedentarias de *S. platycercus* se encuentran en simpatria durante la época migratoria en el centro de México pero no con las poblaciones de *S. p. guatemalae* en Chiapas y Guatemala. En contraste, del Hoyo *et al.* (1999) y Calder & Calder (1992) sugieren que el área de distribución de las poblaciones migratorias se extiende hasta Guatemala durante el invierno, por lo que no se sabe con exactitud hasta donde llegan las poblaciones migratorias durante el invierno y la poca diferenciación fenotípica entre subespecies hace difícil elucidar lo anterior.

Se ha propuesto también que los tiempos de muda y reproducción difieren entre las subespecies y entre las poblaciones migratorias y sedentarias de *S. p. platycercus*. Las poblaciones sedentarias de *S. p. guatemalae* y de *S. p. platycercus* mudan a principios del verano y anidan de septiembre a diciembre, mientras que las poblaciones migratorias de *S. p. platycercus* mudan a mediados de invierno y anidan de abril-mayo a julio. Aunque no hay estudios robustos que apoyen la época reproductiva propuesta por Wagner (1948) para las sedentarias, la cual está basada en observaciones aisladas de despliegues de cortejo (Wagner 1948) y que además es contraria a la observada por C. Lara (comm. pers.) en Tlaxcala, quien ha observado que al menos las poblaciones sedentarias de Tlaxcala se reproducen durante la primavera-verano.

Trabajo de campo

Se muestrearon trece poblaciones de *Selasphorus platycercus* en distintas localidades a través del área de distribución (Estados Unidos y México) para asegurar muestras de las dos subespecies y de los diferentes tipos de comportamiento (Figura 1, Tabla 1). Se identificaron puntos que potencialmente funcionan como áreas de alimentación (parches con flores), paso y/o anidación donde se colocaron un mínimo de 3 y un máximo de 10 redes de niebla (12 o 6 m de largo por 3 m de alto y 33 mm de luz) para capturarlos. Una vez capturados se procedió

a coleccionar las rectrices r5 o rectrices r3, de las cuales se extrajeron ADN para los análisis genéticos. Se eligieron las rectrices r5 y r3 ya que se ha sugerido que estas plumas de la cola probablemente no tienen utilidad durante los despliegues de cortejo para *Selasphorus platycercus* (Christopher Clark comunicación personal a Susan Wethington).

La colecta de plumas para los migratorios se realizaron en Estados Unidos durante la época reproductiva (de mayo a agosto) así como en México durante el invierno en localidades para las que se sabe que no hay poblaciones sedentarias (i.e. Nevado de Colima y Palmito) (Alfonso Langle comm. personal). Las colectas para las poblaciones sedentarias se realizaron a lo largo del año, por lo que se realizaron colectas también durante la época migratoria. Sin embargo consideraremos como las “verdaderas sedentarias” aquellos individuos colectados entre el primero de abril hasta el último día de agosto que es cuando se ha propuesto que las poblaciones migratorias no se encuentran en México (Calder & Calder 1992; Alfonso Langle comm. personal). A lo largo de este trabajo se harán distintas agrupaciones de individuos para los análisis según el lugar donde fueron colectados y el status de migración (ver Figura 1, Tabla 1). Me referiré como M-1 a las poblaciones migratorias que fueron colectadas exclusivamente en USA, como M-2 a las poblaciones migratorias colectadas en México (i.e. Neva en Jalisco y Palm en Sinaloa), como M-1 & M-2 juntando las poblaciones anteriores. Para las poblaciones sedentarias me referiré como S-1_N a las poblaciones colectadas al norte de México (i.e. Nule en Nuevo León y Coah en Coahuila). Como S-1_C a las poblaciones sedentarias del centro de México (i.e. Tlax_sed en Tlaxcala e Hida en Hidalgo), como S-1 será juntando las dos poblaciones anteriores. Para la población sedentaria de Chiapas me referiré como S-2 (ver Figura 1, Tabla 1).

En ciertos estados (Colorado, Arizona, Jalisco y Tlaxcala) se trabajó en colaboración con estaciones de anillado de aves, donde los individuos fueron marcados con un anillo de aluminio con registro único. En localidades donde no fue posible colocarles anillo metálico y para evitar pseudomuestras, a los individuos capturados se les contó el número de rectrices y se tomaron muestras solo a aquellos que tenían 10 rectrices. Posterior a la colecta y toma de datos se liberaron a los colibríes. Las plumas colectadas se colocaron en sobres de papel y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis.

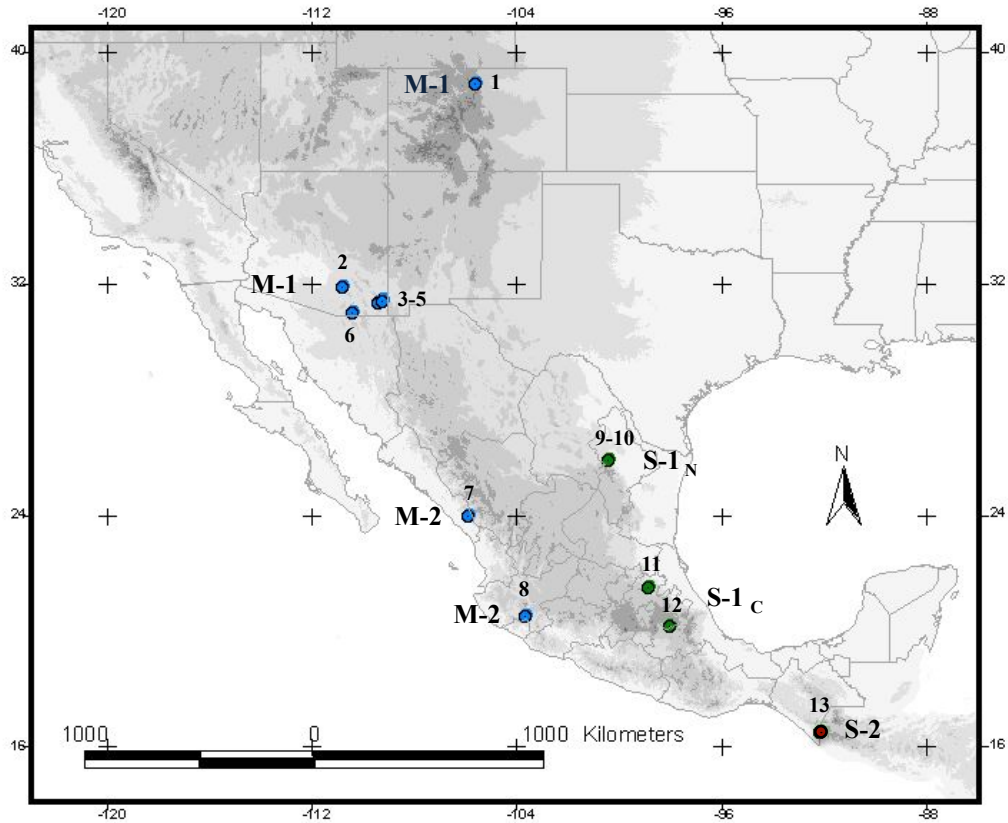


Figura 1. Localidades de colecta de *Selasphorus platycercus*. Los puntos azules corresponden a las poblaciones migratorias, los puntos verdes a las poblaciones sedentarias y el punto vino a la población sedentaria de Chiapas. Los códigos: 'M-1' son individuos colectados en USA, 'M-2' individuos migratorios colectados en México, 'S-1_N' individuos sedentarios colectados en el norte de México, 'S-1_C' individuos sedentarios colectados en el centro de México, 'S-2' son los individuos sedentarios colectados en Chiapas. Los números arábigos corresponden a las localidades de colecta (ver Tabla 1).

Localidad	grupo	Latitud N	Longitud W	Altitud
1. Hollowell (Colo)	M-1	40°22'16"	105°36'18"	2,514
2. Mountain Lemon (Mole)	M-1	32°26'27"	110°47'18"	2,784
3. Paradise (Para)	M-1	31°56'06"	109°13'08"	1,688
4. El Coronado Ranch (Coro)	M-1	31°52'07"	109°22'03"	1,656
5. South Western R. Station (Swrs)	M-1	31°52'59"	109°12'19"	1,650
6. Garden Canyon (Gaca)	M-1	31°28'18"	110°21'24"	1,655
7. El Palmito (Palm)	M-2	23°33'00"	105°50'00"	1,920
8. Volcán Nevado de Colima (Neva)	M-2	19°36'00"	103°37'00"	3,000
9. Cerro El Potosí (Nule)	S-1 _N	24°50'20"	100°19'12"	3,080
10. Arteaga (Coah)	S-1 _N	25°26'43"	100°50'48"	2,880
11. Eloxochitlán (Mida)	S-1 _C	20°44'43"	98°48'36"	1,940
12a. Volcán la Malinche (Tlax _{sed})	S-1 _C	19°12'48"	98° 00'21"	2,500
12b. Volcán la Malinche (Tlax _{mig})	M-2	19°12'48"	98° 00'21"	2,500
13. Volcán Tacaná (Chis)	S-2	15°07'03"	92°06'09"	3,007

Tabla 1. Localidades, grupos, latitud, longitud y altitud de individuos de *Selasphorus platycercus* colectados.

Trabajo de laboratorio

Variación morfológica

Para describir y comparar la variación morfológica entre las poblaciones migratorias y sedentarias se tomaron cuatro medidas: 1) cuerda alar (la distancia de la unión carpal a la punta de la primaria más larga), 2) culmen expuesto (de la base del pico a la punta de la mandíbula superior), 3) largo de la cola (de la base de la glándula uropigial a la punta de la rectriz más larga) y 4) peso (Figura 2). Las medidas del ala y la cola fueron tomadas con una regla estándar utilizadas por anilladores de aves. Las demás medidas se tomaron con un Vernier de precisión marca Tajima de hasta 0.1mm. También se utilizaron datos morfológicos de especímenes de museo tomados por Juan Francisco Ornelas. Como las mediciones no pudieron ser tomadas por una sola persona se comparó y estandarizó la forma en que se tomaron las medidas para evitar sesgos. Debido a que tuvimos acceso a especímenes de museos, pudimos obtener datos de morfología de poblaciones de México para los cuales no tuvimos colectas de plumas (i.e. Aguascalientes, Guerrero, Coahuila, y Michoacán).

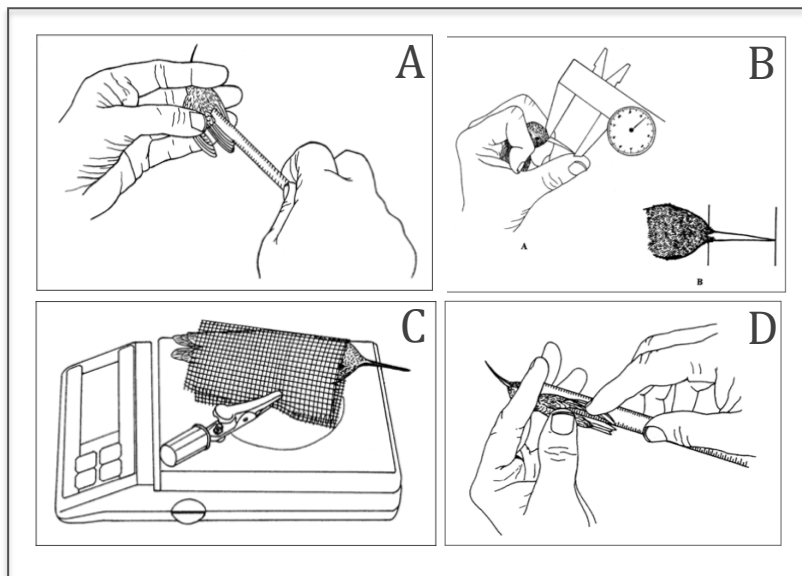


Figura 2. Medidas morfológicas colectadas: A) largo de la cola, B) culmen expuesto, C) peso, D) cuerda alar.

Se realizaron dos tipos de análisis multivariados para los datos morfológicos, un análisis de componentes principales (PCA) y un análisis de varianza múltiple (MANOVA). El PCA es una técnica exploratoria que ayuda a identificar la variabilidad total asociada a cada una de las variables del análisis (Jonhson 1998) según los subgrupos de interés (en este caso migratorios

y residentes a distintas latitudes). El PCA se realizó basado en la matriz de covarianza; debido a que la interpretación estadística es menos complicada con los valores rotados, ya que maximiza la varianza, se rotaron los datos con el método de Varimax. Posterior al análisis de PCA se realizó un análisis de varianza múltiple (MANOVA) para determinar diferencias significativas en los componentes principales resultantes (PC) tomando como factor fijo el grupo (i.e. M-1 & M-2, S-1_N, S-1_C, S-2) y como variable respuesta los scores de los componentes extraídos, seguido de ANOVAs de una vía

Para examinar las diferencias en la variación morfológica entre los grupos anteriores, hice una MANOVA, tomando como factor fijo los grupos y como variables dependientes las cuatro medidas morfológicas. Una ANOVA de una vía siguió la MANOVA, para determinar las diferencias entre grupos para cada variable y se realizó una prueba de Tukey de comparación múltiple. Para satisfacer las suposiciones paramétricas del análisis, los datos fueron transformados Log (x+1) antes del análisis; sin embargo, las gráficas se presentan con los datos no transformados. Los análisis de morfología fueron realizados en el programa SPSS v.20.

ADN mitocondrial

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

El ADN del cálamo de las plumas colectadas se extrajo utilizando el método estándar de Chelex al 10% (Morin *et al.* 1994) y el Kit Dneasy Tissue (Qiagen, Inc) con el protocolo recomendado. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó una porción de los genes ND2 (codificante) y el dominio I de la Región Control (región hipervariable y no codificante), ambos del ADNmt. Para el gen ND2 se amplificaron 353 pb utilizando los primers L5215 (5' TATCGGGCCCATACCCCGAAAAT 3') y H5578 (5' CCTTGAAGCACTTCTGGGGAATCAGA 3') (Hackett 1996). Para la Región Control (RC) se amplificaron 532 pb utilizando los primers ARCO1F (5' AATTTTATGGTGTTTGTGTGTGAA 3') y ARCO1R (5' ACCCTAGCACAACCTCGCACT 3') (González *et al.* 2011). Las reacciones de PCR fueron de un total de 25 µl y se incluyó en todas un control negativo para excluir la contaminación. Las reacciones para la Región Control incluyeron 0.72x buffer, 3.6 mM MgCl₂, 0.14 mM de cada dNTP, 0.16 µg/µl de BSA, 0.16 µM de cada primer, 0.04 *Taq* (Promega) y 2-5 µl de ADN. Las reacciones de PCR fueron realizadas en una termocicladora 2720 (Applied Biosystems) o en una termocicladora

Eppendorf Mastercycler con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos que consistieron en la desnaturalización a 94°C por 1.5 min, alineación a 45-50°C por 1 min y una extensión de 1.5 min a 72°C; con una extensión final de 7 min a 72°C. Para el gen ND2 las reacciones incluyeron 1.00 X buffer, 4.00 mM MgCl₂, 0.14 mM de cada dNTP, 0.16 µg/µl de BSA, 0.16 µM de cada primer, 0.03 *Taq* (Promega) y 2-5 µl de ADN. Las condiciones de las reacciones fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min; 35 ciclos que consistieron en la desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineación a 45°C por 45 seg y una extensión de 1 min a 72°C; con una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa con buffer 1X TBE conteniendo 1.2 µg/ml de bromuro de etidio y se corrieron a 100 V de 15-20 minutos. Los productos de amplificación se purificaron con el kit de purificación de ADN QIAquick (Qiagen) y posteriormente se realizó la secuenciación cíclica en ambas direcciones utilizando el BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Las secuencias de ambos lados se obtuvieron en un secuenciador automatizado ABI 310 y se editaron en el programa Sequencer TM 4.8 demo (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, USA) y los consensos se alinearon manualmente en el programa Se-Al Editor v 2.0a11 (Rambaut 2002). Uní las matrices de ambos marcadores resultando en una matriz combinada de 885pb, la cual fue utilizada para todos los análisis a excepción del análisis de tiempo al ancestro común más reciente (TMCRA) a donde utilicé la matriz de ND2 así como la concatenada.

Variación y diferenciación genética

En Arlequin v 3.11 (Excoffier *et al.* 2005), se determinaron los niveles de variación genética dentro de las poblaciones, mediante la estimación de la diversidad de haplotipos (h), la diversidad de nucleótidos (π) y el número de sitios segregantes (S) para cada localidad.

Se estimaron los parámetros G_{ST} y N_{ST} según Pons & Petit (1996) para evaluar la diferenciación genética poblacional. G_{ST} evalúa la diferencias en las frecuencias de haplotipos dentro de las poblaciones, mientras que N_{ST} incluye tanto la frecuencia de haplotipos como los pasos mutacionales entre ellos. Utilicé el programa PERMUT para calcular ambos parámetros y probé la significancia con 10,000 permutaciones. Cuando N_{ST} es significativamente más grande que G_{ST} , indica que los haplotipos dentro de la misma población están más relacionados entre si que con los haplotipos de poblaciones diferentes, lo cual indica estructura filogeográfica (Pons & Petit, 1996).

