



GENÉTICA DE POBLACIONES Y MODELADO DE LA DISTRIBUCIÓN
ACTUAL Y PASADA DE *Amazilia cyanocephala* (AVES:TROCHILIDAE) EN
MÉXICO

TESIS QUE PRESENTA **SARA COVARRUBIAS JIMÉNEZ**
PARA OBTENER EL GRADO DE **MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Xalapa, Veracruz, México (2012)

RECONOCIMIENTO

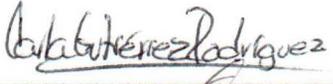
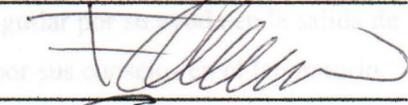
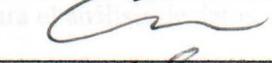
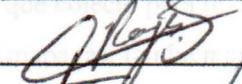
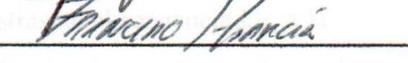


El trabajo realizado en esta tesis se llevó a cabo gracias al apoyo financiero de la Asociación para el Desarrollo de la Investigación Científica y Tecnológica (ADICIT) y al haberme aceptado en su programa, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de estudiante en Tercer Nivel y por el trabajo de mi exposición de esta tesis durante el proyecto 23468, titulado "Variación genética y genética poblacional de *Falco sparverius sparverius* y su población *Amazilia cyanocephala* en México", así como quiero agradecer al Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias y a la Colección Nacional de Tejidos de la Universidad Nacional Autónoma de México por la donación de los ejemplares.

Especialmente a la Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez por su atención, asesoría paciencia y apoyo en todas las fases del proyecto así como también por su amistad.

Aprobación final del documento de tesis de grado:

“Genética de poblaciones y modelado de la distribución actual y pasada de *Amazilia cyanocephala* (Aves: Trochilidae) en México”

	Nombre	Firma
Director	Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez	
Comité Tutorial	Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez	
	Dr. Antonio González Rodríguez	
Jurado	Dr. Octavio Rafael Rojas Soto	
	Dr. Francisco Javier García de León	

Finalmente quiero agradecer con mucho cariño a mis amigos que me apoyaron siempre y con quienes pasó momentos muy divertidos: Andrés Maizora, Daniel Maldonado, Efraín Ramírez, Luis de la Rosa, Bra María Piedra, Armando Hernández, Cándido Flores, David Angulo, Fabiana Gándara y Víctor Pitecos.

RECONOCIMIENTOS

El trabajo realizado en esta tesis se llevo a cabo con el apoyo de distintas fuentes de financiamiento. Agradezco principalmente al Instituto de Ecología , A.C. (INECOL) por haberme aceptado en su posgrado, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención 370990 y por financiar el trabajo de investigación de esta tesis mediante el proyecto 25888, titulado “Variación genética y genética poblacional de *Palicourea padifolia* y el polinizador *Amazilila cyanocephala*”. Así mismo quiero agradecer, al Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias y a la Colección Nacional de Tejidos de la Universidad Nacional Autónoma de México por la donación de tejidos.

Especialmente a la Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez por su asesoría académica, paciencia y apoyo en todas las fases del proyecto así como también por su amistad.

A los investigadores que conformaron mi comité tutorial por todas sus sugerencias para reforzar el proyecto, el Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez y el Dr. Antonio González Rodríguez a quien además también quiero agradecer por haberme aceptado en su laboratorio durante una estancia y por su asesoría. A los jurados de tesis, el Dr. Octavio Rafael Rojas Soto por su ayuda en la elaboración de los análisis de los modelos de nicho ecológico y revisión de la tesis, al Dr. Francisco Javier García de León por la revisión y comentarios que enriquecieron esta tesis.

A Denisse Maldonado Sánchez y Antonio Acini Vásquez Aguilar por su ayuda en la salida de campo y en el laboratorio. A la Dra. Clementina González por sus consejos en el laboratorio, al Dr. Eduardo Ruiz por su ayuda en el uso de programas para el análisis de datos, a la M. C. Flor Rodríguez por proporcionarme muestras de individuos que colectó para realizar este estudio, a Yuyini Licon por su ayuda en la elaboración del mapa, así también agradezco a la M.C. Cristina Bárcenas por su trabajo en el análisis de muestras en el secuenciador, a la LDG. Mónica Olvera por la edición de figuras, a Armando Hernández por su ayuda con los programas de computo, a Leonel Herrera por su ayuda con un análisis estadístico y a Cesar Torres por su ayuda en la elaboración de mapas de nicho ecológico.

Finalmente quiero agradecer con mucho cariño a mis amigos que me apoyaron siempre y con quienes pase momentos muy divertidos: Andreia Malpica, Denisse Maldonado, Erandi Ramírez, Isis de la Rosa, Eva María Piedra, Armando Hernández, Guillermo Huerta, Diego Angulo, Etelvina Gándara y Victor Piñeros.

DEDICATORIA

Por sus consejos y regaños para superarme cada día, con todo el amor y respeto le dedico esta tesis a mi papá y a mi mamá† por cuidar siempre de mí.

A mi hermana y a mis dos hermanos por apoyarme siempre y ser el motivo principal para seguir adelante.

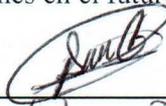
Por último a la familia Covarrubias García quienes han sido parte importante de mi formación personal.

DECLARACIÓN

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, el trabajo de investigación contenido en esta tesis fue efectuado por Sara Covarrubias Jiménez como estudiante de la carrera de Maestría en Ciencias entre agosto del 2010 y agosto del 2012, bajo la supervisión de la Dra. Carla Gutiérrez 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: Sara Covarrubias Jiménez
Director de tesis: Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez



Carla Gutiérrez Rodríguez

ÍNDICE

Resumen	8
Introducción	9
Métodos	14
Genética de poblaciones	14
Obtención de muestras.....	14
Obtención de datos moleculares.....	18
Análisis de datos	18
Variación genética y equilibrio de Hardy-Weinberg.....	18
Estructura genética poblacional.....	19
Flujo génico y barreras geográficas.....	21
Expansión demográfica.....	22
Modelado del nicho ecológico actual y pasado	22
Resultados	23
Genética de poblaciones	23
Variación genética y equilibrio de Hardy-Weinberg.....	23
Estructura genética poblacional.....	24
Flujo génico y barreras geográficas.....	35
Expansión demográfica.....	37
Modelación del nicho ecológico actual y pasado	37
Discusión	39
Diversidad genética.....	39
Flujo génico y expansiones de distribución.....	40
Patrones de estructuración genética y barreras geográficas.....	42
Conclusiones	46
Apéndice	47
Literatura Citada	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Número total de individuos (N) de <i>A. cyanocephala</i> recolectados	15
Tabla 2. Diversidad genética de los individuos pertenecientes a distintas localidades.....	26
Tabla 3. Valores de F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} para las localidades, regiones del BMM y los dos grupos genéticos.....	28
Tabla 4. Valores de F_{ST} y F'_{ST} pareadas entre regiones del BMM.. ..	29
Tabla 5. Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVA)	33
Tabla 6. Estimación del número efectivo de migrantes por generación (Nm) entre las seis regiones del BMM.	35
Tabla 7. Área geográfica de <i>Amazilia cyanocephala</i> ocupada de acuerdo a cada modelo de distribución.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de recolecta de <i>A. cyanocephala</i>	17
Figura 2. a) Asignación de individuos de <i>A. cyanocephala</i> a grupos genéticos (K) mediante STRUCTURE.	31
Figura 3. a) Asignación de individuos de <i>A. cyanocephala</i> a grupos genéticos (K) mediante STRUCTURE, agrupando a los individuos en regiones del BMM.	32
Figura 4. Dendograma sin enraizar mostrando las relaciones genéticas	34
Figura 5. Discontinuidades geográficas y genéticas en la distribución de <i>Amazilia cyanocephala</i>	36
Figura 6. Distribución potencial de <i>A. cyanocephala</i> en México bajo diferentes escenarios climáticos.....	38
Figura 7. Comparación entre las áreas geográficas de los modelos de distribución del UMG (CCSM y MIROC) y del presente para <i>A. cyanocephala</i>	39

LISTA DE APÉNDICE.

Tabla 8. Valores de heterocigosidad observada H_O y esperada H_E para las distintas localidades en cada uno de los locus.....	47
Tabla 9. F_{IS} para las diferentes localidades para cada locus.	49

Resumen

Los procesos históricos tales como los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno y la presencia de barreras geográficas han tenido influencia sobre los patrones de variación y estructuración genética de las especies. Evidencia palinológica y fitogeográfica en México sugieren que en el Último Máximo Glacial (UMG), los bosques mesófilos de montaña (BMM) tuvieron descensos altitudinales lo que posiblemente generó una mayor conectividad del área de distribución de algunas de las especies que habitan este ecosistema. En este trabajo se utilizó a *Amazilia cyanocephala*, un colibrí que se distribuye en el BMM desde Tamaulipas hasta Chiapas, para evaluar si la variación y estructura genética de sus poblaciones fueron influidas por los cambios climáticos ocurridos durante el UMG. Asimismo, se evaluó si la presencia de barreras geográficas localizadas a lo largo de la distribución de la especie ocasiona discontinuidades genéticas. Para esto se amplificaron diez loci de microsátelites de 160 individuos de *A. cyanocephala* pertenecientes a 27 localidades distribuidas en seis regiones del BMM y se modeló el nicho ecológico de la especie en el UMG y en el presente. Los valores de F_{ST} estandarizadas (F'_{ST}) indicaron diferenciación genética entre la mayoría de las regiones del BMM pero los análisis de asignación en STRUCTURE y las F_{ST} sin estandarizar sugieren la presencia de únicamente dos grupos genéticos, uno correspondiendo al norte (nSMO), centro (cSMO) de la Sierra Madre Oriental y Los Tuxtlas (TUX), y el segundo al sur de la Sierra Madre Oriental (sSMO) pacífico (pCHIS) y centro (cCHIS) de Chiapas. Un análisis de barreras geográficas detectó que la cuenca del Papaloapan, la Planicie Costera del Golfo y el Istmo de Tehuantepec posiblemente han limitado el flujo génico entre sitios de recolecta de *A. cyanocephala*. Se detectó un elevado número de migrantes entre las regiones del BMM, sugiriendo que la diferenciación genética de *A. cyanocephala* ocurrió en presencia de flujo génico. Los modelos de nicho ecológico detectaron expansiones del área de distribución geográfica de *A. cyanocephala* durante el UMG así como una mayor área con hábitat disponible para la especie en el UMG que en el presente. En conjunto, los análisis genéticos y los modelos proyectados del área de distribución de *A. cyanocephala* en el UMG, sugieren que las expansiones del área geográfica de distribución de la especie resultaron en la conexión de las distintas regiones del BMM y en el flujo génico entre éstas.

Introducción

Los patrones contemporáneos de diversidad y estructura genética de las especies son en parte un reflejo de procesos históricos, tales como eventos climáticos y formación de barreras geográficas al flujo génico (Avice 2000, Hewit 2000). En particular, los ciclos glaciales del Pleistoceno han sido reconocidos como importantes procesos históricos a gran escala, que han tenido influencia en los patrones demográficos y en la estructura genética de diferentes especies (Hugall et al. 2002, Peterson et al. 2004). En la región Neártica, la vegetación retrocedió a bajas latitudes durante las glaciaciones y luego expandió su distribución hacia el norte durante los períodos interglaciales (Hewit 1996, Hewit 2000). Sin embargo, no todas las especies respondieron de igual forma a los eventos climáticos del Pleistoceno (Hewitt 1996, 2000, Fedorov et al. 2003, Hewit 2004, Zink 1997, Avice 2000, Ball & Avice 1992, Milá et al. 2000, 2007). Las respuestas específicas de cada especie a estos cambios climáticos fueron el resultado de la combinación de la conducta, de las características fisiológicas y ecológicas de las especies, incluyendo su origen biogeográfico, preferencias del hábitat y capacidades de dispersión (Stewart et al. 2010).

Los ecosistemas de las zonas montañas de México también han sido afectados por las fluctuaciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno. Los bosques de pino-encino tuvieron desplazamientos y retracciones cíclicas (Martin & Harrell 1957, Van Devender 1990, McDonald 1993). Dichos desplazamientos resultaron en expansiones del área de distribución de las especies de tierras altas durante los periodos glaciales y en el aislamiento en elevaciones altas durante los interglaciares (Moreno-Letelier & Piñero 2009). Para el bosque mesófilo de montaña en México, existe evidencia de que la distribución actual de las especies que conforman dicho ecosistema ha sido afectada por los cambios climáticos del Pleistoceno. Durante el Pleistoceno las especies del bosque mesófilo de montaña tuvieron expansiones de su distribución, descendiendo a menores elevaciones (700-1000 m) durante el período glacial tardío (Lozano-García 1989, Piperno et al. 2007). Simulaciones del modelo climático global del Último Máximo Glacial (UMG) sugieren un desplazamiento de los bosques montanos hacia partes más bajas, lo cual concuerda con datos palinológicos para Mesoamérica (Lozano-García 1989, Graham 1999, Piperno et al. 2007).

Diversos estudios filogeográficos de especies de aves, árboles y arbustos de zonas montañas de México han documentado que los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno influyeron en los patrones de variación y estructura genética de sus poblaciones. Algunos de estos estudios han reportado estructura filogeográfica limitada con expansiones

demográficas y flujo génico durante los períodos glaciales así como cuellos de botella y aislamiento en áreas de alta elevación durante los interglaciales (Kimura et al. 2002, Moreno-Letelier & Piñero 2009, Cavender-Bares et al. 2011, González-Rodríguez et al. 2004, Ornelas et al. 2010, Gutiérrez-Rodríguez et al. 2011)

Un componente importante de las zonas montanas son las aves, las cuales han sido utilizadas como modelo de estudio para evaluar los procesos históricos y geográficos que han influido en la estructuración genética de sus poblaciones (García-Moreno et al. 2004, Milá et al. 2006, Milá et al. 2007, Milá et al. 2007a, Puebla-Olivares et al. 2008, Barrera-Guzmán et al. 2012). Algunos estudios de aves, que habitan zonas montanas en México, han encontrado divergencia genética entre poblaciones alopátricas aisladas en distintas regiones montañosas (García-Moreno et al. 2004, McCormack et al. 2008, Milá et al. 2007a). Algunas de los factores que se ha sugerido promovieron la diversificación son la presencia de barreras geográficas tales como áreas de baja elevación (García-Moreno et al. 2004, Sánchez-González et al. 2008, Bonaccorso et al. 2008, González et al. 2011), oscilaciones climáticas del Pleistoceno y en consecuencia cambios en la distribución del hábitat (Milá et al. 2007a, Barber & Klicka 2010, Manthey et al. 2011). Algunos estudios en aves, en los que se evalúan el efecto de los procesos históricos demográficos y geográficos en la distribución de la variación genética han empleado como marcadores moleculares distintos fragmentos de ADN mitocondrial y microsátélites (Barr et al. 2008, Brito 2007, McCormack & Smith 2008, Zink et al. 2010, González et al. 2011). Otras investigaciones han utilizado dichos marcadores moleculares, en combinación con el modelado de nicho de las especies, para relacionar la distribución pasada con los patrones filogeográficos, permitiendo de esta forma identificar refugios y barreras geográficas que pudieron haber influido en sus patrones de dispersión y de estructura genética (Zink & Barrowclough 2008, Joseph & Omland 2009, McCormack et al. 2008). Algunos de estos estudios han indicado expansiones poblacionales durante el UMG (Klicka et al. 2011, Bryson et al. 2011), migraciones hacia latitudes más bajas (Gugger et al. 2011) y estabilidad del área de distribución durante el UMG comparada con el presente (Smith et al. 2011). Otros estudios han revelado expansiones postglaciales del área de distribución (McCormack et al. 2008, McKay et al. 2010, Ruegg et al. 2006, Pulgarín & Burg 2012). En conjunto, estos estudios indican que los cambios climáticos ocurridos en el Pleistoceno pueden influir de diferente forma a las poblaciones de las especies lo cual se refleja en sus patrones genéticos (Taberlet et al. 1998, Hewit 2000).

Además de los factores histórico-climáticos, la composición del paisaje también puede moldear la diversidad y la estructura genética de las poblaciones. En este sentido, algunos estudios han sugerido que la presencia de carreteras, cordilleras montañosas y cuerpos de agua actúan como barreras que impiden el flujo génico entre poblaciones (Riley et al. 2006, Antolin et al. 2006, Funk et al. 2005). Estudios en aves han demostrado el efecto de barreras geográficas, tales como altas montañas, sistemas rivereños y valles, en la estructuración genética de las poblaciones y flujo génico entre poblaciones de diferentes especies (Segelbacher & Storch 2002, Piertney et al. 1998). Asimismo, modificaciones recientes del paisaje, como es la fragmentación (i.e., deforestación y el uso de cambio de suelo) pueden influenciar los patrones de estructuración genética; esto debido a la reducción en la conectividad de las poblaciones el flujo de genes puede disminuir y la diferenciación genética aumentar (Giles & Goudet 1997). La magnitud del efecto de la presencia de barreras geográficas y de la fragmentación del hábitat depende en gran medida de la capacidad de dispersión de las especies (Lindsay et al. 2008, Alcalde et al. 2009, Barr et al. 2008, Braunisch et al. 2010, Caizergues et al. 2003) así como de la acción de fuerzas evolutivas tales como selección natural, selección sexual y deriva génica sobre las poblaciones (Coyne & Orr 2004). El aislamiento físico de las poblaciones debido a la presencia de una barrera y con cero flujo génico, incrementa la divergencia genética como resultado de la adaptación a condiciones ambientales diferentes y de deriva génica (Coyne & Orr 2004). Aún si las barreras geográficas son permeables y si el nivel de flujo génico entre las poblaciones es alta, la acción de la selección puede ser suficientemente fuerte para promover diferenciación genética (Nossil 2008) como se ha demostrado en diferentes estudios empíricos (e.g., Kotlík et al. 2008, Niemiller et al. 2008, Milá et al 2009).

