

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure of a saint, likely St. Charles, holding a book. Above the shield is a crown and a cross. The shield is flanked by two lions. The outer ring of the seal contains the Latin text "ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CAETERA".

**Diversidad morfológica y genética del Colibrí de Berilo (*Amazilia beryllina*) y el Colibrí Coliazul (*Amazilia cyanura*) en Guatemala:  
¿hibridación o variaciones intraespecíficas?**

Informe de tesis

Presentado por:

Rosa Alicia Judith Jiménez Barrios

Para optar al título de:

Bióloga

GUATEMALA, MAYO DE 2011

## JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.	Decano
Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Lilian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. José Roy Morales Coronado	Vocal IV
Br. Cecilia Liska De León	Vocal V

## **DEDICATORIA**

A mi mamá y mi papá, por hacer hasta lo imposible con tal de permitirme alcanzar mis sueños.

A mis hermanos, a Jorgito por siempre preocuparse y cuidar de mí y a Pedrito para que pueda ver que con esfuerzo y dedicación podrá alcanzar sus metas.

A mi mejor amigo Pavel, por creer en mí, apoyarme, acompañarme y siempre escucharme con emoción, incluso cuando le cuento mis más disparatadas ideas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de San Carlos, a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y a la Escuela de Biología por todos los conocimientos que vertieron en mí.

Al Museum of Vertebrate Zoology de la Universidad de California, Berkeley, especialmente a Rauri C.K. Bowie y Ted Papenfuss por todo el apoyo que me proporcionaron para que esta investigación pudiera ser realizada.

A todas las personas e instituciones que me abrieron las puertas y me permitieron realizar el trabajo de campo: Reserva Natural Privada Santa Rosa Sumatán, Reserva Natural Privada Patrocinio, Hotel JamBamBoo, Municipalidad de Todos Santos Cuchumatán, Parque Nacional Río Dulce, Hacienda Tijax, Finca El Pilar y muy especialmente a la Reserva Natural Privada San Jerónimo Miramar y Quixayá por la confianza depositada en mí desde que yo iniciaba a trabajar con aves en el año 2007.

A Juan Fernando Hernández y Dulce María Bustamante, por revisar mi trabajo de tesis con esmero y dedicación, ayudando grandemente a mejorarlo.

A Brian Lavin, por toda su paciencia en el laboratorio y su interés en que yo aprendiera.

A mis súper acompañantes de campo: Pavel, Jacobo, Gilberto, Fabiola, Linda, Bárbara y Mafer.

A Raquel Sigüenza, por introducirme en el maravilloso mundo de las aves y siempre confiar en mí.

A Knut Eisermann y Claudia Avendaño, porque la inquietud de hacer este estudio surgió con ellos, en un conteo navideño y por su colaboración al proporcionarme información de la distribución de las especies.

A mis amigos, por siempre darme un empujón cuando lo necesitaba (o jalarme cuesta arriba en las montañas).

Al Consejo Nacional de Áreas Protegidas por otorgar las licencias de investigación y colecta necesarias para el desarrollo de esta tesis.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes	
3.1 Planteamiento del Problema.....	5
3.2 Marco Teórico.....	8
4. Justificación.....	17
5. Objetivos	
5.1 General.....	19
5.2 Específicos.....	19
6. Hipótesis.....	20
7. Materiales y Métodos	
7.1 Universo.....	21
7.2 Población.....	21
7.3 Muestra.....	21
7.4 Variables Independientes.....	21
7.5 Variables Dependientes.....	21
7.6 Materiales.....	22
7.7 Métodos.....	24
7.8 Análisis de Datos.....	34
8. Resultados	
8.1 Colectas.....	39
8.2 Diversidad Morfológica.....	39
8.3 Diversidad Genética.....	62
9. Discusión	
9.1 Diversidad Morfológica.....	72
9.2 Diversidad Genética.....	84
10. Conclusiones.....	88
11. Recomendaciones.....	90
12. Referencias.....	91

### 13. Anexos

Anexo 1. Procedimiento de Toma de Mediciones Cuantitativas de la Coloración de la Cola.....	101
Anexo 2. Procedimiento Detallado de la Obtención de Secuencias de ADN.....	102
Anexo 3. Coloración de las Plumas de la Cola y Curvas de Reflectancia de los Especímenes Colectados.....	117
Anexo 4. Especímenes Colectados del Complejo de Especies <i>Amazilia beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> durante el Período 2009 – 2010.....	144

## 1. Resumen

El Colibrí de Berilo (*Amazilia beryllina*) y el Colibrí Coliazul (*A. cyanura*) se distribuyen principalmente en Mesoamérica. En el sur de México, Guatemala, este de El Salvador y Honduras, estas dos especies habitan en simpatria. Desde hace cien años existen reportes de la posible hibridación de estas dos especies en el departamento de Suchitepéquez en Guatemala. La determinación de los híbridos ha sido basada en la coloración de la cola, aparentemente intermedia entre las dos especies. Así también, se ha reportado que es posible que la coloración de la cola de estos individuos no se deba a más que variaciones intraespecíficas.

El presente estudio se realizó con el fin de analizar la variabilidad morfológica y genética del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *Amazilia cyanura* en Guatemala y determinar si las variaciones morfológicas de los colibríes de este complejo de especies se deben a hibridación entre ambas o a variaciones intraespecíficas. Para esto se colectaron especímenes en cuatro sitios de su área distribución en Guatemala: Suchitepéquez, Huehuetenango, Quetzaltenango y Chimaltenango y se revisaron diferentes características morfológicas (sexo, peso, coloración del plumaje, secuencia de muda) y secuencias genéticas (genes: ND2, BFIB5, TGFB2, AK1 y ODC) de los individuos colectados.

La mayoría de las características morfológicas analizadas no permitieron diferenciar a los grupos *A. beryllina*, *A. cyanura* y los posibles híbridos, *Amazilia* sp. porque no presentan variación entre los individuos de los grupos. La única característica que separó a estos tres grupos fue la coloración de la cola, característica que fue analizada cuantitativamente mediante el uso de un espectrofotómetro de fibra óptica.

Los cinco genes evaluados presentaron baja variabilidad por lo que no fue posible encontrar diferencias entre las especies *A. beryllina* y *A. cyanura*. Esto impidió reconocer si la causa de la coloración de la cola del grupo *Amazilia* sp. se debe a hibridación entre las especies o a variaciones intraespecíficas.

A pesar de que las secuencias genéticas no presentaron diferencias entre las especies *A. beryllina* y *A. cyanura*, los datos de la coloración de la cola permiten observar la separación de los individuos en tres grupos. Por lo tanto, la hipótesis planteada que indica que la variación que se observa en la coloración de la cola de los individuos del grupo *Amazilia* sp. se debe a hibridación no se puede rechazar.

## 2. Introducción

El Colibrí de Berilo (*Amazilia beryllina*) y el Colibrí Coliazul (*Amazilia cyanura*) se distribuyen principalmente en la región mesoamericana. Ambas especies se encuentran en Guatemala y su distribución se traslapa en las laderas del Pacífico del país. Desde 1911 numerosos autores han reportado la posible hibridación de estas dos especies en el municipio de Patulul, departamento de Suchitepéquez (Ridgway, 1911, 448; Griscom, 1932, 201; Land, 1970, 161; Howell y Webb, 1995, 411; Pyle, 1997, 125; McCarthy, 2006, 145; Jiménez, 2009, 20).

Recientemente se han realizado colectas en Patulul y se han encontrado variaciones morfológicas en individuos que se piensa podrían ser híbridos entre el Colibrí de Berilo y el Colibrí Coliazul. Estas variaciones han sido en la coloración del plumaje, principalmente la cola (Jiménez, 2009, 20). Por esta razón, el presente estudio buscaba conocer si las variaciones morfológicas observadas en los colibríes del complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* se deben a la hibridación entre ambas o a variaciones dentro de la misma especie, conocidas como variaciones intraespecíficas.

Tomando en cuenta que los colibríes son aves muy importantes para el equilibrio de la naturaleza y la regeneración de los bosques, ya que contribuyen con la polinización (Kershaw, 2006), su estudio debe ser priorizado para la conservación de la biodiversidad. Además, el estudio de la hibridación entre especies favorece el avance en el conocimiento de la especiación y la extinción de especies (Gill, 2007, 590-597).

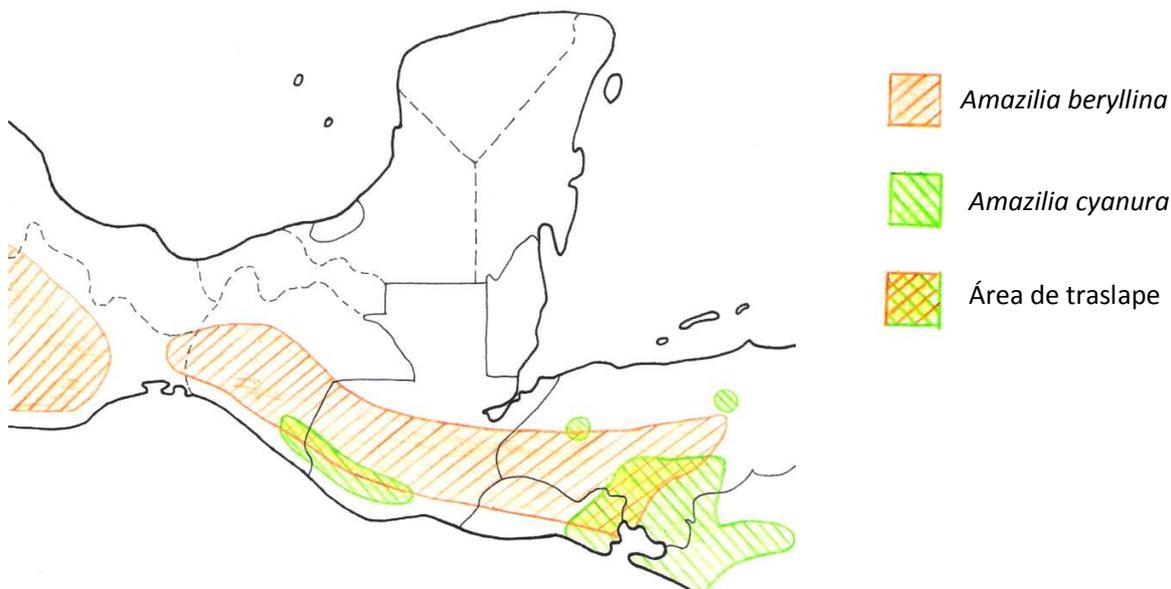
El proceso de hibridación interespecífica ocurre cuando un individuo de una especie se aparea con un individuo de una especie diferente, produciendo descendencia conocida como “híbrida”. La hibridación entre dos especies cercanamente emparentadas es común en la naturaleza, aunque en las aves, la hibridación exitosa no está limitada a especies cercanamente emparentadas o especies hermanas. Los híbridos, generalmente, poseen características físicas que representan una mezcla de las dos especies diferentes que se reprodujeron. En lo que se refiere a los genes, los híbridos son heterocigotos en el ADN nuclear, lográndose distinguir las dos especies parentales. La hibridación es más frecuente cuando las áreas de distribución de las dos especies que se aparean se traslapan. Estas áreas son conocidas como “zonas híbridas”. Las zonas híbridas permiten

realizar estudios genéticos y de estructuras sociales en el proceso de especiación. La hibridación puede guiar a la introgresión, donde los genes de una especie se recombinan con el acervo genético de una segunda especie, uniéndose ambas rápidamente; esto ocurre cuando los niveles de fertilidad en los híbridos son altos. Por el contrario, cuando se producen numerosos híbridos que no son viables, las poblaciones en la región de contacto pueden desaparecer (McCarthy, 2006, 10; Gill, 2007; 590-592; Pálsson, Vigfúsdóttir, Ingólfsson, 2009, 376-377; Vallender, Robertson, Friesen, y Lovette, 2007, 2018).

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Planteamiento del Problema

El Colibrí de Berilo (*Amazilia beryllina*) se distribuye desde el noroeste de México hasta el centro de Honduras en Centro América, raramente se observa en el suroeste de Estados Unidos de América. El Colibrí Coliazul (*Amazilia cyanura*) habita desde el sureste de Chiapas, México hasta el centro de Costa Rica en Centro América. La distribución de estas dos especies se traslapa en algunas regiones de Chiapas, Guatemala, El Salvador y Honduras (Griscom, 1932, 201; Howell y Webb, 1995, 410-411; Schuchmann, 1999, 604. **Figura 1**).



**Figura 1.** Mapa del Norte de Mesoamérica que muestra parte de las áreas de distribución de las especies *Amazilia beryllina* y *A. cyanura*, así como la zona de simpatría entre ambas especies.

Ridgway (1911, 448) fue el primero en determinar un espécimen como híbrido entre el Colibrí de Berilo y el Colibrí Coliazul (**Figura 2**). Desde entonces, varias publicaciones han mencionado esta posible hibridación entre las dos especies (Griscom, 1932, 201; Land, 1970, 161; Howell y Webb, 1995, 411; Pyle, 1997, 125; McCarthy, 2006, 145). También se ha mencionado que las diferencias morfológicas en los individuos no se deben a hibridación, sino a variaciones intraespecíficas en el Colibrí de Berilo (Schuchmann, 1999, 604).

El primer espécimen determinado como híbrido fue colectado en el municipio de Patulul, departamento de Suchitepéquez (Ridgway, 1911, 448). En observaciones y colectas realizadas recientemente en la Reserva Natural Privada San Jerónimo Miramar y Quixayá, situada en el municipio de Patulul, se han capturado tanto individuos de Colibrí de Berilo y Colibrí Coliazul, como individuos con coloraciones intermedias entre ambas especies (Jiménez, 2009, 20. **Figura 3**).



**Figura 2.** Especimen determinado como híbrido entre *A. beryllina* y *A. cyanura* por Ridgway (1911, 448). Forma parte de la colección del Field Museum of Natural History, Chicago, Illinois. No. de catálogo: 22,627. Fotografías: Mary Hennen.

Además de Patulul, los posibles híbridos han sido observados en otros municipios de Guatemala: Mixco, departamento de Guatemala (**Figura 4**); Antigua Guatemala, departamento de Sacatepéquez y San Lucas Tolimán, departamento de Sololá (Eisermann, K. com. pers., octubre 2009). Esto muestra la necesidad de conocer la diversidad genética de ambas especies, tanto en las áreas de simpatría, como en las áreas en que habita una sola de las especies. A diferencia de lo que ocurre en otros países, en Guatemala la distribución del Colibrí Coliazul se traslapa por completo con la distribución del Colibrí de Berilo. No obstante, existen áreas en que solamente

habita el Colibrí de Berilo: Izabal, Zacapa, Alta Verapaz, Huehuetenango, por ejemplo (Howell y Webb, 1995, 410-411; Chaluleu, C. com. pers., octubre 2009).



**Figura 3.** Individuos del género *Amazilia*. Esquina superior izquierda: Colibrí Coliazul (*A. cyanura*). Centro: posible híbrido *A. cyanura* – *A. beryllina*. Esquina superior derecha: Colibrí de Berilo (*A. beryllina*). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez. Mayo 2009.



**Figura 4.** Posible híbrido *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* observado en los alrededores del Km. 21 carretera hacia San Lucas Sacatepéquez, Mixco. Este individuo no tiene la cola de color azul profundo como *A. cyanura* y al igual que las dos especies presenta la base de las plumas primarias interiores y las plumas secundarias exteriores de color rojizo. Fotografía: Pavel García. Diciembre 2009.

### 3.2. Marco Teórico

**3.2.1 La Familia de los Colibríes: Trochilidae.** Los colibríes pertenecen al orden Apodiformes. El orden Apodiformes conforma un grupo monofilético, es decir que todos los integrantes de estos grupos descienden de un ancestro común. Los miembros de este orden comparten la habilidad de rotar las alas desde la base de manera que pueden aprovechar la fuerza del aletazo hacia abajo al igual que hacia arriba, mientras el ala se mantiene totalmente expandida; todos tienen patas muy cortas (Williamson, 2001, 5; Stiles y Skutch, 2003, 240-241; Hackett, Kimball, Reddy, Bowie, Braun, Braun, et al., 2008, 1765). Dentro de este orden se encuentran tres familias: Apodidae, la familia de los vencejos; Hemiprocnidae, la familia de los vencejos arborícolas y Trochilidae, la familia de los colibríes y hermitaños. La familia Trochilidae también representa un grupo monofilético (Hackett y otros, 2008, 1765; McGuire, Witt, Remsen, Dudley, y Altshuler, 2007, 838). Sin embargo, la taxonomía de los colibríes siempre ha presentado desafíos; la razón especies-géneros es muy baja (~ 331 especies en ~ 104 géneros) y a esto se suma el gran número de géneros monotípicos (~ 46). Dos subfamilias son reconocidas tradicionalmente: Phaethornithinae y Trochilinae (Stiles y Skutch, 2003, 240-241; McGuire, Witt, Altshuler, y Remsen, 2009, 155-161). No obstante, dada la escasez de estudios que existe hasta la fecha, es posible que esto cambie.

La familia de los colibríes es una familia muy distintiva del Nuevo Mundo. La mayoría de especies son tropicales y subtropicales y viven en latitudes entre los 10° Norte y los 25° Sur (Camfield, 2004). Los colibríes son conocidos por su pequeño tamaño, su poderoso vuelo y sus brillantes colores. Sus picos delgados, puntiagudos y largos varían de rectos a fuertemente arqueados y son utilizados para tomar el néctar de las flores e insectos; sus lenguas tubulares tienen puntas con barbas para ayudar en la toma del néctar (**Figura 5**). Los colibríes son los únicos pájaros capaces de revertir sus plumas primarias mientras vuelan, esto les permite volar hacia atrás. Las edades usualmente son diferentes (es decir, los juveniles son morfológicamente diferentes a los adultos), las crías son altriciales y nacen desnudas y totalmente dependientes de la madre para su supervivencia (Howell y Webb, 1995, 391-392; Williamson, 2001, 27; Stiles y Skutch, 2003, 240-241). La mayoría de especies tienen plumajes con tonos metálicos, generalmente verdes. Muchas especies tienen iridiscencia, usualmente en la garganta, o en la garganta y en la parte superior del pecho. Los colores iridiscentes son producidos por la luz refractada en lugar de pigmentos, estos

se ven de color negro si no se ven con la luz adecuada (Howell y Webb, 1995, 391). Varias especies, principalmente las que se reproducen en Norte América, son migratorias y muchas otras tienen movimientos locales y estacionales poco conocidos relacionados con la abundancia y distribución de las flores (Howell y Webb, 1995, 391; Stiles y Skutch, 2003, 241).



**Figura 5.** Existe gran diversidad de especies de colibríes con variaciones morfológicas, principalmente en el tamaño corporal y la forma y el tamaño del pico. Izquierda arriba: *Lampornis viridipallens*. Izquierda abajo: *Heliomaster longirostris*. Centro: *Phaethornis longirostris*. Derecha arriba: *Campylopterus hemileucurus*. Derecha abajo: *Abeillia abeillei*. Fotografías: Rosa Alicia Jiménez.

Los colibríes se alimentan de néctar y artrópodos. Al alimentarse de néctar, los colibríes realizan la importante tarea de la polinización, sobre todo en las montañas tropicales en donde las bajas temperaturas limitan la actividad de insectos y murciélagos (Stiles y Skutch, 2003, 241). Las flores especializadas en ser polinizadas por colibríes son tubulares, tienen abundante néctar y generalmente presentan una tonalidad roja, rosada o anaranjada (Williamson, 2001, 19-22; Stiles y Skutch, 2003, 241. **Figura 6**). Existe una fuerte relación entre la morfología y la ecología de los colibríes, por lo que a menudo los tubos florales concuerdan con la longitud y curvatura del pico de sus principales polinizadores (Rodríguez-Flores y Stiles, 2005, 7).



**Figura 6.** Los colibríes prefieren flores tubulares de tonalidad roja, rosada o anaranjada. Izquierda: *Lobelia* sp. Derecha: *Hamelia patens*. Fotografías: Rosa Alicia Jiménez.

Los colibríes pueden sobrevivir ingiriendo únicamente carbohidratos (néctar), sin embargo el hecho de no ingerir proteínas y lípidos (artrópodos) los hace perder peso; cuando no tienen carbohidratos, ni siquiera intentan capturar insectos (Brice, 1992, 151-154; López-Calleja, Fernández, y Bozinovic, 2003, 3349-3357). Se ha reportado que colibríes del género *Amazilia* (*A. castaneiventris* y *A. cyanifrons*) en Colombia se alimentan de los jejenes (Simuliidae) que rondan a los caballos, ya sea capturándolos mientras los jejenes vuelan o mientras se encuentran sobre la piel del caballo (Idrobo y Cortés Herrera, 2006, 40-44). Los colibríes tienen requerimientos bajos de nitrógeno lo que puede ser una adaptación a sus dietas bajas en grasa y libres de fibra, sin embargo no pueden mantener la masa corporal estable cuando no consumen nitrógeno. Se ha estimado que la especie *Sephanoides sephanoides* que habita en Chile, necesita 150 moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) para cubrir sus necesidades diarias de nitrógeno (López-Calleja y otros, 2003, 3349-3357).