Arlequin se utilizó también para realizar los análisis de varianza molecular (AMOVA), cuatro AMOVAs fueron realizadas, i) sin definir grupos a priori, ii) agrupando en dos grupos: Chiapas vs. el resto, iii) agrupando los individuos en tres grupos: migratorias M-1 & M-2, sedentarias S-1 y sedentarias S-2 y, iv) agrupando en cuatro grupos: Migratorias M-1 & M-2, sedentarias S-1_N, sedentarias S-1_C y sedentarias S-2. Utilicé el modelo de evolución de Tamura y Nei (1993) con el parámetro $\gamma = 0.863$ para la matriz combinada y un total de 16,000 permutaciones para determinar la significancia de las AMOVAs. El modelo de evolución obtenido para la matriz concatenada fue 'HKY+I+G'; sin embargo, este modelo no se encuentra dentro de las opciones de Arlequin v 3.11 por lo que el modelo de Tamura y Nei es la aproximación mas cercana. Para evaluar el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones, se generó una matriz de valores de F_{ST} pareadas (Raymond & Rousset 1995) con 10,000 permutaciones. También se hizo una segunda comparación de F_{ST} pareadas donde en vez de poblaciones se utilizaron las agrupaciones de M-1 & M-2, S-1_N, S-1_C, y S-2.

Para probar si existe una relación entre las distancias genéticas y geográficas se realizó una prueba de Mantel para todas las poblaciones en el programa IBDWS (Jensen *et al.* 2005) y se estimó el nivel de significancia con 10,000 permutaciones. Las distancias genéticas se calcularon a partir de la fórmula $F_{ST}/1-F_{ST}$ utilizando los valores obtenidos de las F_{ST} pareadas anteriormente calculadas en Arlequin v 3.11. Las distancias geográficas (en km) se obtuvieron georreferenciando los puntos de colecta en Google Earth© (Europa Technologies, 2010) y midiendo las distancias entre pares de localidades.

Relaciones entre haplotipos

Construí árboles filogenéticos de inferencia bayesiana y de máxima verosimilitud en MRBAYES 3.1.2 (Huelsenbeck *et al.* 2001) y en RAXml (Stamatakis 2006) respectivamente para determinar las relaciones de parentesco entre los haplotipos. Para el análisis Bayesiano, los datos fueron particionados en dos matrices, una que corresponde al gen codificante ND2 (353 pb) y la otra para la región hipervariable y no codificante de la Región Control (532 pb). En JModelTest v.0.1.1 (Posada & Crandall 1998) se obtuvo el modelo evolutivo que mejor se adapta a cada una matriz de las matrices particionadas. El mejor modelo obtenido para ND2 bajo el Criterio de información Bayesiana (BIC) fue el TrN+G (frecuencias de bases: A= 0.2935; C= 0.3372; G= 0.1282; T= 0.2411; parámetro de forma de distribución $\gamma = 0.2010$) y para RC fue el HKY+I+G (frecuencias de bases: A= 0.3584; C= 0.1687; G= 0.2373; T= 0.2356; parámetro de forma de distribución $\gamma = 0.6530$). El análisis se

corrió con la matriz concatenada pero especificando el modelo de evolución de cada marcador. El análisis se corrió 10 millones de generaciones usando cuatro cadenas, muestreando cada 1000 generaciones. Para evaluar la estacionaridad se graficó el número de generaciones contra los valores de probabilidad, se descartaron los primeros 1000 árboles como “burn-in”, y el árbol de consenso se visualizó en FIGTREE 1.2.3. El árbol de máxima verosimilitud se obtuvo en RAXml vía CIPRES (Miller *et al.* 2010), el valor de probabilidad de los nodos se obtuvo con 1000 réplicas de bootstrap. En ambos análisis se utilizaron 2 congéneres del grupo de las abejas como grupos externos para enraizar el árbol (*Selasphorus rufus* y *Stelulla calliope*).

Como los árboles bifurcados pueden no ser siempre la mejor manera de representar filogenias intraespecíficas (Posada & Crandall 2001); construí una red de haplotipos usando el algoritmo Median-joining en el programa Network (Bandelt *et al.* 1999).

Pruebas de expansión demográfica

Para probar cambios pasados en el tamaño efectivo de la población hice la prueba de F_s de Fu (Fu 1997), la cual detecta desviaciones de la neutralidad en escenarios caracterizados por un exceso de alelos raros y mutaciones recientes. Valores negativos y significativos indican un exceso de mutaciones recientes y rechazan estabilidad en la población (Fu 1997). En el caso de la prueba D de Tajima (1989), se comparan los parámetros poblacionales de sitios segregantes y el promedio de las diferencias pareadas entre los haplotipos muestreados, bajo el modelo de sitios infinitos. Valores negativos y significativo de D pueden deberse a factores tales como expansión de la población, cuellos de botella o heterogeneidad en las tasas de mutación (Tajima 1989). Estos análisis se realizaron en Arlequin v 3.11 con 16,000 iteraciones para obtener los niveles de significancia.

También se realizaron distribuciones pareadas de nucleótidos entre haplotipos (distribuciones “mismatch”) para probar expansión súbita en la población con 1000 réplicas de bootstrap (Rogers 1995). Se espera que las poblaciones que han pasado por una expansión demográfica súbita muestren una distribución Poisson, mientras que las poblaciones que han estado en equilibrio por un tiempo relativamente largo, se espera que muestren una distribución bimodal (Slatkin & Hudson 1991). Para probar la bondad de ajuste entre las distribuciones mismatch esperadas y observadas usamos las desviaciones de suma de cuadrados (SSD) entre los mismatch observados y esperados como un test estadístico así como el índice ‘Harpending’s raggedness’, el cual al obtener un valor no significativo indica

expansión en la población. Los análisis de mismatch fueron realizados también en Arlequin v 3.11.

Para reconstruir la historia demográfica de los cambios del tamaño de la población a través del tiempo bajo una aproximación coalescente se realizó el método 'skyline-plot' en BEAST v. 1.5.4 (Drummond & Rambaut 2007). Se corrió un análisis con 30 millones de generaciones, usando el modelo de sustitución HKY+I para las poblaciones migratorias y HKY para las sedentarias, la frecuencia de bases se estableció como empírico, se usó un modelo de reloj molecular relajado no correlacionado lognormal. Los árboles y los parámetros fueron muestreados cada 1000 iteraciones y se hizo un burn-in del 10%. El eje del tiempo fue escalado usando la media geométrica 0.01767 sustitución/sitios/linaje/millón de años. Los resultados de cada corrida se visualizaron en TRACER v.1.5 (Drummond & Rambaut 2007) para asegurar que la estacionaridad y convergencia se alcanzaron y que el tamaño efectivo de la muestra (ESS por sus siglas en inglés) fuera mayor de 200. También utilicé el método 'Extended Bayesian skyline plots' en BEAST (Drummond & Rambaut 2007; Heled & Drummond 2008) y en TRACER determiné los probables cambios en el tamaño de la población con el parámetro `demographic.populationSizeChanges`.

Las pruebas de Fu, D de Tajima y mismatch se hicieron agrupando a los individuos en cinco grupos como a continuación se describe. El primer grupo: migratorias M-1 & M-2, el segundo grupo: migratorias M-1, el tercer grupo: sedentarias S-1_N, el cuarto grupo: sedentarias S-1_C y el quinto grupo: sedentarias S-2.

Estimaciones de flujo génico histórico

El flujo génico histórico (M) entre los grupos genéticos se estimó usando MIGRATE v.3.2.19 usando el modelo máxima verosimilitud (Beerli & Felsenstein 2001) con tres cadenas largas y diez cortas con un 'burn-in' de 10,000. La primera genealogía fue iniciada con un árbol aleatorio, y los parámetros theta inicial (Θ) y la tasa de migración (M) se obtuvieron con cálculos de F_{ST} .

Para medir si la divergencia de los grupos genéticos resultantes ocurrió en presencia o no de flujo génico, realicé análisis de aislamiento con migración en IMA (Hey & Nielsen 2004; Hey & Nielsen 2007). IMA está basado en un modelo Bayesiano de coalescencia en el cual una población ancestral se divide en dos poblaciones y donde durante la divergencia, los grupos resultantes pudieran intercambiar flujo génico en ambas direcciones a diferentes tasas (Hey & Nielsen 2004). Se utilizó la matriz de datos concatenada (ND2 + Región Control)

para la cual se estimaron parámetros poblacionales para la población ancestral y las descendientes: el tamaño efectivo de la población (q_A, q_1, q_2) así como las tasas de migración (m_1 y m_2). IMA es apropiado para estimar parámetros para poblaciones que se han separado recientemente y que podrían seguir compartiendo haplotipos por flujo génico y retención de polimorfismos ancestrales. Se hicieron dos análisis en IMA, el primero fue entre los dos grupos que representan a las dos subespecies, es decir, las migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus* vs. las sedentarias de la subespecie *S. p. guatemalae* de Chiapas. El segundo análisis se hizo con el fin de explorar cuándo ocurrió la divergencia entre migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus* y si durante esta divergencia hubo flujo génico o no, siendo entonces los grupos para dicho análisis (M-1 & M-2 vs. S-1C).

Para los dos análisis se hicieron corridas preliminares para ajustar los parámetros adecuados. Cuando los parámetros se ajustaron y para verificar la convergencia se hicieron cuatro corridas independientes con condiciones idénticas, pero diferentes valores de semilla, con un burn-in de 50 millones de pasos y bajo el modelo de evolución 'HKY'. De acuerdo con Hey (2007) se consideró que los análisis habían convergido en una distribución estacionaria si las corridas independientes tuvieron distribuciones posteriores similares y fue de al menos 50. Se ha propuesto una tasa de sustitución de nucleótidos del 2.5% para marcadores mitocondriales codificantes como ATPasa y ND2 (Smith & Klicka 2010) y del 5% (Milá *et al.* 2007a) para la región control, la cual tiene una tasa de sustitución más alta que las regiones codificantes. Para la matriz concatenada se usó la media geométrica (1.77×10^{-8} s/s/a) de 2.5% y 5 % tasas de divergencia por cada fragmento mitocondrial y el tiempo de generación de 1 año para *Selasphorus platycercus* (Calder & Calder 1992) para estimar los tamaños efectivos de cada grupo y las tasas de migración por generación.

Tiempo al ancestro común más reciente (TMCRA)

Para probar los tiempos al ancestro común más reciente (TMCRA por su siglas en inglés) se utilizaron los haplotipos únicos del gen ND2 y trece especies del grupo de las abejas (*Selasphorus flammula*, *Selasphorus rufus*, *Selasphorus sasin*, *Stellula calliope*, *Atthis heloisa*, *Doricha eliza*, *Calothorax pulcher*, *Calothorax lucifer*, *Calypte anna*, *Calypte costae*, *Tilmatura dupontii*, *Archilochus alexandri* y *Archilochus colubris*) bajo una aproximación bayesiana en BEAST 1.4.7. Se utilizó el modelo de reloj molecular no correlacionado con tasas de sustitución no correlacionadas log-normal distribuidas a través de las ramas y el modelo de evolución GTR. La tasa de sustitución utilizada fue de 0.0125 sustitución/sitio/Ma

como lo sugiere Smith & Klicka (2010), todos los parámetros fueron definidos en el programa BEAUTI 1.4.7. Se corrieron en BEAST 10 millones de generaciones muestreando cada 1,000 generaciones, para evaluar la estacionaridad se graficó el número de generaciones contra los valores de probabilidad, se descartaron los primeros 1000 árboles como “burn-in”, y el árbol de consenso se visualizó en FIGTREE 1.2.3. Se hizo un segundo análisis utilizando los haplotipos únicos de la matriz concatenada (ND2 + RC) pero utilizando solamente ocho especies (*Selasphorus rufus*, *Selasphorus sasin*, *Stellula calliope*, *Atthis heloisa*, *Doricha eliza*, *Calothorax pulcher*, *Archilochus colubris* y *Tilmatura dupontii*). Se utilizaron los mismos parámetro que en la búsqueda anterior y una tasa de sustitución para la RC de 0.025 sustitución/sitio/Ma como lo sugiere Milá *et al.* (2007a).

Microsatélites

Amplificación y genotipificación de microsatélites

Se genotipificaron 71 muestras de las diferentes localidades de colectas para 8 loci polimórficos de microsatélites, los cuales fueron diseñados específicamente para poblaciones de *Selasphorus platycercus* en Colorado por Oyler-McCance *et al.* (2010). En el laboratorio se trabajaron con condiciones diferentes a las propuestas por Oyler-McCance *et al.* (2010). Las reacciones de PCR para los primers marcados se hicieron en volúmenes de 14 µl, 0.61x buffer, 3.61 mM MgCl₂, 0.14 mM de cada dNTP, 0.18 µM de cada primer, 0.04 *Taq* (Promega) y 1-3 µl de ADN. Las reacciones de PCR fueron realizadas en una termocicladora 2720 (Applied Biosystems) o en una termocicladora Eppendorf Mastercycler. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, 35 ciclos que consistieron en la desnaturalización de 40 seg a 94°C, alineación 1 min a 50 a 62°C y extensión de 1 min a 72°C; finalmente con una extensión final de 10 min a 72°C. Para algunos loci que fueron más difíciles de amplificar se utilizó el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min; 35 ciclos que consistieron en la desnaturalización a 94°C por 1.5 min, alineación a 55-60°C por 1 min y una extensión de 1.5 min a 72°C; con una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se diluyeron en agua destilada dependiendo de su concentración y se hicieron dos mezclas de 4 loci cada una: HumB1, HumB2, HumB9, HumB15 y HumB3, HumB10, HumB11 y HumB12 respectivamente. Para determinar el tamaño de los alelos, las mezclas se corrieron con el estándar LIZ 600 (Applied Biosystems)

en el secuenciador ABI 310. La asignación del tamaño de los alelos se realizó en el programa Genemapper v.3.2.

Variación genética y equilibrio Hardy-Weinberg

Para calcular la heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) (Nei 1978), el número promedio de alelos por locus (diversidad alélica) así como para determinar si las poblaciones se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg, se utilizó el programa GENEPOP (<http://genepop.curtin.edu.au>). También se determinaron si todos los pares de loci son independientes mediante pruebas de desequilibrio de ligamiento en FSTAT v.2.93 (Goudet 2001). Todos los resultados se ajustaron a múltiples comparaciones con pruebas de Bonferroni (Rice 1989). La riqueza alélica, una medida del número de alelos por locus entre las poblaciones independiente del tamaño de muestra fue calculado en FSTAT (Goudet 2001). Errores de genotipificación y presencia de alelos nulos se analizaron en Micro-Checker v.2.23 (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Estructura genética poblacional y flujo génico contemporáneo

Para investigar la estructura genética calculé la F_{ST} global y pareadas entre poblaciones y grupos en FSTAT, las diferencias entre poblaciones fueron probadas usando 10,000 permutaciones, las comparaciones múltiples se ajustaron según la prueba de Bonferroni (Rice 1989). F_{ST} es considerado más apropiado que R_{ST} a menos que $R_{ST} > F_{ST}$, lo cual indica que la tasa de mutación no es despreciable en relación a la deriva (Hardy *et al.* 2003). Aunado a lo anterior los valores pareados de F_{ST} son más adecuados en detectar diferencias cuando los tamaños de las muestras son bajos ($n=10$; Harding 1996) y la diferenciación genética es baja (Graham 2012).

Todos las pruebas de diferenciación usando las F_{ST} pareadas fueron corregidos usando el método de corrección 'False discovery rate' según Narum (2006). Estudios recientes han sugerido que las correcciones de Bonferroni son muy severas y frecuentemente desestiman el número de poblaciones que son significativamente diferentes (Garamszegi 2006). Como las correcciones de Bonferroni (Rice 1989) son ampliamente reportadas se incluyeron ambos tipos de correcciones.

Para presentar las relaciones entre los grupos construí un árbol UPGMA en PAUP 4.0 (Swofford 2002) usando las F_{ST} pareadas. La estructura genética con microsatélites también

se evaluó mediante un análisis de coordenadas principales (PCA) en GenAlex 6.41 (Peakall & Smouse 2006). Una prueba de Mantel fue realizada en el programa IBDWS (Jensen *et al.* 2005) y se estimó el nivel de significancia con 10,000 permutaciones. Las distancias genéticas se calcularon a partir de la fórmula $F_{ST}/1-F_{ST}$ utilizando los valores obtenidos de las F_{ST} pareadas anteriormente calculadas en FSTAT. Las distancias geográficas (en km) se obtuvieron fueron las mismas que se obtuvieron para la prueba de Mantel en la mitocondria.

Adicional a los cálculos de F_{ST} pareadas, usé un método de asignación Bayesiano en STRUCTURE v.2.1 (Pritchard *et al.* 2000), el cual asigna probabilísticamente los genotipos a diferentes grupos (K) usando datos de loci múltiples. Se usó el modelo de ancestría 'Admixture' el cual es recomendado por Pritchard *et al.* (2000) para lidiar con muchas de las complejidades de poblaciones reales. Se utilizó la función LOCPRIOR la cual ayuda al agrupamiento cuando la señal de estructura es relativamente débil. Se usó el modelo de frecuencia alélica correlacionadas y se corrieron 10 cadenas para cada K, de K=1 a K=10. El 'burn-in' fue de 500,000 y el número de réplicas de Cadenas de Markov (MCMC) después del 'burn-in' de 1,000,000. Para determinar el valor más probable de grupos K calculé el estadístico 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). Los métodos Bayesianos son más conservadores que las F_{ST} pareadas ya que los métodos de agrupación se desempeñan mejor cuando los valores de $F_{ST} \geq 0.05$ y pueden dar poca estructura genética si los valores de $F_{ST} \leq 0.03$ (Latch *et al.* 2006).