Uno de los ecosistemas que ha sido históricamente fragmentado de manera natural y recientemente por el hombre es el bosque mesófilo de montaña (BMM). Estudios biogeográficos han indicado que el BMM ha sido históricamente afectado por cambios climáticos y geológicos que generaron eventos de aislamiento y provocaron su fragmentación (Luna et al. 1999). Recientemente el BMM ha sufrido deforestación antropogénica severa (Martínez-Morales 2004). A pesar de esto, el BMM es uno de los ecosistemas que más contribuye a la diversidad biológica del país y provee de importantes servicios ecológicos (Martínez-Morales 2004). El BMM mexicano está conformado por parches aislados que albergan un gran número de especies endémicas y en peligro de extinción (Pedraza & Williams-Linera 2003). Se distribuye en forma disyunta a lo largo de la Sierra Madre Oriental (SMO), desde el sur de Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Oaxaca en la Sierra

Madre del Sur (SMS), Sierra de los Tuxtlas (TUX) y en las Sierras del Centro (cCHIS) y Pacífico (pCHIS) de Chiapas. Se ha sugerido que cada una de las sierras (SMS, TUX, cCHIS y pCHIS) se encuentra en una provincia morfotectónica diferente y que además la SMO está conformada por tres regiones morfotectónicas distintas (norte, centro y sur) (Ferrusquía-Villafranca 1993). Las diferentes provincias morfotectónicas difieren en su geología y fisiografía (Ferrusquía-Villafranca 1993) ocasionando que las propiedades edáficas de las regiones sean específicas, lo cual puede influir en la composición florística de cada provincia morfotectónica (Escalante et al. 1993, Higgins et al. 2011). Las diferencias en la composición florística de los bosques aunado con la presencia de áreas de baja elevación pueden constituir barreras ecológicas para las aves asociadas al BMM, limitando la migración de individuos entre las regiones morfotectónicas (García-Moreno et al. 2004, Sánchez-González & Navarro-Sigüenza 2009, Puebla-Olivares et al. 2008)

Un ave que habita el BMM es el colibrí *Amazilia cyanocephala*, sus poblaciones se encuentran a una altitud que va de los 500 a los 2500 m (Johnsgard 1997, Del Hoyo et al. 1999). En México se distribuye de forma disyunta a lo largo de la Sierra Madre Oriental, Sierra de los Tuxtlas y Sierra de Chiapas; y en Centro América desde Guatemala hasta el Norte de Nicaragua. Se ha reportado que *A. cyanocephala* es residente en la temporada de reproducción (Ornelas et al. 2010) y se sospecha que realiza movimientos altitudinales y que deambula del BMM al bosque tropical en la temporada no reproductiva (Del Hoyo et al. 1999). *A. cyanocephala* mide entre 5.5 y 6 cm., se alimenta del néctar de epífitas, de arbustos y de algunos árboles (Johnsgard 1997, Ornelas et al. 2004). La época reproductiva en México comprende de febrero a agosto, durante la cual *A. cyanocephala* tiene una sola puesta de dos huevos (Ornelas 2010). Las características de este colibrí y su asociación con el BMM lo hacen un sistema ideal para estudiar el efecto de los cambios climáticos del Pleistoceno y de las barreras geográficas tuvieron sobre la variación y estructura genética de sus poblaciones.

Los resultados de un estudio filogeográfico reciente en *A. cyanocephala* con ADN mitocondrial indicaron que las poblaciones de la Sierra Madre Oriental y las de la Sierra de Chiapas son genéticamente distintas, formando dos grupos genéticos. Se estimó que los grupos genéticos divergieron en presencia de flujo génico hace 49,300-78,800 años sugiriendo que los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno tuvieron un efecto importante en la estructura genética de *A. cyanocephala*. Los resultados de dicho estudio indican que los grupos genéticos separados por el Istmo de Tehuantepec son también morfológica y ambientalmente diferentes sugiriendo que la selección natural ha sido suficiente para contrarrestar los efectos del flujo génico (Rodríguez-Gómez et al. sometido).

Sin embargo, no se encontró diferenciación genética entre las localidades que se encuentran en las dos sierras de Chiapas ni entre aquellas ubicadas a lo largo de la Sierra Madre Oriental y se detectaron expansiones poblacionales en los dos grupos genéticos después del UMG. Los autores sugieren que esto puede deberse a que las localidades ubicadas en ambos lados del Istmo, estuvieron en contacto como resultado de la migración a tierras bajas de la especie durante las oscilaciones climáticas del Pleistoceno, facilitándose así el intercambio genético (Rodríguez-Gómez et al. sometido).

El presente estudio tiene como principal objetivo evaluar la diversidad y estructura genética de las localidades mexicanas de *Amazilia cyanocephala* utilizando microsatélites, así como modelar su distribución potencial pasada (UMG) y actual de la especie. El uso de marcadores moleculares hipervariables podría proporcionar la resolución necesaria para detectar diferenciación genética entre las localidades de *A. cyanocephala* a diferentes escalas. Además, la modelación del nicho pasada y actual de la especie en conjunto con los datos genéticos puede proporcionar información sobre el efecto que los cambios climáticos del UMG y que la fragmentación más reciente del hábitat han tenido en los patrones de estructuración y flujo génico de la especie.

En particular, se han planteado las siguientes preguntas: (i) ¿Cuáles son los niveles de diversidad y estructura genética de *Amazilia cyanocephala*? (ii) ¿Cómo son los modelos de distribución potencial en el UMG y en el presente de *A. cyanocephala*? (iii) ¿Cómo se relaciona la distribución potencial de *A. cyanocephala* en el UMG con sus patrones de variación genética y estructura poblacional? (iv) ¿Existen barreras geográficas a lo largo de la distribución de *A. cyanocephala* que hayan ocasionado discontinuidades genéticas entre sus poblaciones?

Debido a que se ha reportado que *A. cyanocephala* es una especie residente/sedentaria que habita en los BMM, cuya distribución en diferentes provincias morfotectónicas es discontinua, se espera que el flujo génico sea restringido entre las áreas del BMM y por lo tanto que las localidades que se encuentran en diferentes provincias morfotectónicas estén genéticamente diferenciadas. Además, se espera que las oscilaciones climáticas durante el Pleistoceno hayan tenido un efecto sobre la distribución de la variación y estructura genética de *A. cyanocephala*, por lo que se espera encontrar una co-relación entre los patrones genéticos de los microsatélites y los patrones de distribución geográfica a través del modelado de su nicho.

Métodos

Genética de poblaciones

Obtención de muestras

Se utilizaron muestras de plumas, tejido y piel de un total de 160 individuos de *A. cyanocephala*. La mayoría de las plumas utilizadas (de 144 individuos) habían sido previamente recolectadas y otras (de 7 individuos) se recolectaron para este estudio. Las muestras se obtuvieron capturando individuos de *A. cyanocephala* con redes de niebla (de 6 ó 12 m de largo por 3m de alto), a los cuales se les quitaron dos plumas de la cola. Las plumas se colocaron en bolsas de papel para transportarlas al laboratorio y almacenarlas a -20 °C para su posterior procesamiento genético. Las muestras de tejido (6) y de piel (10) fueron donadas por el Museo de Zoología de la UNAM y por la Colección Nacional de Aves del Instituto de Biología de la UNAM, respectivamente.

Las muestras provienen de un total de 27 sitios del BMM pertenecientes a diferentes provincias morfotectónicas de México (Ferrusquía-Villafranca 1993; Tabla 1, Fig. 1). De la Sierra Madre Oriental (SMO) se obtuvieron muestras de 21 sitios: siete localizados en la parte norte de la Sierra Madre Oriental (nSMO), en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí e Hidalgo; 12 en el centro de la Sierra Madre Oriental (cSMO), en los estados de Puebla y Veracruz; y dos en el sur de la Sierra Madre Oriental (sSMO), en el estado de Oaxaca. De Los Tuxtlas (TUX) se obtuvieron muestras de una localidad de la Sierra de Santa Marta; y de las Sierras del Pacífico (pCHIS) y del centro (cCHIS) de Chiapas de dos y tres localidades, respectivamente.

Tabla 1. Número total de individuos (*N*) de *A. cyanocephala* recolectados indicando la localidad, estado y región del bosque mesófilo de montaña así como la ubicación geográfica y altitud de las localidades.

No. de Localidad	Localidad	Estado	Código	Región	<i>N</i>	Latitud	Longitud	Altitud
1	Alta Cima	Tamaulipas	ATC	nSMO	5	23° 03'	99° 12'	943
2	La Soledad	San Luis Potosí	SOL	nSMO	7	21° 28'	99° 1'	1151
3	Picuatla	Hidalgo	PI	nSMO	1	20° 56'	98° 32'	1155
4	Oxpantla	Hidalgo	OXP	nSMO	2	20° 40'	98° 38'	1697
5	San Bartolo Tutotepec	Hidalgo	SBT	nSMO	1	20° 21'	98° 13'	1155
6	Tenango de Doria	Hidalgo	TED	nSMO	2	20° 26'	98° 13'	1134
7	Ixmiquilpan	Hidalgo	IXM	nSMO	5	20° 37'	98° 58'	1747
8	Lagunillas	Puebla	LAG	cSMO	17	20° 13'	97° 57'	1500
9	Cuetzalan	Puebla	CUET	cSMO	8	19° 59'	97° 30'	1319
10	Huitzilán	Puebla	HUIT	cSMO	6	19° 57'	97° 41'	1487
11	Riscal	Veracruz	RIS	cSMO	8	19° 28'	96° 59'	1586
12	Orduña	Veracruz	ORD	cSMO	3	19° 27'	96° 56'	1349

13	Coapexpan	Veracruz	COAP	cSMO	6	19° 31'	96° 58'	1392
14	Clavijero	Veracruz	INE	cSMO	12	19° 30'	96° 56'	1392
15	Pitaya	Veracruz	PIT	cSMO	3	19° 30'	96° 57'	1341
16	Macuiltepetl	Veracruz	MAC	cSMO	5	19° 32'	96° 55'	1481
17	Coatepec	Veracruz	COAT	cSMO	7	19° 27'	96° 57'	1190
18	La Mancha	Veracruz	CABU	cSMO	1	19° 36'	96° 22'	650
19	Huatusco	Veracruz	HUAT	cSMO	2	19° 11'	96° 58'	1418
20	Sierra Santa Martha	Veracruz	SSM	TUX	3	18° 16'	94° 50'	628
21	San Martín Caballero	Oaxaca	SMC	sSMO	3	18° 06'	96° 38'	1930
22	La Esperanza	Oaxaca	ESP	sSMO	1	17° 39'	96° 20'	1379
23	Cerro Baúl	Oaxaca	CB	pCHIS	7	16° 30'	94° 11'	1137
24	Salvador Urbina	Chiapas	SU	pCHIS	13	15° 45'	92° 49'	908
25	Pueblo Nuevo	Chiapas	PN	cCHIS	11	17° 08'	92° 53'	1639
26	Jitotol	Chiapas	JIT	cCHIS	10	17° 08'	92° 52'	1642
27	Montebello	Chiapas	MB	cCHIS	12	16° 07'	91° 43'	1422

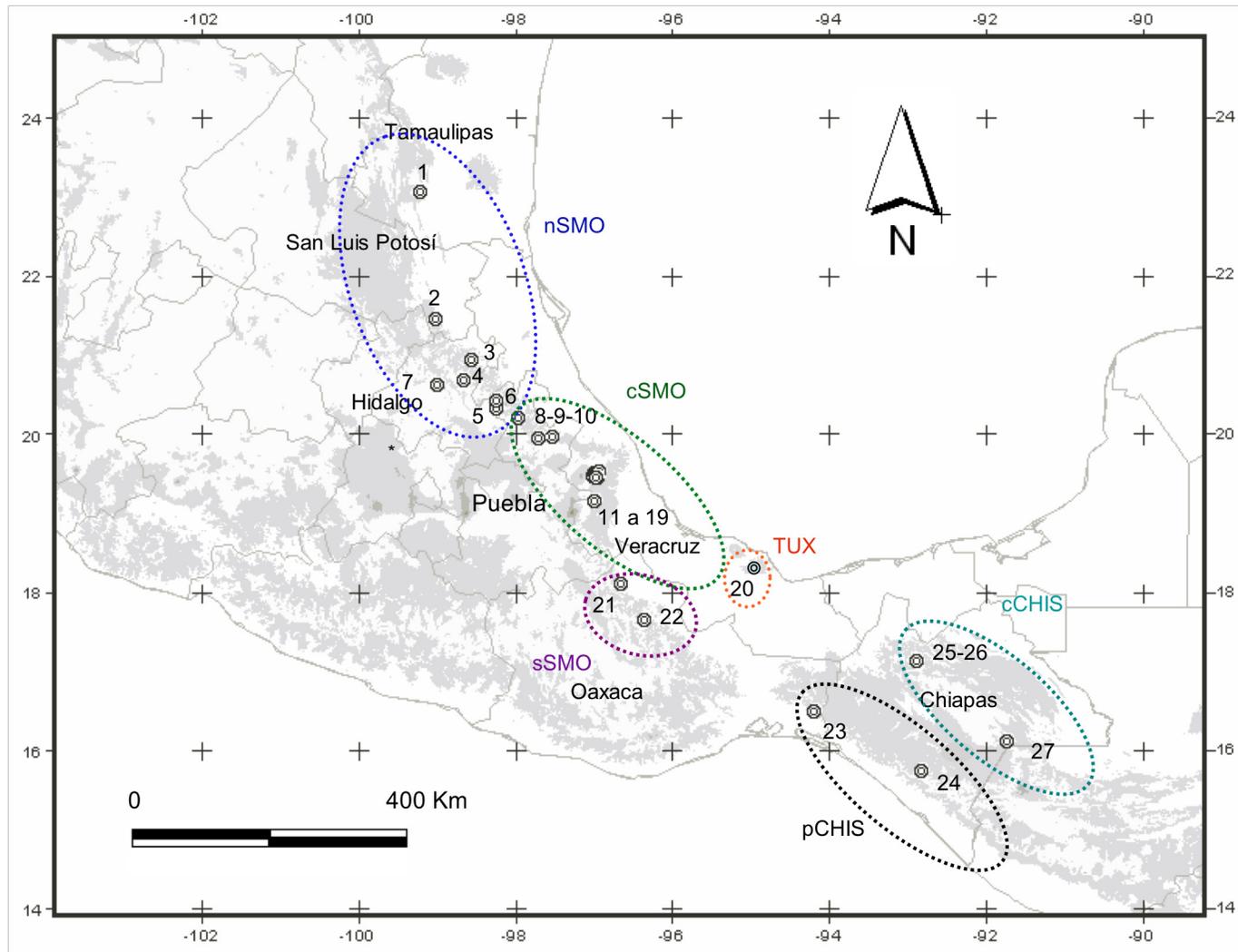


Figura 1. Sitios de recolecta de *A. cyanocephala* a lo largo de su distribución geográfica. Los números corresponden a las localidades y las líneas punteadas a las regiones del bosque mesófilo de montaña de acuerdo a Ferrusquía-Villafranca (1993). Referirse a la Tabla 1 para los códigos.

Obtención de datos moleculares

El ADN de las plumas de los individuos recolectados fue extraído del cálamo de las plumas así como de piel siguiendo el protocolo modificado (Mundy et al. 1997) del kit de extracción de tejidos DNeasy (Qiagen, Inc). Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y el kit de PCR Multiplex (QIAGEN, Inc) se amplificaron 10 loci de microsatélites previamente aislados y caracterizados en *A. cyanocephala* (Gutiérrez-Rodríguez et al. en prep). Las amplificaciones se realizaron combinando los 10 loci de microsatélites en un total de 4 mezclas de la siguiente forma: M1(A1-1-6, A2-1-2), M2(A2-5-3, A1-4-1, A1-3-5, A1-13-8) M3(A2-5-1, A2-4-6) y M4(A1-10-9, A2-3-3). Las reacciones se realizaron en una termocicladora Venti 3550 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: 15 min a 95°C, 38 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 50°C-62°C (dependiendo de la mezcla), 1:30 min a 72°C, una extensión final de 30 min a 60°C y 10 min a 4°C. Los productos de las reacciones de PCR se visualizaron en un secuenciador automatizado ABI 310 (Applied Biosystem). El tamaño de los alelos se determinó usando el estándar de tamaño conocido GeneScan Liz 600 (Applied Biosystems) en el programa GeneMapper 3.2 (Applied Biosystems).

Análisis de datos

Variación genética y equilibrio de Hardy-Weinberg

Se estimó la variación genética calculando el número promedio de alelos combinando todos los loci por localidad y por región del bosque mesófilo en el programa FSTAT 9.3 (Goudet 2001). La riqueza alélica [RA(g)] y la riqueza de alelos privados [RAP(g)] se calcularon con el método de rarefacción usando el programa HP-RARE (Kalinowski 2005) utilizando un número mínimo de 2 alelos (g). La rarefacción es un método que estima el número de alelos esperados en una población de un tamaño especificado. Esta técnica compensa por tamaños de muestras diferentes. Además se calculó la heterocigosidad esperada y observada para cada localidad combinando todos los loci y para cada una de las localidades por locus en el programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al. 2005)

En FSTAT (Goudet 1995) se calculó f , un estimador de la F_{IS} (endogamia dentro de las poblaciones; Weir & Cockerman, 1984) la cual mide el déficit o exceso de heterocigotos dentro de las poblaciones con relación con lo que se esperaría si la población estuviese en equilibrio Hardy-Weinberg. La F_{IS} puede adquirir valores entre -1 y 1, en donde valores mayores de cero indican deficiencias de heterocigotos mientras que valores menores de cero

indican exceso de heterocigotos. Se calcularon las F_{IS} para cada localidad, combinando todos los loci y para cada una de las localidades por locus. Las poblaciones en las que se encontraron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se analizaron en MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al. 2004) para determinar si dichas desviaciones se debían a errores de genotipificación, dominancia de alelos pequeños o alelos nulos. En los casos en los que se detectaron alelos nulos se calcularon las frecuencias de los mismos con el método de Brookfield 1 (Brookfield et al. 1996). La independencia de los loci de microsatélites fue evaluada mediante pruebas de desequilibrio de ligamiento en FSTAT 2.9.3. Se realizó correcciones de Bonferroni para todos los casos en los que se hicieron comparaciones múltiples (Rice 1989).