Se encuentran reportadas 38 especies de colibríes en Guatemala; de éstas solamente una especie (*Archilochus colubris*) es migratoria latitudinal, es decir, que su área de reproducción es en Norte América y en el invierno migra hacia el sur (Howell y Webb, 1995, 391-430). Las otras 37 especies se reproducen en Guatemala (Eisermann y Avendaño, 2007, 53-55).

3.2.2 *El Colibrí de Berilo (Amazilia beryllina) y su Diversidad.* El Colibrí de Berilo se distribuye desde el noroeste de México hasta el centro de Honduras en Centro América, raramente se observa en el suroeste de Estados Unidos de América (Howell y Webb, 1995, 410-411; Schuchmann, 1999, 604). Anteriormente, esta especie era dividida en dos especies diferentes: *A. beryllina* y *A. devillei* (Salvin y Godman, 1892, 295-297; Ridgway, 1911, 447-450). Luego fueron unidas en una misma especie, *A. beryllina* y se consideraron subespecies: *A. b. beryllina* y *A. b. devillei* (Griscom, 1932, 201; Land, 1970, 160; Howell y Webb, 1995, 410). En la actualidad, cinco subespecies son reconocidas:

- *A. b. viola*: noroeste y oeste de México, raramente en el suroeste de Estados Unidos de América
- *A. b. beryllina*: centro de México
- *A. b. lichtensteini*: sur de México (oeste de Chiapas)
- *A. b. sumichrasti*: sur de México (centro y sur de Chiapas)
- *A. b. devillei*: sur de Guatemala y El Salvador al centro de Honduras (Schuchmann, 1999, 604)

Esta especie mide 9.5 a 10 cm. de largo. El pico mide de largo 1.33 veces el tamaño de la cabeza. La cola es cuadrada a ligeramente ahorquillada. Las alas son del mismo largo que la cola. La maxila es negra, la mandíbula es anaranjada en la base y negra en la punta. En la subespecie que habita en Guatemala, el macho posee la garganta, el pecho y el vientre de color verde destellante (obs. pers., 2006 – 2009). Las plumas coberteras infracaudales son de color canela, con el borde blanquecino. La base de las plumas secundarias es de color rojizo. La coronilla y la espalda son de color verde, tornándose café en la rabadilla; las plumas coberteras supracaudales son de color purpúreo. La cola es de color bronce-púrpura a violeta-púrpura. En la hembra, la garganta es de color verde, pero menos intenso; el vientre es verde moteado (Howell y Webb, 1995, 410 y observaciones personales 2006 - 2009).

**3.2.3 El Colibrí Coliazul (*Amazilia cyanura*) y su Diversidad.** El Colibrí Coliazul habita desde el sureste de Chiapas, México hasta el centro de Costa Rica en Centro América. La distribución de estas dos especies (*A. beryllina* y *A. cyanura*) se traslapa en Chiapas, Guatemala, El Salvador y Honduras (Griscom, 1932, 201; Howell y Webb, 1995, 411; Schuchmann, 1999, 604). Anteriormente no había divisiones en esta especie y era considerada como una sola unidad en todo su rango de distribución (Salvin y Godman, 1892, 297-298). Posteriormente se separó en dos subespecies: *A. c. cyanura* y *A. c. guatemalae* (Ridgway, 1911, 445-447; Griscom, 1932, 201; Land, 1970, 161; Howell y Webb, 1995, 411). Actualmente tres subespecies son reconocidas:

- *A. c. guatemalae*: sureste de México (sureste de Chiapas) al sur de Guatemala
- *A. c. cyanura*: sur de Honduras, este de El Salvador y noroeste de Nicaragua
- *A. c. impatiens*: noroeste y centro de Costa Rica (Schuchmann, 1999, 604)

Esta especie mide 9.5 a 10 cm. de largo. El pico mide de largo 1.25 - 1.33 veces el tamaño de la cabeza. La cola es ligeramente ahorquillada. Las alas son del mismo largo que la cola. La maxila es negra, la mandíbula es anaranjada en la base y negra en la punta (obs. pers. 2006 – 2009). En la subespecie que habita en Guatemala, el macho posee la garganta, el pecho y el vientre de color verde destellante, patas blancas llamativas. Las plumas coberteras infracaudales son de color violeta-azul oscuro. La base de las plumas secundarias exteriores y las primarias interiores es de color rojizo. La coronilla y la espalda son de color verde, tornándose púrpura en la rabadilla; las plumas coberteras supracaudales y la cola son de color azul profundo. En la hembra, la garganta es de color verde, pero menos intenso; el vientre es de color gris mate, el color rojizo en las alas es reducido o ausente (Howell y Webb, 1995, 411 y obs. pers. 2006 - 2009).

**3.2.4 Hibridación en aves.** El concepto biológico de especie indica que una especie es un grupo natural de individuos que pueden cruzarse entre sí, pero que están reproductivamente aislados de otros grupos afines (Solomon, Berg, y Martin, 2001, 407). Cuando un individuo de una especie se aparea con un individuo de una especie diferente, produce descendencia conocida como “híbrida”. La hibridación es más frecuente cuando las áreas de distribución de las dos especies que se aparean se traslapan. Los híbridos, generalmente, poseen características físicas que representan una mezcla de las dos especies diferentes que se reprodujeron. En lo que se refiere a los genes, los híbridos son heterocigotos en el ADN nuclear, lográndose distinguir las dos especies

parentales. La hibridación puede guiar a la introgresión, donde los genes de una especie se recombinan con el acervo genético de una segunda especie, uniéndose ambas rápidamente; esto ocurre cuando los niveles de fertilidad en los híbridos son altos. Por el contrario, cuando se producen numerosos híbridos que no son viables, las poblaciones en la región de contacto pueden desaparecer (McCarthy, 2006, 10; Pálsson, Vigfúsdóttir, Ingólfsson, 2009, 376-377; Vallender, Robertson, Friesen, y Lovette, 2007, 2018).

Existen reportes de que alrededor del 9.2% del total de especies de aves en el mundo han producido híbridos (Grant y Grant, 1992, 194; Pálsson, y otros, 2009, 376). Los patos y los gansos (Anseriformes) son el grupo de aves más propenso a hibridizarse. Otros grupos con alta incidencia de híbridos son los urogallos y perdices (Galliformes), carpinteros (Piciformes), colibríes (Trochiliformes), varios gavilanes y garzas (Falconiformes y Ciconiiformes; Grant y Grant, 1992, 194).

La mayoría de los híbridos son menos fértiles que las especies parentales que los produjeron. Sin embargo, el grado de fertilidad puede variar, desde cruces que producen híbridos infértiles a cruces que producen híbridos que son aparentemente tan fértiles como sus padres. El grado de fertilidad varía con la edad, el género o la dirección del cruce (Grant y Grant, 1992, 194; McCarthy, 2006, 9-14).

Como se mencionó anteriormente, los colibríes son un grupo de aves que presenta alta incidencia de híbridos. Esto se debe principalmente a su naturaleza polígama. Los colibríes no solamente producen híbridos con especies parentales del mismo género, sino que la gran mayoría de híbridos conocidos son entre especies de géneros diferentes. Existen reportes de que el género *Amazilia* se ha cruzado con individuos de otros géneros: *Hylocharis*, *Eugenes*, *Cyananthus* y *Chrysuronia* (McCarthy, 2006, 145-146). Además de la hibridación reportada entre *Amazilia beryllina* y *A. cyanura*, *A. beryllina* se ha cruzado con *A. cyanocephala* y *Eugenes fulgens* (Williamson, 2001, 148-151; McCarthy, 2006, 145).

Diversos estudios acerca de la hibridación entre diferentes especies de colibríes se han llevado a cabo. Hasta ahora, la hibridación en los colibríes ha sido afirmada tomando en cuenta caracteres

morfológicos únicamente. Los principales caracteres utilizados han sido: patrones en la coloración del plumaje (de forma cualitativa o cuantitativa), coloración del pico, forma de las alas y de la cola, medidas corporales, peso y osteología del cráneo (Banks y Johnson, 1961, 3 -28; Gill, Stokes, y Stokes, 1973, 170-176; Baldrige, Kiff, Baldrige, y Hansen, 1983, 17-30; Binford, 1985, 148-150; Graves y Zusi, 1990, 754-760; Graves, 2003, 847-851; Graves, 2007, 99-105).

3.2.4.1 Estudio Molecular de la Hibridación de Especies de Aves. Diferentes técnicas moleculares pueden ser utilizadas para la detección de hibridación de especies. Entre estas técnicas se encuentran la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y Secuenciación de ADN, Análisis de Microsatélites y Análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP, por sus siglas en inglés). Los estudios moleculares de hibridación requieren que se pueda monitorear adecuadamente el flujo genético entre dos poblaciones diferentes (Chambers y MacAvoy, 1999, 7-10; Milá, Smith, y Wayne, 2007, 160; Vallender y otros, 2007, 2019; Pálsson y otros, 2009, 377).

Generalmente, al realizar análisis moleculares para detectar la hibridación entre especies, se obtienen secuencias genéticas de genes mitocondriales y genes nucleares. Con lo que respecta a los genes mitocondriales, se espera obtener diferentes secuencias para cada una de las especies parentales (Chambers y MacAvoy, 1999, 6). Evaluando las secuencias de los genes mitocondriales se identifica la especie de la madre de los híbridos, ya que, como es bien sabido el ADN mitocondrial es heredado por vía materna (Moore, 1995, 719; Chambers y MacAvoy, 1999, 15). El ADN mitocondrial es muy útil al intentar diferenciar especies hermanas, muy cercanamente relacionadas o recientemente separadas, ya que usualmente evoluciona más rápido que el ADN nuclear. Al contrario del ADN mitocondrial, el ADN nuclear posee dos copias, una heredada de la madre y la otra del padre, por lo que debe ser analizado de forma diferente. Se obtienen las secuencias de más de un gen nuclear (3 ó 4 genes) y al igual que en el ADN mitocondrial, se evalúa que las secuencias sean diferentes para cada una de las especies involucradas. Si las secuencias presentan diferencias entre las especies, se identifica el origen de las secuencias genéticas en los posibles híbridos. Los híbridos pueden presentar diferentes combinaciones de ADN mitocondrial y ADN nuclear. Los híbridos de la primera generación (F1) presentarían ADN nuclear heterocigoto (una copia de cada una de las especies para todos los genes evaluados) y ADN mitocondrial de una

de las especies, dependiendo de la especie de la madre. Los híbridos a partir de la segunda generación (F2) y los descendientes de retrocruces (un individuo de una de las especies parentales apareado con un híbrido fértil) pueden presentar diferentes mezclas de ADN nuclear, ya no serán heterocigotos en todos los genes nucleares evaluados (Cortés-Ortiz, Duda, Canales-Espinosa, García-Orduña, Rodríguez-Luna, y Bermingham, 2007, 2423. **Figura 7**).

ADN mitocondrial			ADN nuclear				
Gen1	Gen2	Gen3	Gen1	Gen2	Gen3	Gen4	
●	●	●	●	●	●	●	Especie 1
●	●	●	●	●	●	●	Especie 2
●	●	●	●	●	●	●	F1 (Madre Especie 1)
●	●	●	●	●	●	●	F1 (Madre Especie 2)
●	●	●	●	●	●	●	F2 y retrocruces tendrán
●	●	●	●	●	●	●	diferentes combinaciones

●	Homocigoto Especie 1
●	Homocigoto Especie 2
●	Heterocigoto

**Figura 7.** Representación gráfica de las combinaciones de secuencias genéticas que pueden encontrarse en los individuos para la detección de híbridos. Solamente se representan dos de las posibles combinaciones de individuos de la segunda generación (F2) y retrocruces.

Las relaciones entre las secuencias genéticas de las dos especies parentales pueden evidenciarse elaborando árboles filogenéticos, éstos árboles son obtenidos a partir de análisis de parsimonia, análisis bayesianos y/o análisis de máxima verosimilitud. Para enraizar (poseer un árbol con un único nódulo que corresponde a un ancestro común reciente de las especies de estudio) los árboles es necesario contar con un grupo externo, este es un grupo de organismos que sirve como grupo de referencia para la determinación de las relaciones evolutivas entre grupos monofiléticos de organismos. El grupo externo seleccionado debe estar cercanamente relacionado al grupo de estudio, pero no tan cerca como se relacionan los individuos que pertenecen al grupo de estudio (Solomon y otros, 2001, 477). Además, los genes utilizados para detectar la hibridación de dos especies, deben permitir monitorear el flujo genético entre las especies involucradas (Chambers y MacAvoy, 1999, 6).

3.2.4.2 Análisis de Máxima Verosimilitud y Modelos de Evolución del ADN. Una vez que se obtienen las secuencias, es posible elaborar los árboles filogenéticos. Un método muy utilizado para realizar dichos árboles es el análisis de máxima verosimilitud. Este análisis evalúa una hipótesis acerca de la historia evolutiva en términos de la probabilidad en que el modelo propuesto y la historia hipotética darían origen a los datos observados. La suposición es que una historia con más alta probabilidad de alcanzar el estado observado es preferida a una historia con menor probabilidad. El método busca el árbol con la más alta probabilidad o verosimilitud (Opperdoes, 1997). Es un método muy utilizado ya que da resultados explícitos, las suposiciones se ven claras, no están ocultas; se puede hacer que el modelo se ajuste a los datos; y es eficiente y poderoso, utiliza todos los datos, al contrario de los análisis de parsimonia que únicamente emplean los sitios parsimoniosamente informativos (Foster, 2001).

El modelo de evolución que atribuye una cierta probabilidad a cada posible sustitución de nucleótidos es esencial para obtener el árbol correcto (Opperdoes, 1997). Nunca debe asumirse un modelo, lo mejor es encontrar el modelo que se ajusta a los datos. Los modelos están descritos en términos de los parámetros utilizados para describir la tasa a la cual un nucleótido reemplaza a otro durante la evolución. El modelo más complejo es "GTR" (General Time-Reversible). La "reversibilidad del tiempo" (time reversible) se refiere a que la cantidad de cambio del estado "X" al estado "Y" es igual a la cantidad de cambio de "Y" a "X", aunque los dos estados puedan ocurrir con diferentes frecuencias (Foster, 2001).

#### 4. Justificación

Los colibríes se encuentran distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano (Camfield, 2004). Los colibríes son aves muy importantes para el equilibrio de la naturaleza, puesto que no solamente se alimentan de néctar, sino que al realizar esta tarea transportan el polen de una flor a otra, lo que permite la reproducción de muchas especies de plantas. En las montañas la polinización es principalmente llevada a cabo por los colibríes, ya que las bajas temperaturas no permiten a las abejas y otros insectos sobrevivir. Además, las plantas presentan un interés en ser polinizadas por colibríes en lugar de abejas, puesto que estos no colectan el polen para ellos mismos, solo lo transportan (Kershaw, 2006).

Existen 37 especies de colibríes que habitan y se reproducen en Guatemala (Eisermann y Avendaño, 2007, 53-55), en ninguna de ellas se ha estudiado la diversidad genética. La diversidad genética es un componente importante de la biodiversidad y afecta las características de las poblaciones, ya que las poblaciones que han perdido la variación genética pierden la habilidad de adaptarse a nuevas condiciones y consecuentemente se hacen más propensas a la extinción. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) reconoce el mantenimiento de la diversidad genética como una prioridad mundial de conservación (Evans y Sheldon, 2008, 1016-1025; Höglund, 2009, 1-16). Cualquier esfuerzo por estudiar la diversidad genética de un grupo monofilético como los colibríes, por lo tanto, resulta prioritario.

El estudio de la hibridación entre especies presenta gran relevancia en el avance del conocimiento de la formación de nuevas especies o especiación. Sin embargo, la hibridación entre especies también puede conducir hacia la extinción, ya que la hibridación puede afectar la salud de las poblaciones de diferentes maneras, una de ellas es que cambia las proporciones entre sexos puesto que el sexo con cromosomas sexuales diferentes (las hembras en el caso de las aves) tiende ser estéril. Además, cuando una de las dos especies posee un tamaño poblacional menor, sus genes pueden mezclarse por completo con los de la otra especie, guiando al proceso conocido como introgresión y a la subsecuente desaparición de dicha especie (Gill, 2007, 590-597; Vallender y otros, 2007, 2018; Evans y Sheldon, 2008, 1016-1025; Pálsson y otros, 2009, 376-377). El

desarrollo de este estudio constituye un primer paso que guiará la realización de nuevas investigaciones que permitan conocer el efecto de la hibridación en las poblaciones relacionadas.

Además, el estudio de la diversidad genética de las especies de colibríes *Amazilia beryllina* y *A. cyanura* incrementa el conocimiento de la biodiversidad de Guatemala. Esto contribuye al fortalecimiento del Sistema Guatemalteco de Áreas Protegidas (SIGAP) y a la conservación de las aves; en especial los colibríes, ya que todas las especies de esta familia se encuentran en el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora (CITES, por sus siglas en inglés. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza [UICN]-WWF, 1999, 50-51).

## 5. Objetivos

### 5.1 General

Contribuir al conocimiento de la diversidad biológica de las aves en Guatemala, en particular de la familia Trochilidae (colibríes), mediante el estudio de la variabilidad morfológica y genética del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *Amazilia cyanura* para la determinación de la posible hibridación entre ambas especies en Guatemala.

### 5.2 Específicos

- 5.2.1 Describir la variabilidad morfológica y genética del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *Amazilia cyanura* en Guatemala.
- 5.2.2 Determinar si las variaciones morfológicas de los colibríes del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *Amazilia cyanura* se deben a hibridación entre ambas o a variaciones intraespecíficas, utilizando análisis cualitativos y cuantitativos de la coloración del plumaje y secuenciación de genes.

## 6. Hipótesis

Las variaciones morfológicas de los colibríes del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *Amazilia cyanura* se deben a la hibridación entre ambas.

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1 Universo

Especies de colibríes: *Amazilia beryllina*, *A. cyanura* y posibles híbridos *A. beryllina* – *A. cyanura*.

### 7.2 Población

Poblaciones de *Amazilia beryllina*, *A. cyanura* y posibles híbridos *A. beryllina* – *A. cyanura* que habitan en Patulul, Suchitepéquez; Mixco, Guatemala; El Palmar, Quetzaltenango; San Pedro Yepocapa, Chimaltenango; Antigua Guatemala, Sacatepéquez; Livingston, Izabal; Lanquín, Alta Verapaz; Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango.

### 7.3 Muestra

Individuos colectados de *Amazilia beryllina*, *A. cyanura* y posibles híbridos *A. beryllina* – *A. cyanura*. Se colectaron 32 individuos en total (11 *A. beryllina*, 9 *A. cyanura* y 12 posibles híbridos), tomando en cuenta las diferentes localidades de colecta.

### 7.4 Variables Independientes

Las especies identificadas *a priori*:

*Amazilia beryllina*, *A. cyanura* y posibles híbridos *A. beryllina* – *A. cyanura*.