El flujo génico contemporáneo (M) entre los grupos genéticos se estimó con los datos de microsatélites en MIGRATE v.3.2.19, utilizando el modelo de mutación Browniano. Se utilizó el modelo de máxima verosimilitud (Beerli & Felsenstein 2001) con tres cadenas largas y diez cortas con un 'burn-in' de 10,000. La primera genealogía fue iniciada con un árbol aleatorio, y los parámetros theta inicial (Θ) y la tasa de migración (M) se obtuvieron con cálculos de F_{ST} .

Cambios demográficos en el tamaño de la población

Se hicieron dos pruebas para determinar si los datos con microsatélites muestran alguna señal de expansión o contracción poblacional pasada. La prueba de heterocigocidad implementado en BOTTLENECK (Cornuet & Luikart 1996) se utilizó para detectar algún exceso de heterocigocidad (Piry *et al.* 1999). Los estimadores de heterocigocidad esperada bajo el equilibrio deriva-mutación, se calcularon bajo el modelo de mutación de dos fases (TPM two

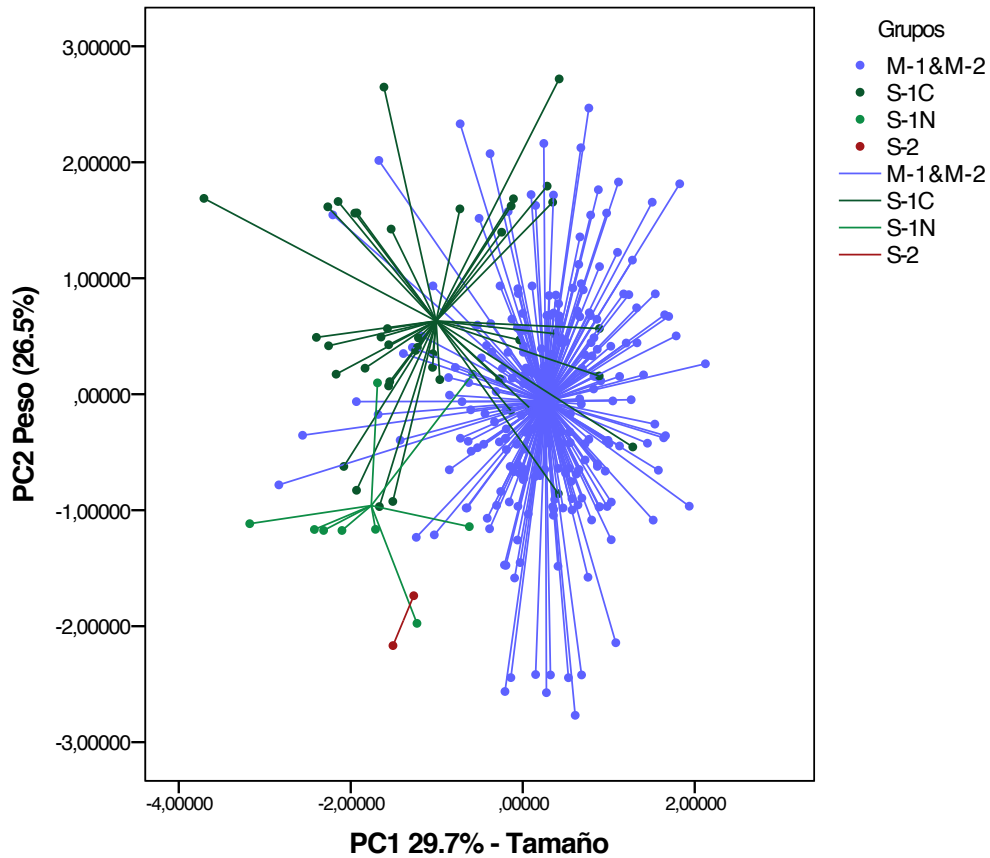
phase mutation model) como lo sugiere Cornuet & Luikart (1996). La proporción de mutaciones paso a paso se estableció a 90% y la varianza a 30. Se utilizó la prueba de Wilcoxon para evaluar la significancia con 10,000 repeticiones. El segundo fueron las pruebas de k y g las cuales detectan señales de expansión en las poblaciones ancestrales (Reich & Goldstein 1998; Reich *et al.* 1999; Bilgin 2007). Valores negativos de k en cada locus indica expansión de la poblaciones, la significancia de la proporción de valores positivos de k se basó en una distribución binomial con la probabilidad de una k positiva establecida a 0.515 (Reich *et al.* 1999). La significancia del valor de g se corroboró en Reich *et al.* (1999).

Resultados

Variación morfológica

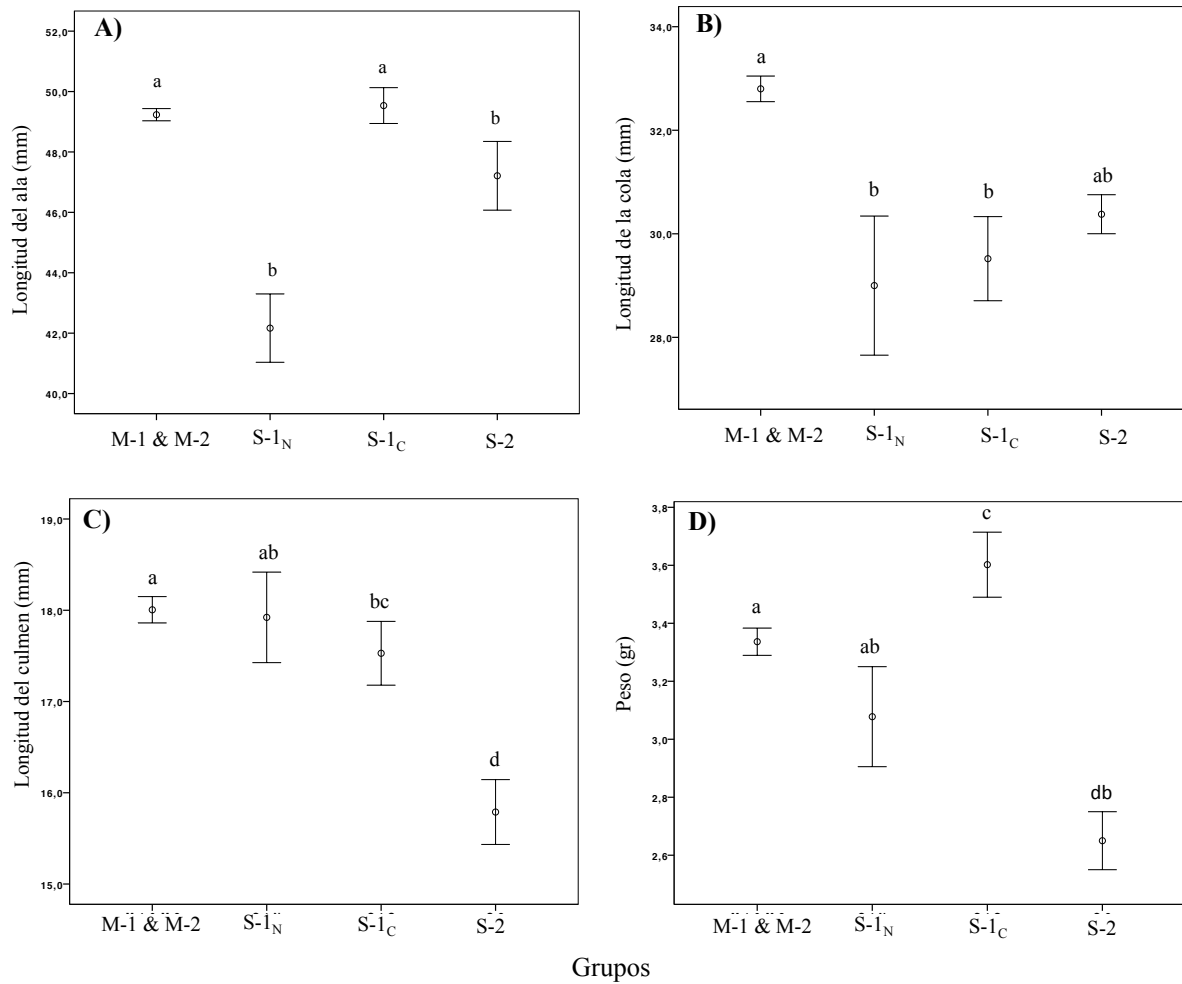
En el análisis de PCA, se extrajeron dos componentes principales (PCs) que en conjunto explicaron el 56.2% de la varianza total (PC1=29.7%, PC2=26.5%). El tamaño (ala, cola y culmen) explicó principalmente el PC1, mientras que el PC2 fue explicado principalmente por el peso. El análisis de MANOVA fue significativo (Wilks' Lambda $F_{6,556} = 27.266$, $P < 0.000$). La ANOVA de una vía mostró diferencias significativas para los resultados de los dos PCs (PC1, $F_{3,282} = 43.99$, $P < 0.000$); (PC2, $F_{3,282} = 12.54$, $P < 0.000$) (Figura 3).

Figura 3. Evaluación de la dispersión entre los componentes PC1 (tamaño) y PC2 (peso). Los círculos azules indican el grupo de migratorios M-1 & M-2, los verde claro el grupo de sedentarias S-1_N, los verde oscuros el grupo de sedentarias S-1_C, y los color vino al grupo de sedentarias S-2. Los puntos de cada grupo se encuentran unidos a su respectivo centroide mediante líneas del mismo color.



El análisis de MANOVA para las cuatro variables morfológicas muestra diferencias significativas entre los grupos (Wilks' Lambda $F_{12,730} = 25.9$, $P < 0.0001$). Las ANOVAs de una vía muestran diferencias significativas para las cada una de las cuatro variables morfológicas (Longitud del ala: $F_{3,282} = 56.3$, $P < 0.0001$; Longitud de la cola: $F_{3,282} = 39.1$, $P < 0.0001$; Longitud del culmen: $F_{3,282} = 6.6$, $P < 0.0001$; Peso: $F_{3,282} = 10.9$, $P < 0.0001$). Los contrastes multivariados de Tukey pueden verse en la Figura 4.

Figura 4. Resultado del análisis de varianza múltiple (MANOVA) para las cuatro medias morfológicas colectadas para *Selasphorus platycercus*. A) Longitud del ala, B) Longitud de la cola, C) Longitud del culmen, D) Peso. Los individuos se agruparon según el status de migración y la zona en que fueron colectados en M-1 & M-2, S-1_N, S-1_C, S-2.



ADN mitocondrial

Variación y diferenciación genética

Para todos los análisis de ADN mitocondrial se utilizaron un total de 105 individuos provenientes de 13 localidades. Se obtuvo un total de 353 pb para ND2, 532 pb para la Región Control y 885 pb para la matriz concatenada, identificándose en total 58 haplotipos (Tabla 2, ver también Anexo1 para ver la lista detallada de los haplotipos así como sus frecuencias). Se encontraron altos niveles de diversidad de haplotipos (h) en la mayoría de las poblaciones 0.857 a 1.000. Cabe mencionar que el tamaño de muestra en muchas poblaciones es pequeño por lo tanto el valor de h es más cercano a 1, sin embargo, las poblaciones para las cuales el número de muestras es mayor (Neva, Palm, Tlax_sed, Tlax_mig y Chis) los valores de h también son altos, mostrando una alta diversidad de haplotipos en todas las poblaciones. Los valores de diversidad de nucleótidos (π) para las localidades fue de 0.00226-0.00753, indicando pocos cambios en las secuencias dentro de la misma población (Tabla 2).

Tabla 2. Número de individuos analizados para el ADNmt (n), número de haplotipos por localidad (H), número de sitios segregantes (S), diversidad genética (h) y diversidad nucleotídica (π).

ADN Mitocondrial					
Localidad	n	H	S	h	π
1. Hollowell (Colo)	10	7	13	0.911±0.077	0.0046±0.0028
2. Mountain Lemon (Mole)	6	6	13	1.000±0.096	0.0053±0.0035
3. Paradise (Para)	3	3	10	1.000±0.272	0.0075±0.0060
4. El Coronado Ranch (Coro)	3	3	5	1.000±0.272	0.0037±0.0032
5. South Western R. Station (Swrs)	2	2	2	1.000±0.500	0.0022±0.0027
6. Garden Canyon (Gaca)	1	1	0	-	-
7. El Palmito (Palm)	10	10	16	1.000±0.044	0.0046±0.0028
8. Volcán Nevado de Colima (Neva)	27	17	21	0.954±0.023	0.0038±0.0022
9. Cerro El Potosí (Nule)	6	5	13	0.933±0.121	0.0056±0.0036
10. Arteaga (Coah)	1	1	0	-	-
11. Eloxochitlán (Hida)	1	1	0	-	-
12a. Volcán la Malinche (Tlax_sed)	18	11	13	0.934±0.040	0.0031±0.0020
12b. Volcán la Malinche (Tlax_mig)	9	7	11	0.944±0.070	0.0037±0.0024
13. Volcán Tacaná (Chis)	8	5	11	0.857±0.108	0.0045±0.0028

La comparación entre los valores de N_{ST} (0.251, ES = 0.1821) y G_{ST} (0.026, ES = 0.0143) indican que el valor de N_{ST} es significativamente mayor que G_{ST} ($P < 0.05$), lo cual sugiere que hay estructura filogeográfica entre las poblaciones de *Selasphorus platycercus*.

Los niveles de diferenciación en la AMOVA donde no se definieron grupos *a priori*, el mayor porcentaje de la variación fue explicado por diferencias dentro de las poblaciones

(76.76%), mientras que el 23.24% restante fue explicado por las diferencias entre poblaciones, siendo el valor de F_{ST} significativo ($F_{ST}= 0.232, P < 0.001$) (Tabla 3). En la AMOVA donde se agrupó Chiapas vs. el resto, el mayor porcentaje de variación (63.39%) fue explicado por diferencias entre los grupos, mientras que la variación dentro de las poblaciones fue de 36.02% y sólo el 0.58% por las diferencias entre poblaciones dentro de los grupos, sin embargo, el valor de la F_{CT} no fue significativo ($F_{CT}= 0.63, P = 0.07$) (Tabla 3). En la AMOVA donde se hicieron tres grupos (M-1 & M-2, S-1 y S-2), el mayor porcentaje de la variación está dado por diferencias dentro de las poblaciones (64.46%), con un menor porcentaje explicado por las diferencias entre grupos (36.12%) y entre poblaciones dentro de los grupos (-0.58%), siendo el valor de la F_{CT} significativo ($F_{CT}= 0.36, P = 0.02$) (Tabla 3). Finalmente para la AMOVA donde se agrupó en cuatro grupos, (M-1 & M-2, S-1_N, S-1_C y S-2), la mayor variación fue explicada por las diferencias dentro de las poblaciones (65.20%), la variación entre grupos fue del 36.23% y la variación entre poblaciones dentro de los grupos fue de -1.43%, siendo el valor de F_{CT} significativo ($F_{CT}=0.36, P= 0.03$) (Tabla 3). En resumen, la variación entre grupos está mejor explicada cuando se agrupa en cuatro (último modelo).

Tabla 3. Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVA) de *Selasphorus platycercus*. (a) sin agrupar las localidades, (b) agrupando S-2 vs. resto, (c) agrupando M-1 & M-2, S-1 y S-2, (d) agrupando M-1 & M-2, S-1_N, S-1_C y S-2. * son los valores que fueron significativos.

Fuente de variación	g.l.	suma de cuadrados	Componente de variación	Porcentaje de variación	índices de fijación
a) sin grupos definidos					
Entre poblaciones	13	78.27	0.59	23.24	
Dentro poblaciones	91	175.95	1.93	76.76	Fst = 0.23*
Total	104				
b) Chiapas vs el resto					
Entre grupos	1	52.49	3.40	63.39	Fct = 0.63
Entre poblaciones dentro de los grupos	12	25.78	0.03	0.58	Fsc = 0.01*
Dentro poblaciones	91	175.95	1.93	36.02	Fst = 0.63*
Total	104	254.22	5.36		
c) Chis vs S-1 vs M-1 & M-2					
Entre grupos	2	57.09	1.07	36.12	Fct=0.36*
Entre poblaciones dentro de los grupos	11	19.92	-0.01	-0.58	Fsc = -0.009*
Dentro poblaciones	91	174.47	1.91	64.46	Fst = 0.35*
Total	104	251.48	2.97		
d) S-2 vs S-1 centro vs S-1 norte vs M-1 & M-2					
Entre grupos	3	60.35	1.06	36.23	Fct = 0.36*
Entre poblaciones dentro de los grupos	10	16.66	-0.04	-1.43	Fsc = -0.02
Dentro poblaciones	91	174.47	1.91	65.2	Fst = 0.34*
Total	104	251.48	2.93		

En la tabla de las F_{ST} pareadas para todas las poblaciones de un total de 55 comparaciones, 13 fueron significativamente diferentes de cero ($P < 0.05$) (Tabla 4). Se observa que todas las comparaciones entre la población de Chiapas contra el resto de las poblaciones resultaron significativas, es decir que Chiapas está genéticamente diferenciada del resto. También, cuatro de las comparaciones entre la población sedentaria de Tlaxcala (Tlax_sed) fueron significativas (i.e. vs. Neva, Palm, Mole y Chis). Las comparaciones entre la población sedentaria de Nuevo León no fueron significativamente diferentes de las demás, así como tampoco se encontraron diferencias entre poblaciones de individuos migratorios, lo cual significa que hay muy poca o ninguna diferenciación genética entre ellas (Tabla 4). La comparación de F_{ST} pareadas entre los grupos (Tabla 8), soporta que el grupo de sedentarias S-2 es significativamente diferente del resto (i.e. M-1 & M-2, S-1_N y S-1_C). La comparación fue significativa entre S-1_C/M-1 & M-2, mientras que la comparación S-1_C/S-1_N fue marginalmente significativa. No se encontraron diferencias entre el grupo de sedentarias del norte de México S-1_N y las migratorias M-1 & M-2.