Estructura genética poblacional

Se realizaron diversas pruebas para evaluar la diferenciación genética entre las diferentes agrupaciones de los sitios de recolecta para ello se calcularon los estimadores de Weir & Cockerman (θ , F) correspondientes a los estadísticos de F de Wright (1978) F_{ST} y F_{IT} en el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). Los análisis se realizaron por locus y combinando todos los loci, para cada localidad, agrupando a las localidades por región del BMM y por grupo genético (ver resultados). La F_{ST} mide la divergencia en las frecuencias alélicas entre poblaciones y la F_{IT} la endogamia total de las poblaciones. A partir de ahora se referirá a los estadísticos θ y F como F_{ST} y F_{IT} respectivamente. La significancia de los estimadores se determinó usando el método de re-muestreo “bootstrap” con 1000 permutaciones. También se realizaron comparaciones de F_{ST} pareadas (no estandarizadas) entre sitios de colecta y entre regiones del BMM, ajustando los resultados para comparaciones múltiples con la corrección de Bonferroni. Debido a que los valores de F_{ST} son influenciados por los niveles de variabilidad genética adicionalmente a las F_{ST} no estandarizadas, se usó el programa RECODEDATA 0.1 (Meirmans 2006) para obtener una matriz de datos que permitiera estimar el valor máximo posible de F_{ST} , para así escalar los valor de F_{ST} a este máximo valor de F_{ST} , como lo recomienda Hedrick (2005). Dicho valor estandarizado de F_{ST} se conoce como F'_{ST} y permite hacer comparaciones entre loci con diferentes niveles de variación y con distintos tamaños efectivos poblacionales además de corregir por los altos niveles de variación dentro de las poblaciones (Hedrick 2005). Se realizaron comparaciones de F'_{ST} pareadas entre sitios de colecta y entre regiones del BMM y los resultados fueron ajustados para comparaciones múltiples mediante la corrección de Bonferroni.

Con el fin de explorar los patrones geográficos de diferenciación genética se realizó un análisis de asignación en el programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000), que se basa en el método Bayesiano para inferir el número más probable de grupos genéticos (K) al que pertenecen los individuos (Pritchard et al. 2000). STRUCTURE se corrió sin información sobre las localidades bajo el modelo de “admixture” con frecuencias alélicas correlacionadas. Este mismo análisis se realizó utilizando el modelo “LOCPRIOR”, el cual utiliza la información de las localidades en donde fueron recolectados los individuos, para ayudar en la detección de estructura genética cuando la señal es débil y no es detectada por los modelos estándares (Hubisz et al. 2009). Los datos también fueron analizados en STRUCTURE agrupando a las localidades por región del BMM usando el modelo de “LOCPRIOR”. Estos dos análisis se hicieron bajo el modelo de “admixture” con frecuencias alélicas correlacionadas. Para explorar la presencia de subgrupos dentro de cada uno de los grupos genéticos encontrados en los análisis anteriores, se realizaron análisis por separado en STRUCTURE, de cada uno de los grupos genéticos encontrados como se sugiere para datos con señal débil (Pritchard et al. 2010). Todos los análisis arriba descritos se realizaron con 10 corridas independientes para cada K (de $K=1$ a $K=8$) con un “burn-in” (punto de comienzo) de 500,000 y un número de réplicas de las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) después del burn-in de 1,000,000. Con el fin de determinar el valor de K más probable se promedió el logaritmo de las verosimilitudes de las diferentes corridas para cada K y se calculó el estadístico ΔK (Evano et al. 2005) para los análisis arriba descritos.

La estructura genética de *A. cyanocephala* también se evaluó por medio de cinco análisis de varianza molecular (AMOVAs) (Excoffier et al 1992) calculadas en ARLEQUIN 3.1 con un total de 16,000 permutaciones. La AMOVA permite determinar cómo se distribuye la variación genética entre y dentro de las poblaciones. La primera AMOVA fue realizada sin definir grupos *a priori*, en la segunda se definieron seis grupos correspondientes a las regiones del BMM (nSMO, cSMO, sSMO, TUX, pCHIS, cCHIS). En la tercera se definieron dos grupos genéticos y en la cuarta dos grupos genéticos y uno mezclado, con base a los resultados del análisis de asignación (ver resultados). En la quinta AMOVA, los grupos fueron definidos con base en los dos filogrupos (este y oeste del Istmo de Tehuantepec) detectados en un estudio previo de la especie en el que se usó ADN mitocondrial (Rodríguez-Gómez et al. sometido).

Las relaciones genéticas entre las localidades de *A. cyanocephala* se representaron gráficamente mediante un dendograma sin enraizar calculado con el método de Neighbor-

Joining y usando la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) en el programa MEGA4 (Tamura et al. 2007).

Flujo génico y barreras geográficas

Se calculó la tasa efectiva de migración (N_m) entre las localidades en el programa MIGRATE 3.0 (Beerli & Felsenstein 2001), el cual se basa en coalescencia. La N_m se estimó bajo un modelo de migración completa que permite la migración entre cualquier par de poblaciones como se supone en el modelo clásico de migración de isla (Beerli & Felsenstein 2001). La primera genealogía se realizó con un árbol al azar, la tasa de migración (M) y theta inicial fueron obtenidas a partir de los cálculos de las F_{ST} . Se corrieron diez cadenas cortas (30, 000 genealogías) y tres cadenas largas después de un burn-in de 20,000 genealogías.

En poblaciones continuas, se espera que la dispersión esté restringida entre localidades aledañas, como resultado de un patrón de aislamiento por distancia (IBD, por sus siglas en inglés) (Wright 1943). Para determinar si las localidades de *A. cyanocephala* se ajustan a un patrón de aislamiento por distancia se realizó una prueba de Mantel en el programa IBDWS 3.16 (Jensen et al. 2005) con 30, 000 permutaciones para comparar las distancias genéticas con las geográficas. Como distancias genéticas se utilizaron los valores de F_{ST} linearizados ($F_{ST}/1-F_{ST}$) y las distancias geográficas se calcularon a partir de las coordenadas de cada uno de los sitios de colecta. El aislamiento por distancia resulta de la relación entre distancias genéticas y geográficas pero dicho patrón puede ser confundido con vicarianza ya que la dispersión de los puntos de la regresión es generalmente muy grande (Bossart & Prowell 1998, Bohonak 2002). Para distinguir entre estas dos posibilidades (IBD vs vicarianza), Bossart & Prowell (1998) recomiendan realizar el análisis en conjunto y por separado los efectos de las poblaciones en la correlación de la distancia genética y geográfica para así evaluar si ciertas poblaciones o grupos de poblaciones son responsables de la autocorrelación espacial. Correlaciones significativas asociadas a ciertas poblaciones o grupos de poblaciones sugieren que vicarianza es la explicación más viable. Por lo tanto se realizaron pruebas de Mantel adicionales cada una incluyendo únicamente a las localidades que conformaron cada grupo genético detectado en STRUCTURE (ver resultados) como se describe arriba.

La posible existencia de barreras geográficas se evaluó en el programa BARRIER 2.2 (Manni et al. 2004), el cual detecta restricciones al flujo génico entre localidades. BARRIER conecta localidades basándose en las coordenadas geográficas de las mismas mediante

triangulaciones de Delaunay. A partir de una matriz de distancias genéticas entre pares de poblaciones, el programa indica las barreras en un mapa identificando los bordes de los polígonos en donde dichas distancias son las mayores. Como distancia genética se utilizó una matriz linearizada de F_{ST} de Slatkin (Slatkin 1995). La confianza estadística de cada barrera se obtuvo calculando 100 réplicas de la matriz de distancias mediante el re-muestreo de las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones .

Expansión demográfica

Se evaluó la posibilidad de cambios demográficos en las localidades, regiones del BMM y grupos genéticos detectados por STRUCTURE (ver resultados) de *A. cyanocephala* mediante las pruebas k (varianza dentro de un locus) y g (varianza entre loci) desarrollados por Reich & Goldstein (1998) y Reich et al. (1999) implementados en el programa KGTEST (Bilgin 2007).

Modelado del nicho ecológico actual y pasado

Para hacer el modelo de distribución actual de *A. cyanocephala* se utilizaron 19 variables climáticas de temperatura y precipitación (BIO 1-19) obtenidas de la base de datos de WorldClim (<http://worldclim.org/download>, Hijmans et al. 2005) con una resolución espacial de 30 seg (c.1 km²) (Hijmans et al. 2005). Estas variables están basadas en valores interpolados de temperatura y precipitación a partir de datos de estaciones climáticas alrededor del mundo y que comprenden el periodo entre 1950 y 2000 (Hijmans et al. 2005).

Se utilizaron 95 registros de ocurrencia de *A. cyanocephala* obtenidos de la GBIF (Global Biodiversity Information Facility <http://data.gbif.org/species/browse/taxon/>), junto con los registros de las localidades donde se recolectaron las muestras utilizadas en los análisis genéticos (n=27). Se realizaron correlaciones en el programa PAST 2.12 (Hammer 2011) para eliminar las variables bioclimáticas correlacionadas. Para la reconstrucción de la distribución pasada durante el UMG se utilizaron las mismas variables bioclimáticas con una resolución de 30 seg y los modelos de circulación: MIROC (Model for Interdisciplinary Research on Climate) (Hasumi & Emori 2004) y CCSM (Community Climate System Model) (Collins et al 2006) para su simulación. Para el desarrollo de los modelos de distribución potencial actual y pasada se utilizó el algoritmo MAXENT (Phillips et al. 2006). Se designó el 75 % y 25% de las muestras para entrenamiento y prueba del modelo, respectivamente. La calidad de los modelos se evaluó usando el área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés) de la ROC parcial. En este análisis se considera únicamente la

proporción de errores de omisión mínima tolerada (0.05) (Peterson et al. 2008, Barve 2008). Valores de AUC mayores a 1 indican que los modelos discriminaron entre las presencias y ausencias. Las distribuciones resultantes fueron proyectadas en el programa Arc View 3.2 (ESRI 1999).

El área de distribución geográfica potencial de *A. cyanocephala* para cada modelo (actual, MIROC y CCSM) se cuantificó con el programa Arc View 3.2 con cada píxel representando aproximadamente 1 km² (Tabla 7). Para comparar el área de distribución actual y pasados, se sobreposicionaron el modelo actual con la proyección bajo el modelo del UMG del escenario CCSM y del escenario MIROC.

Resultados

Genética de poblaciones

Variación genética y equilibrio de Hardy-Weinberg

Los índices de diversidad genética por localidad, combinando todos los loci se indican en la Tabla 2. El número promedio de alelos (N_{PA}) varió entre 0.8 y 5.5 en las localidades de San Bartolo Tutotepec (nSMO) y Pueblo Nuevo (cSMO) respectivamente. Los sitios de recolecta con mayor riqueza alélica RA (2) fueron Montebello (pCHIS) y Cerro Baúl (cCHIS), mientras que Alta Cima (nSMO) y La Mancha (cSMO) contaron con la menor riqueza alélica. Al agrupar las localidades por región del BMM, la mayor riqueza alélica la presentaron el Pacífico (pCHIS) y centro de Chiapas (cCHIS), mientras que el norte (nSMO) y el centro (cSMO) de la Sierra Madre Oriental fueron las regiones con menor riqueza alélica. La riqueza de alelos privados RAP(2) fue de cero para tres localidades del nSMO (Soledad, Oxpantla, San Bartolo Tutotepec) y cinco del centro de la SMO (Orduña, La Mancha, Coatepec, Huitzilán y Lagunillas). La mayor riqueza de alelos privados la presentó Montebello (cCHIS). Las regiones del norte y centro de la SMO fueron las que presentaron la menor riqueza de alelos privados y la del sur de la SMO la que mayor riqueza de alelos privados tuvo. El grupo genético 1 (norte y centro de la SMO y Los Tuxtles) tuvo menor riqueza alélica y riqueza de alelos privados que el grupo genético 2 (sur de la SMO, Pacífico y Centro de Chiapas). En resumen, los valores de mayor riqueza alélica y riqueza de alelos privados se encontraron en las localidades ubicadas en el Centro (cCHIS) y Pacífico de Chiapas (pCHIS) y el grupo genético formado por el sSMO, pCHIS y cCHIS.

El cálculo del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada sitio de muestreo por cada locus indicó que 13 de las localidades estuvieron en desequilibrio debido a una deficiencia de

heterocigotos en al menos un locus (Apéndice: Tabla 8). Para ninguna de las localidades se detectaron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg en más de cuatro loci, siendo las localidades de Montebello y Jitotol las que más loci en desequilibrio Hardy-Weinberg presentaron (Apéndice: Tabla 8). Algunos loci (A2-5-3, A1-4-1, A2-3-3) estuvieron en equilibrio Hardy-Weinberg en todas las localidades y ninguno de los loci estuvo desviado del equilibrio de Hardy-Weinberg en todas los sitios de recolecta, siendo el locus A1-1-6 el que más desviaciones presentó (Apéndice: Tabla 8). Únicamente la localidad de Montebello presentó valores de F_{IS} positivos y significativamente diferente de cero para un locus (Apéndice: Tabla 9).

En el análisis por localidad combinando todos los loci, se detectaron desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg, debido a una deficiencia de heterocigotos en las localidades de Clavijero, Lagunillas, Salvador Urbina, Montebello y Jitotol (Tabla 2). Los valores de F_{IS} fueron positivos y significativamente diferentes de cero después de la corrección de Bonferroni para dichas poblaciones. El análisis de MICRO-CHECKER encontró que las heterocigosidades observadas (H_O) y esperadas H_E fueron significativamente diferentes, sugiriendo la presencia de alelos nulos para el locus A1-1-6 en Clavijero y Montebello; el A1-13-8 en Jitotol; el A2-4-6 en Clavijero, Jitotol, Lagunillas y Montebello, el A1-10-9 en Lagunillas, Jitotol, Salvador Urbina y Montebello y el A2-1-2 en Jitotol. Los intervalos de las frecuencias de alelos nulos encontrados fueron de 0.17 a 0.25 para el locus A1-1-6; de 0.15 a 0.22 para el A2-4-6; de 0.13 a 0.19 para el A1-10-9; de 0.28 para el locus A2-1-2 y de 0.18 para el locus A1-13-8. No se encontraron errores de genotipificación o dominancia de alelos pequeños.

La prueba de desequilibrio de ligamiento de los loci por población, no fue significativa para ninguna de las comparaciones después de la corrección de Bonferroni ($P < 0.00004$), sugiriendo que todos los loci son independientes.

Estructura genética poblacional

Los estimadores de diferenciación genética (F_{ST} y F_{IT}) indicaron diferencias en las frecuencias alélicas entre localidades, regiones del BMM y grupo genético obtenido en STRUCTURE (ver resultados) para diferentes loci (Tabla 3). El análisis agrupando a las localidades por grupo genético obtenido en STRUCTURE, tuvo el mayor número de loci con valores de F_{ST} positivos y significativamente diferentes de cero, mientras que el mayor número de loci con valores de F_{IS} significativos, fue el mismo para las diferentes agrupaciones. Los valores de las F_{ST} y las F_{IS} al combinar todos los loci, fueron positivos y

significativos para las localidades, regiones del BMM y grupo genético, indicando diferenciación genética y deficiencias de heterocigotos respectivamente. El valor más alto de F_{ST} al combinar todos los loci, fue en el que se agruparon a las localidades por grupo genético obtenido en STRUCTURE ($F_{ST} = 0.041$) y el de la F_{IS} fue al agrupar por región del BMM y por grupo genético obtenido en STRUCTURE ($F_{IS} = 0.26$). La endogamia total (F_{IT}) también fue positiva y significativamente diferente de cero para las localidades, regiones y grupos genéticos obtenido en STRUCTURE para varios de los loci y al combinar todos los loci (Tabla 3).

Tanto el valor de diferenciación genética para todas las localidades de *A. cyanocephala* ($F_{ST} = 0.031$, $P < 0.001$) como el valor estandarizado de diferenciación genética ($F'_{ST} = 0.439$, $P < 0.001$) fueron significativos, indicando estructura genética. De un total de 378 comparaciones de las F_{ST} pareadas entre localidades, únicamente 30 resultaron significativas ($P < 0.05$, datos no mostrados) y ninguna de las comparaciones siguieron siendo significativas después de la corrección de Bonferroni ($P < 0.00014$, datos no mostrados). Por otro lado, 105 de las comparaciones de las F'_{ST} pareadas entre localidades resultaron significativas ($P < 0.05$, datos no mostrados) antes de la corrección de Bonferroni y cinco después de la corrección ($P < 0.00014$, datos no mostrados).

La mayoría de las comparaciones que resultaron significativas, fueron entre localidades del norte y centro de la Sierra Madre Oriental con las de Chiapas. Es importante hacer notar que para un gran número de comparaciones (140) tanto de F_{ST} como F'_{ST} no se pudo calcular la significancia debido al tamaño de muestra. Los valores de F_{ST} pareadas entre regiones, indicaron diferenciación genética significativa para cinco comparaciones antes de la corrección de Bonferroni y para cuatro después de la corrección (Tabla 4). Los valores de las F'_{ST} pareadas fueron significativas para 10 comparaciones y sólo siete fueron significativas después de la corrección de Bonferroni (Tabla 4).

Debido al tamaño de muestra de Los Tuxtlas, no fue posible calcular la significancia de las comparaciones de esta región con el resto; sin embargo, los valores de las F_{ST} y F'_{ST} fueron altos para la mayoría de las comparaciones de ésta región.

Tabla 2. Localidad, número de individuos analizados (N_I), número promedio de alelos (N_{PA}), riqueza alélica RA y riqueza de alelos privados RAP (con un tamaño de rarefacción de 2 alelos), proporción de heterocigotos observados (H_O) y esperados (H_E) y coeficiente de endogamia (F_{IS}) calculados para las localidades, regiones del bosque mesófilo de montaña (BMM) y grupo genético (grupo genético 1: nSMO+cSMO+TUX, grupo genético 2: sSMO, cCHIS, pCHIS). En negritas se indican desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg después de la corrección de Bonferroni ($P = 0.00018$). Las líneas indican que no se pudieron realizar los cálculos debido al tamaño de muestra.