### 7.5 Variables Dependientes

- Coloración del plumaje (plumas primarias, plumas secundarias, garganta, vientre, plumas supracaudales)
- Peso (g)
- Color de los dedos y tarsos
- Color de la maxila

- Color de la mandíbula
- Color del iris
- Muda (corporal, alar, de la cola)
- Coloración de las plumas rectrices (de la cola)
- Secuencias de genes

### 7.6 Materiales

- Redes de niebla
- Tubos de aluminio
- Lazo
- Bolsas de manta
- Balanza Pesola de 10 g
- Boletas de toma de datos
- Sujetador de la luz del espectrofotómetro Reflection Probe Holder
- Referencia del blanco espectrofotométrico STAN-SSH High-reflectivity Specular Reference Standard
- Guantes de látex
- Guantes de nitrilo
- Mechero y fósforos
- Papel Parafilm
- Alcohol 100°
- Pipetas de 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L
- Puntas para pipetas (1-10  $\mu$ L, 20-200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L)
- Tubos con capacidad de 0.5 mL
- Placas con 96 celdas con capacidad de 0.5 mL
- Gradillas para tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad
- Horno a 55°C
- Frasco Erlenmeyer 500 mL
- Probeta 100 mL

- Beaker 50 mL
- GPS Garmin Legend
- Cámara fotográfica SONY
- Espectrofotómetro Ocean Optics 2000USB
- Centrifugadora de tubos
- Centrifugadora de placas
- Agitador Vortex
- Espectrofotómetro NanoDrop 1000
- Termocicladores
- Aparato para electroforesis
- Horno microondas
- Máquina secuenciadora ABI 3730
- Material de preparación de pieles de estudio (tijeras, pinzas, bisturí, algodón, varillas de madera, alfileres, cartón, etiquetas)
- Material de preservación de tejidos (viales, alcohol 95%, Buffer DMSO con NaCl 20%)
- Material de extracción de ADN
  - Equipo de extracción *DNAeasy Blood & Tissue* (Qiagen): tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, tubos con filtro, tubos sin filtro, tubos con rosca, Buffer ATL, solución de proteinasa K, buffer AE, buffer AL, etanol 100°, buffer AW1 con etanol, buffer AW2 con etanol.
  - Equipo de extracción estándar con Cloruro de Sodio: tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, Buffer de extracción (95% H<sub>2</sub>O, 2% 0.5M EDTA, 2% 5M NaCl, 1% 1M TRIS), SDS 10%, proteinasa K, Cloruro de Sodio (NaCl) 5M, isopropanol, etanol 80%, buffer AE.
- Material de amplificación de ADN (agua destilada, buffer 10X Invitrogen, buffer 10X Roche, 50mM MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, BSA, cebadores (H6312, L5204, Fib5, Fib6, 5F, 6R, MUSK-I3F, MUSK-I3R, G3P13b, G3P14b, Myo2, Myo3F, 15F, 15R, AK5b<sup>+</sup>extended, AK6c<sup>-</sup>extended, FIB-B17U-long, FIB-B17L-long, OD6, OD8), Taq Invitrogen, Gold Taq Roche)
- Material para electroforesis (agarosa, buffer 1XTBE, marco para preparación de geles, Dye, escala de pesos moleculares de 100 pb, Bromuro de Etilo, caja de luz ultravioleta)

- Material para la purificación del ADN amplificado (Exo/SAP)
- Material para los ciclos de secuenciación (agua, buffer Big Dye, cebadores (H6312, L5204, Fib5, Fib6, 5F, 6R, MUSK-I3F, MUSK-I3R, G3PintL1, G3P14b, Myo2, Myo3F, 15F, 15R, AK5b<sup>+</sup>extended, AK6c<sup>-</sup>extended, FIB-B17U-long, FIB-B17L-long, OD6, OD8), Big Dye v3.1)
- Material para la purificación del producto de los ciclos de secuenciación (Sephadex, placa para Sephadex)
- Software para análisis: Sequencher 4.8, PAUP v.4.0b10, MrModelTest v.2.3, RAxML, R, Microsoft Excel 2007, GraphPad InStat, DnaSP v.5.10, TCS v.1.21

## 7.7 Métodos

**7.7.1 Colecta de Especímenes.** Se colectaron especímenes de los colibríes que morfológicamente se reconocían como: a) *Amazilia beryllina*, b) *A. cyanura* y c) posibles híbridos entre las dos especies. Para realizar la captura de los individuos se utilizaron redes de niebla.

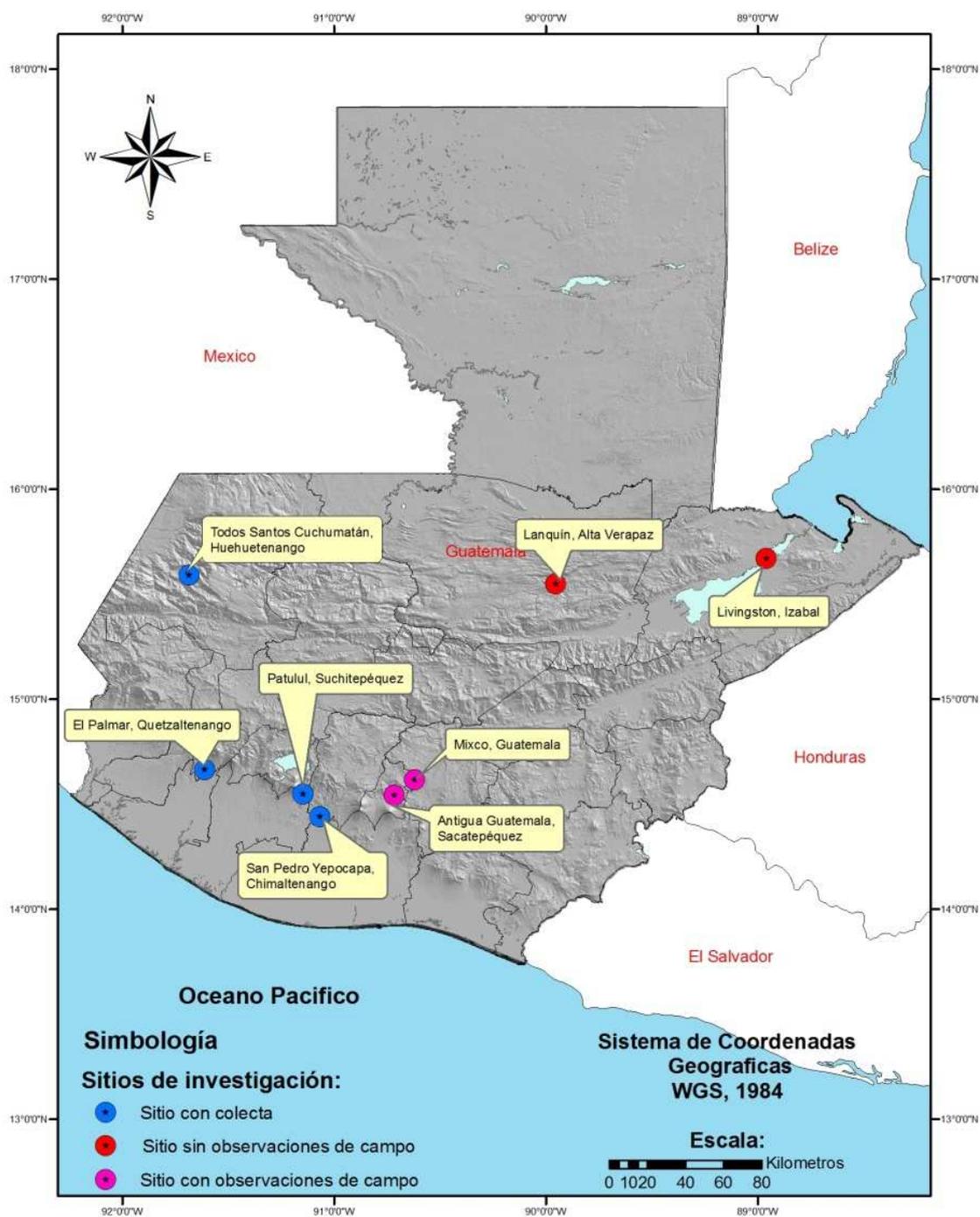
Los colibríes fueron fotografiados y posteriormente algunos (~ 30) individuos fueron sacrificados siguiendo las técnicas recomendadas por The Ornithological Council y American Veterinary Medical Association para la colecta científica de aves silvestres (Gaunt, Oring, Able, Anderson, Baptista, Barlow, y Wingfield, 1997, 14; American Veterinary Medical Associations [AMVA], 2007). El Consejo Nacional de Áreas Protegidas aprobó la colecta de los especímenes y extendió la licencia respectiva (Licencia No. 12811). Se procedió a la preparación de pieles de estudio, durante este proceso se tomaron diferentes datos de cada individuo (sexo, peso, muda del plumaje, osificación craneal, estado de las gónadas, grasa corporal, color del iris, color de los dedos y tarsos, color de la maxila y la mandíbula). Estos datos fueron almacenados como información de referencia complementaria a las pieles de estudio. Las pieles fueron preparadas adecuadamente para su almacenamiento definitivo en la colección ornitológica del Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Durante la preparación inicial de las pieles se tomaron muestras de tejidos (músculo, corazón, hígado, riñón) para realizar los estudios moleculares. Los tejidos fueron preservados en viales (Nalgene) conteniendo alcohol etílico al 95%. Los tejidos fueron tomados en duplicado, un juego de muestras permanece en el Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos de Guatemala y el otro juego fue

exportado al Museum of Vertebrate Zoology, Universidad de California, Berkeley (para lo cual se solicitó el permiso de exportación correspondiente ante el Consejo Nacional de Áreas Protegidas).

Se visitaron ocho sitios en busca de individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* (**Figura 8**). Los ocho sitios visitados se encuentran en el área de distribución de las especies, cinco sitios se ubican en el área de simpatria de ambas especies (Quetzaltenango, Suchitepéquez, Chimaltenango, Sacatepéquez y Guatemala) y tres sitios en el área de alopatría de *A. beryllina* (Huehuetenango, Alta Verapaz e Izabal).

De los ocho sitios visitados, únicamente fue posible realizar colectas en cuatro de ellos (**Figura 8 y Tabla 1**). El primer sitio visitado fue la Reserva Natural Privada San Jerónimo Miramar y Quixayá, municipio Patulul, departamento Suchitepéquez (N 14°32'50.3" O 91°08'47.0". 730– 1150 msnm) debido a que allí es donde se hizo el primer reporte de un híbrido entre las dos especies (Ridgway, 1911, 448), además de los reportes recientes de la observación de estas especies y posibles híbridos en el área. Patulul fue visitado en mayo, junio y julio 2009. Se realizó un esfuerzo de 150 horas / red con redes de niebla y 30 horas con Trampas Russell modificadas. Se capturaron 29 individuos y 17 fueron colectados: cuatro *A. beryllina*, tres *A. cyanura* y diez *Amazilia* sp.

Posteriormente, en diciembre de 2009 se visitó la 27 calle 14-55, Zona 1, Aldea Lo de Coy, Km. 21 carretera a San Lucas Sacatepéquez, Municipio Mixco, Departamento Guatemala (N 14°36'56.6" O 90°37'06.8". ~ 2000 msnm) para verificar reportes recientes de observaciones de híbridos. Fue posible observar individuos que presentan la principal característica de los híbridos: cola de color púrpura (**Figura 4**). Lamentablemente el propietario no dio la autorización de coleccionar especímenes en el área.



**Figura 8.** Ubicación geográfica de los diferentes sitios visitados en busca de individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. Mapa: Pavel García.

**Tabla 1.** Individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* colectados y localidad de colecta.

	<i>Amazilia beryllina</i>		<i>Amazilia cyanura</i>		<i>Amazilia</i> sp.	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
Suchitepéquez	1	3	1	2	2	8
Huehuetenango		5				
Quetzaltenango			2	4		
Chimaltenango	1	1			2	
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>4</b>	<b>8</b>

En marzo de 2010 se visitó un área aledaña a las pozas de Semuc Champey, Lanquín, Alta Verapaz ya que existen reportes de observación de *A. beryllina* en ese sector. Específicamente se trabajó en el Hotel JamBamBoo ubicado en el municipio de Lanquín, Departamento de Alta Verapaz (N 15°32'49.8" O 89°57'05.9". 415 msnm). Se realizó un esfuerzo de 162 horas / red y no fue posible capturar ni un solo individuo de *A. beryllina*. También se hicieron observaciones en el área y no se observó dicha especie. Se capturaron dos especies del género *Amazilia*: *A. tzacatl* y *A. candida* (**Figura 9**) y se observó *Eupherusa eximia* en el área. *A. tzacatl* y *E. eximia* pudieron haber sido confundidas con *A. beryllina* dando un reporte erróneo de la presencia de esta especie en el área.

También en marzo de 2010 se visitó el Parque Regional Municipal Todos Santos Cuchumatán, municipio Todos Santos Cuchumatán, departamento de Huehuetenango (N 15°35'27.3" O 91°40'59.6". 1600–1800 msnm), ya que se contaba con reportes previos de observaciones de *A. beryllina* en el área. Se realizó un esfuerzo de 39 horas / red y fue posible capturar cinco especímenes.



**Figura 9.** Colibríes observados y/o capturados en Lanquín, Alta Verapaz y Livingston, Izabal. Izquierda: *Amazilia tzacatl*. Derecha arriba: *Amazilia candida*. Derecha abajo: *Eupherusa eximia*. Fotografías: Rosa Alicia Jiménez.

Además de Alta Verapaz y Huehuetenango, en marzo de 2010 también se visitó la Reserva Natural Privada Patrocinio, ubicada en el municipio de El Palmar, departamento de Quetzaltenango (N 14°39'51.4" O 91°36'33.9". 700–900 msnm), puesto que es un área de distribución simpátrica de *A. beryllina* y *A. cyanura*. Se realizó un esfuerzo de 188 horas / red y fue posible capturar seis especímenes de *A. cyanura*. No se capturaron ni se observaron individuos de *A. beryllina* en el área.

En abril de 2010 se visitaron tres sitios diferentes, uno de ellos es la Reserva Natural Privada Santa Rosa Sumatán, ubicada en el municipio San Pedro Yepocapa, departamento de Chimaltenango (N 14°26'29.6" O 91°04'00.4". ~700 msnm), área de distribución simpátrica de *A. beryllina* y *A. cyanura*. Se realizó un esfuerzo de 145 horas / red y se colectaron dos especímenes de *A. beryllina* y dos de *Amazilia* sp. No se capturaron ni se observaron individuos de *A. cyanura* en el área.

El siguiente sitio visitado en abril de 2010 fue el Parque Nacional Río Dulce, ubicado en el municipio de Livingston, departamento de Izabal (N 15°40'16.8" O 88°57'31.7". ~30 msnm), área de distribución alopátrica de *A. beryllina*. Se realizó un esfuerzo de 83 horas / red y no fue posible

capturar ni un solo individuo de *A. beryllina*. Se hicieron observaciones en el área y no se observó dicha especie. Al igual que en Lanquín, Alta Verapaz, se capturaron dos especies del género *Amazilia*: *A. tzacatl* y *A. candida* (**Figura 9**).



**Figura 10.** Colibríes *Amazilia* sp. observados en la Finca El Pilar, Antigua Guatemala, Sacatepéquez. Fotografías: Rosa Alicia Jiménez.

El último sitio que se visitó en abril de 2010 fue la Finca El Pilar, ubicada en el municipio de Antigua Guatemala, departamento de Sacatepéquez (N 14°32'33.7" O 90°42'48.6". ~1600 msnm), área con reportes recientes de observaciones de posibles híbridos entre *A. beryllina* y *A. cyanura*. Se realizó un esfuerzo total de 60 horas / red y no se lograron capturar colibríes del género *Amazilia*. Sin embargo, fue posible observarlos y fotografiarlos. Se observaron dos especies de colibríes del género *Amazilia*: *A. cyanocephala* y *Amazilia* sp. Los individuos *Amazilia* sp. podrían representar híbridos entre *A. beryllina* – *A. cyanura*, ya que la cola tenía diferentes colores: bronce y púrpura, colores asociados con los posibles híbridos de dichas especies (**Figura 10**).

**7.7.2 Obtención de Datos Morfológicos.** Diferentes datos morfológicos fueron tomados de los individuos y fueron utilizados con dos propósitos: descripción morfológica de los individuos y análisis de la coloración de las plumas de la cola.

**7.7.2.1 Descripción Morfológica de los Individuos y Contenido del Tracto Digestivo.** Se tomaron en cuenta las siguientes características para la descripción de la morfología de los individuos colectados:

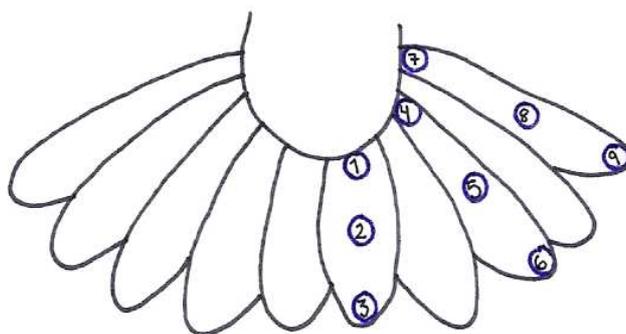
- Sexo
- Peso (g)

- Color de los dedos y tarsos
- Color de la maxila
- Color de la mandíbula
- Color del iris
- Color de la garganta: verde intenso o verde moteado
- Color del vientre: verde intenso o verde moteado
- Presencia / ausencia de color rojizo en las plumas primarias
- Presencia / ausencia de color rojizo en las plumas secundarias
- Color de las plumas supracaudales: bronce, bronce-púrpura, púrpura, púrpura-azul, azul
- Muda corporal
- Muda alar
- Muda de la cola

Además, el contenido del tracto digestivo de 25 individuos fue analizado. Los primeros siete colibríes colectados no cuentan con esta información debido a que no se preservó el esófago y estómago de los mismos. Se trabajó con el contenido estomacal de nueve individuos *A. beryllina*, nueve individuos *A. cyanura* y siete individuos *Amazilia* sp. El esófago y el estómago de los especímenes fueron disectados y, utilizando un estereoscopio y claves dicotómicas, se identificaron los artrópodos que se encontraban dentro de ellos (McAlpine, Peterson, Shewell, Teskey, Vockeroth, y Wood, 1981; Goulet y Huber, 1993; Zumbado, 2006; Merrit, Cummins, y Berg, 2009; Resh y Cardé, 2009). Algunos artrópodos que estaban en los esófagos se encontraban completos por lo que pudieron ser identificados hasta familia. La mayoría de artrópodos que se encontraban en el estómago estaban completamente triturados, solamente se observaron restos (cabezas, alas, patas) que pudieron catalogarse por órdenes. La identificación de los artrópodos fue realizada por Pavel García.

7.7.2.2 Análisis de la Coloración de la Cola. La toma de datos numéricos de la coloración de la cola fue realizada en el Museum of Vertebrate Zoology, Universidad de California, Berkeley; debido a que en dicho museo cuentan con el espectrofotómetro indispensable para la obtención de este tipo de datos.

Se tomaron medidas de reflectancia de tres plumas de la cola. Estas tres plumas fueron: a) rectriz derecha #1, b) rectriz derecha #3 y c) rectriz derecha #5. En cada una de estas plumas se midió la reflectancia de la base, el centro y el ápice (**Figura 11**).



No. de Punto	Nombre del Punto	Abreviatura Utilizada
1	Rectriz Derecha 1 - Base	RD1B
2	Rectriz Derecha 1 - Centro	RD1C
3	Rectriz Derecha 1 - Ápice	RD1A
4	Rectriz Derecha 3 - Base	RD3B
5	Rectriz Derecha 3 - Centro	RD3C
6	Rectriz Derecha 3 - Ápice	RD3A
7	Rectriz Derecha 5 - Base	RD5B
8	Rectriz Derecha 5 - Centro	RD5C
9	Rectriz Derecha 5 - Ápice	RD5A

**Figura 11.** Representación de los diferentes puntos de las plumas de la cola que fueron analizados con el espectrofotómetro de fibra óptica en el complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.

En cada uno de los puntos se tomaron tres mediciones. Cada una de estas mediciones consistía en una curva con valores de reflectancia para cada longitud de onda en el espectro de 400 a 700 nm, rango del espectro visible por el humano (Parra, 2010, 328). Estas mediciones del color se tomaron sobre una mesa cubierta con una franela negra. Se utilizó un Reflection Probe Holder (RPH-1, Ocean Optics, Dunedin, FL) que permite controlar la posición de la emisión de la luz y los

cables de fibra óptica de recepción de la luz a un ángulo de 90° de la muestra, para obtener el reflejo especular. Para tomar estas medidas, se utilizó un espectrofotómetro de fibra óptica Ocean Optics 2000USB (Ocean Optics, Dunedin, FL. Procedimiento detallado en **Anexo 1**).

*7.7.3 Obtención de Datos Genéticos.* Al igual que en los análisis anteriores, los análisis moleculares de los tejidos colectados se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular del Museum of Vertebrate Zoology, Universidad de California, Berkeley dado que allí cuentan con el equipo necesario para el trabajo con ADN, desde su extracción hasta la secuenciación.

Se obtuvieron secuencias de ADN de los 32 especímenes colectados. Se seleccionó inicialmente un gen mitocondrial (ND2) y nueve genes nucleares (BFIB5, TGFB2, MUSK, GAPDH, MYO, BRM, AK1, BFIB7, ODC). Los marcadores moleculares seleccionados han sido utilizados previamente en diferentes estudios de aves, algunos de ellos en estudios de colibríes y han presentado excelentes resultados, por lo que esto mismo se esperaba en *A. beryllina*, *A. cyanura* y los posibles híbridos (Cicero y Johnson, 2001, 27-30; Irestedt, Fjeldså, Johansson, y Ericson, 2002, 499-502; Marini y Hackett, 2002, 1115; Primmer, Borge, Lindell, y Saetre, 2002, 611; Allen y Omland, 2003, 963; Fjeldså, Zuccon, Irestedt, Johansson, y Ericson, 2003, S238; Borge, Webster, Andersson, y Saetre, 2005, 1862; McGuire y otros, 2007, 839; Tello y Bates, 2007, 137; Nguembock, Fjeldså, Couloux, y Pasquet, 2008, 397; Kimball, Braun, Barker, Bowie, Braun, Chojnowski, et al., 2009, 658). A pesar de esto no fue posible obtener secuencias de todos los genes nucleares, únicamente se logró secuenciar los genes: BFIB5, TGFB2, AK1 y ODC.