Tabla 4. Valores de F_{ST} pareadas para todas las localidades de colecta basados en ADNmt (debajo de la diagonal) y microsatélites (arriba de la diagonal). Los valores de $P < 0.05$ están indicadas en negritas. * indican las comparaciones que se mantuvieron significativas después de las correcciones de Bonferroni ($P_{ADNmt} = 0.0009$ y $P_{SSR} = 0.001$) así como con las correcciones siguiendo la corrección 'False discovery rate' ($P_{ADNmt} = 0.010$ y $P_{SSR} = 0.011$), + indican las comparaciones que se mantuvieron solamente con 'False discovery rate'.

	Colo	Mtle	Para	Coro	Swrs	Palm	Neva	Nule	Tlax_mig	Tlax_sed	Chis
Colo	0	-0.0203	-0.0279	0.0148	0.0025	0.0199	-0.0108	0.0128	-	-0.0053	0.0559
Mtle	-0.063	0	0.0055	0.0074	0.02	0.0114	-0.0063	-0.0021	-	-0.011	0.0334
Para	-0.060	-0.121	0	0.1102	0.093	-0.009	-0.0443	-0.0378	-	-0.0374	0.068
Coro	-0.058	-0.083	-0.098	0	0.1939	0.0395	-0.0124	0.0248	-	0.0249	0.0503
Swrs	-0.057	0.000	-0.073	-0.036	0	0.0665	0.0695	-0.0069	-	-0.0049	0.1426
Palm	-0.018	-0.040	-0.070	-0.070	-0.069	0	0.0133	-0.0223	-	0.0102	0.0869**
Neva	0.009	-0.062	0.016	-0.050	0.048	0.030	0	-0.0119	-	0.0059	0.0579
Nule	-0.059	-0.091	-0.086	-0.097	-0.084	-0.018	-0.035	0	-	-0.006	0.0711+
Tlax_mig	-0.058	-0.054	-0.070	-0.024	-0.034	-0.045	0.007	-0.059	0	-	-
Tlax_sed	0.044	0.132+	0.098	0.061	-0.036	0.077	0.145+	0.070	0.067	0	0.0736**
Chis	0.621**	0.591**	0.569+	0.598+	0.656+	0.622**	0.639**	0.587**	0.653**	0.684**	0

El análisis de aislamiento por distancia realizado con la prueba de Mantel donde se incluyeron todas las poblaciones indicó que existe una correlación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética ($r = 0.4111$, $P = 0.006$), es decir que entre mayor distancia geográfica entre las poblaciones mayor es la diferenciación genética entre ellas, lo cual concuerda con el análisis de F_{ST} pareadas (Tabla 4, Tabla 8), donde Chiapas está genéticamente diferenciado del las demás pero además está geográficamente aislado del resto. Se realizó un segundo análisis de Mantel donde quité Chiapas y dejé todas las poblaciones que se encuentran al este del Istmo de Tehuantepec. La prueba indicó que no existe una correlación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética ($r = 0.2907$, $P = 0.0642$), es decir que entre mayor es la distancia geográfica las poblaciones no están genéticamente más diferenciadas entre sí.

Relaciones entre haplotipos

Las topologías tanto del árbol consenso de inferencia Bayesiana como el árbol de máxima verosimilitud fueron muy similares, en general soportando los mismos clados por lo cual solo el árbol de inferencia bayesiana es mostrado (Figura 5). Los dos árboles soportan la separación en dos subclados de los haplotipos entre subespecies (Chiapas vs. el resto), con una probabilidad posterior de 1.0 y un valor de bootstrap de 100. En el primer subclado se encuentran las poblaciones migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus*, el cual tiene un soporte de probabilidad posterior de 0.82 y 74 de bootstrap. El segundo clado aunque con un valor de probabilidad posterior de 0.51 y bootstrap de 50, agrupa todos los haplotipos pertenecientes a la subespecie *S. p. guatemalae* de la localidad de Chiapas, lo cual concuerda con los resultados de estructuración genética (F_{ST} pareadas) y con la red de haplotipos (Figura 6). El porcentaje de divergencia no corregida entre secuencias de los clados anteriores es de 1.19%.

En la red de haplotipos se identifican dos grupos genéticos conectados entre sí por cinco pasos mutacionales (Figura 6). El primer grupo está formado por 53 haplotipos de individuos muestreados entre las poblaciones migratorias (azules) y las sedentarias del centro (verde oscuro) y norte de México (verde claro). Los haplotipos más frecuentes para el primer grupo fueron el H3, H7, H8 y H11, donde el haplotipo (H8) están compartidos entre las poblaciones migratorias y sedentarias mientras que el H3, H7 y H11 son exclusivos de la población migratoria. En total, las poblaciones migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus* comparten 6 haplotipos. En este primer grupo genético aunque se comparten haplotipos entre migratorios y sedentarios hay haplotipos exclusivos para cada grupo. El segundo grupo genético está formado por 5 haplotipos de individuos colectados en Chiapas (color vino) los cuales pertenece a la subespecie *S. p. guatemalae* y donde no comparten haplotipos con ninguna de las otras localidades (Figura 6). Hubieron dos haplotipos privados para el grupo de sedentarias S-1_N (H52 y H53), nueve haplotipos privados para las sedentarias S-1_C (H18, H19, H20, H21, H27, H28, H32, H47, H48), cinco haplotipos privados para las sedentarias S-2 (H54, H55, H56, H57, H58), seis haplotipos compartidos entre poblaciones migratorias y sedentarias (H1, H8, H24, H26, H41, H49) y los restantes 36 haplotipos son privados para las poblaciones migratorias.

Figura 5. Filograma consenso de inferencia Bayesiana para *S. platycercus*. Se muestran los valores de las probabilidades posteriores y los valores de máxima verosimilitud. Valores menores a .70/70 (de probabilidad posterior y máxima verosimilitud respectivamente) no se muestran. Círculos azules = M-1&M-2, verde oscuro = S-1_C, verde claro = S-1_N, vino = S-2. Los círculos combinados son haplotipos compartidos entre cualquiera de las combinaciones anteriores.

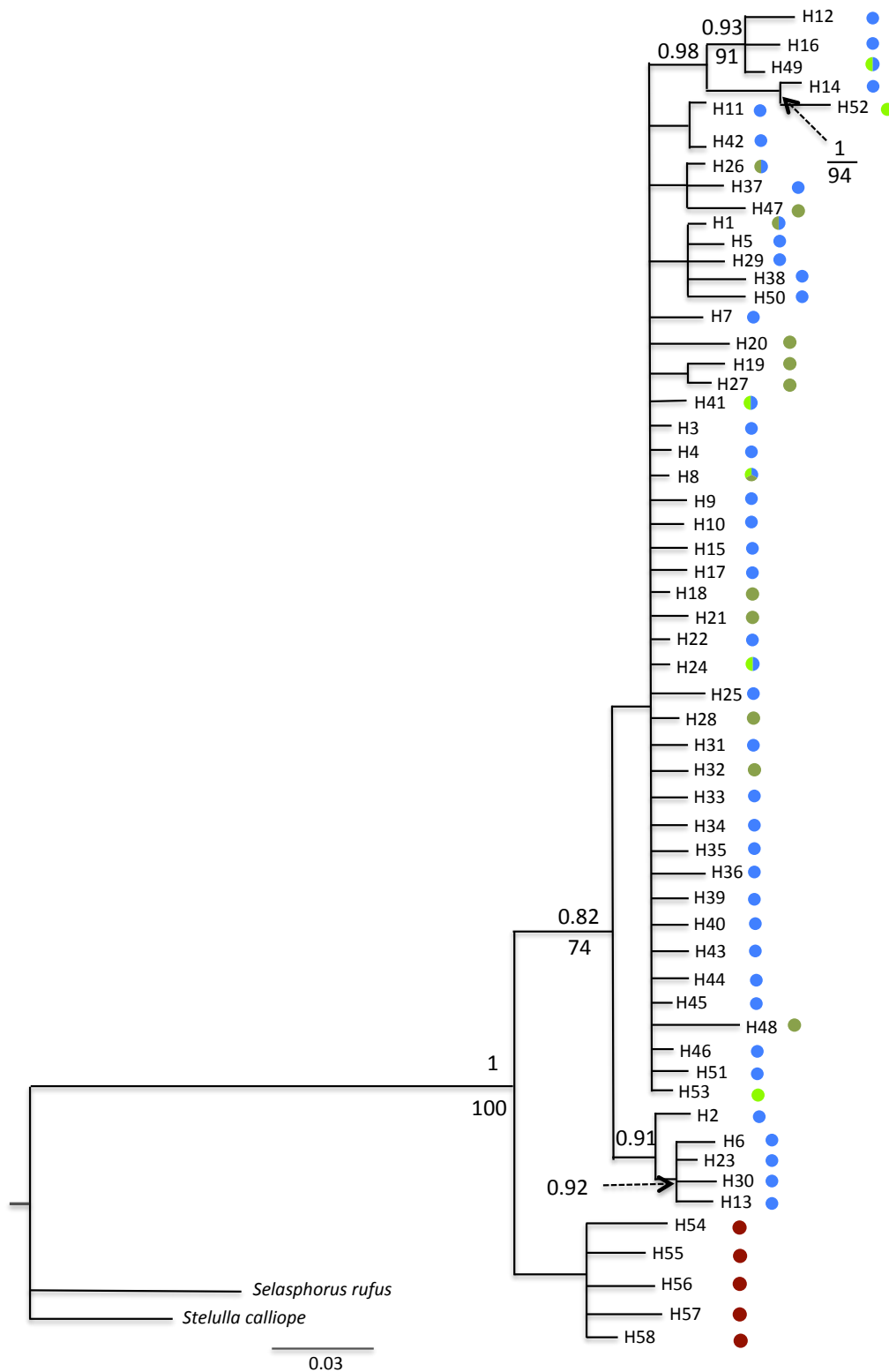
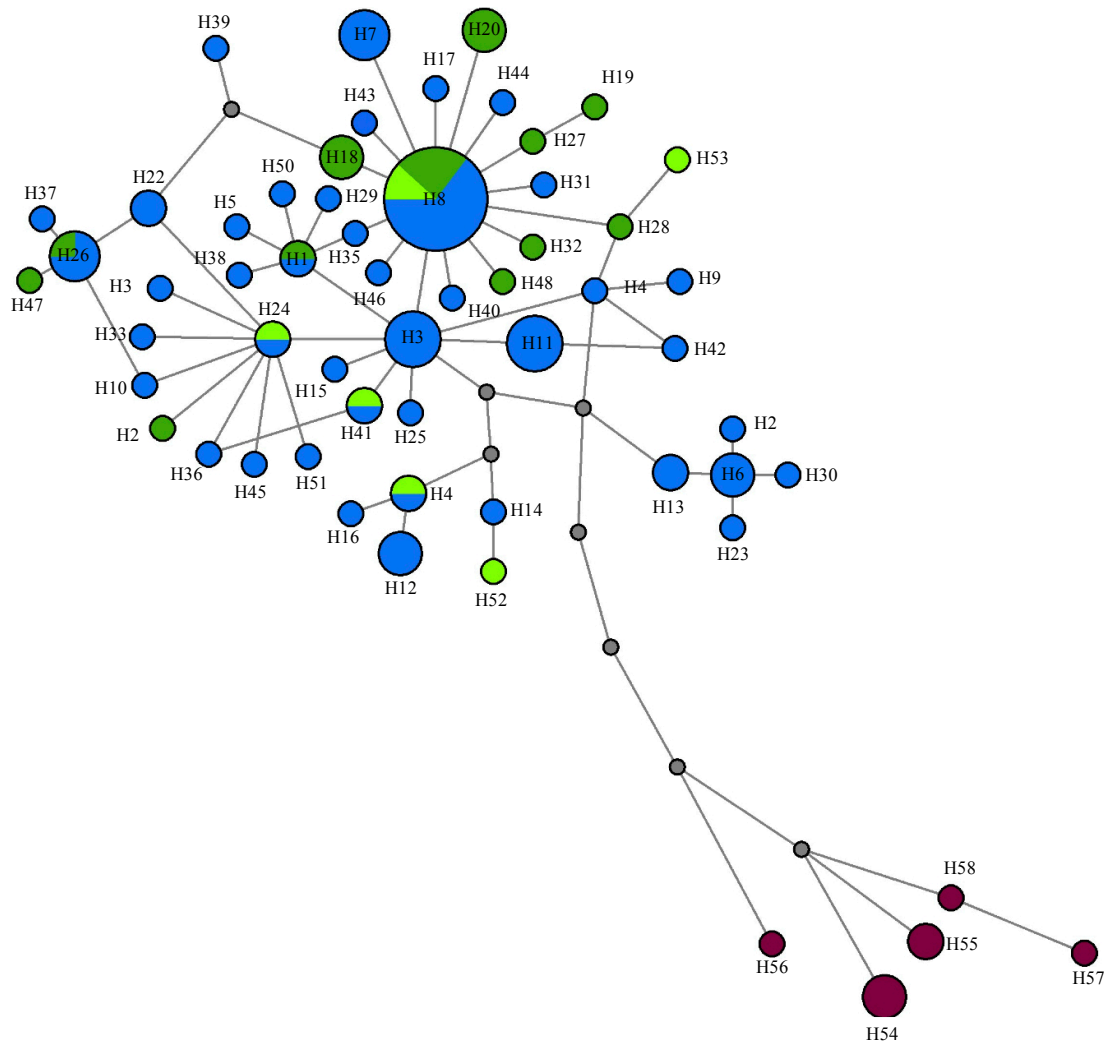


Figura 6. Red de haplotipos median-joining para *Selasphorus platycercus*. El color azul representa las poblaciones migratorias, el verde oscuro las poblaciones sedentarias del centro México, el verde claro las poblaciones sedentarias del norte de México y el color vino la población de Chiapas. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del haplotipo, los círculos grises y más pequeños representan los haplotipos no muestreados y las líneas son cambios mutacionales entre haplotipos.



Pruebas de expansión demográfica

Las poblaciones de individuos migratorios (M-1 & M-2, M-1) así como de los sedentarios del centro de México (S-1_C) muestran que hubo una expansión poblacional reciente (Tabla 5). Los valores de la prueba de Fu son valores negativos altos y significativos (Migratorias M-1 & M-2, $F_u = -26.041$, $P < 0.05$; Migratorias M-1, $F_u = -12.409$, $P < 0.05$; Sedentarias S-1_C, $F_u = -9.385$, $P < 0.05$) (Tabla 5). En contraste, la prueba de Fu muestra que en las poblaciones sedentarias del norte de México (S-1_N) y Chiapas (S-2) no hubo una expansión poblacional

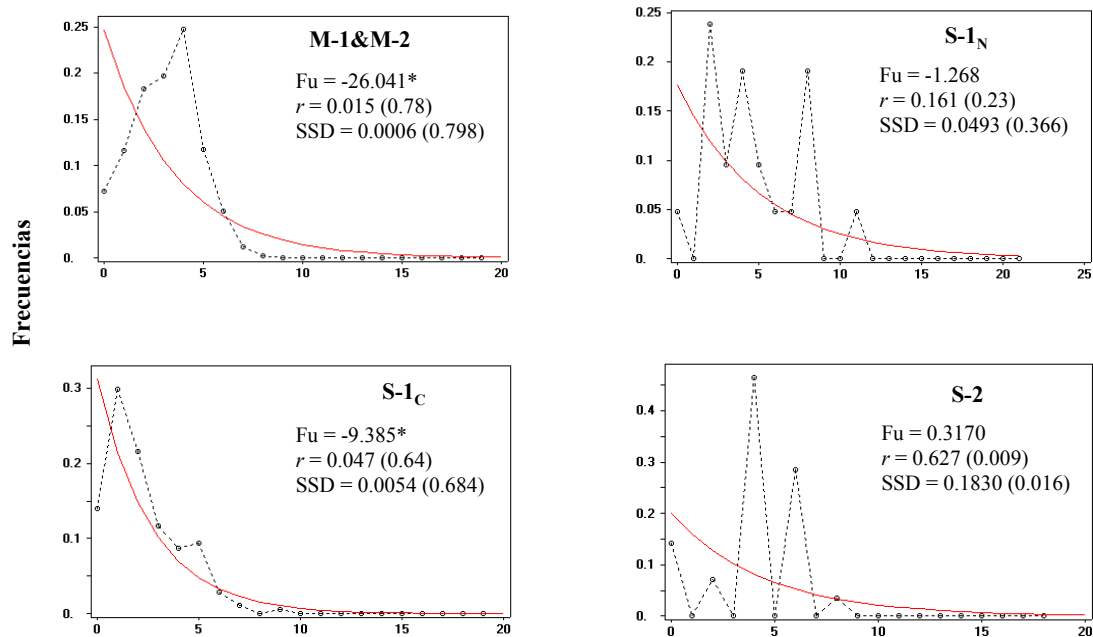
reciente (Sedentarias S-1_N, Fu = -1.268, $P > 0.05$, Sedentarias S-2, Fu = 0.3170, $P > 0.05$) (Tabla 5).