Localidad	N_I	N_{PA}	RA (2)	RAP (2)	H_O	H_E	F_{IS}
Alta Cima	5	2.600	1.400	0.05	0.330	0.400	0.197
Soledad	7	3.600	1.520	0.00	0.569	0.520	-0.105
Picutla	1	1.500	-----	0.12	0.500	0.500	-----
Oxpantla	1	1.900	1.550	0.00	0.400	0.500	0.385
San Bartolo, Tutotepec	2	0.800	-----	0.00	0.200	0.200	-----
Tenango de Doria	2	1.300	1.480	0.01	0.250	0.267	0.333
Grutas de Tolantongo	5	2.000	1.520	0.03	0.275	0.387	0.359
nSMO	23	1.957	1.500	0.03	0.361	0.396	0.234
Orduña	3	2.200	1.430	0.00	0.467	0.440	-0.077
Clavijero	12	4.700	1.560	0.03	0.437	0.561	0.230
Pitaya	3	2.700	1.580	0.02	0.533	0.580	0.086
Coapexpan	6	2.900	1.530	0.03	0.460	0.534	0.155
Riscal	8	2.820	1.580	0.03	0.541	0.584	0.080
Macuiltepetl	5	3.400	1.600	0.04	0.550	0.602	0.097
Huatusco	2	2.000	1.410	0.06	0.400	0.417	0.059
La Mancha	1	1.400	1.400	0.00	0.400	0.400	-----
Coatepec	7	4.000	1.510	0.00	0.440	0.517	0.160
Cuetzalan	8	3.500	1.500	0.02	0.373	0.503	0.255
Huitzilan	6	2.900	1.430	0.00	0.317	0.431	0.288
Lagunillas	17	4.900	1.510	0.00	0.412	0.517	0.207

cSMO	78	2.654	1.513	0.027	0.444	0.507	0.140
Localidad	N_i	N_{PA}	RA (2)	RAP (2)	H_o	H_E	F_{IS}
Sierra Sta. Martha	3	1.900	1.570	0.02	0.467	0.507	0.158
TUX	3	1.900	1.570	0.31	0.467	0.507	0.158
GRUPO GENÉTICO 1	104	2.170	1.920	0.890	0.440	0.536	0.181
La Esperanza	1	1.100	-----	0.03	0.200	0.200	-----
San Martín Caballero	3	2.500	1.540	0.02	0.400	0.547	0.314
sSMO	4	1.800	1.540	0.36	0.300	0.373	0.314
Cerro Baúl	6	4.100	1.610	0.06	0.525	0.616	0.161
Salvador Urbina	13	4.800	1.580	0.03	0.466	0.581	0.205
pCHIS	19	4.450	1.568	0.31	0.423	0.529	0.249
Montebello	12	5.300	1.630	0.07	0.486	0.637	0.247
Jitotol	10	4.600	1.570	0.03	0.364	0.574	0.378
Pueblo Nuevo	11	5.500	1.600	0.03	0.503	0.602	0.171
cCHIS	33	4.792	1.600	0.35	0.451	0.604	0.265
GRUPO GENÉTICO 2	56	3.680	2.050	1.010	0.455	0.602	0.247

Tabla 3. Valores de F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} para las localidades, regiones del bosque mesófilo de montaña (BMM) y los dos grupos genéticos para cada locus y combinando todos los loci. En negritas se indican los valores significativos ($P < 0.001$) después del “bootstrap” con 1000 permutaciones

	LOCUS										TOTAL
	A1-1-6	A2-1-2	A2-5-3	A1-4-1	A1-3-5	A1-13-8	A2-5-1	A2-4-6	A1-10-9	A2-3-3	
Localidades											
F_{IS}	0.259	0.185	0.035	-0.038	0.081	0.104	0.321	0.359	0.356	0.248	0.198
F_{ST}	0.009	0.026	0.029	0.078	0.01	0.045	-0.013	0.025	0.03	0.043	0.031
F_{IT}	0.265	0.205	0.063	0.043	0.09	0.144	0.312	0.375	0.375	0.28	0.223
Región del BMM											
F_{IS}	0.259	0.176	0.067	0.001	0.072	0.13	0.259	0.372	0.359	0.251	0.206
F_{ST}	0.012	0.051	-0.009	0.053	0.029	0.021	0.102	0.005	0.035	0.053	0.029
F_{IT}	0.268	0.218	0.058	0.054	0.098	0.148	0.335	0.375	0.381	0.291	0.229
Grupo genético											
F_{IS}	0.259	0.174	0.059	0.007	0.067	0.135	0.268	0.368	0.362	0.256	0.206
F_{ST}	0.017	0.076	0.006	0.066	0.05	0.018	0.123	0.022	0.04	0.065	0.041
F_{IT}	0.272	0.237	0.064	0.072	0.114	0.151	0.358	0.382	0.388	0.304	0.239

Tabla 4. F_{ST} (arriba de la diagonal) y F'_{ST} (debajo de la diagonal) pareadas entre regiones del BMM. Los valores significativos se indican en negritas antes ($P < 0.05$) y con un asterisco después ($P < 0.003$) de la corrección de Bonferroni. Debido al tamaño de muestra la significancia de las comparaciones de Los Tuxtlas con el resto de las regiones no pudo calcularse.

	nSMO	cSMO	sSMO	TUXT	pCHIS	cCHIS
nSMO	-	0.001	0.094	0.050	0.061*	0.050*
cSMO	0.469*	-	0.0231	0.023	0.046*	0.037*
sSMO	0.455	0.430*	-	-0.065	0.050	-0.001
TUXT	0.485	0.463	0.383	-	-0.042	-0.0017
pCHIS	0.453*	0.438*	0.387	0.425	-	-0.0014
cCHIS	0.437*	0.429*	0.376	0.407	0.397*	-

El análisis de asignación de las localidades sin utilizar la información de estas, no indicó grupos genéticos distintos (datos no mostrados). Sin embargo, en el análisis en el que se utilizó la información de las localidades (modelo “LOCPRIOR”), el número de grupos más probables fue de $K=2$ (Fig. 2). Un grupo está formado por los individuos recolectados en las localidades del norte y centro de la Sierra Madre Oriental así como los individuos de Los Tuxtlas. El otro grupo está constituido por los individuos recolectados en el sur de la Sierra Madre Oriental así como los del Pacífico y centro de Chiapas (Fig. 2a). El valor calculado de ΔK corroboró la existencia de dos grupos genéticos (Fig 2b).

En el análisis en el que se agruparon a las localidades por región del BMM (nSMO, cSMO, sSMO, TUX, pCHIS y cCHIS) y en el que se utilizó la información de las localidades (modelo “LOCPRIOR”), el número de grupos genéticos más probables (K) fue también de dos (Fig. 3a). Un grupo corresponde a las regiones norte y centro de la Sierra Madre Oriental mientras que el otro a las regiones del sur de la Sierra Madre Oriental, el Pacífico y centro de Chiapas. Los individuos de Los Tuxtlas parecen ser una mezcla de genotipos del norte y centro de la Sierra Madre Oriental (en rojo Fig. 3a) con aquellos de Chiapas y el sur de la Sierra Madre Oriental (en verde Fig. 3a). El valor calculado de ΔK indica la presencia de dos grupos genéticos, pero la existencia de tres grupos genéticos no es muy diferente a la de dos (Fig 3b). Los análisis adicionales de STRUCTURE realizados para cada uno de los grupos genéticos detectados por separado, con el fin de detectar subgrupos no mostraron diferenciación genética adicional (datos no mostrados).

Las AMOVAs indicaron diferenciación genética en todos los niveles jerárquicos de todos los análisis (Tabla 5). En la AMOVA en el que no se definieron grupos, únicamente el 4.7% de la variación genética estuvo explicada por diferencias entre localidades mientras que el 95.3% por diferencias dentro de las poblaciones. Así mismo, cuando se agruparon las localidades por regiones del BMM, el mayor porcentaje de la variación (93.5%) fue explicado por diferencias dentro de las poblaciones, el 4.49% por diferencias entre poblaciones y únicamente 1.94% por diferencias entre los seis grupos del BMM. En la AMOVA en la que se definieron dos grupos genéticos (nSMO + cSMO y sSMO + pCHIS + cCHIS) y un grupo mezclado (TUX) basándose en los resultados de STRUCTURE, los porcentajes de la variación explicados por diferencias dentro de las poblaciones, entre poblaciones y entre grupos genéticos fueron de 92.6%, 4.3% y 3.01% respectivamente. De forma similar, los resultados de la AMOVA en la que se definieron dos grupos genéticos (nSMO + cSMO + TUX y sSMO + pCHIS + cCHIS) los porcentajes de la variación explicados por diferencias dentro de las poblaciones, entre poblaciones y entre grupos genéticos fueron de 92.6%, 4.47% y 2.83% respectivamente. Los resultados de la AMOVA en el que se agrupó de acuerdo a los filogrupos detectados con el ADN mitocondrial (este y oeste del Istmo de Tehuantepec), indicaron que la mayor parte de la variación genética es explicada por diferencias dentro de las localidades (92.52%), el 4.4% por diferencias entre regiones del BMM y el 3.06% por diferencias entre grupos ubicados a cada lado del Istmo. Los valores de las F_{CT} de las AMOVAs en las que se definieron dos grupos genéticos y uno mezclado (STRUCTURE), dos grupos genéticos (STRUCTURE) y dos grupos genéticos a cada lado del Istmo fueron iguales y más altos que el de las otras dos agrupaciones (Tabla 5).

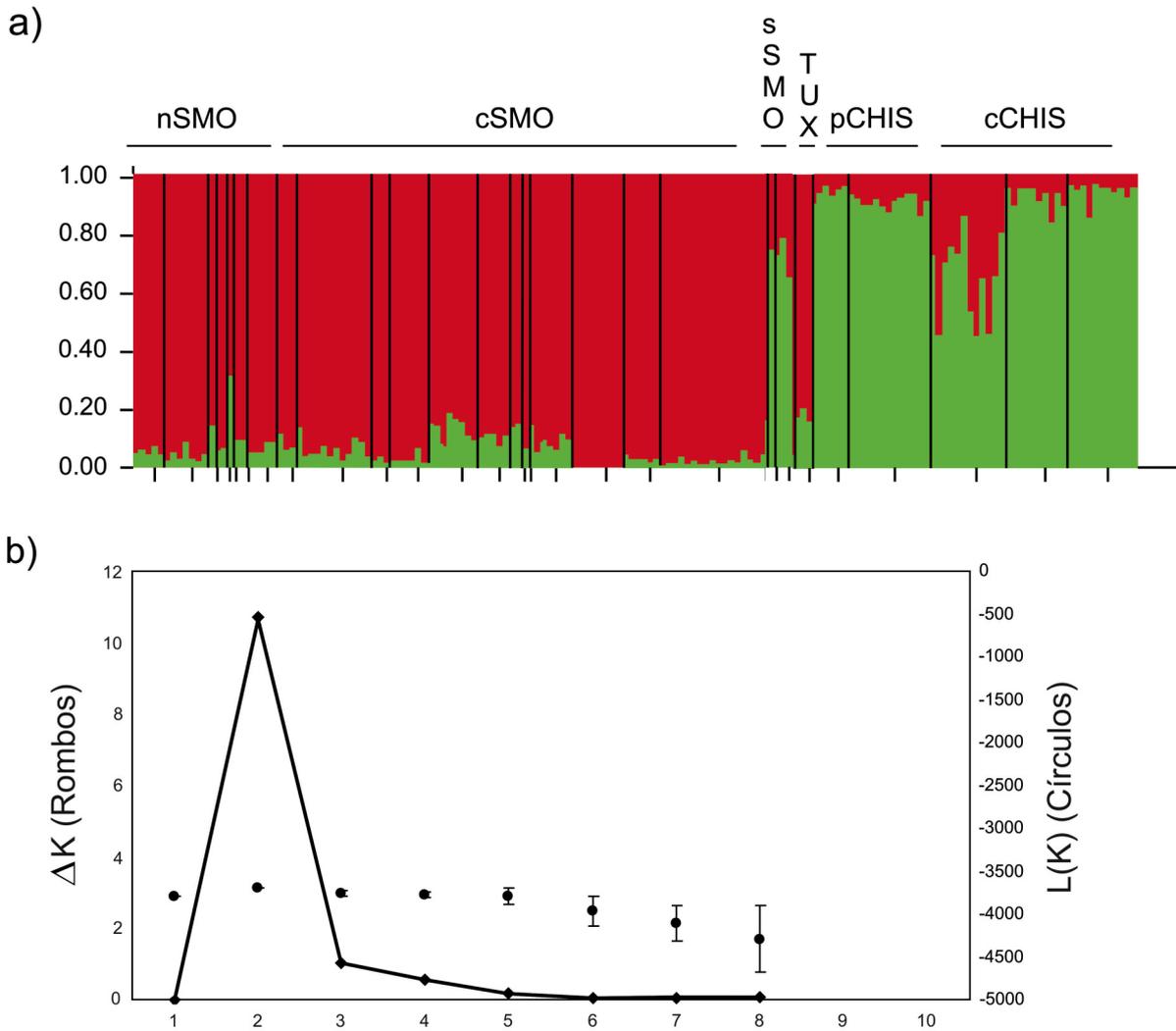


Figura 2. a) Asignación de individuos de *A. cyanocephala* a grupos genéticos (K) mediante STRUCTURE. Probabilidad de los 160 individuos de pertenecer a un número óptimo de $K=2$. Cada columna representa un individuo y está dividida en secciones de colores que representan el número de grupos a los que pertenecen. Las localidades se encuentran separadas por una línea negra vertical. Debajo de la gráfica se indican las regiones del BMM. b) Media de la probabilidad logarítmica de los datos y su desviación estándar de 10 corridas para cada valor de K (a la derecha del eje Y) y valores de ΔK ($K=1$ a $K=10$) (a la izquierda del eje Y), calculados de acuerdo a Evanno et al. (2005).

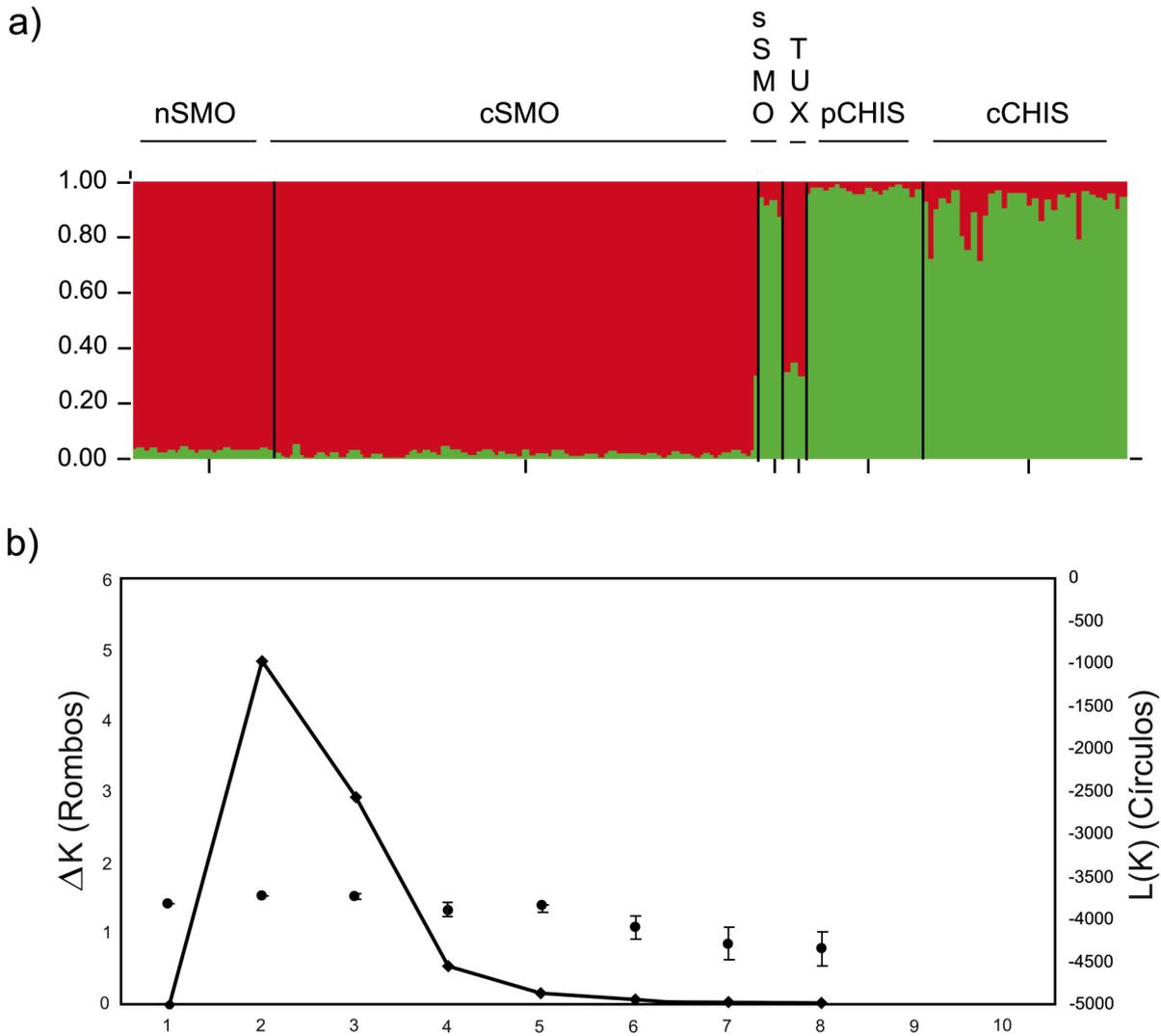


Figure 3. a) Asignación de individuos de *A. cyanocephala* a grupos genéticos (K) mediante STRUCTURE, agrupando a los individuos en regiones del BMM. Probabilidad de 160 individuos de pertenecer a un número óptimo de $K=2$. Cada columna representa un individuo, la cual está dividida en secciones de colores que representan el número de grupos a los que pertenecen. Las regiones del BMM están separadas por una línea vertical negra. Debajo de la gráfica se indican las regiones del BMM. b) Media de la probabilidad logarítmica de los datos y su desviación estándar de 10 corridas para cada valor de K (a la derecha del eje Y) y valores de ΔK ($K=1$ a $K=5$) (a la izquierda del eje Y) calculados de acuerdo con Evanno et al. (2005).