El ADN fue aislado utilizando el método estándar con Cloruro de Sodio y el equipo *DNAeasy Blood & Tissue* (Qiagen) siguiendo los protocolos estándar. La amplificación de las secuencias deseadas se desarrolló utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los cebadores adecuados para cada gen (**Tabla 2**). El producto amplificado mediante PCR fue purificado utilizando Exonucleasa y Fosfatasa Alcalina de Camarón (Exo/SAP, por sus siglas en inglés). El producto purificado fue colocado en ciclos de secuenciación utilizando la mezcla de reacción secuenciadora *Big Dye*. El producto de los ciclos de secuenciación fue purificado utilizando columnas de Sephadex. El producto purificado fue visualizado en una secuenciadora ABI 3730 (Sellas, 2008. Applied Biosystems, Carlsbad, CA. Procedimiento detallado en **Anexo 2**).

**Tabla 2.** Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial y nuclear del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Fuente
<b>Gen mitocondrial amplificado y secuenciado</b>			
ND2	H6312	CTTATTTAAGGCTTTGAAGGCC	Cicero y Johnson, 2001 Tello y Bates, 2007
ND2	L5204	TAACTAAGCTATCGGGCGCAT	Diseñado por S. Hackett
<b>Genes nucleares amplificados y secuenciados</b>			
BFIB5	Fib5	CGCCATACAGAGTATACTGTGACAT	Marini y Hackett, 2002 Tello y Bates, 2007
BFIB5	Fib6	GCCATCCTGGCGATTCTGAA	Marini y Hackett, 2002 Tello y Bates, 2007
TGFB2	5F	TTGTTACCCTCCTACAGACTTGACTC	Primmer y otros, 2002
TGFB2	6R	GACGCAGGCAGCAATTATCC	Primmer y otros, 2002
AK1	AK5b <sup>+</sup> extended	ATTGACGGCTACCCTCGCGAGGTGAAACAG	McGuire y otros, 2007
AK1	AK6c <sup>-</sup> extended	CACCCGCCCGCTGGTCTCTCCTCG	McGuire y otros, 2007
ODC	OD6	GACTCCAAAGCAGTTTGTCTGCTCAGTGT	Allen y Omland, 2003
ODC	OD8	ATTGGTGGTGGCTTCCCTGGCTCTGAAGA	Allen y Omland, 2003
<b>Genes nucleares no amplificados ni secuenciados</b>			
MUSK	MUSK-I3F	CTTCCATGCACTACAATGGGAAA	Kimball y otros, 2009
MUSK	MUSK-I3R	CTCTGAACATTGTGGATCCTCAA	Kimball, y otros, 2009
GADPH	G3P13b	TCCACCTTTGATGCGGGTGCTGGCAT	Fjeldså y otros, 2003
GAPDH	G3P14b	AAGTCCACAACACGGTTGCTGTA	Fjeldså y otros, 2003
MYO	Myo2	GCCACCAAGCACAAGATCCC	Irestedt y otros, 2002 Fjeldså y otros, 2003
MYO	Myo3F	TTCAGCAAGGACCTTGATAATGACTT	Irestedt y otros, 2002 Fjeldså y otros, 2003

**Tabla 2.** (Continuación...) Cebadores utilizados para la amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial y nuclear del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.

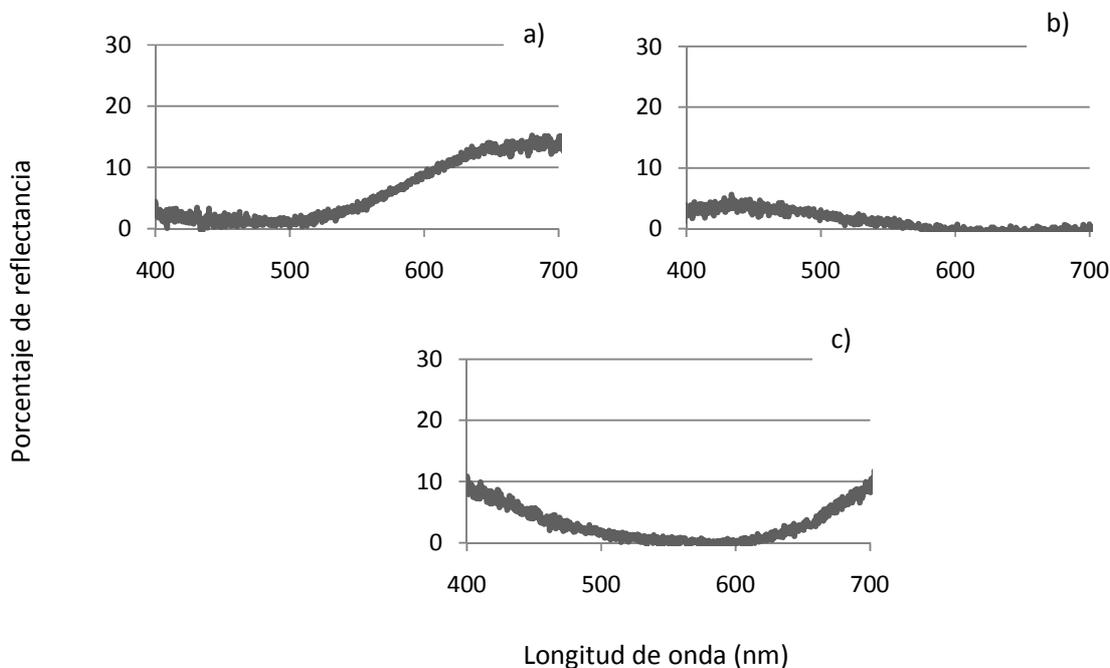
Gen	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Fuente
BRM	15F	AGCACCTTTGAACAGTGGTT	Borge y otros, 2005
			Nguembock y otros, 2008
BRM	15R	TACCTTATGGAGACGACGGA	Borge y otros, 2005
			Nguembock y otros, 2008

## 7.8 Análisis de Datos

**7.8.1 Análisis de Datos Morfológicos.** Este análisis de los datos fue realizado en la Universidad de San Carlos de Guatemala, ya que allí se contaba con las herramientas necesarias para llevarlo a cabo. Se realizaron las descripciones de los tres grupos de individuos utilizando las variables morfológicas mencionadas en la Sección 7.7.2.1 y el contenido estomacal encontrado en cada uno de ellos. Estos datos fueron cotejados descriptivamente con los grupos que se formaron a partir de los datos de coloración de la cola.

Se analizó el peso (g) de todos los especímenes colectados. Se calculó el peso medio para cada uno de los grupos morfológicos (tomando en cuenta especie y sexo) y la desviación estándar de este peso. Se evaluó si el peso varía significativamente intraespecíficamente, dependiendo del sexo; para esto se realizaron pruebas de Mann-Whitney para cada una de las especies. Al encontrar que no existen diferencias significativas en el peso entre machos y hembras de cada uno de los grupos morfológicos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.) se evaluó si el peso varía interespecíficamente por medio de un Análisis de Varianza, luego de verificar con una prueba de Bartlett la igualdad de las desviaciones estándar (Estadístico de Bartlett = 2.397 y  $p = 0.3017$ ) y con pruebas de Kolmogorov-Smirnov la normalidad de los datos ( $p > 0.10$ ). Además se realizaron diagramas de caja para observar gráficamente la superposición de los datos del peso (Daniel, 2002, 295, 678, 684).

Ya que se contaba con tres mediciones de cada uno de los nueve puntos evaluados en cada individuo (**Figura 11**), estas tres mediciones se promediaron para contar con una única curva del porcentaje de reflectancia vs. longitud de onda. Se graficó cada una de estas curvas promedio, lo que dio un total de nueve gráficas por cada individuo. A partir del promedio de los valores del espectro de reflectancia de cada uno de los nueve puntos de las plumas de la cola, se estimaron dos mediciones del color basadas en un análisis de clasificación de segmentos (Endler, 1990, 337-344; Parra, 2010, 327-328): color, el cual se refiere a la longitud de onda de máxima pendiente, dicho en otras palabras, la longitud de onda dominante reflejada por un objeto de color; e intensidad del color, la cual representa la saturación del color o cuanta reflectancia está concentrada bajo un segmento específico del espectro, conocida también como pureza del color (Parra, 2010, 328. **Figura 12**).



**Figura 12.** Representación gráfica de los conceptos color e intensidad del color. Las diferencias en color pueden observarse en a) y b), ya que evidentemente presentan la longitud de onda dominante o de pendiente máxima en distintos rangos del espectro visible, a) entre 600 – 700 nm, color rojo y b) 400 – 500 nm, color azul. Así también, a) y b) presentan alta intensidad o pureza del color al tener la curva en un solo lado del espectro, mientras que c) presenta baja intensidad del color, ya que al tener dos curvas, una a cada lado del espectro, la pureza de cada color es reducida.

Posteriormente, todos los valores del porcentaje de reflectancia vrs. longitud de onda de cada uno de los nueve puntos analizados en cada individuo fueron ingresados en el software R y utilizando el script desarrollado por Parra (2010) se obtuvo un único valor de “color” y un único valor de “intensidad del color” para cada punto de las plumas de la cola. Finalmente, se obtuvo nueve valores de color y nueve valores de intensidad del color por cada individuo.

Se obtuvo la distancia euclidiana de los valores de las mediciones del color y la intensidad del color, según propuesto por Endler (1990, 344) y Parra (2010, 328).

$$D = \sqrt{(H^2) + (C^2)}$$

Donde:  $D$  = Distancia Euclidiana

$H$  = Color

$C$  = Intensidad del color

Con el único valor obtenido para cada uno de los nueve puntos de cada individuo (resultante euclidiana) se realizaron diagramas de caja para poder observar gráficamente los datos de los nueve sitios de la cola analizados (**Figura 11**) en los tres grupos morfológicos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.).

Cada una de las variables (diferentes puntos medidos con el espectrofotómetro de fibra óptica. **Figura 11**) fue examinada con un análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis), para conocer si existía diferencia significativa en dicha variable entre los diferentes grupos morfológicos analizados (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.). La hipótesis nula en cada uno de los análisis de varianza no paramétricos (ya que se realizó un análisis por cada variable) era que no existe diferencia significativa entre los tres grupos morfológicos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.) en la variable analizada. Previo a esto se confirmó que los datos (resultante euclidiana de cada individuo de cada una de las variables) no presentaban normalidad con una prueba de Kolmogorov-Smirnov y tampoco presentaban homocedasticidad de las desviaciones estándar, lo cual se verificó con una prueba de Bartlett (Daniel, 2002, 684; Gotelli y Ellison, 2004, 433; López, 2009). Cuando las diferencias entre los tres grupos morfológicos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y

*Amazilia* sp.) eran significativas se realizaron comparaciones múltiples de Dunn para conocer qué pares de grupos morfológicos eran diferentes. Estas pruebas se elaboraron con el software GraphPad InStat (San Diego, CA).

**7.8.2 Análisis de Datos Moleculares.** Estos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio de Biología Molecular del Museum of Vertebrate Zoology, Universidad de California, Berkeley y en la Universidad de San Carlos de Guatemala, puesto que allí cuentan con el software necesario para el procesamiento de datos moleculares. Se analizó el gen mitocondrial ND2 y los genes nucleares que fueron secuenciados eficientemente (secuencias limpias, es decir, con alto porcentaje de nucleótidos leídos correctamente por la máquina secuenciadora): BFIB5, TGFB2, AK1 y ODC. Las secuencias complementarias (ya que se contaba con dos secuencias por cada gen de cada individuo, debido a los dos cebadores: hacia delante – *forward* – y hacia atrás – *reverse* –) fueron combinadas utilizando el Software Sequencher 4.8 (Genecodes, Ann Arbor, MI). Posteriormente, las secuencias múltiples (las secuencias de un gen de todos los individuos) fueron alineadas a mano en PAUP v.4.0b10 (Swofford, 2003) agregando el grupo externo. Se seleccionaron preferentemente otras especies de colibríes como grupo externo. En el caso de no contar con secuencias de colibríes como grupo externo, se utilizaron secuencias de chotacabras (Orden Caprimulgiformes), ya que según Hackett y otros (2008, 1765-1766) es un grupo de especies emparentadas a los colibríes. Las secuencias utilizadas como grupo externo fueron obtenidas en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. McGuire y otros, 2007, 838. **Tabla 3**).

Los genes que codifican proteínas fueron particionados por codones (partición de datos). Se identificó que el modelo de evolución más adecuado para cada partición de los datos, según el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike, 1973, 267-281) era el modelo “GTR”; esto se desarrolló con el software MrModelTest v.2.3 (Nylander, 2004; Posadas y Crandall, 2001, 817-818). Se hizo un análisis de máxima verosimilitud utilizando el software RAxML 2.1.2 (Stamatakis, 2006, 2688-2690). Los árboles obtenidos a partir del análisis de máxima verosimilitud indican las relaciones entre los individuos de las diferentes especies, lo que permite evaluar la separación de las dos especies involucradas (*A. beryllina* y *A. cyanura*) y las relaciones entre los posible híbridos con cada una de ellas.

**Tabla 3.** Secuencias utilizadas como grupo externo para los diferentes genes secuenciados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.

Gen	Código de acceso en GenBank	Especie
ND2	EU042522	<i>Amazilia rutila</i>
	EU042523	<i>Amazilia saucerrottei</i>
	EU042524	<i>Amazilia tzacatl</i>
	EU042525	<i>Amazilia versicolor</i>
	EU042526	<i>Amazilia viridigaster</i>
BFIB5	EU739283	<i>Nyctibius grandis</i>
TGFB2	EU737356	<i>Colibri coruscans</i>
	EU737426	<i>Phaethornis griseogularis</i>
AK1	EU042440	<i>Amazilia rutila</i>
	EU042441	<i>Amazilia saucerrottei</i>
	EU042442	<i>Amazilia tzacatl</i>
	EU042443	<i>Amazilia versicolor</i>
	EU042444	<i>Amazilia viridigaster</i>
ODC	GU166949	<i>Amazilia saucerrottei</i>
	GU166950	<i>Amazilia tzacatl</i>
	GU166951	<i>Amazilia versicolor</i>
	GU166953	<i>Amazilia viridigaster</i>

Además, para el gen mitocondrial ND2, se obtuvieron los diferentes haplotipos utilizando el software DnaSP v.5.10. Posteriormente se realizó una gráfica de red de haplotipos en el software TCS v.1.21. Para este gen también se calculó la diversidad nucleotídica.

## 8. Resultados

### 8.1 Colectas

Se colectaron 32 individuos en total (**Tabla 1**), pertenecientes a los tres grupos morfológicos identificados *a priori* como: *A. beryllina* (11 individuos), *A. cyanura* (9 individuos) y *Amazilia* sp. (12 individuos). Posteriormente se describió por separado a las hembras y los machos de cada uno de estos grupos, para tomar en cuenta la variación debida al sexo en la descripción morfológica.

Es muy importante notar las proporciones de sexos que se encontraron en los tres diferentes grupos morfológicos. En todos los casos, se colectó mayor cantidad de hembras que de machos (**Tabla 1**). En el grupo *A. beryllina*, se colectaron nueve hembras y únicamente dos machos; cinco de dichas hembras fueron colectadas en Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango donde no se capturó ningún macho. Tres hembras se colectaron en Patulul, Suchitepéquez y una en San Pedro Yepocapa, Chimaltenango; se colectó un macho en cada uno de estos dos sitios. Tanto en el grupo de *A. cyanura* como *Amazilia* sp., se colectó el doble de hembras en relación a los machos; en todos los sitios en que se encontraron estas especies se capturaron individuos de ambos sexos.

### 8.2 Diversidad Morfológica

**8.2.1 Peso.** El grupo de las hembras de *A. cyanura* presentó el peso más bajo, que en promedio tuvo un peso de  $3.63 \pm 0.25$  g y el grupo de los machos de *A. beryllina* pesó más que el resto de los grupos,  $4.55 \pm 0.35$  g (peso promedio del grupo). Esto se ve reflejado en el peso mínimo y máximo de cada uno de los grupos; una hembra *A. cyanura* presentó el peso mínimo menor, 3.50 g y un macho *A. beryllina* tuvo el peso máximo mayor, 4.80 g (**Tabla 4**).

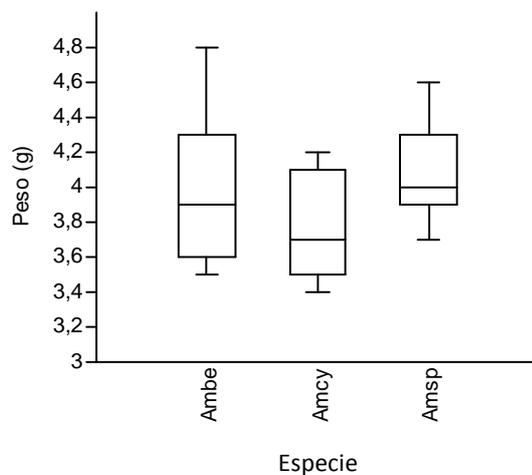
Al analizar con la prueba de Mann-Whitney sí existe variación intraespecífica en el peso, en ninguno de los grupos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.) se encontró diferencia significativa entre machos y hembras ( $p > 0.07$ ). Debido a esto, se analizaron en conjunto los datos de

hembras y machos de cada grupo al momento de buscar variación interespecífica por medio de un análisis de varianza.

**Tabla 4.** Número de especímenes colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* para cada uno de los grupos morfológicos identificados, sexo y peso.

Especie	Número de Individuos	Peso (g)			
		Mínimo	Máximo	Media	Desviación Estándar
<b><i>Amazilia beryllina</i></b>	<b>11</b>	<b>3.50</b>	<b>4.80</b>	<b>3.99</b>	<b>0.44</b>
Hembras	9	3.50	4.50	3.87	0.36
Machos	2	4.30	4.80	4.55	0.35
<b><i>Amazilia cyanura</i></b>	<b>9</b>	<b>3.40</b>	<b>4.20</b>	<b>3.77</b>	<b>0.29</b>
Hembras	6	3.40	4.10	3.63	0.25
Machos	3	3.90	4.20	4.03	0.15
<b><i>Amazilia sp.</i></b>	<b>12</b>	<b>3.70</b>	<b>4.60</b>	<b>4.09</b>	<b>0.28</b>
Hembras	8	3.70	4.60	4.01	0.29
Machos	4	4.00	4.50	4.25	0.21

Al realizar el análisis de varianza no se encontró diferencia significativa ( $p = 0.1187$ ) en el peso de las diferentes especies (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia sp.*). Este mismo resultado puede observarse en los diagramas de caja (**Figura 13**), en donde es evidente la superposición de los valores del peso de los individuos de las diferentes especies.



**Figura 13.** Diagramas de caja de los valores del peso de los individuos colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. (Ambe = *Amazilia beryllina*, Amcy = *Amazilia cyanura*, Amsp = *Amazilia* sp.).

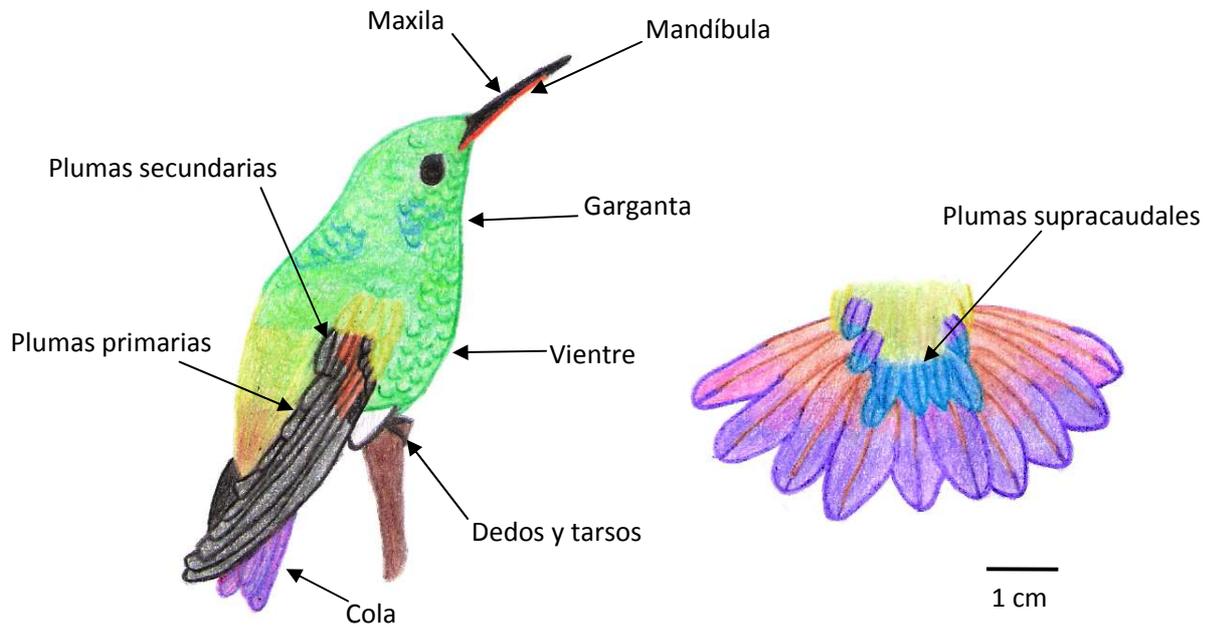
**8.2.2 Coloración y Plumaje.** La mayoría de las características morfológicas que fueron evaluadas, son iguales en todos los individuos de los tres grupos examinados (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.). Las características compartidas entre todos los individuos son las siguientes:

- Color de los dedos y tarsos: negros.
- Color de la maxila: negra.
- Color de la mandíbula: base anaranjada, punta negra.
- Color del iris: café.
- Color de la garganta: todas las hembras presentan un color verde moteado, mientras que todos los machos tienen la garganta de color verde intenso, sin importar el grupo al que pertenecen.
- Color del vientre: todas las hembras presentan un color verde moteado, mientras que todos los machos tienen el vientre de color verde intenso, sin importar el grupo al que pertenecen.
- Color rojizo en la base de las plumas primarias: presente en todos los individuos, excepto RAJ111, el cual fue categorizado como *Amazilia* sp.
- Color rojizo en la base de las plumas secundarias: presente en todos los individuos, excepto RAJ111, el cual fue categorizado como *Amazilia* sp. (**Figura 14**).