Los valores de la prueba D de Tajima en general muestran valores negativos lo cual significa un exceso de polimorfismos de baja frecuencia en relación a lo esperado, lo que puede sugerir expansión en la población. La prueba de D de Tajima fue significativa para el grupo de Migratorias M-1 & M-2 así como para el grupo de sedentarios S-1_C, sugiriendo expansión poblacional. La prueba no dio significativa para el grupo de migratorias M-1, para el grupo de sedentarias S-1_N y S-2.

Grupos	r	Fu	Dt	SSD	SSD P
1. Migratorias (M-1 & M-2)	0.015 (0.78)	-26.041 *	-1.548*	0.0006	0.798
2. Migratorias (M-1)	0.029 (0.31)	-12.409*	-1.145	0.0086	0.193
3. Sedentarias (S-1 _N)	0.161(0.23)	-1.268	-1.009	0.0493	0.366
4. Sedentarias (S-1 _C)	0.047 (0.64)	-9.385*	-1.662 *	0.0054	0.684
5. Sedentarias (S-2)	0.627 (0.009)	0.3170	-0.285	0.1830	0.016

Tabla 5. Pruebas de expansión demográfica. Índice Harpending's raggedness con valor de significancia entre paréntesis (r), test de Fu (Fu), D de Tajima (Dt), suma de cuadrados de la desviación (SSD), valor de significancia de SSD (SSD P).

La prueba y la forma de la distribución mismatch del grupo de las migratorias y sedentarias del centro de México se ajusta al modelo de expansión poblacional reciente (Migratorias M-1 & M-2, SSD = 0.0006, $P = 0.798$, $r = 0.015$ (0.78); Migratorias M-1, SSD = 0.0086, $P = 0.193$, $r = 0.029$ (0.31); S-1_C, SSD = 0.005, $P = 0.684$, $r = 0.047$ (0.64)). Aunque la distribución mismatch para el grupo de sedentarias del norte de México es bimodal, el estadístico SSD y el índice Harpending's raggedness' no fueron significativos por lo cual no soportan una población estable, lo cual contrasta con las pruebas de Fu y D de Tajima (Sedentarias S-1_N, SSD = 0.049, $P = 0.366$, $r = 0.161$ (0.23)). En contraste la prueba no apoya la expansión poblacional para el grupo de sedentarias S-2 de Chiapas, la cual muestra una distribución mismatch bimodal (Sedentarias S-2, SSD = 0.1830, $P = 0.016$, $r = 0.627$ (0.009)). Esto concuerda con la prueba de Fu y D de Tajima.



Diferencias pareadas

Figura 7. Distribuciones mismatch por grupo. Para cada grupo están los valores de la prueba de F_u , y los estadísticos SSD (con la significancia entre paréntesis) y el índice Harpending's (con la significancia entre paréntesis).

El análisis bayesiano 'Skyline-plot' sugiere que en las poblaciones migratorias M-1 & M-2 hubo un incremento en el N_e (tamaño efectivo de la población) de 20,000 a 40,000 años atrás aproximadamente, donde la mayor expansión se fue hace 25,000 años, fechas anteriores al UGM. Para la población S-1_C parece haber un incremento gradual pero constante a lo largo de 60,000 años. Mientras que para las sedentarias S-1_N y S-2 no hubo incremento en el N_e . El análisis con el parámetro demographic.populationSizeChanges indicó de 0 a 2 cambios en el N_e de la población. Para la población M-1 & M-2 los cambios en la población fueron muestreados más frecuentemente con 1 cambio ($0 < 200$, $1 \approx 24,000$). Para las sedentarias del centro de México S-1_C la frecuencia de los cambios también fue mayor en 1 ($0 \approx 700$, $1 \approx 12,500$, $2 \approx 6000$) lo cual sugiere que en ambos grupos la expansión poblacional se dio una sola vez a lo largo del tiempo.

Estimaciones de flujo genético histórico

El número de inmigrantes entre grupos por generación (Nm) fue asimétrico. El mayor intercambio de individuos se da en dirección norte-sur de migratorios M-1 & M-2 a sedentarias del centro de México S-1_C (42.86). Hay un intercambio casi simétrico entre las

sedentarias del norte de México S-1_N con las migratorias M-1 & M-2 (31.81) y con sedentarias del centro de México S-1_C (30.56). El número de migrantes que intercambia las sedentarias del centro S-1_C con el resto es en general de 0. De igual forma, el intercambio de migrantes entre el grupo de sedentarias S-2 y el resto fue en general de 0 en ambas direcciones. Por los resultados anteriores, se podría decir que el patrón de intercambio génico es asimétrico y que la magnitud de intercambio es mayor de norte a sur que viceversa.

Tabla 6. Número de inmigrantes (Nm) por generación entre grupos de *Selasphorus platycercus* estimados con Máxima Verosimilitud en MIGRATE para la mitocondria. La primera columna de la izquierda representa el grupo de donde provienen los migrantes.

	M-1 & M-2	S-1_N	S-1_C	S-2
M-1 & M-2	-	15.56	42.86	3.54E-15
S-1_N	31.81	-	30.56	7.64E-13
S-1_C	1.90E-15	7.68E-16	-	7.68E-16
S-2	0.37	3.25E-12	3.15E-12	-

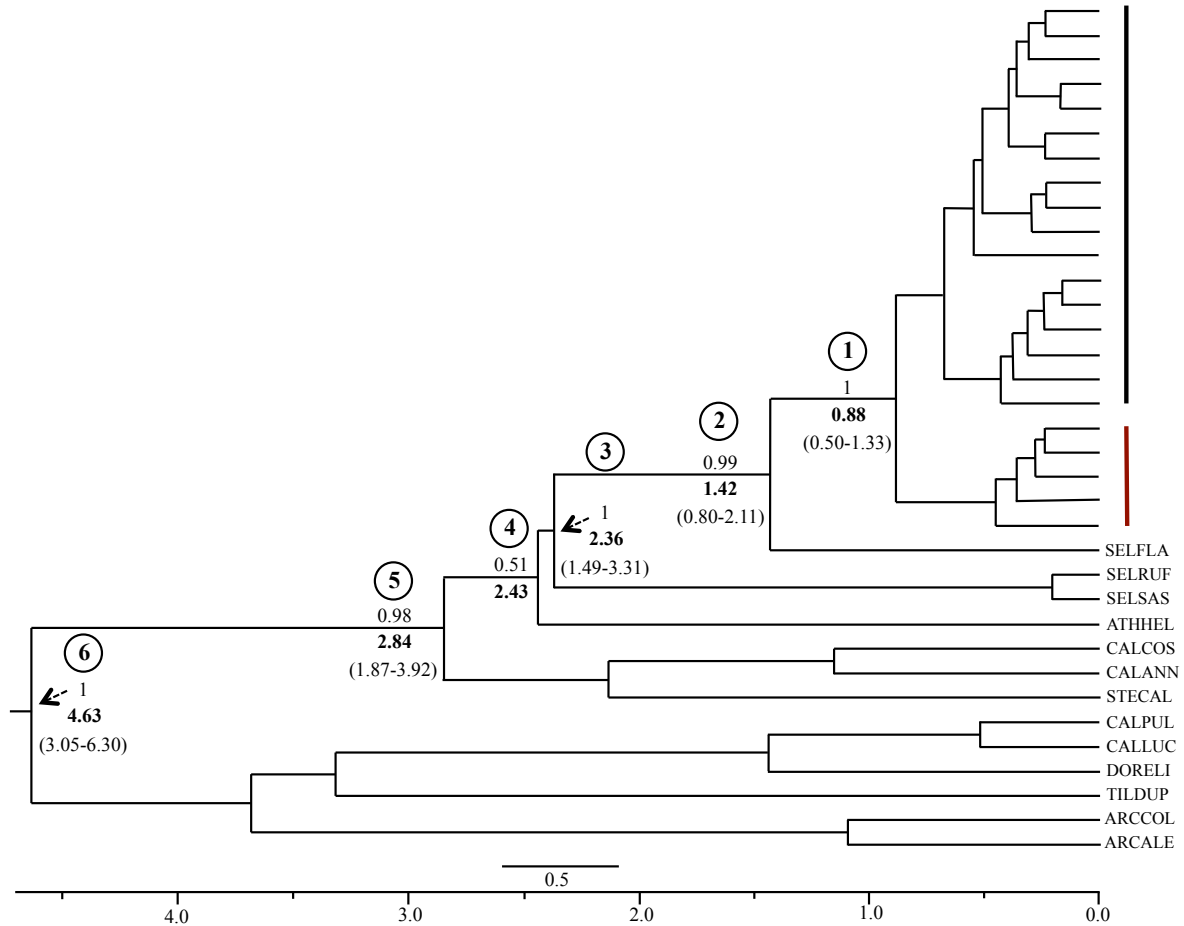
Para los análisis en IMA, los valores de los tamaños efectivos de la muestra (EES por sus siglas en inglés) de los parámetros fueron de 53 a 374 en el primer análisis y de 65 a 221 en el segundo. Los valores reportados son los promedio de las estimaciones de los parámetros para las cuatro corridas y el 90% de las densidades de probabilidades posteriores (HDP por su siglas en inglés). Los resultados para el primer análisis (*S. platycercus* vs. *S. guatemalae*) se describen a continuación. La población ancestral (q_A) se estima fue de 119,000 (HPD 6,770 - 454,000) y los tamaños de las poblaciones descendientes fue de $q_1 = 1,410,000$ (HPD 823,000 - 2,400,000) para *S. platycercus* y $q_2 = 120,000$ (HPD 34,000 - 467,000) para *S. guatemalae*. Las tasas de migración entre los grupos genéticos (m_{2-1} y m_{1-2}) fueron de 0.00444 (HPD 0.00258 - 6.24) individuos por generación en dirección Chiapas vs. resto, y de 0.00189 (HPD 0.000534 - 8.52) individuos por generación en la dirección opuesta. En el segundo análisis quisimos explorar el tiempo de divergencia entre sedentarios del centro de México (S-1_C) y las migratorias (M-1 & M-2) y si la divergencia ocurrió en presencia de flujo génico. La población ancestral (q_A) se estima fue de 62,800 (HPD 2,990 - 450,000) y los tamaños de las poblaciones descendientes fue de $q_1 = 922,000$ (HPD 372,000 - 2,510,000) para M-1 & M-2 y $q_2 = 463,000$ (HPD 111,000 - 5,430,000) para S-1_C. Las tasas de migración fueron de 16.60 (HPD 0.0283 - 16.30) individuos por generación en dirección S-1_C a M-1 & M-2 y de 0.0129

(HPD 0.00312 – 25.50) individuos por generación en la dirección contraria, es decir, que durante la divergencia hubo flujo génico de sedentarios a migratorios pero no de migratorios a sedentarios. El tiempo de divergencia estimado entre estos grupos fue de 56,900 años (HPD 17,200 – 98,900 años).

Tiempo al ancestro común mas reciente (TMRCA)

Con base a el gen ND2, el tiempo de divergencia entre las dos subespecies (nodo1) es de 0.88 millones de años (Ma.) (Figura 8). A su vez *Selasphorus platycercus* diverge de *Selasphorus flammula* (nodo 2) que se distribuye en centro América alrededor de 1.42 Ma. Una divergencia más antigua (nodo 3) es apoyada entre las especies anteriores y los *Selasphorus* de Norte América (*S. rufus* y *S. sasin*) hace 2.36 Ma. Los tiempo de divergencia obtenidos a partir de la matriz concatenada (árbol no mostrado) apoya que la divergencia del nodo 1 es de 0.56 Ma (0.33-0.81 Ma.), dicha divergencia está apoyada con un probabilidad posterior de 1.

Figura 8. Árbol de estimación de tiempos de divergencia utilizando el gen ND2. Los valores dentro del círculo representa el nodo, los valores debajo de la rama representan el tiempo de divergencia del nodo en millones de años y los intervalos, el valor arriba de la rama es la probabilidad posterior. La línea negra muestra a la subespecie *S. p. platycercus* y la roja a *S. p. guatemalae*.



Microsatélites

Variación genética y equilibrio de Hardy-Weinberg

Un total de 71 individuos y 8 loci fueron amplificados, se calculó la diversidad genética combinando los ocho loci para cada población (Tabla 7). A través de todas las localidades muestreadas, el número de alelos varió de 11 en Gaca y Coah a 53 en Tlax_sed. El número de alelos promedio varió de 1.37 en Gaca y Coah a 6.62 en Tlax_sed, mientras que el número de alelos privados entre 1 en Swrs y Coro a 4 para Tlax_sed. La riqueza alélica por localidad tuvo valores de 1.38 en Coah a 1.71 en Para. No se encontraron evidencias de errores de genotipificación en Micro-Checker v. 2.23 (Van Oosterhout *et al.* 2004).

Los valores de heterocigocidad observada no se desviaron consistentemente del Equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 7), solamente tres localidades (Colo, Tlax_sed y Chis)

estuvieron desviadas del Equilibrio de H-W para el locus HumB10 después de las correcciones de Bonferroni ($P \leq 0.0004$). Al analizar las tres localidades en Micro-Checker se sugiere la presencia de alelos nulos. El resto de las poblaciones no se desviaron del Equilibrio de Hardy-Weinberg para ninguno de los loci. Las pruebas de desequilibrio de ligamiento mostraron que ninguna de las comparaciones locus/localidad fueron significativas después de las correcciones de Bonferroni ($P \leq 0.000027$).

Estructura genética poblacional y flujo génico contemporáneo

La F_{ST} global obtenida en FSTAT combinando todos los loci fue de 0.015 y resultó significativamente diferente de cero ($P = 0.005$), lo cual sugiere diferenciación entre las poblaciones. Para los valores de F_{ST} pareadas entre localidades, en general Chiapas es la única población con valores diferentes significativamente del resto, sin embargo, después de la corrección de Bonferroni ($P \leq 0.001$) solo dos comparaciones se mantuvieron significativas Chis/Tlax_sed y Chis/Palm (Tabla 4). Como anteriormente se había mencionado las pruebas de Bonferroni pueden resultar muy severas y a menudo desestiman el número de poblaciones que son significativamente diferentes (Garamszegi 2006). Se hicieron las correcciones múltiples siguiendo el método de Narum (2006) y la comparación Chis/Nule resultó significativa, mientras que las demás no resultaron significativas. Los valores de P para las poblaciones Colo y Swrs estuvieron un poco por encima del valor crítico de $P = 0.011$.

Como el número de individuos por población en varias localidades es menor a lo recomendado ($n=10$; Harding 1996, tomado de Graham 2012), se calcularon las F_{ST} pareadas agrupando a las localidades en cuatro grupos: i) poblaciones migratorias M-1 & M-2, ii) poblaciones sedentarias S-1_N, iii) población sedentaria S-1_C, y iv) sedentarias S-2 de Chiapas. Los valores de F_{ST} fueron de -0.0030 para M-1 & M-2/S-1_N indicando que no hay diferenciación genética entre estos grupos a 0.0732 para S-1_C/S-2 lo que indica 'moderada' diferenciación genética entre los grupos según Wright (1978). Los valores de P de las F_{ST} pareadas se mantuvieron significativas después de las correcciones cuando se compara Chiapas contra el resto, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de migratorias M-1 & M-2 contra los grupos de sedentarias S-1_N y S-1_C (Tabla8).

Tabla 7. Número de individuos analizados para los microsatélites (NSSR), número promedio de alelos por locus (PA/locus), riqueza alélica (RA), Número de alelos privados (AP), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He). Los valores de Ho con asterisco significan las poblaciones que estuvieron desviadas del HWE después de las correcciones de Bonferroni para el locus HumB10.