Tabla 5. Resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVA) de *A. cyanocephala*. a) sin agrupar las localidades, b) agrupando las localidades por región del BMM, c) agrupando las localidades en dos grupos genéticos y uno mezclado (Los Tuxtlas) en base a los resultados de STRUCTURE, d) agrupando las localidades en dos grupos genéticos obtenidos en el análisis de STRUCTURE e) agrupando las localidades al este y al oeste del Istmo de Tehuantepec (IT)

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Porcentaje total	Indices de fijación	P valor
a) Sin grupos definidos					
Entre poblaciones	26	10.81	4.7	$F_{ST}=0.06$	0.0049
Entre individuos	273	77.52	95.3		
b) Regiones del BMM					
Entre regiones	5	12.26	1.94	$F_{CT}=0.02$	0.0007
Entre poblaciones	21	32.34	4.49	$F_{ST}=0.06$	0.0040
Dentro de poblaciones	273	277.59	93.55	$F_{SC}=0.05$	0.0260
c) Dos grupos genéticos y Los Tuxtlas					
Entre grupos	2	7.78	3.01	$F_{CT}=0.03$	0.001
Entre poblaciones	24	36.81	4.3	$F_{ST}=0.07$	0.005
Dentro de poblaciones	273	277.59	92.6	$F_{SC}=0.04$	0.04
d) Dos grupos genéticos					
Entre grupos	1	6.11	2.83	$F_{CT}=0.03$	0.003
Entre poblaciones	25	38.48	4.47	$F_{ST}=0.07$	0.0300
Dentro de las poblaciones	273	277.59	92.69	$F_{SC}=0.05$	0.0007
e) Dos grupos a cada lado del Istmo (IT)					
Entre grupos	1	6.32	3.06	$F_{CT}=0.03$	0.005
Entre poblaciones	25	38.27	4.40	$F_{ST}=0.07$	0.003
Dentro de las poblaciones	273	277.59	92.52	$F_{SC}=0.05$	0.02

El dendograma realizado a partir de los valores de distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) entre localidades no muestra una clara estructura genética que corresponda a las diferentes regiones del BMM. Sin embargo, las localidades del centro y Pacífico de Chiapas junto con una localidad del sur de la SMO forman un grupo genéticamente homogéneo, algunas localidades del norte, centro y sur de la SMO (HUAT, PI, OXP, CABU y ESP) forman otro grupo y el resto de los sitios se agrupan a un tercer clado (Fig 4).

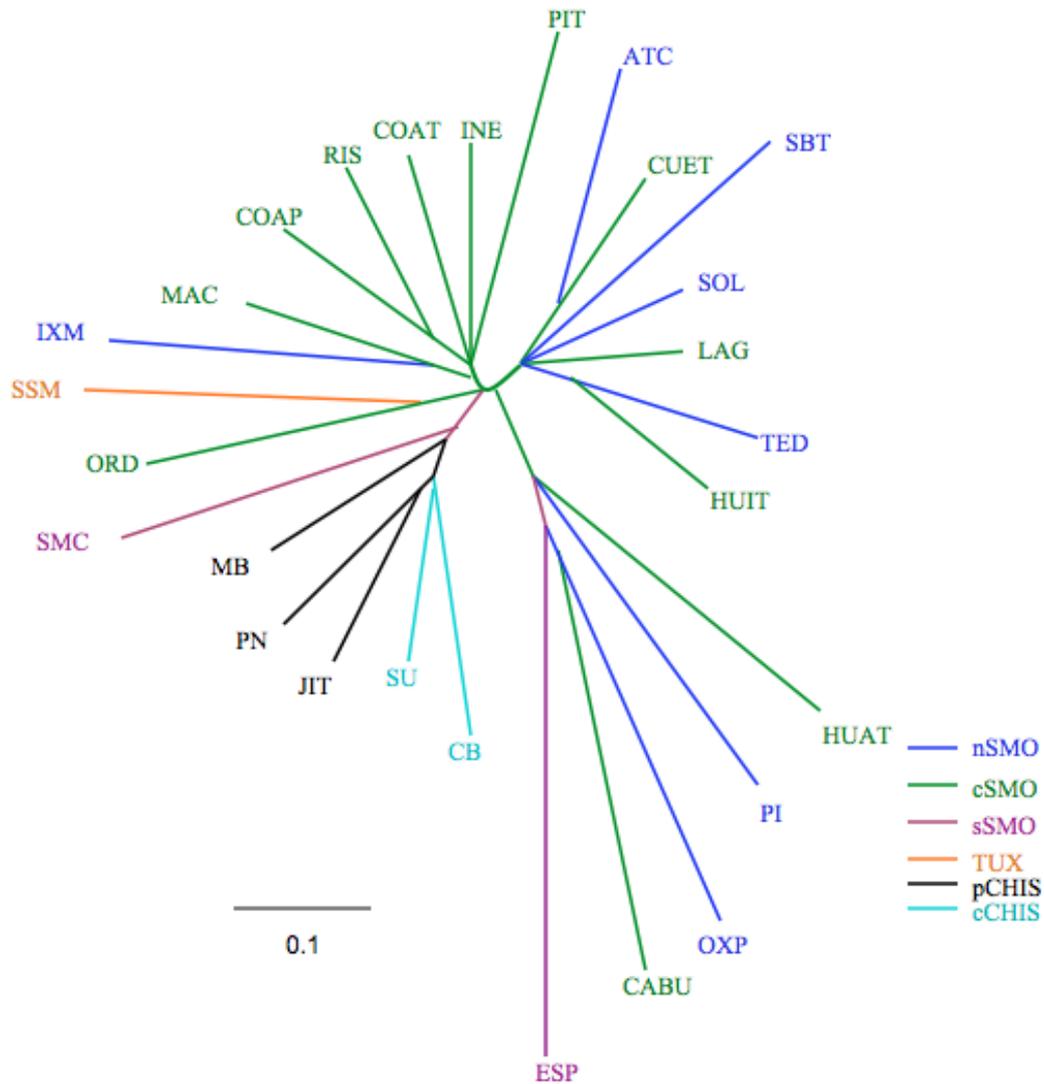


Figura 4. Dendograma sin enraizar mostrando las relaciones entre las diferentes localidades de *A. cyanocephala*. El árbol se calculó con el método de Neighbor-Joining usando la distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967). Referirse a la Tabla 1 para los códigos de las abreviaciones de las poblaciones. Se indican las regiones del BMM al que pertenece cada una de las localidades.

Flujo génico y barreras geográficas

La mayoría de las regiones del BMM presentaron un número de migrantes (N_m) mayor a 1 (Tabla 6). La región de Los Tuxtlas presentó el nivel más alto de migración, con 5.35 y 5.32 individuos migrando hacia el centro y sur de la Sierra Madre Oriental, respectivamente. Un número similar de migrantes ($N_m=4.67$) se detectaron de Los Tuxtlas a las dos regiones localizadas en Chiapas. En la dirección opuesta (de las dos regiones de Chiapas hacia Los Tuxtlas) el número de migrantes fue de los más bajos ($N_m= 1.63$ y 1.44), indicando flujo asimétrico entre estas regiones. De igual forma, el número de migrantes fue alto del sur de la Sierra Madre Oriental al Pacífico y centro de Chiapas con 4.08 y 3.24, respectivamente; mientras que en la dirección opuesta (del Pacífico y centro de Chiapas al sur de la Sierra Madre Oriental) el número de migrantes fue menor (Tabla 6). La migración entre el norte y centro de la Sierra Madre Oriental, en general fue más baja que entre el resto de las regiones. Si se agrupan las regiones del BMM, de la Tabla 6, en los dos grupos genéticos sugeridos por STRUCTURE, los resultados del análisis del número de migrantes sugieren que la migración entre los grupos genéticos nSMO + cSMO y sSMO + cCHIS y pCHIS es asimétrica, siendo mayor el flujo génico del sur hacia el norte.

Tabla 6. Estimación del número efectivo de migrantes por generación (N_m) entre las seis regiones del BMM. Las poblaciones receptoras se indican con un asterisco.

	nSMO*	cSMO*	sSMO*	TUXT*	pCHIS*	cCHIS*
nSMO	-	3.37	0.85	0.62	1.45	1.84
cSMO	1.89	-	0.98	1.41	1.45	1.90
sSMO	2.17	2.67	-	2.40	4.08	3.24
TUXT	1.59	5.35	5.32	-	4.67	4.67
pCHIS	2.07	2.83	1.44	1.63	-	3.36
cCHIS	2.33	1.46	2.52	1.44	1.92	-

La prueba de Mantel para determinar si existe una correlación entre distancias genéticas y geográficas de todas las localidades muestreadas de *A. cyanocephala* resultó marginalmente significativa ($r= 0.19$, $P = 0.057$). El análisis realizado únicamente con las localidades del grupo genético (norte y centro de la SMO) detectado por STRUCTURE no muestra aislamiento por distancia ($r = -0.21$, $P = 0.08$) ni tampoco el que sólo incluyó a las localidades del otro grupo genético (sur de la SMO y Chiapas, $r = 0.11$, $P = 0.6$).

Los límites geográficos revelados por el programa Barrier se muestran en la Figura 5. En el mapa se representan tres bordes que corresponden a zonas que actúan como barreras al flujo génico entre poblaciones y que tienen valores moderadamente altos de bootstrap. El borde con el valor de bootstrap más alto, corresponde a una barrera que separa a las poblaciones del norte y centro de la SMO de las poblaciones del sur de la SMO y Chiapas, la cual corresponde a la cuenca del Papaloapan. Los otros dos bordes separan a las poblaciones de la SMO y a la de Los Tuxtlas de las de Chiapas y a los Tuxtlas del resto de las poblaciones, respectivamente. Dichas barreras corresponden al Istmo de Tehuantepec y a una parte de la Planicie costera del Golfo que rodea a Los Tuxtlas.

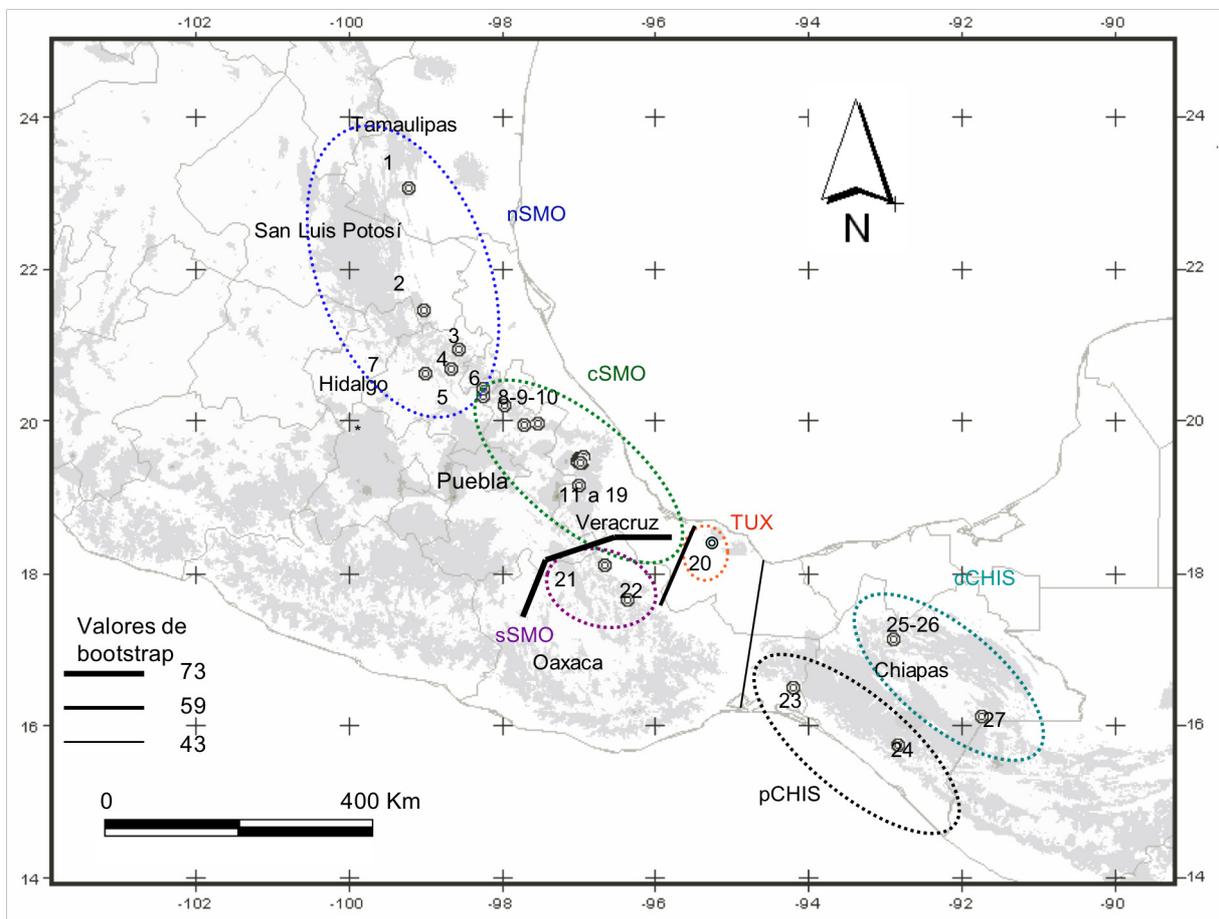


Figure 5. Discontinuidades geográficas y genéticas en la distribución de *Amazilia cyanocephala*. Los números corresponden a las localidades y los óvalos en colores indican las distintas áreas del BMM. Las barreras entre las poblaciones se indican con líneas en color negro. El grosor de las líneas corresponde a los valores de bootstrap. Para los códigos de las localidades y las abreviaciones de las regiones, referirse a la Tabla 1.

Expansión demográfica

Las pruebas de k y de g fueron en su mayoría no significativas para las localidades y agrupando por región del BMM y por grupo genético detectado por STRUCTURE, indicando equilibrio demográfico. La prueba de k sólo fue significativa para las localidades Cerro Baúl ($k = 9, P = 0.008$), que se localiza en el Pacífico de Chiapas y para Jitotol ($k = 8, P = 0.04$) que se encuentra en el centro de Chiapas. La prueba de g fue significativa para la región del norte de la Sierra Madre Oriental ($g = 0.15, P < 0.05$) valor menor al de la tabla de Reich et al. 1999).

Modelación del nicho ecológico actual y pasado

Los valores de la AUC obtenidas para los tres modelos fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores a 1 (modelo actual=1.71, modelo UMG (MIROC)=1.57 y modelo UMG (CCSM)=1.73), indicando una clasificación correcta de los datos de presencia y ausencia de la especie en los tres modelos. Las proyecciones de los escenarios climáticos muestran cambios considerables entre los modelos del pasado (UMG) y el actual (Fig. 6). Durante el UMG, el modelo bajo el escenario climático de CCSM, sugiere que hubo mayor área con condiciones climáticas viables para la especie entre las poblaciones de la Sierra Madre Oriental, del Pacífico y del centro de Chiapas (Fig. 6a). Bajo el escenario de MIROC (Fig. 6b) el área con condiciones viables para la especie fue menor para las regiones del sSMO y Los Tuxtlas que en el escenario de CCSM, quedando aisladas entre sí y sin contacto con las poblaciones de Chiapas (Fig. 6b). En el modelo del escenario actual hay una reducción del área con condiciones favorables para la especie, quedando aislada en parches. Dichos parches corresponden al norte mas el centro de la SMO, sur de la SMO, Los Tuxtlas y Chiapas (Fig. 6c). En general, la distribución de las condiciones climáticas viables para *A. cyanocephala* en el UMG indican una conexión de los bosques debido al descenso de los mismos a bajas altitudes, lo cual pudo haber promovido la migración de los individuos y flujo génico entre las distintas áreas del BMM. Las áreas geográficas representadas por el número de píxeles fueron mayores para los modelos del pasado (UMG) bajo ambos escenarios de MIROC y CCSM, que para el presente (Tabla 7). De igual forma al sobreponer los dos modelos del pasado con el del presente, se encontró que en el UMG existió mayor área con condiciones viables para las poblaciones de *A. cyanocephala* que en el presente, sugiriendo una expansión del área de distribución de la especie durante el UMG (Fig. 7).

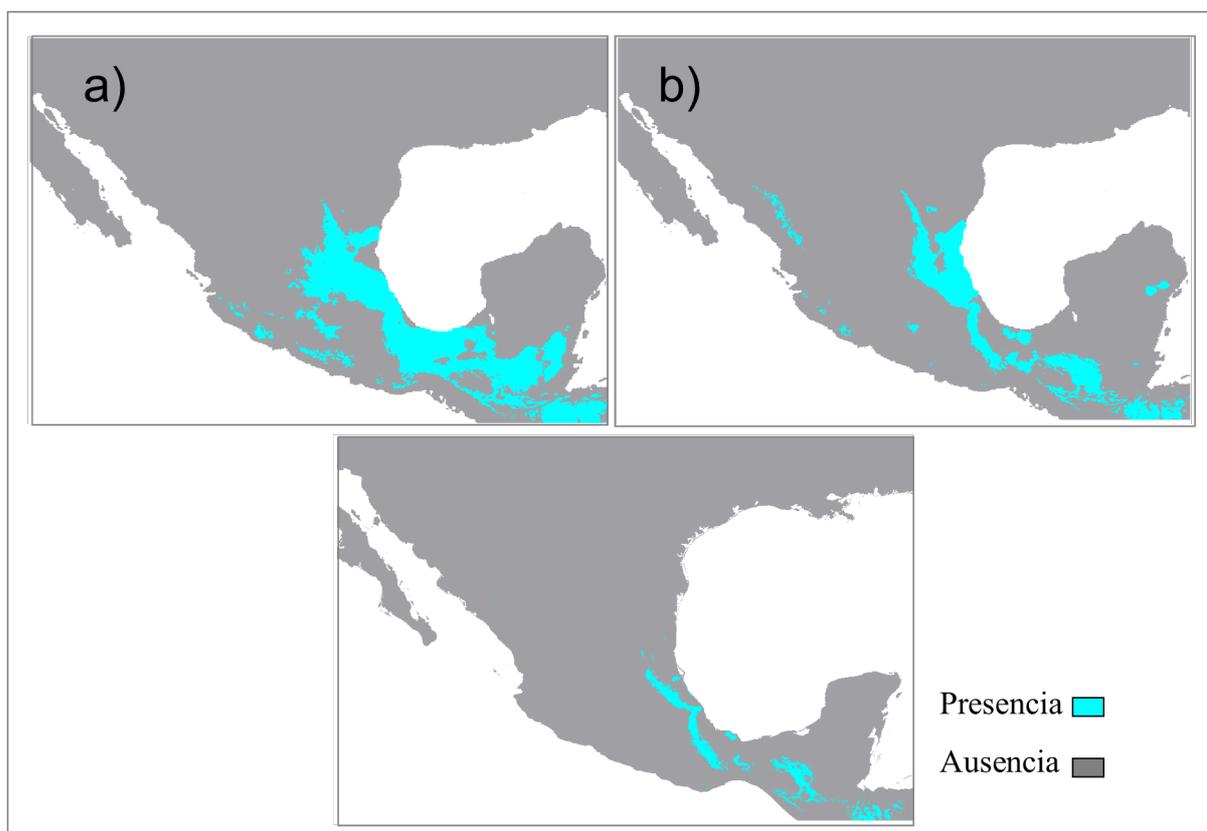


Figura 6. Distribución potencial de *A. cyanocephala* en México a) bajo el escenario de CCSM en el UMG, b) bajo el escenario MIROC en el UMG y c) bajo el modelo actual.