A pesar de que el color rojizo en las plumas estuvo presente en casi todos los individuos, en los 11 *A. beryllina* colectados se observó variación en la coloración rojiza de las alas. Esta coloración estuvo presente en las plumas primarias y secundarias de los 11 especímenes. Los cinco especímenes hembras colectados en Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango, presentaron parches conspicuos de coloración rojiza en las alas; tienen la base de las plumas primarias internas y  $\geq 50\%$  del área expuesta de las plumas secundarias de dicho color. Cinco especímenes colectados en las laderas del Pacífico (Patulul, Suchitepéquez y San Pedro Yepocapa, Chimaltenango) presentaron coloración rojiza en la base de las plumas primarias interiores y en  $< 50\%$  del área expuesta de las plumas secundarias. Únicamente un espécimen colectado en San Pedro Yepocapa no presentó un parche conspicuo de coloración rojiza en las alas, únicamente mostró este color en la porción extremadamente basal de las plumas primarias interiores y en  $< 50\%$  del área expuesta de las plumas secundarias.

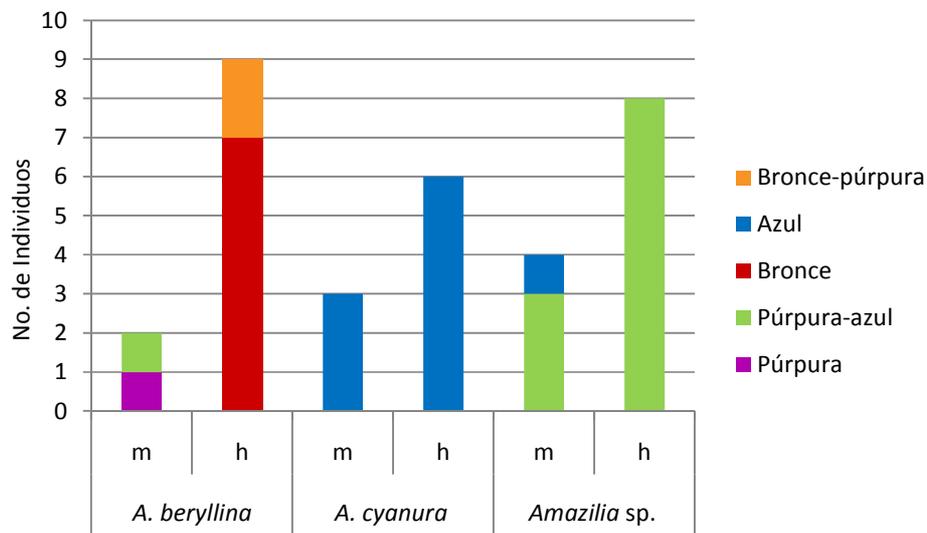
Los especímenes colectados de la especie *A. cyanura* en Patulul, Suchitepéquez y en El Palmar, Quetzaltenango, presentaron diferencia en la extensión del parche de color rojizo en las alas relacionada con el sexo. Los machos presentaron un parche relativamente conspicuo con la base de las primarias interiores y  $\leq 50\%$  del área expuesta de las plumas secundarias de color rojizo. Las hembras no presentaron un parche conspicuo en las alas, tenían color rojizo únicamente en la porción extremadamente basal de las plumas primarias interiores y un parche de dicho color muy reducido en las plumas secundarias exteriores ( $< 50\%$  del área expuesta).

Dentro de los colibríes colectados que conforman el grupo *Amazilia* sp. uno de los especímenes no presentó coloración rojiza en las alas (RAJ111, tal como se menciona anteriormente). Además, tres hembras colectadas en Patulul presentaron un parche rojizo en las alas poco conspicuo, con esta coloración únicamente en la porción casi extremadamente basal de las plumas primarias y en  $< 50\%$  del área expuesta de las plumas secundarias. Cuatro hembras (colectadas en Patulul) y cuatro machos (dos colectados en Patulul y dos en San Pedro Yepocapa) presentaron un parche rojizo en las alas relativamente conspicuo, con este color en la base de las plumas primarias y  $< 50\%$  del área expuesta de las plumas secundarias.



**Figura 14.** Esquema de un macho con plumaje de un posible híbrido *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. Dibujo: Rosa Alicia Jiménez.

El color de las plumas supracaudales es muy variable entre grupos (**Figura 15**). Los machos de la especie *A. beryllina* tienen dichas plumas de color púrpura o púrpura-azul, mientras que las hembras las tienen de color bronce o bronce-púrpura. Todos los individuos de la especie *A. cyanura* presentan las plumas supracaudales de color azul, hembras y machos por igual. Once (ocho hembras y tres machos) de los 12 especímenes del grupo *Amazilia* sp. presentan las plumas supracaudales de color púrpura-azul, únicamente un macho las tiene de color azul.



**Figura 15.** Coloración de las plumas supracaudales de los 32 individuos colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* durante los años 2009 - 2010 (m = machos, h = hembras).

**8.2.3 Muda del Plumaje.** Tres aspectos de la muda del plumaje fueron tomados en cuenta: corporal, alar y de la cola. Durante los meses en que se tomaron las muestras, siempre se encontraron individuos mudando alguna de estas tres partes del cuerpo.

En lo que se refiere a la muda corporal, en los meses de junio 2009 y marzo 2010, fue cuando más individuos se encontraron mudando, seis individuos en cada mes (**Tabla 5**). Una hembra del grupo *A. beryllina* se encontró mudando en el mes de abril 2010. Los dos machos colectados de *A. beryllina* se encontraban mudando (junio 2009, abril 2010).

En el grupo *A. cyanura* se observó que ocho (seis hembras y dos machos) de los nueve individuos colectados de esta especie presentaban muda corporal durante los meses de junio 2009 y marzo 2010. Únicamente un macho colectado en junio 2009 no se encontraba mudando al momento de su captura (**Tabla 5**).

Todos los individuos colectados del grupo *Amazilia* sp. se encontraban mudando su plumaje corporal durante su captura (ocho hembras y cuatro machos). Estos individuos fueron colectados en los meses de mayo, junio, julio 2009 y abril 2010 (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** Muda del plumaje corporal de los individuos colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* y su temporalidad.

		<i>A. beryllina</i>		<i>A. cyanura</i>		<i>Amazilia</i> sp.	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<b>may-09</b>	Sin muda		2				
	Con muda						5
<b>jun-09</b>	Sin muda			1			
	Con muda	1			2	2	1
<b>jul-09</b>	Sin muda		1				
	Con muda						2
<b>mar-10</b>	Sin muda		5				
	Con muda			2	4		
<b>abr-10</b>	Sin muda						
	Con muda	1	1			2	

En lo que se refiere a la muda de las plumas de las alas, la mayoría de individuos se encontraban mudando durante los meses de mayo y junio 2009, nueve individuos en total (**Tabla 6**). Del grupo *A. beryllina* las dos hembras que estaban mudando fueron capturadas en mayo 2009 y marzo 2010. Un macho se encontraba mudando en junio 2009.

Las hembras del grupo *A. cyanura* fueron capturadas mudando su plumaje alar durante los meses de junio 2009 y marzo 2010 (tres hembras). Un macho de este grupo se encontró mudando las plumas de las alas en marzo 2010. La mitad de los individuos del grupo *Amazilia* sp. capturados se encontraban mudando su plumaje alar, cuatro hembras (mayo y junio 2009) y dos machos (abril 2010. **Tabla 6**).

**Tabla 6.** Muda del plumaje alar de los individuos colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* y su temporalidad.

		<i>A. beryllina</i>		<i>A. cyanura</i>		<i>Amazilia</i> sp.	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<b>may-09</b>	Sin muda		2				1
	Con muda		3				1
<b>jun-09</b>	Sin muda	2		1			
	Con muda		1		2	1	
<b>jul-09</b>	Sin muda		2				1
	Con muda						
<b>mar-10</b>	Sin muda			1	3		4
	Con muda			1	1		1
<b>abr-10</b>	Sin muda					1	1
	Con muda	2					

Del total de 13 individuos que se encontraban mudando su plumaje alar, 11 de ellos estaban mudando las plumas primarias. Nueve individuos mudaban estas plumas de manera simétrica (muda de las plumas del ala derecha y ala izquierda en sincronía) y dos de ellos de forma asimétrica (muda de las plumas del ala derecha y ala izquierda en diferentes momentos. **Tabla 7**).

**Tabla 7.** Tipo de muda alar presentada en diferente individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* colectados en Suchitepéquez, Quetzaltenango y Chimaltenango en los años 2009 – 2010.

Especie	Muda alar simétrica	Muda alar asimétrica
<i>A. beryllina</i>	RAJ116, RAJ134	
<i>A. cyanura</i>	RAJ129, RAJ132, RAJ159, RAJ160	
<i>Amazilia</i> sp.	RAJ124, RAJ127, RAJ165	RAJ113, RAJ162

La mayoría de especímenes colectados (27) no se encontraban mudando las plumas de la cola, únicamente cinco individuos estaban mudando las plumas de la cola en los meses de mayo 2009, julio 2009 y abril 2010 (Tabla 8).

**Tabla 8.** Muda del plumaje de la cola de los individuos colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* y su temporalidad.

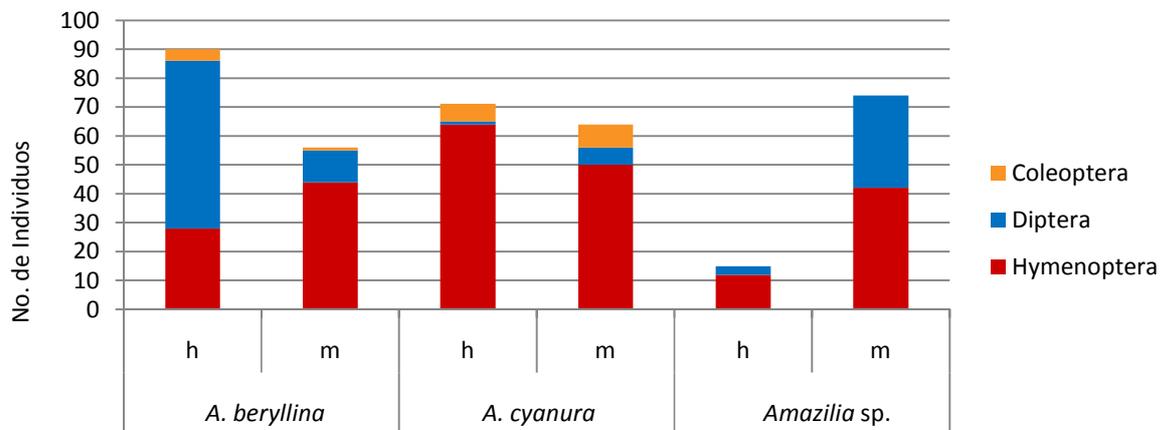
		<i>A. beryllina</i>		<i>A. cyanura</i>		<i>Amazilia</i> sp.	
		Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<b>may-09</b>	Sin muda		4				1
	Con muda		1				1
<b>jun-09</b>	Sin muda	2	1	1	2	1	
	Con muda						
<b>jul-09</b>	Sin muda		2				
	Con muda						1
<b>mar-10</b>	Sin muda			2	4		5
	Con muda						
<b>abr-10</b>	Sin muda					1	1
	Con muda	2					

8.2.4 *Contenido del Tracto Digestivo*. Todos los tractos digestivos examinados contenían artrópodos. La mayoría de los individuos examinados (16 de un total de 25) tenían el estómago completamente lleno (**Tabla 9**).

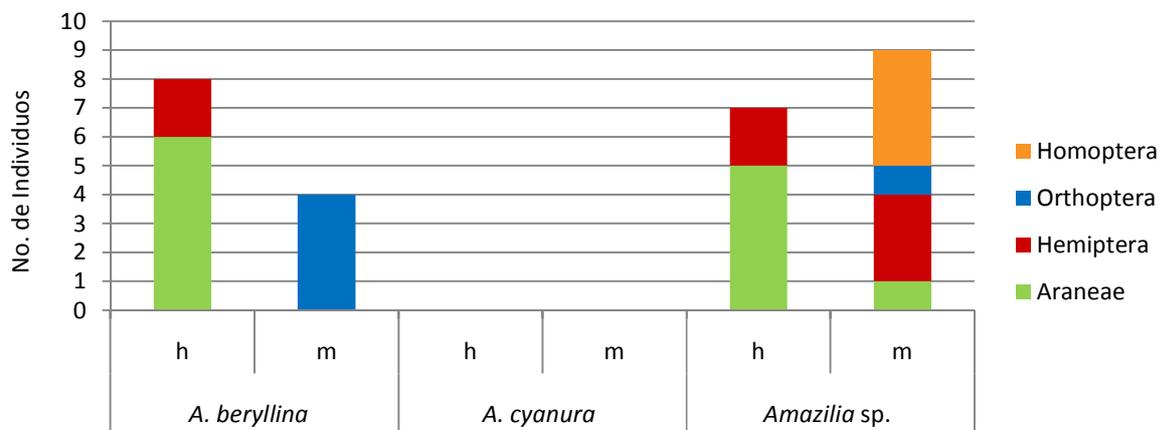
**Tabla 9.** Porcentaje del contenido estomacal encontrado en especímenes del complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* (h = hembras, m = machos).

	<i>A. beryllina</i>		<i>A. cyanura</i>		<i>Amazilia sp.</i>	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras	Machos	Hembras
<b>10%</b>					1	
<b>25%</b>			1	1		
<b>50%</b>		1		2	1	2
<b>100%</b>	2	6	2	3	2	1

Los individuos de los grupos *A. beryllina* y *Amazilia sp.* presentaron gran cantidad de insectos de los órdenes Hymenoptera y Diptera, mientras que los colibríes del grupo *A. cyanura* solamente presentaron gran cantidad de insectos del orden Hymenoptera. Otros órdenes de artrópodos encontrados fueron: Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera, Homoptera y Araneae. La mayor cantidad de artrópodos encontrados en los tractos digestivos únicamente fueron determinados hasta Orden, aunque algunos pudieron identificarse en el nivel taxonómico de Familia (**Figuras 16, 17, 18 y Tabla 10**).



**Figura 16.** Contenido del tracto digestivo del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. Artrópodos de los órdenes Coleoptera, Diptera, Hymenoptera. (h = hembras, m = machos).



**Figura 17.** Contenido del tracto digestivo del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. Artrópodos de los órdenes Homoptera, Orthoptera, Hemiptera, Araneae. (h = hembras, m = machos).



**Figura 18.** Artrópodos encontrados en el tracto digestivo de individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. a) Contenido estomacal (restos de artrópodos); b) Contenido del esófago; c) y d) Orden Araneae; e) Familia Torymidae, Orden Hymenoptera; f) Familia Eulophidae, Orden Hymenoptera; g) Orden Orthoptera; h) Orden Hemiptera; i) Familia Pipunculidae, Orden Diptera; j) Orden Homoptera. Fotografías: Rosa Alicia Jiménez.

**Tabla 10.** Listado taxonómico de los artrópodos encontrados en el tracto digestivo de individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.

<i>A. beryllina</i>	<i>A. cyanura</i>	<i>Amazilia sp.</i>
Orden Hymenoptera	Orden Hymenoptera	Orden Hymenoptera
Familia Ceraphronidae	Familia Ceraphronidae	Familia Ceraphronidae
Familia Torymidae	Familia Torymidae	Familia Myrmaridae
Familia Aphelinidae	Familia Aphelinidae	Familia Aphelinidae
Superfamilia Chalcidoidea	Superfamilia Vespoidea	Familia Sapygidae
		Familia Eulophidae
Orden Diptera	Orden Diptera	Orden Diptera
Familia Scatopsidae	Familia Scatopsidae	Familia Scatopsidae
Familia Phoridae		Familia Phoridae
Familia Tipulidae		Familia Pipunculidae
Familia Blephariceridae		Familia Pyrgotidae
		Familia Ceratopogonidae
Orden Coleoptera	Orden Coleoptera	Orden Homoptera
Familia Curculionidae		
Orden Orthoptera		Orden Orthoptera
Orden Hemiptera		Orden Hemiptera
Orden Araneae		Orden Araneae

**8.2.5 Análisis de la Coloración de la Cola.** Se tomaron las medidas de reflectancia de las plumas de la cola de 30 especímenes colectados (11 *A. beryllina*, 9 *A. cyanura*, 10 *Amazilia* sp.). Dos especímenes no fueron tomados en cuenta (RAJ124 y RAJ162) en esta sección debido a que no contaban con las plumas necesarias para el análisis, se encontraban mudándose; no obstante, ambos individuos fueron catalogados como posibles híbridos *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. Esta catalogación fue basada en la coloración observada en las plumas de la cola de los individuos.

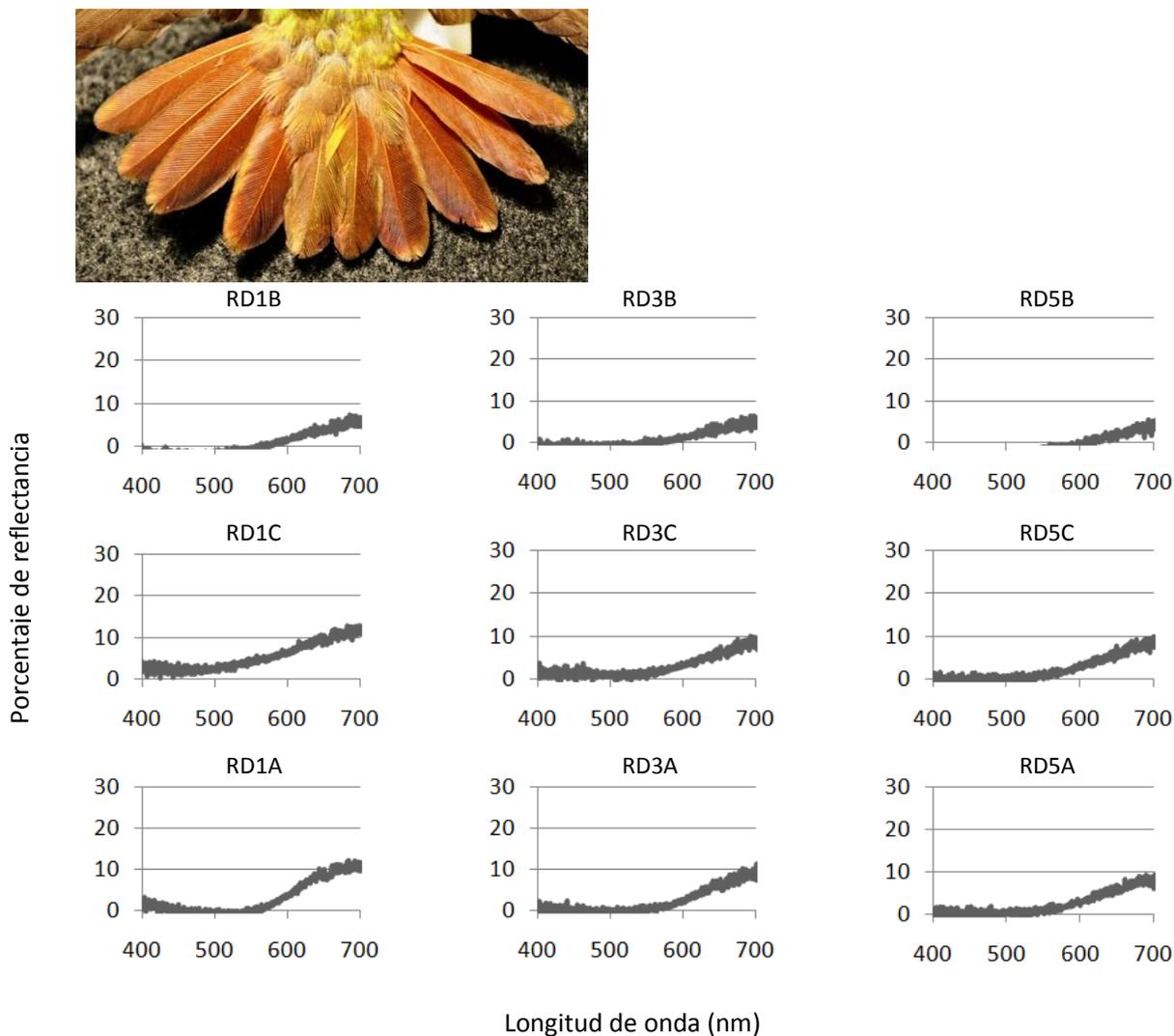
Utilizando el espectrofotómetro de fibra óptica se obtuvieron los valores del porcentaje de reflectancia para el rango del espectro visible por el ojo humano. El promedio de las tres mediciones en cada punto de las diferentes plumas fue graficado (Longitud de onda vrs. Porcentaje de reflectancia. **Figuras 19, 20 y 21. Anexo 3**), obteniendo de esta manera nueve gráficas por individuo, cada gráfica con la curva de reflectancia de una de las variables analizadas (RD1B, RD1C, RD1A, RD3B, RD3C, RD3A, RD5B, RD5C y RD5A. **Figura 11**). Al observar estas curvas de reflectancia se hace evidente la diferencia entre los tres grupos estudiados: *A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.