ADN Microsatélites

Localidad	NSSR	PA/locus	RA	AP	Ho	He
1. Hollowell (Colo)	8	5.00	1.63	3	0.484*	0.592
2. Mountain Lemon (Mole)	6	4.25	1.61	0	0.128	0.118
3. Paradise (Para)	2	2.75	1.71	0	0.625	0.531
4. El Coronado Ranch (Coro)	3	2.62	1.53	1	0.541	0.432
5. South Western R. Station (Swrs)	2	2.12	1.50	1	0.562	0.375
6. Garden Canyon (Gaca)	1	1.37	1.50	0	-	-
7. El Palmito (Palm)	6	4.37	1.67	0	0.517	0.605
8. Volcán Nevado de Colima (Neva)	9	5.87	1.67	2	0.560	0.630
9. Cerro El Potosí (Nule)	6	4.75	1.70	2	0.541	0.639
10. Arteaga (Coah)	1	1.37	1.38	0	-	-
11. Eloxochitlán (Hida)	1	1.75	1.75	0	-	-
12a. Volcán la Malinche (Tlax_sed)	17	6.62	1.65	4	0.534*	0.629
12b. Volcán la Malinche (Tlax_mig)	0	-	-	-	-	-
13. Volcán Tacaná (Chis)	9	4.37	1.57	3	0.407*	0.532

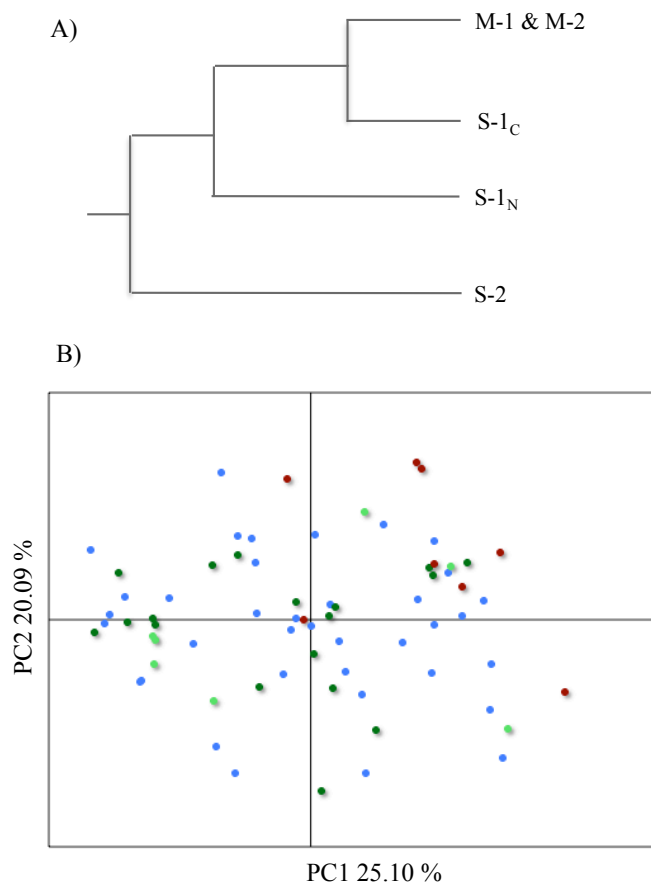
Tabla 8. Valores de F_{ST} pareadas entre grupos basados en ADNmt (debajo de la diagonal) y microsatélites (arriba de la diagonal). Los valores de $P < 0.05$ están indicadas en negritas. * indican las comparaciones que se mantuvieron significativas después de las correcciones de Bonferroni ($P_{ADNmt} = 0.008$ y $P_{SSR} = 0.024$) así como con las correcciones siguiendo la corrección 'False discovery rate' ($P_{ADNmt} = 0.008$ y $P_{SSR} = 0.024$), + indican las comparaciones que se mantuvieron solamente con 'False discovery rate'.

	M-1 & M-2	S-1 _N	S-1 _C	S-2
M-1 & M-2	0	-0.0117	-0.0030	0.0575*
S-1 _N	-0.0335	0	-0.0149	0.0528⁺
S-1 _C	0.0950*	0.0695	0	0.0732*
S-2	0.6327*	0.5873*	0.6837*	0

El árbol UPGMA construido con los valores de F_{ST} pareadas para representar las relaciones entre los grupos muestra a las sedentarias S-2 de Chiapas como el grupo basal seguido del grupo de las sedentarias S-1_N, S-1_C y las migratorias M-1 & M-2 (Figura 9a). En análisis de coordenadas principales (PCA) realizado en Genalex, se extrajeron tres componentes principales (PCs) los cuales explican el 25.10%, 20.09% y el 15.89%

respectivamente. En general se observan dos grupos con cierto grado de solapamiento, el primero donde se encuentran el grupo de migratorias M-1 & M-2 y las sedentarias S-1_N y S-1_C y el segundo grupo donde se encuentra el grupo de sedentarias S-2 (Figura 9b).

Figura 9. A) Árbol UPGMA basado en distancias F_{ST} para los cuatro grupos, B) Análisis de Coordenadas Principales (PCA) para los microsatélites. Los puntos corresponden a cada uno de los individuos. El color azul representa a las migratorias M-1 & M-2, el color verde oscuro sedentarias S-1_C, el verde claro las sedentarias S-1_N y el color vino las sedentarias S-2.

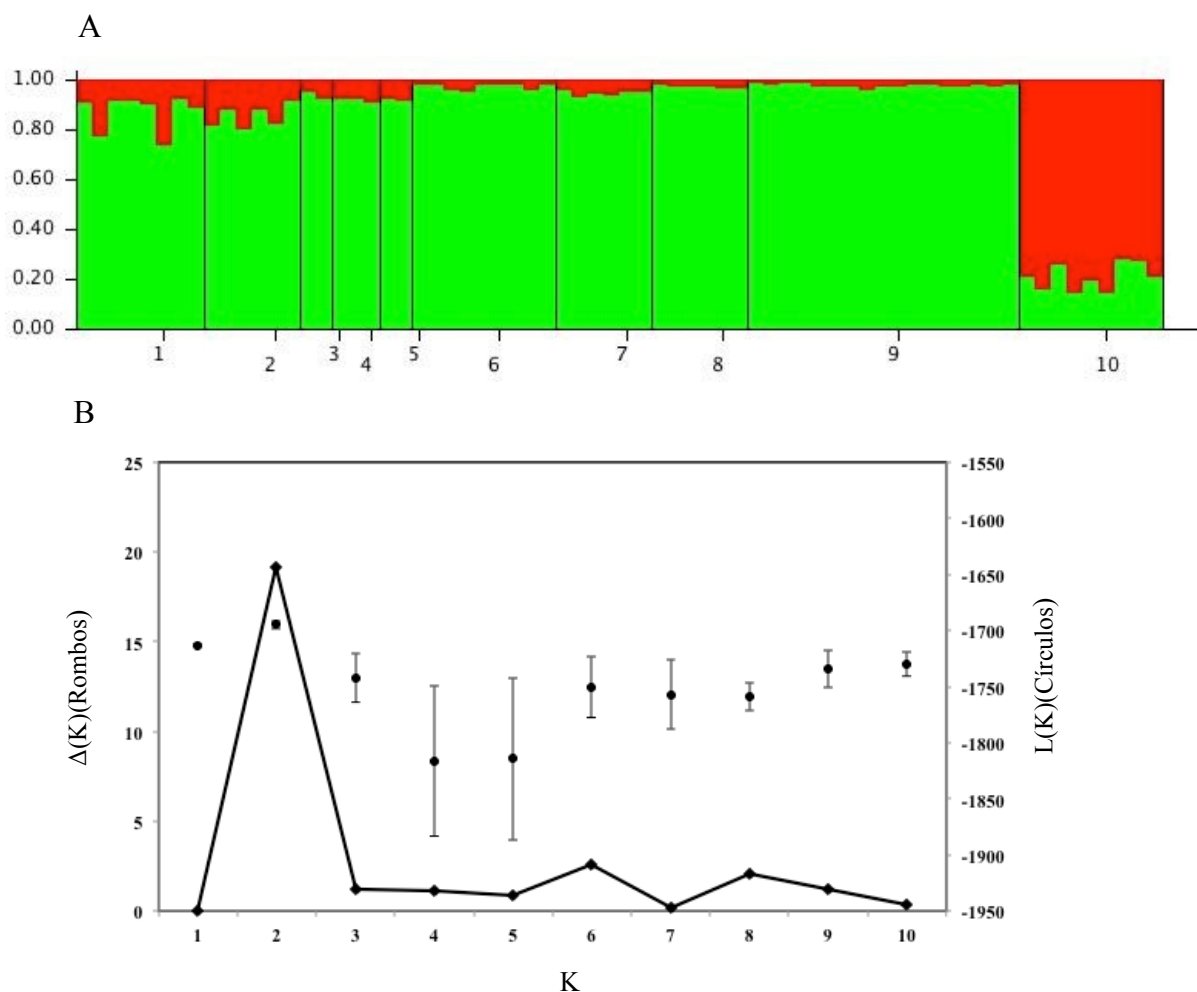


El resultado de las pruebas de Mantel para probar aislamiento por distancia muestran que existe una relación negativa y no significativa entre la distancia genética y la geográfica al tomar en cuenta todas las poblaciones ($r = -0.2763$, $P = 0.94$) y también excluyendo a Chiapas del análisis ($r = -0.5332$, $P = 0.99$), lo cual indica que la distancia geográfica no influye en que las poblaciones estén más diferenciadas genéticamente.

El valor de K obtenido con el análisis de STRUCTURE para 68 individuos provenientes de 10 localidades (no se incluyeron localidades con 1 individuo) sugiere la presencia de dos

grupos genéticos ($K = 2$) (Figura 10a). El primer grupo está formado por individuos de las poblaciones migratorias y sedentarias del norte-centro de México y el segundo grupo por los individuos de Chiapas, lo anterior es confirmado por el resultado de ΔK (Figura 10b), el cual sugiere también la presencia de dos grupos genéticos ($\Delta K = 2$).

Figura 10. Asignación de individuos de *Selasphorus platycercus* a grupos genéticos (K) mediante el método de asignación Bayesiana en STRUCTURE. A) Probabilidad de que los 68 individuos pertenezcan a un número óptimo de $K = 2$. B) Medida de la probabilidad logarítmica de los datos y su desviación estándar de 10 corridas para cada valor de K (a la derecha del eje de las Y) y los valores de ΔK ($K = 1$ a $K = 10$) calculados de acuerdo con Evanno *et al.* 2005 (a la izquierda del eje de las X).



El número de migrantes entre grupos por generación (Nm) fue asimétrico, habiendo una mayor migración de individuos migratorios a residentes (Tabla 9) y donde el mayor intercambio de individuos se da entre las poblaciones migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus*. El grupo de las migratorias M-1 & M-2 intercambia un mayor

número de inmigrantes con el grupo de sedentarias del centro de México S-1_C (20.24). Las sedentarias del norte S-1_N intercambia un mayor número de inmigrantes con S-1_C (15.18). El menor número de inmigrantes fue de la población sedentaria S-2 con el resto. Las sedentarias del centro de México S-1_C intercambia un mayor número de migrantes con las sedentarias del norte de México S-1_N (7.61).

Tabla 9. Número de inmigrantes (Nm) por generación entre grupos de *Selasphorus platycercus* estimados con Máxima Verosimilitud en MIGRATE para los microsatélites. La primera columna de la izquierda representa el grupo de donde provienen los migrantes.

	M-1 & M-2	S-1_N	S-1_C	S-2
M-1 & M-2	-	17.61	20.24	13.07
S-1_N	12.31	-	15.18	7.01
S-1_C	7.16	7.61	-	3.52
S-2	2.14	2.22	0.96	-

Cambios demográficos en el tamaño de la población

La prueba de exceso de heterocigocidad en BOTTLENECK bajo el modelo TPM (Tabla 10), fue significativa para los grupos de sedentarias S-1_N y S-2 ($P = 0.03$ y $P = 0.03$) lo cual sugiere que estos grupos han pasado por un cuello de botella. P significa la probabilidad de desviación del equilibrio deriva-mutación usando el test de Wilcoxon. Para los grupos M-1 & M-2, M-1 y S-1_C la prueba no fue significativa para el exceso de heterocigotos ($P = 0.15$, $P = 0.12$, $P = 0.42$ respectivamente) lo que significa que la diversidad genética estuvo en equilibrio de deriva-mutación. Los resultados de las pruebas de k y g que indican expansiones poblacionales para los diferentes grupos fueron los siguientes (Tabla 10): M-1 & M-2 ($k = 7$, $P = 0.029$; $g = 1.03$, $P > 0.05$), M-1 ($k = 8$, $P = 0.003$; $g = 1.53$, $P > 0.05$), S-1_N ($k = 2$, $P = 0.957$; $g = 0.75$, $P > 0.05$), S-1_C ($k = 7$, $P = 0.029$; $g = 0.65$, $P > 0.05$), S-2 ($k = 3$, $P = 0.834$; $g = 1.36$, $P > 0.05$). Los resultados de la prueba k sugiere que las migratorias M-1 & M-2, M-1 así como las sedentarias S-1_C experimentaron expansión poblacional. Esto contrasta con la estabilidad poblacional de los grupos S-1_N y S-2, lo cual concuerda con los resultados de las pruebas de expansión demográfica de la mitocondria. Los resultados de la prueba g fallaron en detectar expansión poblacional en todos los grupos, lo que puede estar relacionado con las distintas tasas de mutación de los loci lo cual se sabe puede afectar el análisis (Reich & Goldstein 1998) (Tabla 10).

Tabla 10. Pruebas de cuello de botella y expansión poblacional calculadas para microsatélites. * Para la prueba en Bottleneck significa exceso de heterocigotos. * Para la prueba de k son valores significativos por lo tanto expansión poblacional. * Para la prueba de g son valores significativos por lo tanto expansión poblacional.

	M-1 & M-2	M-1	S-1 _N	S-1 _C	S-2
Bottleneck	0.15	0.12	0.03*	0.42	0.03*
k	7*	8*	2	8*	3
g	1.03	1.53	0.75	0.65	1.36

Discusión

Diferenciación genética entre poblaciones migratorias y sedentarias

Los patrones de diferenciación genética a lo largo de la distribución de las poblaciones de *Selasphorus platycercus* fue en general congruente con ambos marcadores moleculares, distinguiéndose dos grupos genéticos bien diferenciados. El primer grupo genético está conformado por las poblaciones de individuos migratorios (M-1 & M-2) y las poblaciones de residentes del noreste y centro de México (S-1_N y S-1_C), las que corresponden a su vez a la subespecie *Selasphorus platycercus platycercus*. El segundo grupo lo conforman los sedentarios de Chiapas (S-2) correspondientes a la subespecie *Selasphorus platycercus guatemalae*. Con los marcadores mitocondriales se encontró una menor diferenciación genética entre poblaciones migratorias y sedentarias dentro del grupo de *Selasphorus platycercus platycercus*. Dichas diferencias fueron entre el grupo de sedentarias del centro de México (S-1_C) y el de individuos migratorios (M-1 & M-2). El grupo de individuos sedentarios del norte de México (S-1_N) no difiere genéticamente del grupo de migratorios, mientras que hay mayor diferenciación genética con el grupo de sedentarios del centro de México (S-1_C), lo cual sugiere que las poblaciones sedentarias del norte de México son genéticamente más parecidas a las migratorias a pesar del comportamiento migratorio divergente. En contraste, con los microsatélites solamente se encontraron diferencias genéticas entre subespecies al igual que la mitocondria pero no se encontraron diferencias genéticas entre migratorios y sedentarios de *S. p. platycercus*, lo cual sugiere que ambas poblaciones aunque con diferentes tipos de comportamiento forman un solo grupo genético.

Los análisis filogenéticos Bayesiano y de Máxima Verosimilitud soportan la monofilia recíproca entre los dos grupos genéticos mencionados anteriormente, los cuales corresponden

a las dos subespecies propuestas (*S. p. platycercus* y *S. p. guatemalae*). Las relaciones entre haplotipos de las poblaciones migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus* no fueron resueltas por los análisis filogenéticos ya que los haplotipos de ambas poblaciones se encontraron dispersos a lo largo del árbol. De acuerdo a los resultados de tiempo al ancestro común más reciente y flujo génico durante la divergencia obtenidos en BEAST e IMA respectivamente, la divergencia entre las dos subespecies fue alrededor de 800,000 años y donde durante la divergencia no hubo intercambio génico en ninguna de las dos direcciones, lo que sugiere que dicha divergencia se debe a un solo evento de dispersión en dirección norte a sur o viceversa.

Nuestros resultados apoyan que *Selasphorus platycercus* se originó alrededor de 1.4 Ma. al divergir de su grupo hermano *Selasphorus flammula* el cual se distribuye en Centro América (Costa Rica y Panamá). A su vez este clado divergió de los *Selasphorus* de Norte América (*S. rufus* y *S. sasin*) alrededor de 2.8 Ma. Lo anterior podría sugerir que el género *Selasphorus* se originó en Norte América y hubo una posterior colonización al sur, lo cual coincidiría con lo propuesto por Bleiweiss (1998) quien propone que Norte América fue el centro de origen del llamado grupo de las abejas en los colibríes el cual incluye al género *Selasphorus*; sin embargo, para responder a fondo dicho cuestionamiento habría que incluir muestras de los representantes faltantes del género *Selasphorus* de Centro América (*S. ardens* y *S. scintilla*)

Con los marcadores mitocondriales, dentro de *S. p. platycercus* se encontraron haplotipos privados para cada grupo así como seis haplotipos compartidos entre migratorios y sedentarios. El patrón de haplotipos compartidos y estructuración genética débil entre migratorios y sedentarios de *S. p. platycercus* puede ser porque la divergencia entre los sedentarios del centro de México y los migratorios ha ocurrido recientemente (56,900 años) y en presencia de flujo génico en dirección sur a norte. Aunado a lo anterior, los análisis de flujo génico histórico (mitocondria) y contemporáneo (microsatélites) en general, sugieren que el número de migrantes por generación entre migratorios y sedentarios de *S. p. platycercus* es mayor a uno, lo cual podría ser suficiente para homogeneizar las diferencias genéticas que podrían existir entre las poblaciones en base a lo que los modelos teóricos sugieren (Hartl & Clark 1997). Aunque los valores de flujo génico contemporáneo obtenidos con los microsatélites deben ser tomados con precaución ya que los valores de F_{ST} fueron en general bajos y por lo tanto el valor del número de migrantes entre poblaciones se podrían sobre estimar (Freeland 2005), el patrón general obtenido con ambos marcadores indica que la magnitud de intercambio de individuos es mayor de migratorios a sedentarios que en

dirección contraria, por lo cual se podría sugerir que las poblaciones migratorias pudieran tener una doble nidada durante el invierno, donde el intercambio génico con las sedentarias de México es probable. Rohwer *et al.* (2009) documentaron una posible doble nidada para cinco especies de aves neárticas (*Coccyzus americanus*, *Vireo cassinii*, *Icteria virens*, *Icterus cucullatus* e *Icterus spurius*) en sus territorios de invierno al noroeste de México. Otra posible explicación es que algunos individuos migratorios se `queden´ por algún tiempo en sus territorios de invierno y posteriormente regresan al norte, escenario en el cual podría haber intercambio de flujo génico de migratorias a sedentarias. No obstante la presencia de flujo génico histórico y contemporáneo entre migratorios y sedentarios de *S. p. platycercus*, la diversidad y divergencia en el comportamiento migratorio ha podido establecerse y mantenerse entre poblaciones. La poca o nula diferenciación genética entre poblaciones con diferente comportamiento migratorio ha sido documentada (Pérez-Tris *et al.* 2004, Milá *et al.* 2006, Riou *et al.* 2012, Miller *et al.* 2012), así como entre poblaciones migratorias con diferentes rutas y/o distancias migratorias (Lyons *et al.* 2012, Bensch *et al.* 1999). Lo anterior sugiere que las diferencias en el comportamiento migratorio no siempre requieren o resultan en una diferenciación substancial en el genoma como lo sugieren los marcadores neutrales utilizados y que probablemente las diferencias en la migración se deban a otros mecanismos (Lyons *et al.* 2012). La divergencia en el comportamiento migratorio podría no estar representada en una diferenciación genética en marcadores neutrales, sino en genes asociados a la migración, los cuales pueden estar bajo fuertes presiones de selección (Bensch *et al.* 1999), y donde la expresión genética diferencial en el tipo de comportamiento migratorio puede estar basada en diferentes regímenes estacionales (Liedvogel *et al.* 2011) a los cuales están expuestos los individuos a lo largo de su distribución.