Tabla 7. Área geográfica de *Amazilia cyanocephala* ocupada de acuerdo a cada modelo de distribución. El área geográfica se indica en km^2 , en donde cada pixel corresponde a aproximadamente a 1km^2 .

Escenario de distribución	Área geográfica aproximada (km^2)
Pasado UMG: CCSM	523,056 km^2
Pasado UMG: MIROC	286,542 km^2
Presente	86,930 km^2

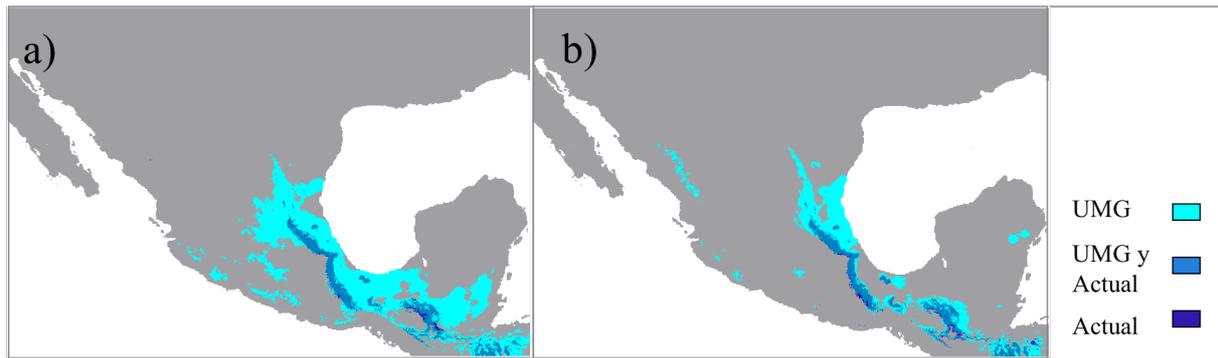


Figura 7. Comparación entre las áreas geográficas de los modelos de distribución del UMG (CCSM y MIROC) y del presente para *A. cyanocephala*. Se muestra el área de distribución geográfica de los modelos del UMG a) CCSM y b) MIROC, así como el área donde coinciden cada uno de dichos modelos con el actual y el área exclusiva de distribución del modelo actual.

Discusión

Diversidad genética

La diversidad genética estimada con el número promedio de alelos, fue en general baja en las diferentes localidades de *A. cyanocephala*. La riqueza alélica también fue baja en todas las localidades y regiones presentando niveles similares. Así mismo, la riqueza de alelos privados fue similar en las diferentes poblaciones de *A. cyanocephala* pero al agrupar las poblaciones en regiones, las del Pacífico, centro de Chiapas y sur de la Sierra Madre Oriental presentaron un mayor número de alelos privados comparado con las poblaciones del norte y centro de la Sierra Madre Oriental. El grupo genético formado por el sSMO y Chiapas presentó mayor riqueza alélica comparado con el grupo genético constituido por el nSMO y cSMO. La riqueza alélica encontrada en este estudio es comparable a lo reportado para el colibrí *Campylopterus curvipennis*, que es una especie que también habita en el BMM (González et al. 2011). Sin embargo, es más baja a la encontrada con microsatélites en otras especies de aves (Barr et al. 2008, Callens et al. 2011, Miller et al 2012). Los bajos niveles de diversidad genética encontrados en este estudio pueden ser resultado de endogamia en las poblaciones, bajo tamaño efectivo de la población, cuellos de botella o expansiones poblacionales recientes (Pulgarín & Burg 2012, Alcaide et al. 2009, Caizergues et al. 2003, Johnson et al. 2003).

De forma similar, los resultados del estudio de *A. cyanocephala* en el que usaron ADN mitocondrial, reportan que la mayoría de las poblaciones presentan baja diversidad nucleotídica y pocos haplotipos privados en las poblaciones de la especie (Rodríguez-Gómez et al. sometido). En conjunto, los patrones de baja diversidad genética obtenidos con microsatélites (este estudio) y con el ADN mitocondrial (Rodríguez-Gómez et al. sometido) sugieren que las poblaciones de *A. cyanocephala* tiene las características típicas de especies que han sufrido expansiones poblacionales recientes y rápidas (Pulgarín & Burg 2012). Las pruebas de k y g de expansión demográfica con microsatélites soportan en cierta parte estos resultados, ya que fueron estadísticamente significativas para el norte de la Sierra Madre Oriental y para dos de las localidades de Chiapas, indicando expansiones poblacionales. Sin embargo, los análisis de expansión poblacional realizados para cada grupo genético detectado con STRUCTURE no fueron significativos, por lo que sería necesario realizar pruebas de expansión poblacional empleando métodos más robustos tales como los bayesianos. En el estudio de *A. cyanocephala* en el que se empleó ADN mitocondrial, se detectaron dos grupos genéticos ubicados al este y al oeste del Istmo de Tehuantepec que sufrieron expansiones demográficas durante el Pleistoceno (Rodríguez-Gómez et al. sometido). Es posible que las expansiones poblacionales de *A. cyanocephala* detectadas con el ADN mitocondrial y por el nuclear hayan sido promovidas por el aumento del área con condiciones climáticas viables para la especie, incrementándose así el tamaño de sus poblaciones. Esta idea es soportada por los dos modelos de nicho proyectados hacia el UMG, que indican que el área geográfica con hábitat climáticamente viable para *A. cyanocephala*, representada por el número de píxeles, fue mayor durante el UMG que en el presente.

Flujo génico y expansiones de distribución

Los resultados de los modelos del nicho ecológico sugieren que durante el UMG el área con condiciones viables para *A. cyanocephala* se extendía a lo largo de la Sierra Madre Oriental y era mayor que en el presente. Es posible que contactos repetidos durante los períodos glaciales, en los que el hábitat favorable para *A. cyanocephala* descendió a altitudes mas bajas para evadir las menores temperaturas de las zonas montañosas, promovieran la dispersión de la especie entre las regiones del norte y centro de la SMO y con esto el flujo génico entre las mismas, homogeneizando genéticamente a las poblaciones. Esto es soportado por los resultados de flujo génico obtenidos de MIGRATE, que indican que hubo altos niveles de migración entre las poblaciones del norte y centro de la SMO. Otros estudios han

encontrado expansiones del rango de distribución de diferentes especies con datos genéticos y geográficos en el Neotrópico (Bryson et al. 2011, Klicka et al. 2011, Smith et al. 2011) y en particular en la Sierra Madre Oriental. Por ejemplo en las aves *Cardinalis cardinalis* y *Picoides villosus* se encontró que el área de distribución geográfica en la SMO fue mayor durante el UMG que en el presente y detectaron expansión poblacional en ambas especies (Smith et al. 2010, Klicka et al. 2011).

Los modelos del nicho proyectados hacia el UMG también sugieren que áreas con las condiciones favorables para la especie en el sur de la SMO se encontraban conectadas con las de Chiapas, contrario a lo indicado por el modelo del presente. Dicha conexión de las condiciones climáticas también pudo haber promovido el contacto entre poblaciones de *A. cyanocephala* a través del Istmo de Tehuantepec permitiendo el intercambio genético y la retención de alelos compartidos entre las poblaciones del sur de la SMO y Chiapas como lo reflejan los resultados de los microsatélites, que sugieren que los individuos del sur de la SMO son genéticamente más similares a los individuos de Chiapas. De forma similar, los resultados del estudio previo de *A. cyanocephala* con ADN mitocondrial (Rodríguez-Gómez et al. sometido) muestran que el haplotipo más frecuente está ampliamente distribuido desde Tamaulipas hasta Chiapas, sugiriendo flujo génico histórico entre las poblaciones de esta especie. La migración entre las poblaciones de la SMO y las de Chiapas encontrada con los microsatélites es asimétrica, con un mayor número de migrantes de las poblaciones de Chiapas hacia las de la SMO. Esto concuerda con lo reportado para el ADN mitocondrial en el que aparentemente la fuente de migrantes son las poblaciones de Chiapas (Rodríguez-Gómez et al. sometido) y puede estar relacionado con cambios de la distribución del BMM durante los ciclos glaciales del Pleistoceno. Sin embargo, es importante incluir muestras de la especie distribuidas al sur de Chiapas para confirmar la direccionalidad de la migración.

De acuerdo al escenario climático del modelo CCSM, durante el UMG, también existieron las condiciones disponibles para *A. cyanocephala* entre los Tuxtles y la SMO y entre los Tuxtles y Chiapas, sugiriendo una conexión entre dichas regiones. Los resultados de los microsatélites, en general concuerdan con esto, ya que los individuos recolectados en Los Tuxtles parecen ser una mezcla, es decir tienen una probabilidad similar de pertenecer al grupo de la SMO que al de Chiapas, como lo indican los resultados del análisis de asignación. De igual forma, el número de migrantes de Los Tuxtles hacia las tres regiones de la SMO y hacia Chiapas es de las más altas, sugiriendo elevados niveles de flujo génico entre estas regiones. Dicha migración es también asimétrica, el número de migrantes es mayor en la dirección de los Tuxtles a la SMO y a Chiapas. Esto posiblemente se deba a que cuando los bosques

estuvieron conectados en el UMG, se promovió la migración de individuos en busca de más recursos de la región más pequeña que son Los Tuxtlas hacia otras regiones del BMM. Sin embargo, debido al número limitado de muestras de Los Tuxtlas estos resultados deben ser tomados cautelosamente.

Por otro lado en el modelo de nicho actual se puede observar una reducción del hábitat de *A. cyanocephala* y por lo tanto discontinuidad entre algunas de las regiones del BMM, quedando distribuido en parches que corresponden al norte mas el centro de la SMO, el sur de la SMO, Los Tuxtlas y Chiapas. Debido a la distribución actual del BMM y a observaciones de campo, que sugieren que *A. cyanocephala* habita dichos parches y que es residente/sedentaria (Johnsgard 1997, Del Hoyo et al. 1999), se esperaría encontrar bajos niveles de flujo génico entre las diferentes regiones del BMM con los microsatélites. Sin embargo, las estimaciones de flujo génico obtenidas con los microsatélites no concuerdan con esto ya que sugieren dispersión de este colibrí a través de las distintas regiones del BMM. Es posible que el efecto de la fragmentación actual del BMM y el consecuente aislamiento genético entre las poblaciones no se vea aún reflejado en los microsatélites debido a que no ha transcurrido suficiente tiempo para que acumulen mas diferencias, siendo los patrones observados la huella genética dejada por las glaciaciones del Pleistoceno. Esto es soportado por el bajo polimorfismo de los diferentes loci de *A. cyanocephala* analizados en este estudio, el cual es en general menor que en otras especies de aves (Barr et al. 2008, McCormack et al. 2008, Callens et al. 2011, Miller et al 2012). El uso de marcadores mas variables como los AFLPs ayudaría a determinar si los patrones detectados se deben a la presencia de polimorfismos ancestrales o flujo génico.

Patrones de estructuración genética y barreras geográficas

Los análisis de asignación sugieren la presencia de dos grupos genéticos, el primero conformado por el nSMO y el cSMO y el segundo por las localidades del sSMO, del Pacífico y centro de Chiapas. Resultados similares se encontraron con el ADN mitocondrial pero en dicho estudio uno de los grupos genéticos está constituido por las localidades de la SMO (norte, centro y sur) y el otro por las de Chiapas (Rodríguez et al. sometido). Esta discordancia podría explicarse por dispersión diferencial de los sexos como se ha sugerido para otras especies de aves (Prugnolle & Meeus 2002) o por dispersión secundaria de los individuos del sur de la SMO a través del Istmo de Tehuantepec. Este tipo de dispersión secundaria a través del Istmo ha sido reportada en otros taxa (Castoe et al. 2003, Mulcahy et

al. 2006, Duennes et al. 2012). El análisis de STRUCTURE, agrupando por región del BMM, detectó que los individuos colectados en Los Tuxtlas son una mezcla de genotipos del norte y centro de la SMO y del sur de la SMO y Chiapas, sugiriendo altos niveles de flujo génico entre estas regiones y Los Tuxtlas y la presencia de individuos mezclados. Estos individuos son el resultado de apareamientos entre individuos de Chiapas con los de la SMO, siendo estos los parentales. Sin embargo, es necesario aumentar el tamaño de muestra de Los Tuxtlas para determinar si en realidad constituyen un grupo de genotipos mezclados. Otros estudios con microsatélites en aves (Neto et al 2012, Hansson et al. 2012, Barlow et al. 2011, Welch et al. 2012, Poulakakis et al. 2008) y en otros taxa (Brown et al. 2007, Machado-Schiaffino et al. 2010, Allal et al. 2011) también han detectado mezcla de genotipos en algunas de sus poblaciones.

Los dos grupos genéticos detectados por STRUCTURE fueron soportados por las AMOVA's, ya que aquellas en las que se agruparon a las localidades de acuerdo a los resultados de STRUCTURE fueron las que tuvieron los valores de F_{CT} más altos. Sin embargo, el valor de la F_{CT} en la AMOVA en la que se agruparon a las poblaciones por región del BMM fue muy similar al resto de las AMOVAs, sugiriendo diferenciación genética también entre regiones del BMM. Dicha diferenciación genética también fue sugerida por las F_{ST} pareadas estandarizadas (F'_{ST}) que revelaron diferencias significativas entre cinco de las seis regiones del BMM pero no por las F_{ST} pareadas sin estandarizar que indican diferenciación genética únicamente entre el nSMO y cSMO vs pCHIS y cCHIS así como entre el cSMO y el sSMO. A pesar de que los valores de diferenciación genética fueron más bajos para las F_{ST} que para las F'_{ST} , probablemente debido a que la variación genética fue mayor dentro que entre las poblaciones de *A. cyanocephala* lo cual ocasiona valores bajos de diferenciación genética antes de la corrección, cuando se usan marcadores multilocus (Hedrick 1999), los valores de F_{ST} no estandarizados concuerdan con los grupos genéticos sugeridos por STRUCTURE.

Investigaciones en otras especies de aves, en las que se han utilizado microsatélites sugieren niveles de diferenciación genética con un intervalo entre 0.009 y 0.094 (Barr et al. 2008, McCormack & Smith 2008, Callens et al 2011, González et al. 2011, Pulgarín & Burg 2012, Neto et al. 2012), concordando mas con los resultados de las F_{ST} no estandarizadas que con las estandarizadas, reportadas en este estudio.

Se ha sugerido que STRUCTURE no puede detectar grupos genéticos cuando la señal de los datos es baja (Pritchard et al. 2010) y Hubisz et al. (2009) recomiendan usar el modelo de LOCPRIOR para detectar estructura genética cuando la señal es débil. El análisis de

STRUCTURE en el que no se proporcionó información previa de las localidades, es decir en el que no se utilizó el modelo de LOCPRIOR, no detectó grupos genéticos. Otros estudios en aves en los que han empleado microsatélites y STRUCTURE, han tenido que usar el modelo LOCPRIOR u otros programas de análisis de asignación debido a la poca habilidad de STRUCTURE para detectar grupos genéticos cuando la señal de los datos es débil (e.g., Barr et al. 2008, Neto et al. 2012, Miller et al. 2012). Sería importante realizar pruebas de poder estadístico para identificar si el tamaño de muestra, el número de loci y su polimorfismo usados en este estudio son suficientes para detectar diferenciación genética (Ryman et al. 2006). Esto me permitiría asegurar que la poca diferenciación genética detectada en *A. cyanocephala* se debe a elevados niveles de flujo génico entre los fragmentos del BMM y no a la falta de poder de los análisis.

El dendograma, en el que se utilizaron las distancias genéticas entre localidades, no mostró una clara estructura genética que corresponda con cada una de las diferentes regiones del BMM. Dicho patrón puede ser el resultado de flujo génico entre regiones del BMM como lo soportan los resultados del número de migrantes, el cual es mayor a uno entre la mayoría de las regiones. Se ha reportado que las poblaciones de *A. cyanocephala* son residentes en la temporada de reproducción (Ornelas et al. 2010, Del Hoyo et al. 1999) pero desafortunadamente no se sabe nada más acerca de la conducta de dispersión de la especie. Por otro lado, el resultado de alelos compartidos entre individuos de diferentes regiones del BMM también puede ser resultado de la retención de polimorfismos ancestrales sin tiempo suficiente para diferenciarse. Los resultados del estudio previo de *A. cyanocephala* realizado con ADN mitocondrial (Rodríguez-Gómez et al. sometido), sugieren que la divergencia entre las poblaciones del este y el oeste del Istmo de Tehuantepec ocurrió recientemente, por lo que es factible que no haya transcurrido suficiente tiempo para que los alelos de las diferentes regiones del BMM hayan acumulado mutaciones que los diferencien. Sería importante realizar observaciones en el campo y estudios de captura re-captura de individuos de *A. cyanocephala* para corroborar el elevado flujo génico sugerido por los resultados de este estudio.

La prueba de Mantel en la que se incluyeron a todas las localidades fue marginalmente significativa indicando que las localidades más alejadas geográficamente son genéticamente menos similares. Sin embargo, las pruebas en las que sólo se incluyeron a las localidades pertenecientes a cada uno de los grupos genéticos, no fueron significativas, sugiriendo que la estructura genética encontrada en este estudio posiblemente se debe a otros

factores como la presencia de barreras geográficas tal como lo indica el análisis de identificación de barreras.