El grupo *A. beryllina* presenta un patrón de coloración bronce-rojiza con toques violáceos metálicos. Este patrón de coloración, además de observarse directamente en los especímenes, también puede observarse claramente y de una forma más objetiva en las curvas de reflectancia. La mayoría de los 11 individuos capturados de este grupo presentaron los valores de la longitud de onda dominante alrededor de los 600 – 700 nm (tonalidades anaranjada, roja) en las tres plumas analizadas y las tres posiciones en cada pluma (**Figura 11**). Algunos individuos (RAJ116, RAJ134, RAJ137, RAJ163, RAJ164) presentaron valores de la longitud de onda dominante en dos segmentos del espectro visible, observados como dos picos diferentes en la gráfica, uno alrededor de los 400 – 500 nm (tonalidad azul, violeta) y el otro en los 600 – 700 nm, principalmente en las tres posiciones de la rectriz derecha 1 (RD1B, RD1C y RD1A. **Figura 19 y Anexo 3**).

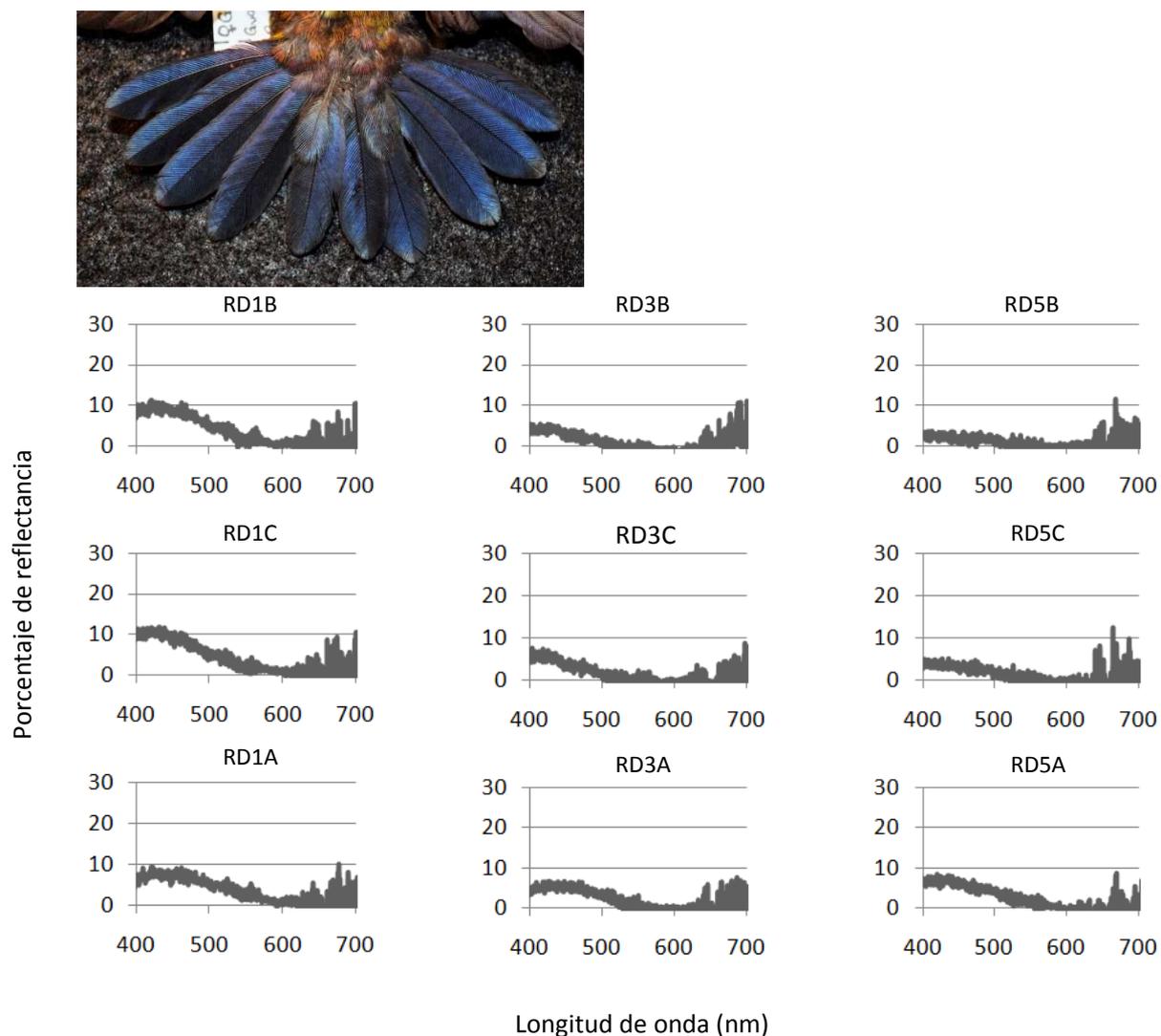
Los individuos del grupo de estudio de *A. cyanura*, conformado por nueve especímenes, tienen la cola de color azul profundo; por esto mismo presentan los valores de la longitud de onda dominante alrededor de los 400 – 500 nm. Solamente un individuo (RAJ156) presentó valores dominantes en dos segmentos del espectro visible, observados en la gráfica como dos picos

diferentes, uno alrededor de los 400 – 500 nm y el otro en los 600 – 700 nm en el centro de las rectrices derechas 1 y 3 (RD1C y RD3C. **Figura 20 y Anexo 3**).

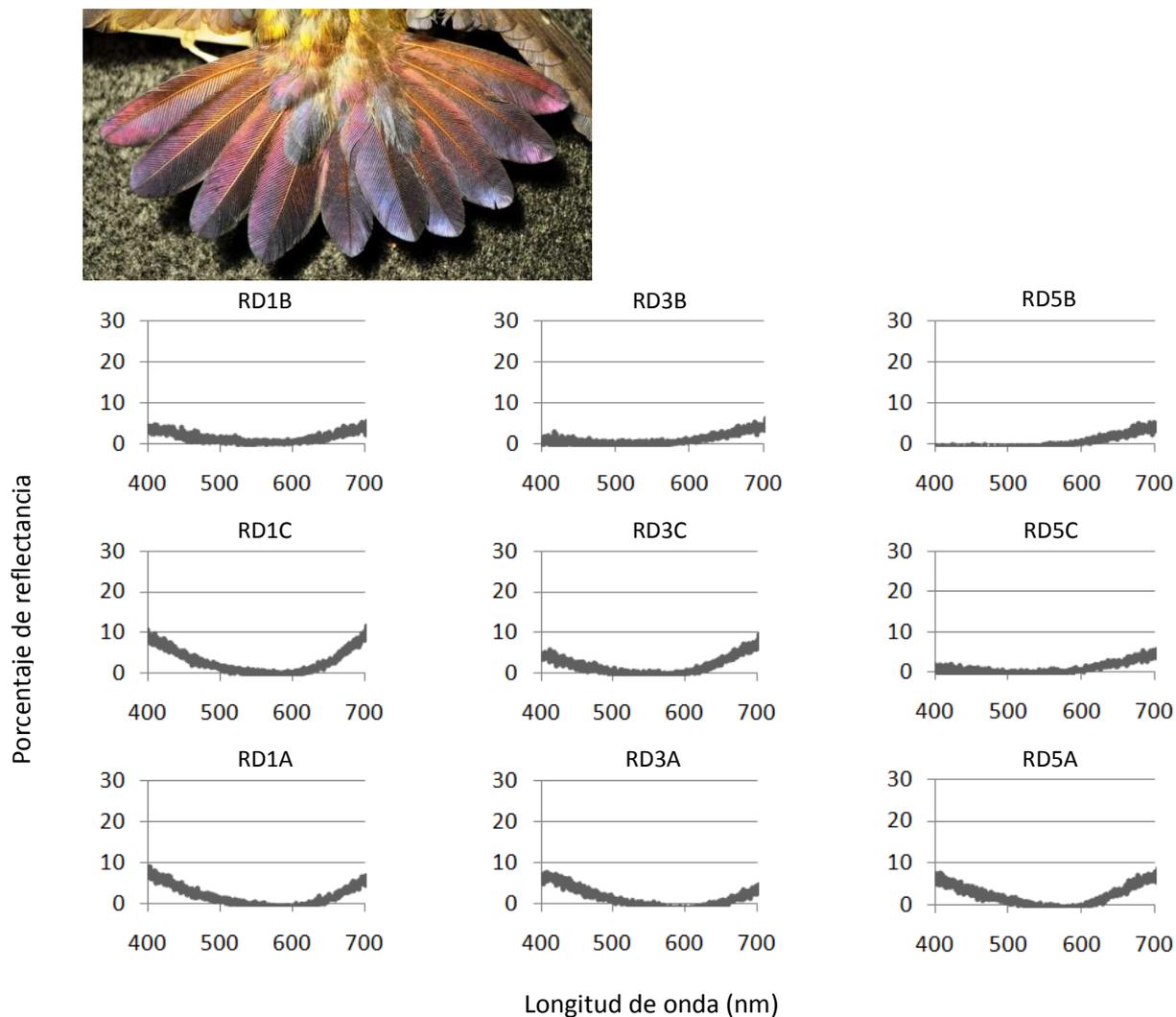
Los colibríes colectados del grupo *Amazilia* sp. son los que presentaron mayor variación intragrupo en la coloración de las plumas de la cola con respecto a *A. beryllina* y *A. cyanura*, ésta puede ser bronce-rojiza con violeta, bronce-rojiza únicamente en la base y la mayor parte de la pluma de color violeta-púrpura-azul o púrpura-azul, principalmente las rectrices interiores (1 y 2) son de color violeta-púrpura más oscuro. Esto se ve reflejado en las curvas de reflectancia, ya que al igual que *A. beryllina*, presentaron gráficas con valores de longitud de onda dominante alrededor de los 600 – 700 nm, principalmente en la base y el centro de las rectrices derechas 3 y 5 (RD3B, RD3C, RD5B y RD5C). De forma similar que *A. cyanura*, presentaron gráficas con valores de longitud de onda dominante alrededor de los 400 – 500 nm, primordialmente en el ápice de las rectrices derechas 1 y 3 (RD1A y RD3A). Además presentaron gráficas con valores dominantes en dos segmentos del espectro visible, observados en la gráfica como dos picos diferentes, uno alrededor de los 400 – 500 nm y el otro en los 600 – 700 nm, este tipo de coloración se presentó en todas las posiciones de la pluma y en todas las plumas estudiadas, aunque en mayores proporciones en las tres posiciones de la rectriz derecha 1 (RD1B, RD1C y RD1A), el centro y ápice de la rectriz derecha 3 (RD3C y RD3A) y el ápice de la rectriz derecha 5 (RD5A. **Figuras 21, 22 y Anexo 3**).



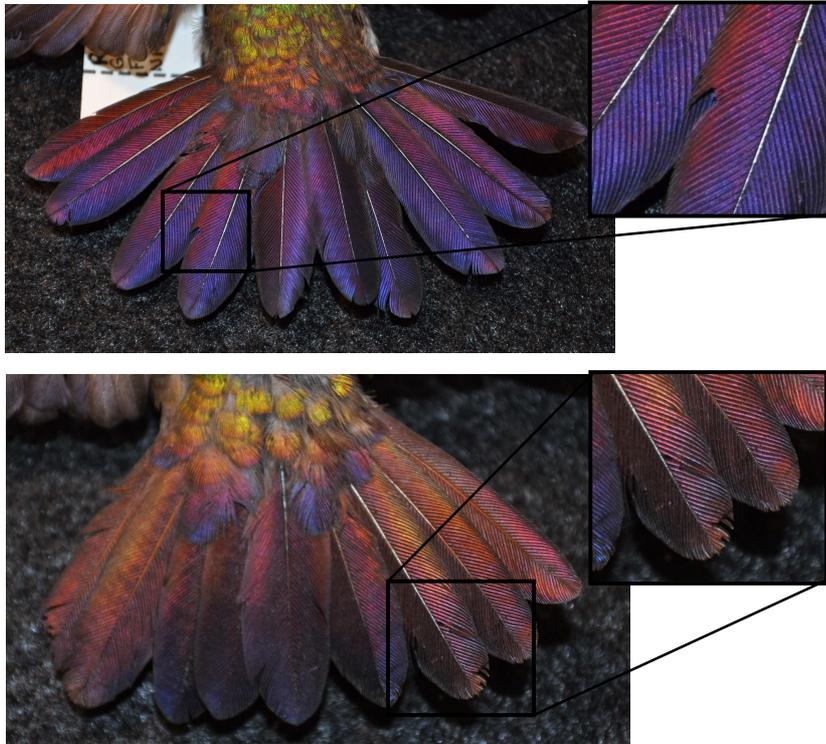
**Figura 19.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ152). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



**Figura 20.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ160). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.

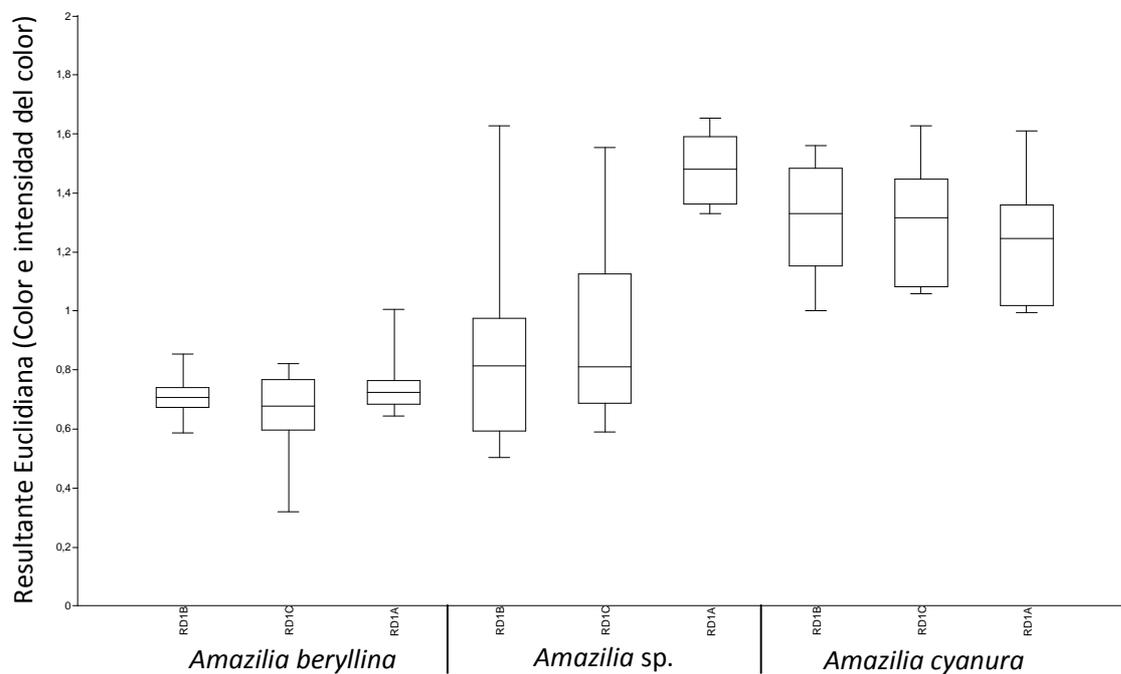


**Figura 21.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ128). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



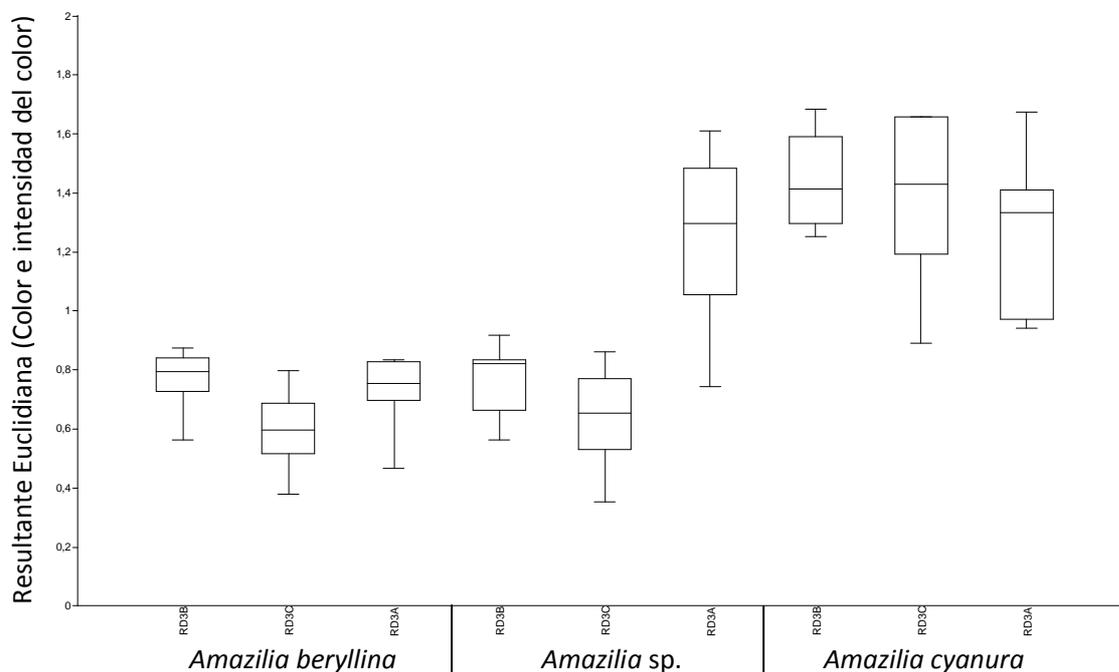
**Figura 22.** Coloración de las plumas de la cola de dos individuos *Amazilia* sp. (Arriba: RAJ113, abajo: RAJ127). Ampliado: desgaste de las plumas. Fotografías: Rosa Alicia Jiménez.

Al comparar los rangos de los valores obtenidos de la resultante euclidiana (a partir del color y la intensidad del color), por pluma y sitio en cada pluma (**Figuras 23, 24 y 25**) se observa en qué sitios se diferencian los tres grupos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.). En la pluma rectriz derecha 1 (**Figura 23**) *A. beryllina* se diferencia de *A. cyanura* en la base y el centro de esa pluma, en el ápice los valores se traslapan ligeramente. En lo que respecta a la base y el centro de la rectriz derecha 1, *Amazilia* sp. se traslapa con *A. beryllina* y *A. cyanura*, mientras que en el ápice se traslapa únicamente con *A. cyanura*.