Como contraparte a lo anterior, se han detectado diferencias genéticas y morfológicas entre poblaciones reproductivas simpátricas de *Sylvia atricapilla* que tiene orientación migratoria diferente (Rolshausen *et al.* 2009). Se sugiere que las diferencias en las orientación migratoria puede llevar a una segregación temporal cuando las diferentes poblaciones llegan a los territorios de anidación, donde individuos con la misma orientación migratoria se reproducen selectivamente entre si. Este primer aislamiento reproductivo puede facilitar entonces la divergencia fenotípica adaptativa entre poblaciones que se enfrentan a diferentes presiones de selección que están asociadas con cada una de las rutas de migración (por mencionar algunos: diferentes distancias de migración y recursos alimenticios disponibles) (Rolshausen *et al.* 2009). Otras posibles explicaciones como la deriva génica y efecto

fundador también han sido evocadas para tratar de explicar las diferencias genéticas y morfológicas (Rolshausen *et al.* 2009).

Como se mencionó anteriormente, los análisis poblacionales con marcadores mitocondriales no mostraron diferencias genéticas entre las poblaciones sedentarias del norte de México con las migratorias (F_{ST} pareadas). Para el suroeste de USA y norte de México, se ha reconstruido una detallada historia del cambio del hábitat en los últimos 40,000 años para un roedor (*Neotoma* spp., Betancourt *et al.* 1990). De acuerdo a estos datos la mayor parte del suroeste de USA y el norte de México estuvieron conectados por bosques durante el UGM, aproximadamente hace 18,000 años y probablemente hasta hace 8,000 a 9,000 años. Desde entonces, el calentamiento del planeta ha llevado a los bosques a elevaciones más altas, culminando en algún punto del Holoceno medio cuando los pastos y los desiertos desplazaron los bosques en las tierras bajas, resultando en los llamados 'sky-island' (McCormack *et al.* 2008). Dos 'sky-island' existen en el sur de USA y norte de México, uno en Arizona y el otro en la región Trans-Pecos del oeste de Texas y norte de Coahuila. El análisis de migración histórica obtenida de la mitocondria sugiere que los sedentarios del norte de México y los migratorios han tenido intercambio de flujo génico en ambas direcciones. Los análisis de expansión poblacional muestran que el norte de México (poblaciones de Coahuila y Nuevo León) han permanecido estables a lo largo del tiempo. Es probable que esta área de bosques de pino-encino haya fungido como un refugio durante el Pleistoceno como lo sugieren Castoe *et al.* (2007) y Waltari *et al.* (2007), y que después de la divergencia con Tlaxcala hace 56,900 años, las poblaciones pudieron haberse ido al norte de México donde posteriormente pudieron haberse expandido al norte.

El efecto del Pleistoceno en la distribución de *Selasphorus platycercus*

La expansión poblacional de los migratorios y los sedentarios del centro de México es apoyada por la prueba de Fu, D de Tajima y distribuciones de mismatch para el ADNmt así como la prueba de k para los microsatélites. Las pruebas de expansión anteriores no apoyaron crecimientos poblacionales para el grupo de sedentarias del norte de México (Nuevo León y Coahuila). La hipótesis del refugio durante el Pleistoceno para ésta área parece plausible, donde este grupo ha estado históricamente en el norte de México y/o que durante las glaciaciones del Pleistoceno no cambiaron su distribución a latitudes más sureñas (e.g. centro de México). La población de Chiapas tampoco ha sufrido un incremento en el tamaño poblacional probablemente porque las latitudes sureñas no sufrieron tan fuertemente los

cambios del Pleistoceno. Los resultados aquí obtenidos siguen el mismo patrón que en estudios similares como el de *Spizella passerina* (Milá *et al.* 2006), *Dendroica coronata* (Milá *et al.* 2007a), especies del género *Junco* (Milá *et al.* 2007b), *Oporornis tolmiei* (Milá *et al.* 2000), las cuales tienen distribuciones similares a *Selasphorus platycercus* y donde las poblaciones más sureñas han permanecido más estables a lo largo del tiempo mientras que las poblaciones norteñas han experimentado expansiones poblacionales post Pleistoceno. El único resultado en este estudio que contrasta con los anteriores es la estabilidad en el tamaño poblacional en el norte de México, lo que podría haber funcionado como un refugio durante las glaciaciones. El uso de métodos como el modelado de nicho ecológico (ENMs por sus siglas en inglés), podrían ser útil ya que se pueden identificar los sitios donde potencial puede ocurrir la especie bajo las condiciones climáticas actuales. De igual forma, se puede hacer la proyección hacia el pasado con las condiciones climáticas del UGM, lo cual podría ayudarnos a identificar los sitios que potencialmente fungieron como refugios para la especie (Waltari *et al.* 2007). Lo anterior, se puede contrastar con los datos genéticos obtenidos y así dar soporte de que el norte de México pudo haber sido un refugio para *Selasphorus platycercus* durante el UGM.

El papel que las glaciaciones del Pleistoceno han jugado en la expansión, diversificación y evolución de la migración de las especies de aves de Norte América han probado que las glaciaciones del cuaternario, en especial aquellas del UGM, han moldeado los patrones actuales de diversidad genética y de comportamiento actuales (Milá *et al.* 2007b, Milá *et al.* 2006, Perez-Tris *et al.* 2004, Joseph *et al.* 2003). Nuestro estudio sugiere que las poblaciones migratorias experimentaron un rápido incremento en el tamaño efectivo de sus poblaciones durante el Pleistoceno tardío (20,000 a 40,000 años atrás), dicho incremento poblacional se ha dado en un solo pulso. Aunado a lo anterior, los resultados obtenidos a partir de IMA sobre la divergencia entre las poblaciones migratorias y sedentarias de la subespecie *S. p. platycercus* indican que la divergencia ocurrió hace aproximadamente 56,900 años. Estos resultados sugieren que el principal factor que explica la separación actual entre migratorios y sedentarias así como la evolución del comportamiento de migración fue una rápida expansión de individuos a latitudes norteñas durante un periodo interglacial del Pleistoceno tardío, donde probablemente por las nuevas oportunidades ecológicas que se presentaron durante este periodo, un grupo de individuos pudo haber explotado los recursos disponibles. La aparición de las migraciones de larga distancia anuales parecen haber evolucionado solamente para las poblaciones reproductivas de las latitudes más norteñas (USA) las cuales al viajar entre diferentes territorios les permite tomar ventaja de los recursos

disponibles durante las estaciones del año. Este escenario apoya la hipótesis de 'expansión del Pleistoceno', la cual plantea que hubo rápidas expansiones poblacionales hacia el norte debido al mejoramiento en las condiciones climáticas que siguieron el UGM desde poblaciones que se encontraban en latitudes más sureñas, hipótesis documentada en aves (Milá *et al.* 2000; Veit *et al.* 2005) y otros grupos de vertebrados (Taberlet *et al.* 1998; Bell 2000).

La hipótesis de 'expansión del Pleistoceno' es apoyada con el análisis de IMA donde el flujo génico durante la divergencia fue de las sedentarias del centro de México hacia los migratorios y no en dirección contraria, es decir, de sur a norte. Como se ha probado recientemente a través de simulaciones (Grant *et al.* 2012), los análisis bayesianos 'Skyline plots' parecen no poder recuperar eventos de tiempos distantes, dando información solamente sobre el último cambio demográfico en la población, los cuales en general datan del Pleistoceno. Como se sabe la migración es un proceso lábil (Pulido & Berthold 2010) el cual pudo haberse ganado y perdido muchas veces durante la historia de un linaje, por lo tanto y en base a lo anterior, se sugiere que el Pleistoceno tardío han tenido un papel importante en la evolución de la migración así como en la divergencia entre comportamientos que en la actualidad vemos en el sistema de *Selasphorus platycercus platycercus*. Sin embargo, la historia detrás de cómo ha sido la ganancia y pérdida sucesiva de la migración a través de la historia de *S. p. platycercus* no puede ser documentada.

Una pregunta interesante a contestar es cómo llegaron las poblaciones de Chiapas y Guatemala a estar geográficamente aislada del resto y con una población donde el N_e es mucho más pequeño que el resto. Una posible explicación que se ha documentado para otras especies como *Hirundo rustica* (Martínez 1983) y *Ciconia ciconia* (Snow 1978) es llamada la 'suspensión de la migración' en donde individuos migratorios pudieron haber suspendido la migración de primavera estableciendo así nuevas poblaciones reproductivas en el sur. Esta hipótesis se ha propuesto considerando el número de especies de aves conespecíficas o formas cercanamente relacionadas, que anidan en hábitats equivalentes pero en el hemisferio opuesto (Snow 1978, Newton 2003). Otra posible explicación es que la población inicial ocurriera en Chiapas-Guatemala y que algunos individuos cruzaran el Istmo de Tehuantepec alrededor de unos 800,000 años.

Los resultados de los skyline plots sugieren que después de la divergencia de Chiapas y el resto, la población de sedentarias del centro de México (S-1_C) ha tenido una expansión gradual pero constante a lo largo de 60,000 años por lo que después de cruzar el IT las poblaciones pudieron asentarse en el centro de México y/o norte de México y posterior al

retroceso de las glaciaciones empezaran las expansiones al norte y la evolución de la migración anual. Los resultados de la mitocondria muestran que la tasa efectiva de población de Chiapas es mucho menor que la de las poblaciones del norte del IT (120,000 vs. 1,410,000). Además, la tasa efectiva de la población de Chiapas es más parecida a la de la población ancestral (119,000). Aunado a lo anterior, los resultados de la mitocondria resaltan que Chiapas es una población que ha permanecido estable en el tiempo por lo que la hipótesis de la diversificación de sur al norte es apoyada por estos datos.

Diferenciación morfológica entre poblaciones migratorias y sedentarias

Nuestros resultados podrían sugerir que diversos procesos tales como la alopatria así como adaptaciones a la migración, podrían haber moldeado la diversidad morfológica observada hoy en *Selasphorus platycercus*. Las poblaciones migratorias de *Selasphorus platycercus* tienen alas más largas lo cual concuerda con resultados anteriores (Winkler & Leisler 1992; Tellería *et al.* 1999, Rolshausen *et al.* 2009, 2010), ya que individuos migratorios necesitan una mayor cobertura alar. Las poblaciones sedentarias del norte de México y Chiapas tienen las alas más cortas, lo cual concuerda con la teoría, además estas poblaciones no han tenido expansiones poblacionales, siendo poblaciones que probablemente han permanecido sedentarias a lo largo del tiempo. La longitud del ala de las poblaciones sedentarias del centro de México es similar a la de las migratorias, es decir, tienen alas largas. Una posible explicación es que estas poblaciones a pesar de ser sedentarias podrían realizar migraciones cortas o altitudinales a lo largo del año en busca de alimento. Como se sabe la migración es un atributo que puede ganarse y perderse a lo largo del tiempo y en periodos relativamente cortos por lo que el intercambio de flujo génico entre poblaciones migratorias y sedentarias podría dar como resultado a poblaciones con migraciones parciales, es decir, con individuos tanto migratorios como sedentarios (Pulido & Berthold 2010). Los resultados de la comparación de longitud de la cola entre individuos migratorios contrastan con resultados anteriormente propuestos (Winkler & Leisler 1992; Tellería *et al.* 1999) ya que la cola en migratorios fue mayor que en los sedentarios. Se ha propuesto que las colas más cortas en migratorios ayuda a reducir la fricción del viento durante las migraciones, lo cual resulta en un menor gasto energético y que las colas más largas en sedentarios incrementan la maniobrabilidad. Sin embargo, estudios anteriores se han realizado en especies planeadoras como albatros y paserinas las cuales necesitan maximizar tanto la velocidad de vuelo y minimizar la fricción con el viento (Pennycuick 1982, Winkler & Leisler 1992; Tellería *et al.* 1999), lo cual sugiere que colas cortas no son un atributo necesario de un ave migratoria y que más bien depende de un balance de costo/beneficio. En el caso de los colibríes, las colas más largas en migratorios pudieran ayudar a una mayor maniobrabilidad y dirección de vuelo durante las migraciones ya que por bajo peso son más vulnerables al viento.

La longitud del culmen pareciera corresponder a un gradiente latitudinal donde a menor latitud menor es la longitud del culmen. El tamaño del culmen es más parecido entre las poblaciones migratorias y las del norte de México, las del norte de México con las poblaciones del centro de México y la población de Chiapas con una longitud de pico mucho

menor. Las diferencias en la longitud del culmen podrían corresponder con las diferencias en los recursos florales de los cuales se alimentan, aunque estudios más precisos serían necesarios para confirmar lo anterior. Diferencias en el tamaño del culmen se han encontrado también para el colibrí *Amazilia cyanocephala* (Rodríguez-Gómez *et al.* 2012), donde las poblaciones al sur del Istmo de Tehuantepec tienen picos relativamente más pequeños.

Aunque se sabe que la fluctuación del peso en colibríes es grande a lo largo del día debido al alto metabolismo y gasto energético que poseen (Schondube *et al.* 2003) un patrón interesante fue encontrado con respecto al peso. Hay diferentes hipótesis que tratan de explicar por qué las poblaciones sedentarias persisten en los territorios de invierno de muchas aves migratorias. Se ha planteado como hipótesis que si los sedentarios son mejores competidores que los migratorios pueden superar y resistir la llegada de los migratorios (Pérez-Tris *et al.* 2002). En el caso particular de *Selasphorus platycercus* se encontró que la población de sedentarias del centro de México son más pesadas que cualquiera de las otras poblaciones. Una hipótesis podría ser que poblaciones migratorias y sedentarias (del centro de México) ocurran en simpatria durante el invierno (lo cual apoya los análisis de MIGRATE), por lo que al tener mayor peso y por tanto ser más grandes podría darles ventaja con respecto a las migratorias, patrón que se ha documentado en *Sylvia atricapilla* (Pérez-Tris *et al.* 2002). La población sedentaria de Chiapas es la de menor peso que todas y siguiendo la lógica anterior y según lo propuesto por Howell & Webb (1995), los migratorios no llegan hasta Chiapas por lo cual no tendrían que competir por recursos.

Conclusiones

En este estudio se encontraron dos grupos genéticos diferenciados, dichos grupos fueron consistentes para ambos marcadores (nucleares y mitocondriales). Dichos grupos corresponden a las dos subespecies que se han propuesto, la subespecie *S. p. platycercus* la cual comprende poblaciones migratorias y sedentarias y la subespecie *S. p. guatemalae* que se encuentra geográficamente aislada de la anterior. El análisis bayesiano y máxima verosimilitud soportan la monofilia recíproca entre las dos subespecies, las cuales además también están diferenciadas morfológicamente.

También, se encontraron diferencias morfológicas entre poblaciones con hábitos migratorios divergentes en la subespecie *S. p. platycercus*, pero poca diferenciación genética en los marcadores neutrales utilizados, sugiriendo que es una gran población donde a pesar del intercambio génico la diferencia de comportamiento han podido establecerse, probablemente por respuestas a presiones de selección ambientales diferentes. Este estudio resalta la importancia que tuvo el Pleistoceno tanto en la distribución actual de *Selasphorus platycercus*, en los patrones genéticos encontrados, así como en la evolución del comportamiento divergente entre poblaciones.