Se detectó la presencia de por lo menos tres barreras al flujo génico; sin embargo dos de éstas tienen valores bajos de bootstrap (<60). La barrera que tiene el valor de bootstrap más alto es la que separa a las poblaciones del sur de la SMO del resto de las poblaciones de la SMO y está situada en la cuenca del Papaloapan. A pesar de que la cuenca del Papaloapan tiene algunas áreas montañosas como el BMM, también está formada por zonas de baja elevación y los distintos ríos que conforman la cuenca están compuestos por bosque tropical caducifolio y pastizales (Rzedowski et al. 2004), hábitats con diferentes condiciones climáticas y de vegetación que no son adecuados para *A. cyanocephala* (Del Hoyo et al. 1999). Estudios en distintos taxa, incluyendo algunas aves (e.g., *Chlorospingus optthalmicus* y *Aulacorhynchus prasinus*), han encontrado discontinuidades genéticas entre poblaciones de Oaxaca y del centro de la SMO y se ha sugerido que dichos rompimientos son resultado de que la cuenca del Papaloapan ha fungido como barrera (Sullivan et al. 1997, García-Moreno et al. 2004, León-Paniagua et al. 2007, Puebla-Olivares et al. 2008, Bryson et al. 2011).

BARRIER también detectó una barrera entre las poblaciones de la SMO y las de Chiapas. Dicha barrera corresponde al Istmo de Tehuantepec, el cual es un área de baja elevación que presentan condiciones ecológicas distintas a las requeridas por *A. cyanocephala* (Barrier et al. 1998). Sin embargo, el bajo valor de bootstrap asociado a esta barrera en combinación con los análisis de migración, sugieren que existe flujo génico entre el sSMO, pCHIS y cCHIS por lo que esta barrera es permeable para algunos individuos, concordando con los resultados del ADN mitocondrial de *A. cyanocephala* (Rodríguez-Gómez et al. sometido). A pesar de que el Istmo de Tehuantepec ha fungido como barrera al flujo génico en aves (García-Moreno et al. 2006, Miller et al. 2007, Barber & Klicka 2010, González et al. 2011), encontrándose altos niveles de diferenciación entre las poblaciones localizadas a ambos lados de la barrera, estudios en otras aves han reportado poca diferenciación genética entre las poblaciones localizadas a ambos lados del Istmo (Navarro-Siguenza et al. 2008, Puebla-Olivares et al. 2008, Arbeláez-Cortés et al. 2010). Una tercera barrera se detectó entre Los Tuxtlas y la SMO, que corresponde con la Planicie Costera del Golfo, la cual rodea y aísla a Los Tuxtlas de otros sistemas montañosos y cuya vegetación son principalmente pastizales. La Planicie Costera puede limitar el flujo génico de *A. cyanocephala* debido a que su vegetación son principalmente pastizales y a que la Sierra de los Tuxtlas es de origen volcánico lo cual la hace distinta edáfica, climática y geomorfológicamente (Martin del Pozzo 1997) al resto de las regiones del BMM. Sin

embargo, esta barrera también parece ser permeable al flujo génico como lo indican su bajo valor de bootstrap y el alto número de migrantes entre Los Tuxtlas y el resto de las regiones del BMM, que es más alto que en la dirección opuesta (de la SMO a Los Tuxtlas o de Chiapas a Los Tuxtlas). Este flujo génico asimétrico sugiere que la Planicie Costera puede ser una barrera permeable para los híbridos localizados en Los Tuxtlas, pero no para los parentales de la SMO y de Chiapas.

Los resultados en conjunto del presente estudio, en conjunto indican que a pesar de que se detectó diferenciación genética y barreras geográficas entre algunas regiones del BMM, el flujo génico entre las mismas es alto, sugiriendo que la divergencia genética entre las poblaciones de *A. cyanocephala* ocurrió en presencia de flujo génico, como lo han reportado otros estudios (Fitzpatrick et al. 2008, Kotlík et al. 2008, Niemiller et al. 2008, Milá et al. 2009, Brandley et al. 2010). Esto concuerda hasta cierto punto, con el estudio previo en la especie realizado con ADN mitocondrial, en el que se estimó que las poblaciones ubicadas a cada lado del Istmo de Tehuantepec divergieron recientemente (aproximadamente hace 49, 300-75,800 años) y que ésta divergencia ocurrió en presencia de flujo génico (Rodríguez-Gómez et al. sometido). Análisis adicionales con los microsatélites usando el modelo de aislamiento con migración (IMa; Hey & Nielsen 2004) son necesarios para corroborar que la divergencia ocurrió en presencia de flujo génico y para estimar el tiempo en el que está ocurrió para determinar si la señal genética detectada en este estudio está influenciada por el UMG.

Conclusiones

Los resultados de este estudio detectaron dos grupos genéticos, uno conformado por el norte y centro de la Sierra Madre Oriental y el otro por el sur de la Sierra Madre Oriental, centro y Pacífico de Chiapas. Asimismo, los resultados sugieren que los individuos de Los Tuxtlas son una mezcla de genotipos de ambos grupos genéticos detectados. El patrón de intercambio genético entre regiones del BMM, fue soportado por los modelos del área de distribución de *A. cyanocephala* proyectados hacia el UMG, los cuales sugieren que hubo expansiones del área de distribución y conexiones entre las distintas regiones del BMM facilitando el contacto y flujo génico entre éstas. Sin embargo, la presencia de barreras geográficas tales como la cuenca del Papaloapan ha limitado dicho flujo génico entre las dos poblaciones genéticas detectadas. Los patrones de variación y estructura genética encontrados en este estudio son resultados de la combinación de los cambios climáticos ocurridos durante el Último Máximo Glacial y la presencia de barreras geográficas.

Apéndice

Tabla 8. Valores de heterocigosidad observada H_O y esperada H_E para las distintas localidades en cada uno de los locus. Los valores en negritas indican desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg.

Localidad	A1-1-6		A2-1-2		A2-5-3		A1-4-1		A1-3-5		A1-13-8		A2-5-1		A2-4-6		A1-10-9		A2-3-3	
	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E
Alta Cima	0.600	0.911	0.600	0.644	0.000	0.000	0.400	0.356	0.000	0.429	0.200	0.200	0.000	0.000	1.000	0.679	0.500	0.786	0.000	0.000
La Soledad	0.714	0.912	0.667	0.561	0.429	0.363	0.833	0.530	0.833	0.636	0.714	0.560	0.000	0.000	0.500	0.409	0.857	0.846	0.143	0.385
Picuatla	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000
Oxpantla	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
San Bartolo																				
Tutotepec	0.000	0.000	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000	0.833	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.833	0.000	0.667	0.000	0.667
Tenango de Doria	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.833	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.833	0.000	0.000
Grutas de Tolantongo	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.867	1.000	0.733	0.000	0.667	0.000	0.533	0.000	0.000	0.250	0.607	0.500	0.464	0.000	0.000
Orduña	0.667	0.733	0.667	0.533	0.667	0.600	0.667	0.733	0.000	0.000	0.333	0.333	0.000	0.000	0.667	0.533	0.333	0.333	0.667	0.600
Clavijero	0.583	0.949	0.250	0.475	0.200	0.353	0.700	0.732	0.900	0.774	0.364	0.437	0.000	0.000	0.417	0.743	0.500	0.757	0.455	0.394
Pitaya	1.000	1.000	0.333	0.733	0.500	0.500	0.500	0.500	1.000	0.667	0.667	0.800	0.000	0.000	0.667	0.733	0.667	0.867	0.000	0.000
Coapexpan	0.667	0.818	0.000	0.545	0.400	0.356	1.000	0.712	0.200	0.689	0.667	0.485	0.000	0.000	0.667	0.485	0.500	0.821	0.500	0.429
Riscal	0.714	0.912	0.571	0.725	0.375	0.342	0.714	0.648	0.500	0.591	1.000	0.733	0.000	0.000	0.375	0.592	0.875	0.817	0.286	0.484
Macuiltepetl	1.000	1.000	0.500	0.750	0.800	0.711	0.600	0.511	0.750	0.750	0.800	0.733	0.000	0.000	0.200	0.511	0.600	0.800	0.250	0.250
Huatusco	1.000	0.833	1.000	1.000	0.500	0.500	0.000	0.000	0.500	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.833	0.000	0.000
La Mancha	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Coatepec	0.857	0.967	0.167	0.167	0.429	0.385	0.429	0.363	0.571	0.495	0.714	0.758	0.000	0.000	0.143	0.582	0.800	0.889	0.286	0.560
Cuetzalan	0.429	0.879	0.750	0.575	0.125	0.125	0.333	0.621	0.500	0.625	0.375	0.517	0.000	0.000	0.429	0.758	0.625	0.758	0.167	0.167
Huitzilan	0.600	0.911	0.667	0.545	0.333	0.303	0.667	0.485	0.333	0.530	0.167	0.167	0.000	0.000	0.200	0.200	0.200	0.867	0.000	0.303
Lagunillas	0.769	0.923	0.412	0.490	0.294	0.337	0.412	0.515	0.750	0.677	0.375	0.544	0.000	0.000	0.235	0.480	0.563	0.819	0.313	0.381
La Esperanza	0.667	0.800	1.000	1.000	0.500	0.500	0.667	0.533	0.000	0.000	0.333	0.733	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000	1.000
San Martín																				
Caballero	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Continuación tabla 8.

Localidad	A1-1-6		A2-1-2		A2-5-3		A1-4-1		A1-3-5		A1-13-8		A2-5-1		A2-4-6		A1-10-9		A2-3-3	
	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E	H_O	H_E
Cerro Baúl Salvador	0.750	0.857	0.333	0.545	0.500	0.439	0.500	0.561	0.500	0.455	0.500	0.636	0.333	0.303	0.667	0.818	0.500	0.803	0.667	0.742
Urbina	0.900	0.832	0.455	0.589	0.154	0.369	0.615	0.505	0.182	0.260	0.615	0.622	0.182	0.312	0.500	0.692	0.455	0.853	0.600	0.774
Montebello	0.400	0.916	0.700	0.716	0.333	0.359	0.583	0.605	0.545	0.558	0.727	0.571	0.091	0.255	0.364	0.797	0.545	0.870	0.571	0.725
Jitotol Pueblo	0.700	0.858	0.100	0.563	0.500	0.568	0.500	0.563	0.200	0.358	0.400	0.763	0.100	0.100	0.300	0.647	0.444	0.810	0.400	0.505
Nuevo	0.700	0.911	0.600	0.600	0.667	0.503	0.400	0.489	0.400	0.363	0.727	0.848	0.091	0.091	0.400	0.663	0.500	0.837	0.545	0.710

Tabla 9. F_{IS} para las diferentes localidades para cada locus. Los valores en negritas indican desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg debido a deficiencias de heterocigos. Fijado se refiere a las localidades que presentan un sólo alelo y los guiones indican que no se pudo realizar el cálculo para esa localidad, debido a que sólo se recolecto un individuo.

Localidad	A1-1-6	A2-1-2	A2-5-3	A1-4-1	A1-3-5	A1-13-8	A2-5-1	A2-4-6	A1-10-9	A2-3-3
Alta Cima	0.368	0.077	Fijado	-0.143	1.000	0.000	Fijado	-0.600	0.400	Fijado
La Soledad	0.231	-0.212	-0.200	-0.667	-0.351	-0.304	Fijado	-0.250	-0.014	0.647
Picuatla	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxpantla	0.500	Fijado	Fijado	Fijado	Fijado	-0.333	Fijado	0.000	1.000	Fijado
San Bartolo Tutotepec	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tenango de Doria	-	Fijado	0.000	Fijado	-	Fijado	Fijado	Fijado	0.500	Fijado
Grutas de Tolantongo	-	Fijado	-0.200	-0.500	1.000	1.000	Fijado	0.625	-0.091	Fijado
Orduña	0.111	-0.330	-0.143	0.111	Fijado	0.000	Fijado	-0.333	0.000	-0.143
Clavijero	0.396	0.480	0.446	0.045	-0.174	0.175	Fijado	0.450	0.350	-0.163
Pitaya	0.000	0.600	0.000	0.000	-1.000	0.200	Fijado	0.111	0.273	Fijado
Coapexpan	0.200	1.000	-0.143	-0.463	0.733	-0.429	Fijado	-0.429	0.429	-0.200
Riscal	0.231	0.226	-0.105	-0.111	0.167	-0.400	Fijado	0.382	-0.077	0.429
Macuiltepetl	0.000	0.368	-0.143	-0.200	0.000	-0.103	Fijado	0.636	0.273	0.000
Huatusco	-0.333	0.000	0.000	Fijado	0.000	Fijado	Fijado	0.000	0.500	Fijado
La Mancha	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Coatepec	0.122	0.000	-0.125	-0.200	-0.171	0.063	Fijado	0.769	0.111	0.510
Cuetzalan	0.532	-0.333	0.000	0.487	0.211	0.288	Fijado	0.341	0.186	0.000
Huitzilán	0.368	-0.250	-0.111	-0.429	0.394	0.000	Fijado	0.000	0.789	1.000
Lagunillas	0.172	0.164	0.130	0.206	-0.111	0.318	Fijado	0.517	0.320	0.185
La Esperanza	0.200	Fijado	0.000	-0.333	-	0.600	Fijado	Fijado	0.000	Fijado
San Martín Caballero	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sierra Sta. Martha	0.667	-0.500	0.000	0.000	-0.333	Fijado	0.000	1.000	1.000	0.000
Cerro Baúl	0.143	0.412	-0.154	0.118	-0.111	0.231	-0.111	0.200	0.400	0.111
Salvador Urbina	-0.087	0.237	0.593	-0.231	0.310	0.010	0.429	0.286	0.479	0.234
Montebello	0.576	0.023	0.074	0.038	0.024	-0.290	0.655	0.556	0.385	0.226
Jitotol	0.192	0.830	0.126	0.118	0.455	0.489	0.000	0.550	0.467	0.217
Pueblo Nuevo	0.241	0.000	-0.352	0.191	-0.108	0.149	0.000	0.410	0.416	0.241

Literatura Citada

- Alcaide M, Serrano D, Negro JJ, Tella JL, Laaksone T, Müller C & Korpimäki E. (2009). Population fragmentation leads to isolation by distance but not impoverishment in the philopatric Lesser Kestrel: a comparison with the widespread and sympatric Eurasian Kestrel. *Heredity*, 102:190-198.
- Allal F, Sanou H, Millet L, Vaillant A, Camus-Kalundaivelu L, Logossa ZA, Lefèvre F & J-M Bouvet. (2011). Past climate changes explain the phylogeography of *Vitellaria paradoxa* over Africa. *Heredity*, 107:174-186.
- Antolin M, Savage L, Eisen R. (2006). Landscape features influence genetic structure of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Landscape Ecology*, 21:867-875.
- Arbelaéz – Cortés E, Nyári AS, Navarro – Sigüenza AG. (2010). The differential effect of lowlands on the phylogeographic pattern of a Mesoamerican montane species (*Lepidocolaptes affinis*, Aves: Furnariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 658 – 668.
- Avise JC. (1994). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. New York.
- Avise JC. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Ball RM & Avise JC. (1992). Mitochondrial control region sequences. In: *Avian Molecular Evolution and Systematics* (ed. Mindell DP), pp. 51-82. A
- Barber BR & Klicka J. (2010). Two pulses of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proceedings of The Royal Society B*, doi:10.1098/rspb.2010.0343.
- Barlow EJ, Daunt F, Wanless S, Álvarez D, Reid JM & Stephen Cavers. (2007). Weak large-scale population genetic structure in a philatric seabird, the European Shag *Phalacrocorax aristotelis*. *IBIS, International Journal of Avian Science*, 153 (4): 768-778.
- Barr KR, Lindsay DL, Athrey G, Lance RF, Hayden TJ, Tweddale SA, Leberg PL. (2008). Population structure in endangered songbird: Maintenance of genetic differentiation despite high vagility and significant population recovery. *Molecular Ecology*, 17: 3628-3639.

- Barrera-Guzmán AO, Milá B, Sánchez-González LA & Navarro-Sigüenza. (2012). Speciation in an avian complex endemic to the mountains of the Middle America (*Ergaticus*, Aves:Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62, 907-920.
- Barrier, E., Velasquillo, L., Chavez, M. & Gaulon, R. (1998). Neotectonic evolution of the Isthmus of Tehuantepec (Southeastern Mexico). *Tectonophysics*, 287, 7–96.
- Barve N. (2008). Tool for Partial-ROC (Biodiversity Institute, Lawrence, KS, ver1.0.
- Beerli P & Felsenstein J. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population size in *n* subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98:4563-4568.
- Bilgin R. (2007). Kgttest: a simple Excel Macro program to detect signatures of population expansion using microsatellites. *Molecular Ecology Notes*, 7: 416-417.
- Bohonak AJ. (2002). IBD (Isolation with Distance): a program for population genetic analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93:153-154.
- 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.
- Bossart JL & Prowell DP. (1998). Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *TREE* 13: 202-206.
- Brandley MC, Guiher TJ, Pyron R, Winne CT & Burbrink FT. (2010). Does dispersal across an aquatic geographic barrier obscure phylogeographic structure in the diamond-backed watersnake (*Nerodia rhombifer*)?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57: 552-560.
- Brito PH. (2007). Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite genetic structure among Western European populations of tawny owls (*Strix aluco*). *Molecular Ecology*, 16: 3423-3437.
- Brookfield JFY. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453- 455.
- Brown DM, Brenneman RA, Koepfli KP, Pollinger JP, Milá B, Georgiadis NJ, Louis Jr, Grether GF, Jacobs DK & Wayne R. (2007). Extensive population genetic structure in the giraffe. *BioMedCentral Evolutionary Biology*, 1:13.
- Bryson JR, Murphy RW, Lathrop A & Lazcano Villareal D. (2011). Evolutionary drivers of phylogeographical diversity in the highlands of Mexico: a case study of the *Crotalus triseriatus* species group of montane rattlesnakes. *Journal of Biogeography*, 38: 697- 710.