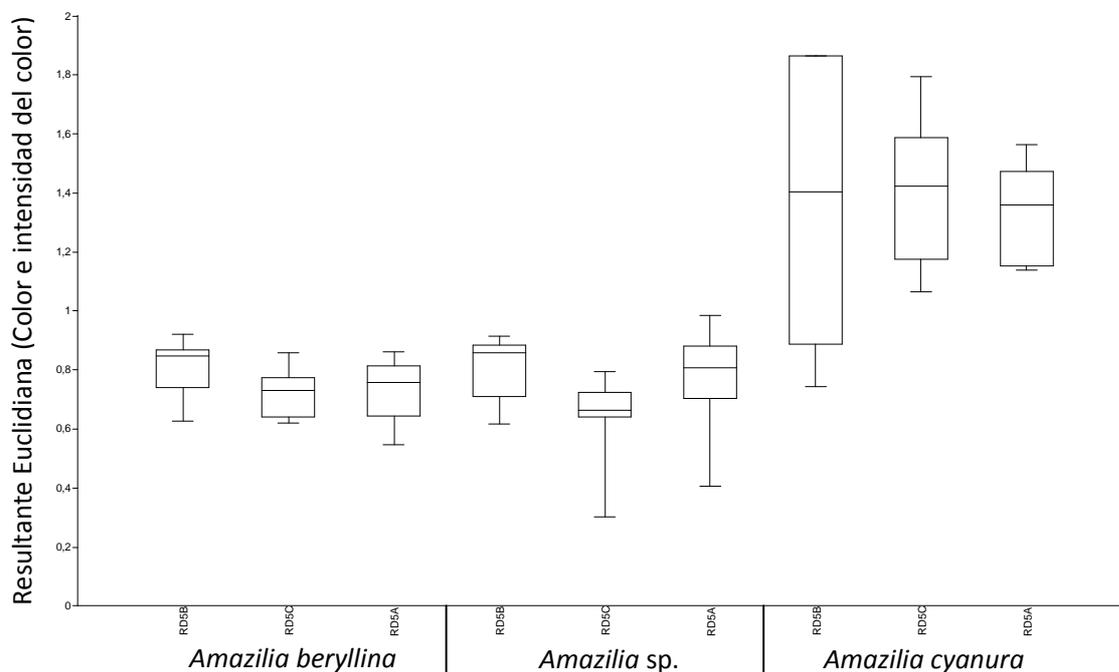
**Figura 23.** Diagramas de caja de la resultante euclidiana obtenida a partir de los valores de color e intensidad del color de la pluma rectriz derecha 1 en el complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice).

En la pluma rectriz derecha 3 (**Figura 24**) *Amazilia beryllina* y *A. cyanura* poseen valores diferentes en los tres puntos: base, centro y ápice. *Amazilia sp.* se traslapa únicamente con *A. beryllina* en la base y el centro de la pluma; el ápice se traslapa principalmente con *A. cyanura* y ligeramente con *A. beryllina*.



**Figura 24.** Diagramas de caja de la resultante euclidiana obtenida a partir de los valores de color e intensidad del color de la pluma rectriz derecha 3 en el complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. (RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice).

En la pluma rectriz derecha 5 (**Figura 25**) *A. beryllina* se diferencia de *A. cyanura* en el centro y el ápice de la pluma, mientras que los valores se traslapan en la base (podría haber algún error en la toma de los datos de la base de *A. cyanura*, ya que con las observaciones realizadas se puede notar que los tres puntos de la pluma evaluados aparentan ser del mismo color). En lo que respecta a *Amazilia sp.*, se traslapa con *A. beryllina* y *A. cyanura* en la base, mientras que en el centro y el ápice de la pluma únicamente se traslapa con *A. beryllina*.



**Figura 25.** Diagramas de caja de la resultante euclidiana obtenida a partir de los valores de color e intensidad del color de la pluma rectriz derecha 5 en el complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. (RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice).

Los análisis de varianza no paramétricos (Kruskal-Wallis) realizados para cada una de las nueve variables (utilizando los valores de las distancias euclidianas de los diferentes sitios de las plumas de la cola, **Figura 11**) indicaron que sí existe diferencia significativa entre los tres grupos analizados, *A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia sp.* (**Tabla 11**). Los análisis de comparaciones múltiples de Dunn (**Tabla 11**) mostraron que variables presentan diferencias significativas entre las especies:

- *A. beryllina* – *A. cyanura*: RD1B, RD1C, RD1A, RD3B, RD3C, RD3A, RD5B, RD5C y RD5A.
- *A. beryllina* – *Amazilia sp.*: RD1A y RD3A.
- *A. cyanura* – *Amazilia sp.*: RD1B, RD3B, RD3C, RD5B, RD5C y RD5A.

**Tabla 11.** Resultados del análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) y comparaciones múltiples de Dunn realizados para cada uno de los diferentes sectores de las plumas de la cola analizados en el complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. En azul se muestran las comparaciones que presentaron diferencias significativas entre los grupos.

Sitio (variable)	Kruskal-Wallis		Comparaciones Múltiples de Dunn
	KW	P	
RD1B	15.735	0.0004	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.001$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.05$
RD1C	16.224	0.0003	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.001$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
RD1A	23.279	0.0001	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.05$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.001$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
RD3B	18.312	0.0001	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.001$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.001$
RD3C	18.537	< 0.0001	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.001$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.01$
RD3A	17.979	0.0001	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.001$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.001$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
RD5B	12.396	0.0020	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.01$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.01$

**Tabla 11.** (Continuación...) Resultados del análisis de varianza no paramétrico (Kruskal-Wallis) y comparaciones múltiples de Dunn realizados para cada uno de los diferentes sectores de las plumas de la cola analizados en el complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. En azul se muestran las comparaciones que presentaron diferencias significativas entre los grupos.

Sitio (variable)	Kruskal-Wallis		Comparaciones Múltiples de Dunn
	KW	P	
RD5C	18.921	< 0.0001	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.01$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.001$
RD5A	18.921	< 0.0001	<i>A. beryllina</i> – <i>A. cyanura</i> : $p < 0.001$
			<i>A. beryllina</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p > 0.05$
			<i>A. cyanura</i> – <i>Amazilia</i> sp.: $p < 0.01$

### 8.3 Diversidad Genética

Se obtuvieron secuencias de ADN de cinco genes, uno mitocondrial (ND2) y cuatro nucleares (BFIB5, TGFB2, AK1 y ODC). En general, no se encontró variación entre las secuencias obtenidas para cada una de las dos especies (*A. beryllina* y *A. cyanura*) que representan las especies parentales de los posibles híbridos. Esto se hace evidente al observar los árboles obtenidos con el análisis de máxima verosimilitud (**Figuras 26, 27, 28, 29 y 30**); ya que puede notarse que los valores en los nodos son muy bajos (menores de 90), esto indica que la separación entre los individuos es muy débil. Además, en cuatro de los cinco genes (ND2, TGFB2, AK1 y ODC), se pudieron encontrar secuencias idénticas entre diferentes individuos, incluso entre *A. beryllina* y *A. cyanura*. El gen nuclear BFIB5 fue secuenciado con un total de 597 pares de bases y se logró secuenciar los 32 individuos colectados; este fue el único gen en el que no se encontraron pares de secuencias idénticas.

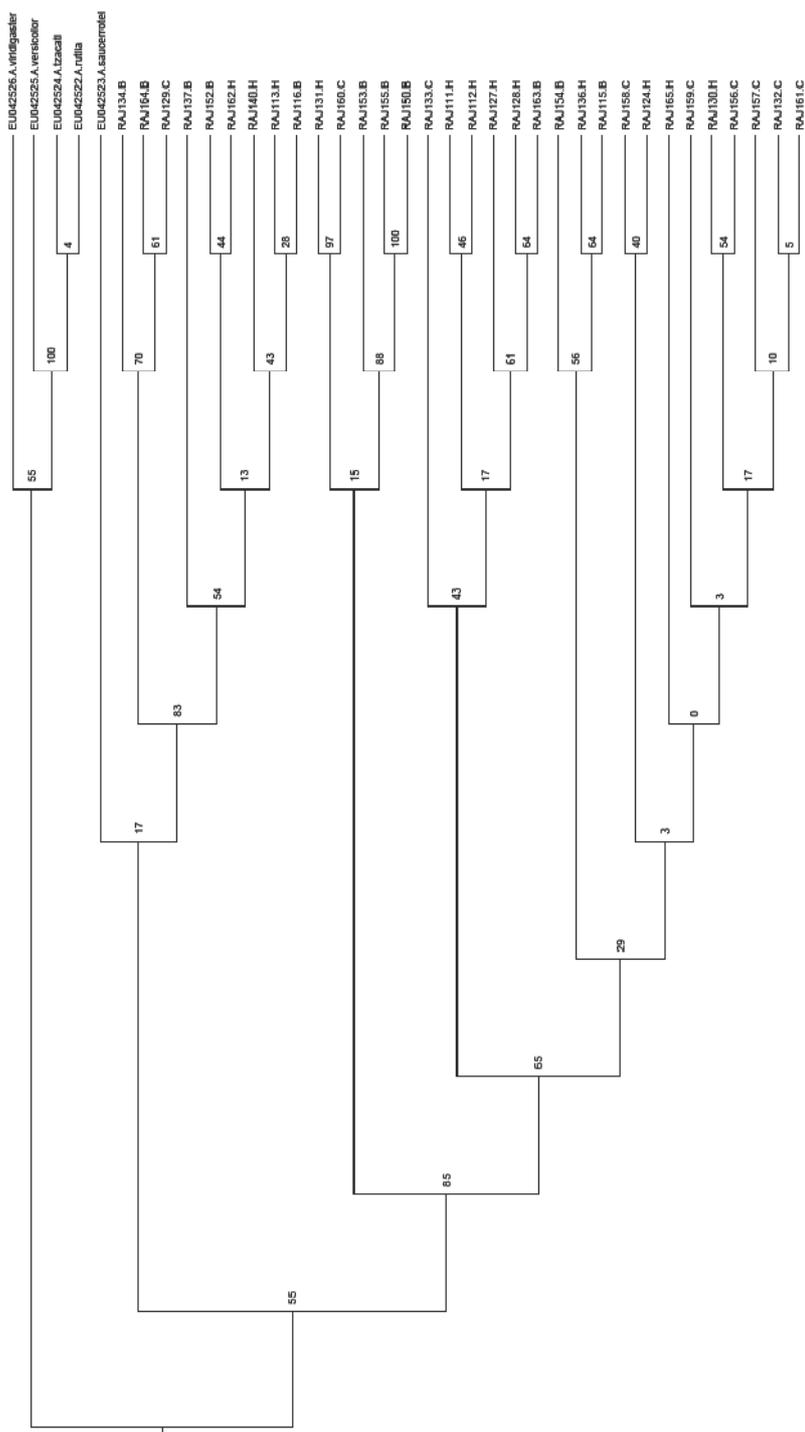
El gen nuclear TGFB2 fue secuenciado con un total de 618 pares de bases y se logró secuenciar los 32 individuos colectados. En este gen se encontró únicamente un par de secuencias idénticas: RAJ133 *A. cyanura* – RAJ165 *Amazilia* sp.

El gen mitocondrial ND2 fue secuenciado con un total de 1041 pares de bases y se logró secuenciar los 32 individuos colectados. Dentro de este gen se encontraron ocho pares de secuencias idénticas, estos pares de secuencias idénticas se encontraron entre individuos *Amazilia* sp. – *Amazilia* sp., *A. beryllina* – *Amazilia* sp., *A. cyanura* – *Amazilia* sp. y *A. beryllina* – *A. cyanura* (**Tabla 12**), independientemente del sitio de colecta, ya que se encontraron secuencias idénticas incluso entre individuos colectados en áreas de distribución alopátrica. La diversidad nucleotídica encontrada en el gen ND2 fue de 0.00610. Además, en este gen se obtuvieron seis diferentes haplotipos; dos de estos haplotipos, los más representados (haplotipo 1, 17 individuos y haplotipo 2, 9 individuos), estuvieron presentes en los tres grupos: *A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp. (**Figura 31**). Tal como se mencionó, se encontraron ocho parejas de secuencias idénticas y se obtuvieron únicamente seis haplotipos diferentes. Esto se debe a que dentro de cada haplotipo existen variaciones que diferencian las secuencias, aunque sigan siendo de cierto haplotipo. Se puede observar que hay cuatro parejas de secuencias idénticas que presentan el haplotipo 1, a pesar de que las ocho secuencias que conforman estas cuatro parejas no sean idénticas entre sí.

**Tabla 12.** Pares de individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* con secuencias idénticas del gen mitocondrial ND2.

Pares de individuos con secuencias idénticas					
No.	Haplotipo	Número de catálogo y especie	Sitio de colecta	Número de catálogo y especie	Sitio de colecta
1	1	RAJ111 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ112 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
2	2	RAJ113 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ116 – <i>A. beryllina</i>	Suchitepéquez
3	2	RAJ113 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ140 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
4	1	RAJ115 – <i>A. beryllina</i>	Suchitepéquez	RAJ136 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
5	1	RAJ124 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ158 – <i>A. cyanura</i>	Quetzaltenango
6	1	RAJ128 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ163 – <i>A. beryllina</i>	Chimaltenango
7	2	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ164 – <i>A. beryllina</i>	Chimaltenango
8	4	RAJ150 – <i>A. beryllina</i>	Huehuetenango	RAJ155 – <i>A. beryllina</i>	Huehuetenango

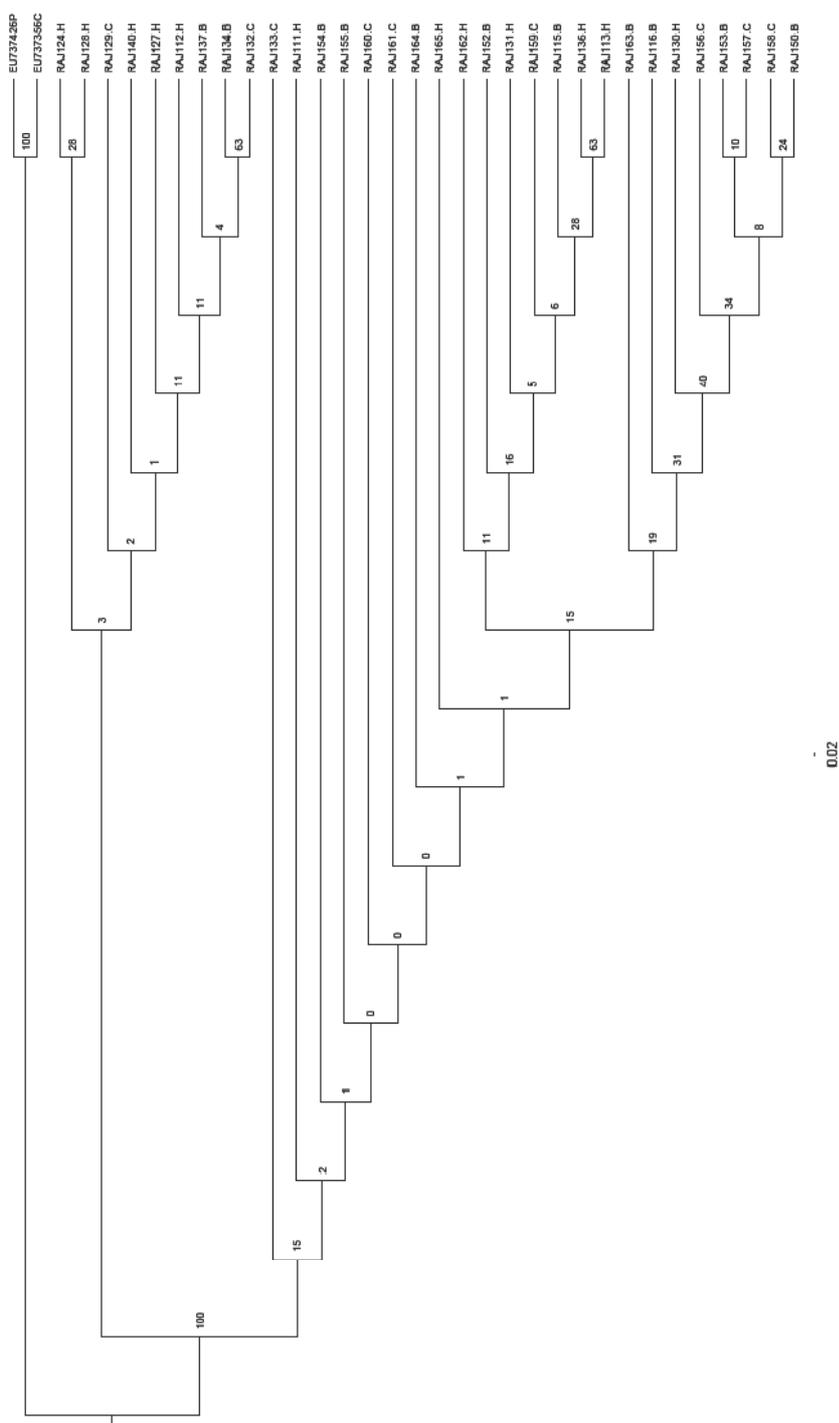
Sitios y años de colecta de los individuos: Patulul, Suchitepéquez (2009); Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango (2010); El Palmar, Quetzaltenango (2010); San Pedro Yepocapa, Chimaltenango (2010).



0.02

**Figura 26.** Análisis de máxima verosimilitud del gen mitocondrial ND2 de diferentes individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* colectados en Suchitepéquez, Huehuetenango, Quetzaltenango y Chimaltenango durante el período 2009 – 2010. (B = *Amazilia beryllina*, C = *Amazilia cyanura*, H = posibles híbridos *A. beryllina* – *A. cyanura*).





**Figura 28.** Análisis de máxima verosimilitud del gen nuclear TGF2 de diferentes individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* colectados en Suchitepéquez, Huehuetenango, Quetzaltenango y Chimaltenango durante el período 2009 – 2010. (B = *Amazilia beryllina*, C = *Amazilia cyanura*, H = posibles híbridos *A. beryllina* – *A. cyanura*).

El gen nuclear AK1 fue secuenciado con un total de 544 pares de bases. Se logró obtener secuencias de 31 individuos colectados. No fue posible obtener la secuencia de RAJ157 *A. cyanura*. En este gen se encontraron 5 pares de secuencias idénticas (**Tabla 13**).

El gen nuclear ODC fue secuenciado con un total de 603 pares de bases. Se logró obtener secuencias de 31 individuos colectados. No fue posible obtener la secuencia de RAJ153 *A. beryllina*. En este gen se encontraron 10 pares de secuencias idénticas (**Tabla 14**).

**Tabla 13.** Pares de individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* con secuencias idénticas del gen nuclear AK1.

Pares de individuos con secuencias idénticas				
No.	Número de catálogo y especie	Sitio de colecta	Número de catálogo y especie	Sitio de colecta
1	RAJ128 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ130 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
2	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ153 – <i>A. beryllina</i>	Huehuetenango
3	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ155 – <i>A. beryllina</i>	Huehuetenango
4	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ159 – <i>A. cyanura</i>	Quetzaltenango
5	RAJ160 – <i>A. cyanura</i>	Quetzaltenango	EU042442 – <i>A. tzacatl</i>	GenBank

Sitios y años de colecta de los individuos: Patulul, Suchitepéquez (2009); Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango (2010); El Palmar, Quetzaltenango (2010).

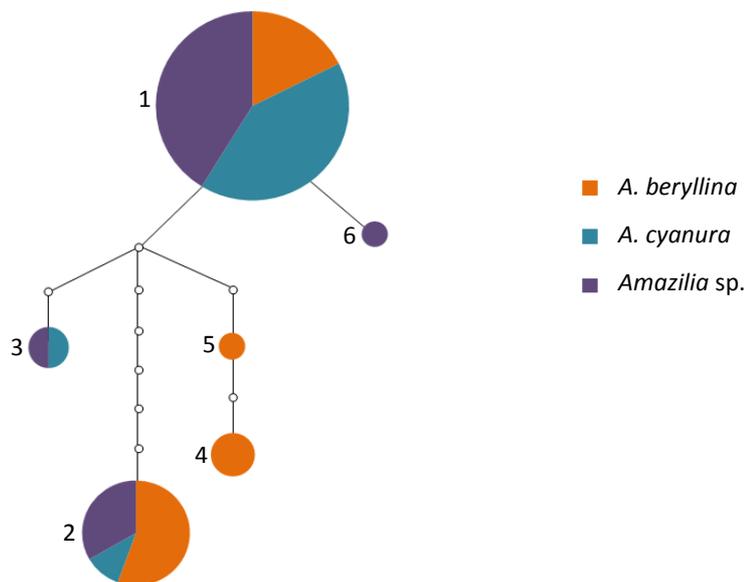
**Tabla 14.** Pares de individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* con secuencias idénticas del gen nuclear ODC.

Pares de individuos con secuencias idénticas				
No.	Número de catálogo y especie	Sitio de colecta	Número de catálogo y especie	Sitio de colecta
1	RAJ112 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ127 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
2	RAJ112 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez	RAJ128 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
3	RAJ115 – <i>A. beryllina</i>	Suchitepéquez	RAJ161 – <i>A. cyanura</i>	Quetzaltenango
4	RAJ115 – <i>A. beryllina</i>	Suchitepéquez	RAJ165 – <i>Amazilia</i> sp.	Chimaltenango
5	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ133 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez
6	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ136 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
7	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ140 – <i>Amazilia</i> sp.	Suchitepéquez
8	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ155 – <i>A. beryllina</i>	Huehuetenango
9	RAJ129 – <i>A. cyanura</i>	Suchitepéquez	RAJ160 – <i>A. cyanura</i>	Quetzaltenango
10	RAJ134 – <i>A. beryllina</i>	Suchitepéquez	RAJ157 – <i>A. cyanura</i>	Quetzaltenango

Sitios y años de colecta de los individuos: Patulul, Suchitepéquez (2009); Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango (2010); El Palmar, Quetzaltenango (2010); San Pedro Yepocapa, Chimaltenango (2010).