Literatura citada

- Avise JC (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise JC, Walker D (1998). Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of Royal Society of London, Series B*, **265**, 457-463.
- Avise JC, Walker D, Johns GC (1998). Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of Royal Society of London, Series B*, **265**, 1707-1712.
- Bandelt HJ, Foster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Beerli P, Felsenstein J. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in *n* subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**, 4563-4568.
- Bell CP (2000). Process in the evolution of bird migration and pattern in avian ecogeography. *Journal of Avian Biology*, **31**, 258-265.
- Bensch S, Andersson T, Akersson S. (1999). Morphological and molecular variation across a migratory divide in willow warblers, *Phylloscopus trochilus*. *Evolution*, **53**, 1925-1935.
- Berthold P (1999). A comprehensive theory for the evolution, control and adaptability of avian migration. *Ostrich*, **70**, 1-12.
- Betancourt JL, van Devender TR, Martin PS (1990). *Packrat middens: the last 40,000 years of biotic change*. Tucson, AZ: University of Arizona Press.
- Bleiweiss R (1998). Origin of hummingbird faunas. *Biological Journal of Linnean Society*, **65**, 77-97.
- Bilgin R (2007). Kgttest: a simple Excel Macro program to detect signatures of population expansion using microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 416-417.
- Bolnick DI, Fitzpatrick BM (2007). Sympatric speciation: Models and empirical evidence. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, **38**, 459-487.
- Bonaccorso E, Navarro-Sigüenza AG, Sánchez-González LA, Peterson AT, García-Moreno J (2008). Genetic differentiation of the *Chlorospingus ophthalmicus* complex in Mexico and Central America. *Journal of Avian Biology*, **39**, 311-321.

- Calder W, Calder LL (1992). Broad-tailed Hummingbird. *The birds of North America*, **16**, 16pp.
- Castoe TA, Spencer CL, Parkinson CL (2007). Phylogeographical structure and historical demography of the western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*): a perspective on North American desert biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**, 193-212.
- Chavarría-Pizarro T, Gutiérrez-Espeleta G, Fuch EJ, Barrantes G (2010). Genetic and morphological variation of the Sooty-capped Bush Tanager (*Chlorospingus pileatus*), a Highland Endemic Species from Costa Rica and Western Panama. *The Wilson Journal of Ornithology*, **122**, 279-287.
- Cornuet JM, Luikart G (1996). Description and power analysis of two test for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Davis LA, Roalson EH, Cornell KL, McClanahan KD, Webster MS (2006). Genetic divergence and migration patterns in a North American passerine bird: implications for evolution and conservation. *Molecular Ecology*, **15**, 2141-2152.
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J. Eds (1999). Handbook of the World. Vol. 5. Barn-owls to Hummingbird. Lynx Edicions, Barcelona.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Endler JA (1977). Geographic Variation, Speciation and Clines (Princeton: Princeton University Press).
- 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 (2005). Arlequin ver. 3.11. An Integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Fjeldsa J, Lovett JC (1997) Geographical patterns of phylogenetic relicts and phylogenetically subordinate species in tropical African forest biota. *Biodiversity and Conservation*, **6**, 325–346.
- Freeland JR (2005). *Molecular Ecology*. Wiley. England. 109-153.

- Fu YX (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection, *Genetics*, **147**, 915-925.
- Garamszegi LZ (2006). Comparing effect sizes across variables: generalization without the need for Bonferroni correction. *Behavioral Ecology*, **17**: 682-687.
- Gentry A (1989). Speciation in tropical forests. In: Tropical Forests: Botanical Dynamics, Speciation and Diversity (L. B. Holm-Nielsen, I. C. Nielsen & H. Balslev, eds), pp. 113–134. Academic Press, New York.
- Graham BA, Burg TM (2012). Molecular markers provide insights into contemporary and historic gene flow for a non-migratory species. *Journal of Avian Biology*, **43**, 001-017.
- Grant WS, Liu M, Gao T, Yanagimoto T (2012). Limits of Bayesian skyline plots analysis of the mtDNA sequences to infer historical demographies in Pacific herring (and other species). *Molecular phylogenetics and Evolution*, **65**, 203-212.
- Griscom L (1932). The distribution of Bird-Life in Guatemala. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, **64**, 1-458.
- Goudet J (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- 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*). *BMC Evolutionary Biology*, **11**, 38.
- Hackett SJ (1996). Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **5**, 368–382.
- Hardy OJ, Charbonnel N, Freville H, Heuertz M (2003). Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. *Genetics*, **163**, 1467-1482.
- Harding RM (1996). Lines of descent from mitochondrial Eve: an evolutionary look at coalescence. – En: Donnelly, P. and Tavaré, S. (eds), *Progress in population genetics and human evolution*. Springer, pp. 15-32.
- Hartl D, Clark AG (1997). *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Inc., USA, pp.189-198.
- Heled J, Drummond AJ (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, 289.

- Hewitt GM (2000). The genetic consequences of iceages. *Nature*, **405**, 907-496.
- Hewitt GM (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B sciences*, **359**, 183-195.
- Hey J, Nielsen R (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. Persimilis*. *Genetics*, **167**, 747-760.
- Hey J, Nielsen R (2007). Integrating within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **104**, 2785-2790.
- Howell S, Webb S (1995). *Birds of Mexico and Northern Central America*. Oxford.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, **17**, 754-755.
- Irwin DE (2009). Speciation: New migratory direction provides route toward divergence. *Current Biology*, **19**, R1111-R1113.
- Jensen JL, Bohonak AJ, y Kelley ST (2005). Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.22 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Johnson DE (1998). Métodos multivariados aplicados al análisis de datos. International Thomson Editores.
- Joseph L, Wilke T, Alpers D (2003). Independent evolution of migration on the South American landscape in a long-distance temperate-tropical migratory bird, Swainson's flycatcher (*Myiarchus swainsoni*). *Journal of Biogeography*, **30**, 925-937.
- Latch E, Dharmarajan G, Glaubitz J, Rhodes O (2006). Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics*, **7**, 295-302.
- Liedvogel M, Akersson S, Bensch A (2011). The genetics of migration on the move. *Trends in Ecology and Evolution*. **26** (11), 561-569.
- Lyons JI, Pierce AA, Barribeau SM, Sternberg ED, Mongue AJ, Roode JC. Lack of genetic differentiation between monarch butterflies with divergent migration destinations. *Molecular Ecology* **21**, 3433-3444.
- Martínez MM (1983). Nidificación de *Hirundo rustica erythrogaster* (Boddaert) en la Argentina (Aves, Hirundinidae). *Neotropica* **2**,83-86.

- Mayr E, O'Hara RJ (1986). The biogeographical evidence supporting the Pleistocene forest refuge hypothesis. *Evolution*, **40**, 55-67.
- McCormack JE, Peterson AT, Bonaccorso, Smith TB (2008a). Speciation in the highlands of Mexico: genetic and phenotypic divergence in the Mexican Jay (*Aphelocoma ultramarine*), *Molecular Ecology*, **17**, 2505-2521.
- McCormack JE, Smith JE (2008b). Niche expansion leads to small-scale adaptive divergence along an elevation gradient in a medium-sized passerine bird. *Proceedings of the National Academy of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **275**, 2155-2164.
- McCormack JE, Bowen BS, Smith TB (2008c). Integrating paleoecology and genetics of bird populations in two sky island archipelagos. *BMC Evolutionary Biology*, **6**:28
- Milá B, Girman DJ, Kimura M, Smith TB (2000). Genetic evidence for the effect of postglacial population expansion on the phylogeography of a North American Songbird. *Proceedings of the National Academy of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **267**, 1033-1040.
- Milá B, Smith BT, Wayne KR (2006). Postglacial population expansion drives the evolution of long distance migration in a songbird. *Evolution*, **60** (11), 2403-2409.
- Milá B, Smith BT, Wayne KR (2007a). Speciation and rapid phenotypic differentiation in the yellow-rumped warbler *Dendroica coronata* complex. *Molecular Ecology*, **16**, 159-173.
- Milá B, McCormack JE, Castañeda G, Wayne RK, Smith TB (2007b). Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proceedings of the National Academy of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **274**, 2653-2660.
- Milá B, Wayne RK, Fitze P, Smith TB (2009). Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorynchus spirurus*, a Neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology*, **18**, 2979-2995.
- Miller MP, Mullins TD, Parrish Jr JW, Walters R, Haig SM (2012). Variation in migratory behavior influences regional genetic diversity and structure among American kestrel populations (*Falco sparverius*) in North America. *Journal of Heredity*, **103** (4): 503-514.

- Morin PA, Messeir J, Woodruff DS (1994). DNA extraction, amplification, and direct sequencing from Hornbill feathers. *Journal of The Science Society of Thailand*, **20**, 31-41.
- Moritz C, Patton JL, Schneider CJ, Smith TB (2000). Diversification of rainforest faunas: an integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 533-563.
- Montgomery TH Jr (1896). Extensive migration in birds as a check upon the production of geographical varieties. *American Naturalist*, **30**, 458-464.
- Narum SR (2006). Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics*, **7**, 783-787.
- Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**:853.
- Newton I (2003). Speciation and biogeography of birds. London, Academic Press.
- Oyler-McCance SJ, Fike JA, Talley-Farnham T, Engelman T, Engelman F (2010). Characterization of ten microsatellite loci in the Broad-tailed Hummingbird (*Selasphorus platycercus*). *Conservation Genetics Resources*, **3**, 351-353.
- Peakall R, Smouse PE (2006). GenAlEx 6: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- Pennycuik CJ (1982). The flight of Petrels and Albatrosses (Procellariiformes), observed in South Georgia and its vicinity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B sciences*, **300**, 75-106.
- Pérez-Tris, J. & Tellería, J. L. 2002. Migratory and sedentary blackcaps in sympatric non-breeding grounds: implications for the evolution of avian migration. *Journal of Animal Ecology*, **71**, 211-224
- Pérez-Tris J, Bensch S, Carbonell R, Helbing A, Tellería JL (2004). Historical diversification of migratory patterns in a passerine bird. *Evolution*, **58**, 1819-1832.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999). Bottleneck: a computer program for detecting recent reduction in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.
- Phillips AR (1975). The migrations of Allen's and other hummingbirds. *Condor*, **77**, 196-205.
- Pons O, Petit RJ (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, **144**, 1237-1245.

- Posada D, Crandall KA (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, **14**, 817-818.
- Posada & Crandall (2001). Interspecific gene genealogies: tree grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 37-45.
- Pritchard JK, Stephens M, & Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Pulido F & Berthold P (2010). Current selection for lower migratory activity will drive the evolution of residency in a migratory bird population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107 (16)**, 7341-7346.
- Pyle P (1997). Identification Guide to North American Birds. Part I. Slate Creek Press, Bolinas, California.
- Rambaut A (2002). Se-AI Sequence Alignment Editor, v2.0a11. *Oxford*: Department of Zoology, University of Oxford.294X.2002.01637.x.
- Rappole JH (1995). The ecology of migrant birds: A neotropical perspective. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Raymond M, Rousset F (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280-1283.
- Reich DE, Goldstein DB (1998). Genetic evidence for Paleolithic human population expansion in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **95**, 8119-8123.
- Reich DE, Feldman MW, Goldstein DB (1999). Statistical properties of two test that use multilocus data sets to detect population expansions. *Molecular Biology and Evolution*, **16**: 453-466.
- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical test. *Evolution*, **43**, 233-225.
- Rice WR, Salt GW (1990). The evolution of reproductive isolation as a correlated character under sympatric conditions: experimental evidence. *Evolution*, **44**, 1140-1152.
- Riou S, Combreau O, Judas J, Lawrence M, Saleh Al Baidani M, Pitra C (2012). Genetic differentiation among migrant and resident populations of the threatened Asian Houbara Bustard. *Journal of Heredity*, **103 (1)**, 67-70.
- Rodríguez-Gómez F, Gutiérrez-Rodríguez C, Ornelas JF (2012). Genetic, phenotypic and ecological divergence with gene flow at the Isthmus of Tehuantepec: the case of

the azure crowned hummingbird (*Amazilia cyanocephala*). *Journal of Biogeography* 00, 0-0.

- Rogers AR (1995). Genetic evidence for Pleistocene population explosion. *Evolution*, **49**, 608-615.
- Rohwer S, Hobson KA, Rohwer VG (2009). Migratory double breeding in Neotropical migrants birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **106** (45), 19050-19055.
- Rolshausen G, Segelbacher G, Hobson KA, Schaefer HM (2009). Contemporary evolution of reproductive isolation and phenotypic divergence in sympatry along a migratory divide. *Current Biology*, **19**, 2097-2101.
- Rolshausen G, Hobson KA, Schaefer HM (2010). Spring arrival along a migratory divide of sympatric blackcaps (*Sylvia atricapilla*). *Oecologia*, **162**, 175-183.
- Roy M (1997). Recent diversification in African greenbuls (*Pycnonotidae: Andropadus*) supports a montane speciation model. *Proceedings of the National Academy of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **264**, 1337–1344.
- Schluter D (2000). *The ecology of Adaptive Radiation*, Oxford University Press, Oxford.
- Schneider CJ, Moritz C (1999). Rainforest refugia and evolution in Australia's Wet Tropics. *Proceedings of the National Academy of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **266**, 191–196.
- Schneider C, Smith TB, Larison B, Moritz C (1999). A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: ecological gradients vs. rainforest refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **96**, 13869–13873.
- Schondube JE, Contreras-Martinez S, Ruan-Tejeda I, Calder WA, Santana-Castellon E (2003). Migratory patterns of the Rufous Hummingbird in western Mexico. En: *Conservation of migratory pollinators and their nectar corridors in North America* (ed. Gary Nabhan). University of Arizona Press, Tucson
- Slatkin M, Hudson RR (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, **129**, 555-562.
- Smith TB, Wayne RK, Girman DJ & Bruford MW (1997). A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science*, **276**, 1855–1857.

- Smith TB, 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.
- Snow DW (1978). Relationships between European and African avifaunas. *Bird study* **15**, 65-83.
- Stamatakis A (2006). RAxML-VI-HPC: Maximum Likelihood-based Phylogenetic Analyses with Thousands of Taxa and Mixed Models. *Bioinformatics* **22**, 2688–2690.
- Swofford DL: . PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) Sinauer Associates Sunderland Massachusetts; 2002
- SPSS, Inc. 2002. *SPSS 11.0.2 for Mac OSX*. SPSS, Inc., Chicago IL.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453–464.
- Tajima F (1989). Statistical-method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Tamura K, Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**, 512-526.
- Tellería JL, Carbonell R (1999). Morphometric variation of five Iberian Blackcap *Sylvia atricapilla* populations. *Journal of Avian Biology*, **30**, 63-71.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535–538.
- Wagner HO (1948). Die Balz de Kolibris *Selasphorus platycercus*. *Zool. Jahrb. Abt. Syst. Okol, Geogr. d. Tiere*, **77**, 267-275.
- Waltari E, Hijmans RJ, Peterson AT, Nyári AS, Perkins SL, Guralnick RP (2007). Locating Pleistocene refugia: comparing phylogeographic and ecological niche model predictions. *PLoS ONE*, **7**, e563
- Weir JT (2009). Implications of genetic differentiation in Neotropical montane forest birds. *Ann Missouri Bot. Gard*, **96**, 410-433.
- Winker K (2000). Migration and speciation. *Nature*, **40**, 36.
- Winker K, Pruett C (2006). Seasonal migration, speciation, and morphological convergence in the genus *Catharus* (Turdidae). *The Auk*, **123**, 1052-1068.

- Winker K (2010). On the origin of species through heteropatric differentiation: A review and model of speciation in migratory animals. *Ornitological Monographs*, **69**, 1-30.
- Winkler H, Leisler B (1992). On the ecomorphology of migrants. *Ibis*, **134**, 21-28.
- Wright S, 1978. Evolution and the genetics of populations. Volume 4. Variability within and among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.

Anexos

Localidad	Lista de haplotipos
1. Hollowell (Colo)	H6(1), H7(1), H8(3), H12(1), H26(2), H45(1), H46(1)
2. Mountain Lemon (Mole)	H6(1), H8(1), H11(1), H26(1), H49(1), H50(1)
3. Paradise (Para)	H13(1), H38(1), H39(1)
4. El Coronado Ranch (Coro)	H40(1), H41(1), H42(1)
5. South Western R. Station (Swrs)	H43(1), H44(1)
6. Garden Canyon (Gaca)	H51(1)
7. El Palmito (Palm)	H8(1), H11(1), H29(1), H30(1), H31(1), H33(1), H34(1), H35(1), H36(1), H37(1)
8. Volcán Nevado de Colima (Neva)	H1(1), H2(1), H3(4), H4(1), H5(1), H6(1), H7(2), H8(4), H9(1), H10(1), H11(3), H12(2), H13(1), H14(1), H15(1), H16(1), H17(1)
9. Cerro El Potosí (Nule)	H8(2), H41(1), H49(1), H52(1), H53(1)
10. Arteaga (Coah)	H24(1)
11. Eloxochitlán (Hida)	H33(1)
12a. Volcán la Malinche (Tlax_sed)	H1(1), H8(1), H18(3), H19(1), H20(3), H21(1), H26(1), H27(1), H28(1), H47(1), H48(1)
12b. Volcán la Malinche (Tlax_mig)	H3(1), H7(1), H8(2), H22(2), H23(1), H24(1), H25(1)
13. Volcán Tacaná (Chis)	H54(3), H55(2), H56(1), H57(1), H58(1)

Anexo 1. Localidad y lista de haplotipos por localidad, la frecuencia de cada haplotipo está dentro del paréntesis