- Braunisch V, Segelbacher G, Hirzels A. (2010) . Modelling functional landscape connectivity from genetic population structure: a new spatially explicit approach. *Molecular Ecology*, 19, 3664-3678.
- Castoe TA, Chippendale PT, Campbell JA, Ammerman LK, Parkinson CL. (2003). Molecular systematics of the middle American jumping pitvipers (genus *Atropoides*) and phylogeography of the *Atropoides nummifer* complex. *Herpetologica* 59: 420 – 431.
- Caizergues A, Rätti O, Helle P, Rotellis L, Ellison L & Yves Rasplus J. (2003). Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix L.*) in fragmented vs continuous landscapes. *Molecular Ecology*, 12:2297-2305.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. (1967). Phylogenetic analysis models and estimation procedures . *Evolution*, 32: 550-570.
- Cavenders - Bares J, González - Rodríguez A, Pahlich A, Koehler K & Deacon N. (2011). Phylogeography and climatic niche evolution in live oaks (*Quercus* series Virentes) from the tropics to the temperate zone. *Journal of Biogeography*, 38, 962-981.
- Collins WD, Bitz CM, Blackmon ML, Bonan GB, Bretherton CS, Carton JA, Chang P, Donay SC, Hack JJ, Henderson TB, Kiehl JT, Large WG, McKenna DS, Santer BD & Smith RD. (2006) . The Community Climate System Model Version 3. *Journal of Climate*, 19: 2122-2143.
- Coyne JA & Orr HA. (2004). Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, MA, pp 545.
- Del Hoyo J, Elliot A, Sargatal J. (1999). Handbook of the World. Vol 5. Barn-owls to Hummingbird. Lynx (eds) Barcelona.
- Duennes MA, Lozier JD, Hines HM, Sydney AC. (2012). Geographical patterns of genetic divergence in the widespread Mesoamerican bumble bee *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 64: 219-231.
- Evanno G, Regnaut S & Goudet J. (2005). Detecting the number of cluster s of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G & Schneider S. (2005). Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

- Fedorov VB, Goropashnaya AV, Jaarola M & Cook JA. (2003). Phylogeography of lemmings (*Lemmus*): no evidence for postglacial colonization of Arctic from the Beringian refugium. *Molecular Ecology*, 12: 725-731.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (1993) Geology of Mexico: a synopsis. Biological diversity of Mexico: origins and distribution (ed. by T.P. Ramamoorthy, R. Bye and A. Lot), pp. 3–107.
- Fitzpatrick BM, Placyk JS, Niemiller ML, Casper GS & Burghardt GM. (2008). Distinctiveness in the face of gene flow: hybridization between specialist and generalist gartersnakes. *Molecular Ecology*, 17: 4107-4117.
- Funk WC, Blouin MS, Corn PS, Maxell BA, Pilliod DS, Amish S & Allendorf FW. (2005). Population structure of Columbia spotted frogs (*Rana luteiventris*) is strongly affected by the landscape. *Molecular Ecology* 14: 483-496.
- García-Moreno J, Navarro-Sigüenza AG, Peterson AT, Sánchez-González LA. (2004). Genetic variation coincides with geographic structure in the common bush-tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from México. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33:186-196.
- García-Moreno J, Cortés N, García-Deras GM, Hernández-Baños BE. (2006). Local origin and diversification among *Lampornis* hummingbirds: A Mesoamerican taxon. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38:488-498.
- Giles B & Goudet J. (1997). A case study of genetic structure in a plant metapopulation. In: *Metapopulation Biology*. IA Hanski, ME Gilpin, pp. 429-454. Academic Press, San Diego.
- Goudet J. (2001). FSTAT a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. www2.unil.ch/popgene/software/fstat. Html.
- 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*). *BioMedCentral Evolutionary Biology*, 11: 38.
- González-Rodríguez A, Bain JF, Golden JL & Oyama K. (2004). Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis* - *Q. Laurina* complex in México: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology*, 13, 3467-3476.
- Gutiérrez - Rodríguez C, Ornelas JF, Rodríguez - Gómez F. (2011). Chloroplast DNA phylogeography of a distylous shrub (*Palicourea padifolia*, Rubiaceae) reveals past

fragmentation and demographic expansion in Mexican cloud forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 603-615.

- Gugger PF, González-Rodríguez A, Rodríguez-Correa H, Sugita S & Cavender-Bares. (2011). Southward Pleistocene migration of Douglas – fir into Mexico: phylogeography, ecological niche modeling, and conservation of ‘rear edge’ populations. *New Phytologist*, 189: 1185 – 1199.
- Hammer, O. (2011). PAST (Paleontological Statistics). Natural History Museum. University of Oslo. <http://folk.uio.no/hammer/past/index.html>
- Hasumi, H. and Emori, S. (2004). K-1 coupled GCM (MIROC) description. Center for Climate System Research, Univ. of Tokyo.
- Hansson B, Tarka M, Dawson D & Horsburgh. (2012). Hybridization but No Evidence for Backcrossing and Introgression in a Sympatric Populations of Great Reed Warblers and Clamours Reed Warblers. *PLoS ONE*, 7(2): e311667.
- Hedrick PW. (1999). Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53: 313-318.
- Hedrick P. (2005). A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*, 59 (8): 1633-1638.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- 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.
- Hewit GM. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58:247-276.
- Hewit GM. (2000). The legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405:907-913.
- Hewit GM. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359:183-195.
- Higgins MA, Ruokolainen K, Tuomisto H, Llerena N, Cardenas G, Phillips OL, Vásquez R & Räsänen M. (2011). Geological control of floristic composition in Amazonian forest. *Journal of Biogeography*, 38 (11): 2136-2149.
- Hugall A, Moritz C, Mousall A & Stanisic J. (2002). Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brasier 1875). *Proceedings of the National Academy of*

Sciences, 99 (9):6112-6117.

- Hubisz M, Falush D, Stephens M & Pritchard J. (2009). Inferring weak population structure with the assistance sample group information. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1322-1332.
- Jansen JL, Bohonak AJ, Kelley ST. (2005). Isolation by distance, web service. *BioMedCentral, Genetics* 6:13, v.3.16. Available at <http://ibdws.sdsu.edu>
- Johnsgard PA. (1997). *The Hummingbirds of North America*. 2da edición. Smithsonian Institution press. Washington, pp 127-128.
- Johnson JA, Toepfer JE & Dunn P. (2003). Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite population structure in fragmented populations of greater prairie - chickens. *Molecular Ecology*, 12:3335-3347.
- Joseph L, Omland K. (2009). Phylogeography: its development and impact in Australo-Papuan ornithology with special reference to paraphyly in Australian birds. *The Emu*, 109: 1-23.
- Kalinowski ST. (2005). HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5:187-189.
- Kimura M, Clegg SM, Lovette IJ, Holder KR, Girman DJ, Milá B, Wade P & Smith TB. (2002). Phylogeographical approaches to assessing demographic connectivity between breeding and overwintering regions in a Nearctic-Neotropical warbler (*Wilsonia pusilla*). *Molecular Ecology*, 11:1605-1616.
- Klicka J, Spellman GM, Winker K, Chua V, Smith TB. (2011). A Phylogeographic and Population Genetic Analysis of a Widespread, Sedentary North American Bird: The Hairy Woodpecker (*Picoides villosus*). *The Auk*, 128 (2): 346-362.
- Kotlík P, Marková S, Choleva L, Bogutskaya NG, Ekmekci FG & Ivanova PP. (2008). Divergence with gene flow between Ponto –Caspian refugia in an anadromous cyprinid *Rutilus frissi* revealed by multiple gene phylogeography. *Molecular Ecology*, 17:1076-1088.
- León – Paniagua L, Navarro – Sigüenza AG, Hernández – Baños BE, Morales JC. (2007). Diversification of the arboreal mice of the genus *Habromys* (Rodentia: Cricetidae: Neotominae) in the Mesoamerican highlands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 653-664.
- Lindsay DL, Barr KR, Lance RF, Tweddale SA, Hayden TJ, Leberg PL. (2008). Habitat fragmentation and genetic diversity of an endangered, migratory songbird, the golden cheeked warbler (*Dendroica chrysoparia*). *Molecular Ecology*, 17:2122-2133.

- Lozano-García S, Sosa-Nájera S, Sugiura Y, Caballero M. (2005). 23,000 yr of vegetation history of the Upper Lerma, a tropical high-altitude basin in Central Mexico. *Quaternary Research*, 64: 70–82.
- Luna Vega I, Alcántara Ayala O, Espinosa Organista D & Morrone JJ. (1999). Historical relationships of the Mexican cloud forest: a preliminary vicariance model applying Parsimony Analysis of Endemicity to vascular plant taxa. *Journal of Biogeography*, 26: 1299-1305.
- Machado-Schiaffino G, Juanes F & García – Vazquez E. (2010). Introgressive hybridization in North American hakes after secondary contact. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55: 552-558.
- Manthey JD, Klicka J, Spellman GM. (2011). Cryptic diversity in a widespread North American songbird: phylogeography of the brown creeper (*Certhia americana*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58:502-512.
- Martin PS & Harrell BE. (1957). The Pleistocene history of temperate biotes in Mexico and eastern United States. *Ecology*, 38: 468-480.
- Martin Del Pozzo AL. (1997). Geología. En: González-Soriano E, Dirzo R y Voght RC. Historia Natural de los Tuxtlas pp. 25-31. UNAM-CONABIO, México, D.F.
- Martinez-Morales MA. (2004). Landscape patterns influencing bird assemblages in a fragmented Neotropical cloud forest. *Biological Conservation*, 121:117-126.
- McCormack JE, Bowen BS & Smith TB. (2008). Integrating paleoecology and genetics of bird populations in two sky island archipelagos. *BMC Biology*, 6:28
- McCormack JE & Smith TB. (2008). Niche expansion leads to small – scale adaptative divergence along an elevation gradient in a medium – sized passerine bird. *Proceedings the Royal Society B*, 275: 2155-2164.
- McKay BD, Mays HL, Peng Y-W, Kozak KH, Y CH-T, Yuan H-W. (2010). Recent range-wide demographic expansion in a Taiwan endemic montane bird, Steere’s Liocichla (*Liocichla steerii*). *BioMedCentral Evolutionary Biology*, 10 (71): 1471-2148.
- Manni F, Guerard & Heyer E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’ algorithm”. *Human Biology*, 76 (2):173-190.
- McDonald JA. (1993). Phytogeography and history of the alpine-subalpine flora of the northeastern Mexico. Biological diversity in Mexico: origins and distribution (ed. By T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa), pp. 681-703. Oxford University Press, New York.

- Meirmans PG. (2006). Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure, *Evolution*, 11: 2399-2402.
- Milá B, Girman DJ, Kimura M & Smith TB. (2000). Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American. *Proceedings of the Royal Society B*, 267, 1033-1040.
- Milá B, McCormak JE, Castañeda G, Wayne RK & Smith TB. (2007). Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus Junco. *Proceedings of the Royal Society B*, 274, 2653-2660.
- Milá B, Smith TB & Wayne R. (2007a). Speciation and rapid phenotypic differentiation in the yellow – rumped warbler *Dendroica coronata* complex. *Molecular Ecology*, 16, 159-173.
- Milá B, Wayne RK, Fitze P & Smith TB. (2009). Divergence with flow and fine – scale phylogeographical structure in the wedge – billed woodcreeper, *Glyphorynchus spirurus*, a Neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology*, 28: 2979-2995.
- Miller MJ, Bermingham E & Ricklefs RE. (2007). Historical biogeography of the New World solitaires (Myadestes spp). *The Auk*, 3:868-885.
- Miller MP, Haigh SM, Mullis TD, Popper K and Green M. (2012). Evidence for Population Bottlenecks and Subtle Genetic Structure in the Yellow Rail. *The Condor*, 114 (1): 100 – 112.
- Moreno-Letelier A & Piñero D. (2009). Phylogeographic structure of *Pinus strombiformis* Engelm, across the Chihuahuan Desert filter – barrier. *Journal of Biogeography*, 36:121-131.
- Mundy NI, Unitt P & Woodruff DS. (1997). Skin from feet of Museum Specimens as a Non-Destructive Source of DNA for Avian Genotyping. *The Auk*, 114 (1): 126-129.
- Navarro-Sigüenza AG, Peterson T, Nyari A, García – Deras GM & García-Moreno J. (2008). Phylogeography of the *Buarremon* brush – finch complex (Aves, Emberizidae) in Mesoamerica. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 21-35.
- Neto JM, Arroyo JL, Bargain B, Monrós JS, Mátrai N, Procházka P & Zehtinjiev P. (2012). Phylogeography of a Habitat Specialist with High Dispersal Capability: The Savis' Warbler *Locustella luscinioides*. *PLoS ONE*, 7(6): e38497
- Niemiller ML, Nosil P, Fitzpatrick BM. (2008). Recent divergence – with - gene flow in Tennessee cave salamanders (Plethodontidae; *Gyrinophilus*) inferred from gene genealogies. *Molecular Ecology*, 19: 2258-2275.

- Nossil P. (2008). Speciation with gene flow could be common. *Molecular Ecology*, 17, 2103-2106.
- Ornelas JF, Jiménez L, González C & Hernández A. (2004). Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. I. Hummingbirds' effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany*, 91:1052-1062.
- Ornelas JF. (2010). Nests, eggs and Young of the Azure-crowned Hummingbird (*Amazilia cyanocephala*). *The Wilson of Ornithology*, 1223:592-597
- Ornelas FJ, Ruiz-Sánchez E & Sosa V. (2010). Phylogeography of *Podocarpus matudae* (Podocarpaceae): pre-Quaternary relicts in northern Mesoamerican cloud forest. *Journal of Biogeography*, 37: 2384-2396.
- Pedraza RA & Williams-Linera G. (2003). Evaluation of native tree species for the rehabilitation of deforested areas in A Mexican cloud forest. *New Forests*, 26: 83-99.
- Peterson, A.T, Martínez-Meyer E, González-Salazar C. (2004). Reconstructing the Pleistocene geography of the *Aphelocoma jays* (Corvidae). *Diversity and Distributions*, 10 (4): 237-246.
- Peterson TA, Papes M & Soberón J. (2008). Rethinking receiver operating characteristics analysis applications in ecological niche modeling. *Ecological Modeling*, 213:63-72.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Piertney SB, McColl AC, Bacon PJ, Dallas JF. (1998). Local genetic structure in red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*): evidence from microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 7: 1645-1654.
- Piperno DR, Moreno JE, Iriarte J, Holst I, Lachniet M, Jones JG, Ranere AJ & Castanzo R. (2007). Late Pleistocene and Holocene environmental history of the Iguala Valley, Central Balsas watershed of Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104: 11874–11881.
- Poulakakis N, Antoniou A, Mantziou G, Parmakelis A, Skartsi T, Vasilakis D, Elorriaga J, De la Puente J, Gavashelishvili A, Ghasabyan M, Katzner T, Mcgrady M, Batbayar N, Fuller M and Natsagdorj T. (2008). Population structure, diversity, and phylogeography in the near-threatened Eurasian black vultures *Aegypius monachus* (Falconiformes; Accipitridae) in Europe: insights from microsatellite and mitochondrial DNA variation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95:859-872.

- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Pritchard JK, Wen X & Falush D. 2010. Documentation for structure: Version 2.3. Department of Human Genetics, University of Chicago, Chicago, IL.
- Prugnolle F & De Meeus T. (2002). Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity*, 88:161-165.
- Puebla – Olivares F, Bonaccorso E, Espinosa de los Monteros A, Omland KE, Llorente – Bousquets JE, Peterson AT & Navarro – Sigüenza AG. (2008). Speciation in the emerald toucanet (*Aulacorhynchus prasinus*) complex. *The Auk*, 125: 39 – 50.
- Pulgarín-R PC, Burg TM (2012). Genetic Signals of Demographic Expansion in Downy Woodpecker (*Picoides pubescens*) after the Last North American Glacial Maximum. *PLoS ONE* 7(7): e40412
- 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.
- Reich DE & Goldstein DB. (1998). Genetic evidence for a Paleolithic human population expansions in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 95: 8119-8123.
- Rzedowski J, Medina Lemus R, Calderón de Rzedowski G. (2004). Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana*, 66: 23-151.
- Rice WR. (1989). Analyzing tables of statistical test. *Evolution*, 43:223-225.
- Riley SP, Pollinger JP, Sauvajot RM, York EC, Bromley C, Fuller TK & Wayne RK. (2006). A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* 15: 1733-1741.
- Rodríguez-Gómez F, Gutiérrez-Rodríguez C & Ornelas JF. Genetic, phenotypic and ecological divergence with gene flow at the Isthmus of Tehuantepec: the case of the azure crowned hummingbird (*Amazilia cyanocephala*). *Sometido a Journal of Biogeography*.
- Ruegg KC, Hijmans RJ & Moritz C. (2006). Climate change and the origin of migratory pathways in the Swanson's thrush, *Catharus ustulatus*. *Journal of Biogeography*, 33:1172-1182.
- Ryman N & Palm S. (2006). POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Molecular Ecology*, 6:600-602.

- Sánchez - González LA, Morrone JJ & Navarro – Sigüenza AG. (2008). Distributional patterns of the Neotropical humid forest avifaunas. *Biological Journal of the Linnean Society*, 94:175-194.
- Sánchez – González LA & Navarro – Sigüenza AG. (2009). History meets ecology: a geographical analysis of ecological restriction in the Neotropics humid montane forest avifaunas. *Diversity and Distribution*, 15:1-11.
- Segelbacher G & Storch I. (2002). *Capercaillie* in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Molecular Ecology*, 11: 1669-1677.
- Slatkin M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Smith BT, Escalante P, Hernández Baños BE, Navarro Sigüenza AG, Rohwer S & Klicka J. (2011). The role of historical and contemporary processes on phylogeographic structure and genetic diversity in the Northern Cardinal, *Cardinalis cardinalis*. *BioMedCentral Evolutionary Biology*, 11:136.
- Stewart JR, Lister AM, Barnes I & Dalén L. (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B*, 277:661-671.
- Sullivan J, Arellano E & Rogers DS. (2000). Comparative phylogeography of Mesoamerican Highland Rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist*, 155:755–768.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG & Cosson FJ. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7:453-464.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Van Devender TR. (1990). Late Quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and México. In : Betancourt JL, Van Devender TR, Martin PS. (Eds). *Packrat Middens. The last 40,000 years of biotic change*. University of Arizona Press, Tucson, pp. 350-362.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM & Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correction genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4:535-538.

- Weir BS & Cockerham CC. (1984). Estimating F - statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Welch AJ, Fleischer RC, James HF, Wiley AE, Ostrom PH, Adams J, Duvall F, Holmes N, Penniman J & Swindle KA. (2012). Population divergence and gene flow in an endangered and highly mobile seabird. *Heredity*, 1-10.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. (2008). *Genetics*, 28: 114-138.
- Zink RM. 1997. Phylogeographic studies of North American birds. En: Mindell, DP (ed.). Avian molecular evolution and systematic. Academic Press, E.U.
- Zink RM & Barrowclough, GF. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17:2107-2121.
- Zink RM, Jones AW, Farquhar CC, Westberg MC & Gonzalez Rojas JI. (2010). Comparison of the Molecular Markers in the Endangered Black-Capped Vireo (*Vireo atricapilla*) and Their Interpretation in Conservation. *The Auk*, 127 (4): 797-806.