**Figura 31.** Red de haplotipos del gen mitocondrial ND2 de diferentes individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* colectados en Suchitepéquez, Huehuetenango, Quetzaltenango y Chimaltenango durante el período 2009 – 2010.

## 9. Discusión

### 9.1 Diversidad Morfológica

La separación de los individuos en diferentes especies se ha basado principalmente en las variaciones morfológicas que los mismos presentan (concepto morfológico de especie *sensu* Freeman y Herron, 2000, 316). Las aves no han sido una excepción. Tal es el caso de las especies *Amazilia beryllina* y *A. cyanura*. Lamentablemente no existe una estandarización y la descripción morfológica de estas especies varía dependiendo del autor (Ridgway, 1911, 445-451; Land, 1970, 160-161; Peterson y Chalif, 1973, 101; Howell y Webb, 1995, 410-411; Pyle, 1997, 125; Schuchmann, 1999, 604; Sibley, 2000, 295; Williamson, 2001, 148-151; Howell, 2002; National Geographic, 2002, 264-265; Stiles y Skutch, 2003, 254; Garrigues y Dean, 2007, 126-127; Floyd, 2008, 261). Esto podría deberse a la variación morfológica presentada en los especímenes que cada uno ha utilizado para describir las especies.

**9.1.1 Coloración y Plumaje.** Según lo presentado en la literatura, las especies *A. beryllina* y *A. cyanura* han sido separadas esencialmente por las diferencias que presentan en la coloración de su cola. Los individuos de los tres grupos morfológicos no difieren en peso (**Tabla 4 y Figura 13**) ni en varias características que son iguales en todos los especímenes colectados: el color de los dedos y tarsos es negro, el iris de los ojos es café, la maxila es negra, la mandíbula tiene la punta de color negro y la base anaranjada; éstas son características bastante uniformes en los especímenes y su descripción está estandarizada en la literatura (Ridgway, 1911, 445-451; Peterson y Chalif, 1973, 101; Howell y Webb, 1995, 410-411; Pyle, 1997, 125; Schuchmann, 1999, 604; Williamson, 2001, 148-151; Stiles y Skutch, 2003, 254).

Una característica muy importante del complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* es que los individuos presentan color rojizo en las alas, específicamente en la base de las plumas primarias interiores y las plumas secundarias exteriores. Esta es la característica utilizada por Ridgway (1911, 439) para separar estas especies de sus similares en la clave dicotómica que elaboró. La extensión del parche de color rojizo en las alas de las dos especies es variable dependiendo la fuente que se consulte. *A. beryllina* según algunas descripciones tiene color castaño, castaño

oscuro, oxidado, cobre o bronce en las alas, sin hacer mención a las plumas y secciones específicas (Land, 1970, 160; Peterson y Chalif, 1973, 101; National Geographic, 2002, 264-265; Floyd, 2008, 261); otros autores mencionan que el parche de color castaño o rojizo en esta especie está ubicado en la base de las plumas secundarias y en la base de las plumas primarias interiores (Pyle, 1997, 125; Schuchmann, 1999, 604; Sibley, 2000, 295; Williamson, 2001, 148) y, haciendo referencia a la subespecie que habita en Guatemala, *A. b. devillei*, Ridgway (1911, 447-448) y Howell y Webb (1995, 410) indican que el color rojizo en las alas puede estar restringido a las secundarias, las cuales son oscuras por lo menos en la mitad terminal de la porción expuesta, siendo las primarias completamente oscuras o con color castaño solamente en la porción extremadamente basal. Tal como se mencionó en la sección de Resultados, todos los especímenes *A. beryllina* presentaron coloración rojiza en las alas, sin embargo, presentaron variaciones en la extensión del parche de dicho color. No se encontraron diferencias obvias en esta característica (coloración rojiza en las alas) entre los machos y hembras colectados en una misma localidad, tal como indica Howell (2002) posiblemente para la subespecie más norteaña *A. b. viola*, en la cual el parche presente en las hembras es de menor tamaño al de los machos.

Ocurre lo mismo con la descripción del color rojizo en las alas de *A. cyanura*. Las descripciones más generales solamente indican que puede presentar o que presenta color castaño o rojizo en las alas (Ridgway, 1911, 445-447; Peterson y Chalif, 1973, 101; Garrigues y Dean, 2007, 126-127), este parche de color castaño es menor al que presenta *A. beryllina* según sugiere Land (1970, 161). Las descripciones más específicas mencionan que el color rojizo está presente en la base de las plumas secundarias exteriores y la base de las plumas primarias interiores, este parche de color rojizo puede estar reducido o ausente en las hembras (Howell y Webb, 1995, 411; Schuchmann, 1999, 604; Stiles y Skutch, 2003, 254). Estas descripciones coinciden con los resultados obtenidos; se observó el parche de coloración rojiza en las alas de todos los especímenes y además, la extensión del parche estuvo relacionada con el sexo, siendo este de menor tamaño en las hembras.

En el grupo de los especímenes designados como *Amazilia* sp. se encontró variación en la presencia y extensión del parche rojizo en las alas. Una hembra colectada de Patulul (RAJ111) no presentó esta coloración en las plumas de las alas; según Howell y Webb (1995, 411) y Schuchmann (1999, 604) el color rojizo puede estar reducido o ausente en las hembras de la

especie *A. cyanura*, aunque por la coloración púrpura que tiene esta hembra en las plumas de la cola no puede ser asignada como *A. cyanura* (especie que tiene la cola de color azul profundo. Howell y Webb, 1995, 411; Schuchmann, 1999, 604; Stiles y Skutch, 2003, 254). Tal como se mencionó en la sección de resultados, se observó mucha variación en la extensión del parche de color rojizo en las alas de los colibríes colectados.

A pesar de que la coloración rojiza en las alas ha sido utilizada para describir las diferentes subespecies de *A. beryllina* y *A. cyanura* (Howell y Webb, 1995, 410-411; Schuchmann, 1999, 604), de acuerdo a los resultados obtenidos, existe variación en este parche de color incluso dentro de la misma subespecie. En *A. beryllina* se encontraron diferencias en individuos colectados en el mismo sitio (San Pedro Yepocapa, Chimaltenango), lo mismo ocurrió con el grupo *Amazilia* sp. (Patulul, Suchitepéquez). En el grupo *A. cyanura* existió diferencia en la extensión del parche dependiendo del sexo. Estas variaciones intraespecíficas hacen que la extensión del parche de color rojizo en las alas se traslape entre las diferentes especies, lo que impide el uso de esta característica para separarlas y menos aún detectar la presencia de híbridos.

Como información adicional, es importante mencionar que varias características morfológicas (coloración de las alas, plumas supracaudales y plumas de la cola) de los especímenes colectados en Huehuetenango coinciden con la descripción de *A. b. sumichrasti* (Salvin y Hartert, 1892, 213-214). Esta subespecie no está reportada para Guatemala, su área de distribución se encuentra en el centro y sur del estado de Chiapas, México, por lo que esta misma podría ser la subespecie que habita en Huehuetenango (Schuchmann, 1999, 604). Convendría confirmar esta observación con capturas o colectas posteriores.

La coloración de la garganta y el vientre permite identificar el sexo de los individuos. El color de la garganta es verde intenso en todos los machos de las especies *A. beryllina* – *A. cyanura* y verde moteado en las hembras, esto pudo observarse perfectamente en los especímenes colectados. El color del vientre varía dependiendo de la subespecie. Tal como se menciona en la sección de Antecedentes, en Guatemala habitan con certeza *A. b. devillei* y *A. c. guatemalae*; en ambos grupos los machos presentan el vientre de color verde intenso y las hembras tienen motas verdes en un fondo café grisáceo (Ridgway, 1911, 447-451; Land, 1970, 161; Peterson y Chalif, 1973, 101;

Howell y Webb, 1995, 410-411; Pyle, 1997, 125; Schuchmann, 1999, 604; Williamson, 2001, 148; Howell, 2002; National Geographic, 2002, 264-265; Stiles y Skutch, 2003, 254; Floyd, 2008, 261). Esta característica también fue evidente en los especímenes colectados.

Además del color rojizo en las alas, el color de las plumas supracaudales (**Figura 15**) y el color de las plumas de la cola son características utilizadas para diferenciar las especies *A. beryllina* – *A. cyanura* y las subespecies de *A. beryllina*. Estas dos características son muy variables, tanto en los individuos colectados como en las descripciones realizadas por diferentes autores. *A. cyanura* es la especie en que las descripciones realizadas previamente tienen un mayor consenso, indicando que las plumas supracaudales de esta especie son de color azul metálico profundo (Ridgway, 1911, 445-447; Land, 1970, 161; Howell y Webb, 1995, 411) aunque Schuchmann (1999, 604) sugiere que pueden ser de púrpura-violeta a azul profundo. En todos los especímenes colectados de *A. cyanura* el color de las plumas supracaudales es azul profundo, sin importar el sexo.

El color de las plumas supracaudales en *A. beryllina* es muy variable, tal como ha sido documentado por diferentes autores. El color de estas plumas puede ser púrpura o violeta-púrpura (Ridgway, 1911, 447-451), violeta (Land, 1970, 160), púrpura (Howell y Webb, 1995, 410), uniformemente azuladas a bronce-violeta (Pyle, 1997, 125), púrpura-negro (Sibley, 2000, 295), violeta-púrpura oscuro (Williamson, 2001, 148) o cobre-púrpura (Howell, 2002). Además según Schuchmann (1999, 604), el color de las plumas supracaudales varía dependiendo de la subespecie, siendo a menudo de color cobre a rojizo en general en el grupo *A. beryllina*, violeta-azul oscuro en *A. b. viola*, plateado en *A. b. lichtensteini* y púrpura a bronce castaño en *A. b. sumichrasti*. Los machos colectados de esta especie presentaron las plumas supracaudales de color púrpura (un individuo) o púrpura-azul (un individuo), mientras que las hembras las tuvieron de color bronce (siete individuos) o bronce-púrpura (dos individuos. **Figura 15**).

Los individuos del grupo *Amazilia* sp. no presentaron mucha variación en el color de las plumas supracaudales, ya que once (ocho hembras y tres machos) presentaron color púrpura-azul en estas plumas y únicamente un macho presentó color azul (**Figura 15**).

Tal como se ha mencionado, el color de las plumas supracaudales presenta variación dentro de los grupos *A. beryllina* y *Amazilia* sp., siendo uniforme únicamente en *A. cyanura*. Por esta razón, esta característica solamente permite separar los individuos *A. cyanura* del grupo *A. beryllina* – *Amazilia* sp.

**9.1.2 Muda del Plumaje.** La mayoría de aves mudan su plumaje una vez al año, ya que las plumas se desgastan y deben estar en excelentes condiciones para optimizar el vuelo (Stiles, 1980, 334-335; Pyle, 1997, 125). El proceso de muda del plumaje es un proceso energéticamente muy costoso por lo que suele ocurrir en una época del año específica, generalmente al finalizar la reproducción (Pyle, 1997, 125; Floyd, 2008, 261; Fraser, Diamond, y Chavarría, 2010, 645-647). Las temporadas reproductivas de *A. beryllina* y *A. cyanura* no han sido descritas por completo. Se sabe que *A. beryllina* se reproduce de junio a octubre (con pico en septiembre en el estado de Oaxaca) en el oeste y sur de México y de mayo a septiembre (principalmente de junio a agosto) en Estados Unidos de América (Howell y Webb, 1995, 410; Schuchmann, 1999, 604; Williamson, 2001, 149-151). Debido a que se encontraron individuos de esta especie mudando alguna sección de su plumaje (corporal, alar y de la cola) en los meses de mayo, junio y julio 2009, marzo y abril 2010 (**Tablas 5, 6 y 8**), estos meses podrían descartarse como temporada reproductiva en Guatemala, ya que la reproducción y la muda no ocurren al mismo tiempo (Stiles, 1980, 332-335; Fraser y otros, 2010, 645-647). El haber encontrado individuos de *A. beryllina* mudando en los meses de marzo a julio, coincide con la temporada de muda propuesta por Pyle (1997, 125), de marzo a agosto.

Los datos de reproducción de *A. cyanura* son escasos (Howell y Webb, 1995, 411; Schuchmann, 1999, 604). Sin embargo, en el Parque Arqueológico Takalik Abaj ubicado en el Departamento de Retalhuleu se encontraron nidos en los años 2000 y 2001 (el reporte no indica meses, Eisermann y Avendaño, 2007, 90) y Fraser y otros (2010, 645-647) proponen que en Nicaragua la temporada reproductiva de *A. cyanura* podría ser similar a la de *A. saucerrottei*, especie cercanamente relacionada que se reproduce de diciembre a abril en Costa Rica. En Nicaragua *A. c. cyanura* se encuentra mudando su plumaje en abril y mayo, aunque no se poseen datos del resto del año (Fraser y otros, 2010, 646). La mayoría de los especímenes colectados en junio 2009 y marzo 2010

se encontraba en alguna etapa de la muda del plumaje, por lo que en estos meses podrían encontrarse fuera de la temporada reproductiva.

Todos los individuos colectados del grupo *Amazilia* sp. se encontraban mudando alguna sección de su plumaje en los meses de mayo, junio y julio 2009 y abril 2010, por lo que esta temporada podría ser descartada como su época reproductiva. Puede notarse también que el período de muda de este grupo coincide con *A. beryllina* y *A. cyanura*, existe traslape en el período de muda de los tres grupos morfológicos.

Once individuos (dos *A. beryllina*, cuatro *A. cyanura* y cinco *Amazilia* sp. **Tabla 7**) se encontraban mudando las plumas primarias; como es usual en los colibríes, la muda se lleva a cabo desde adentro hacia afuera, iniciando por la pluma primaria 1, llegando a la pluma primaria 8, procediendo con la pluma primaria 10 y finalmente la pluma primaria 9 (Stiles, 1995a, 120; Pyle, 1997, 125). En nueve individuos la muda de las plumas primarias parece ser simétrica, mientras que en dos especímenes esta muda es asimétrica, la asimetría en la muda de las plumas primarias es poco común según Stiles (1995a, 121).

La secuencia de muda de las plumas rectrices suele ser variable entre e intra especies. De todos los individuos colectados solamente en un espécimen *A. beryllina* puede reconocerse el patrón de muda, la secuencia de muda de las rectrices es la siguiente: 1-2-5-4-3 (cada número indica la pluma que se muda, el 1 representa la pluma interior y el número 5 la pluma más exterior). Este patrón de muda ha sido uno de los patrones que se han observado en *A. saucerottei* en Costa Rica, especie emparentada a *A. beryllina*. La muda de las plumas rectrices en este individuo de la especie *A. beryllina* es asimétrica, condición frecuente en la muda de las plumas rectrices (Stiles, 1995a, 122).

**9.1.3 Contenido del Tracto Digestivo.** Los colibríes del complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* tuvieron una buena disponibilidad de artrópodos durante las temporadas junio-julio 2009 y marzo-abril 2010 en los diferentes sitios de colecta. Esto puede deducirse del hecho de que la mayoría de individuos colectados (16 de un total de 25) poseía gran cantidad de artrópodos en sus tractos digestivos (**Tabla 9**).

Los colibríes colectados de las especies *A. beryllina* – *A. cyanura* consumieron mayormente insectos de los órdenes Hymenoptera y Diptera (**Figura 16**); insectos que capturan principalmente volando. Avispas y moscas son los insectos más comunes de los cuales se alimentan los colibríes que atrapan a los insectos en vuelo (Stiles, 1995b, 861-864). Es notable mencionar que se encontró el cuerpo de una araña en el estómago de un macho del grupo *Amazilia* sp. (**Figura 17**). Hasta el momento se ha sugerido que los machos de diferentes especies de colibríes no suelen alimentarse de arañas, ni de insectos atrapados en telas de araña, pues se les dificulta acercarse a las telas de araña por su limitada capacidad de volar suspendidos en el mismo sitio, en relación a las hembras (Stiles, 1995, 868-869; Hardesty, 2009, 20). Las dietas diferentes entre individuos de la misma especie o de especies diferentes disminuyen la competencia por alimento. La competencia por alimento puede guiar al desplazamiento de caracteres y diferenciación de los individuos (Freeman y Herron, 2000, 78).

*9.1.4 Proporciones de sexos (machos : hembras).* En los tres grupos de colibríes identificados (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.) se encontró que la proporción de hembras era mayor a la proporción de machos en los especímenes colectados (**Tabla 4**). Esta relación de sexos se ha observado en los adultos de otras especies de colibríes, *Archilochus colubris*, *A. alexandri*, *Selasphorus platycercus*, *S. rufus* y *S. sasin*; aunque en su etapa juvenil se encuentren en proporciones similares entre los dos sexos (Elliston y Baltosser, 1995, 76-81; Howell y Gardali, 2003, 17-20; Bassett y Cubie, 2009, 154-158).

El análisis de las proporciones de sexos en las poblaciones de aves puede realizarse desde diferentes puntos de vista. Primero, el sexo de un híbrido está relacionado con su fertilidad. Entre los híbridos producidos por un cruce, cuando un sexo está ausente, es infértil o inviable, virtualmente siempre será el sexo heterogamético (según la Regla de Haldane), el cual en las aves es la hembra (McCarthy, 2006, 8-9; Gill, 2007, 591). Basándose en los datos obtenidos, parcialmente la Regla de Haldane no explica lo que está ocurriendo en el complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura*, ya que se capturaron hembras de los tres grupos morfológicos, lo cual indica que las hembras son organismos viables. Sin embargo, que se haya capturado gran proporción de hembras no representa que no esté ocurriendo hibridación entre las especies, ya que no se evaluó si éstas son fértiles. Además en algunos cruces, las hembras son tan comunes

como los machos y ponen huevos fértiles; en otros, ponen huevos estériles; en algunos otros no ponen huevos (McCarthy, 2006, 8-9).

Segundo, existe baja o nula variabilidad genética encontrada en los especímenes evaluados. Cuando dos poblaciones naturales se hibridizan pero los dos tipos de ADN mitocondrial característicos de las dos poblaciones parentales permanecen segregados, las hembras híbridas usualmente serán estériles, ya que en las aves las hembras son el sexo heterogamético. Es importante mencionar que la esterilidad en los híbridos puede producirse por reforzamiento, cuando la selección natural actúa directamente para incrementar el aislamiento reproductivo, y por aislamiento post-cigótico producido por incompatibilidad genética (McCarthy, 2006, 8-9, 24). Según el gen mitocondrial analizado, ND2 (**Figuras 26 y 31, Tabla 12**), las secuencias idénticas encontradas entre los grupos, incluso entre *A. beryllina* y *A. cyanura*, y los haplotipos compartidos por las especies, podría decirse que para este gen el ADN mitocondrial no está segregado entre las poblaciones parentales. Sin embargo, esto no es concluyente para afirmar o negar que se esté dando la hibridación entre las especies *A. beryllina* y *A. cyanura*, ya que un solo gen puede no ser representativo de todo el genoma mitocondrial. Además podría ser que el gen ND2 no varía entre las dos especies analizadas, ya sea por las relaciones filogenéticas entre las especies (relación ancestro – descendiente) o porque el tiempo que han estado separadas ha sido corto, evolutivamente hablando (Gill, 2007, 590; Welch, Yoshida y Fleischer, 2011, 1371).

Tercero, se capturó mayor cantidad de hembras que de machos lo que podría estar relacionado con el comportamiento de los individuos. La mayoría de las especies de colibríes de la subfamilia Trochilinae son territoriales, y, aunque las hembras pueden ser territoriales (Wolf, 1969, 490), los machos son los que principalmente presentan este comportamiento. Los machos del género *Amazilia* pueden formar arenas de cortejo o permanecer solitarios en perchas en donde defienden territorios durante la mayor parte del día y a lo largo de casi todo el año; en Estados Unidos de América, el macho *A. beryllina* canta desde una percha conspicua dentro de su territorio durante el principio de la temporada reproductiva, los individuos no permanecen en el territorio de reproducción durante el invierno (Stiles y Skutch, 2003, 254; Williamson, 2001, 149). Al realizar estas actividades (defensa del territorio, participación en arenas de cortejo) los machos se encuentran en una sola ubicación lo que puede disminuir su probabilidad de captura con redes de

niebla. El comportamiento usual de los machos pudo reducir el número de machos capturados en los diferentes sitios visitados, alterando la detección de las proporciones machos: hembras de las poblaciones.

*9.1.5 Análisis de la Coloración de la Cola.* Según los resultados obtenidos, existen diferencias significativas entre los tres grupos analizados. Estas diferencias se observan en los análisis de varianza no paramétricos (**Tabla 11**) realizados para cada una de las nueve variables estudiadas (**Figura 11**), variables que corresponden a los datos numéricos de la coloración obtenidos para diferentes puntos de la cola.

La coloración de las plumas de la cola en *A. beryllina* ha sido descrita de diferentes formas, según la literatura cada una de sus cinco subespecies presenta variaciones, aunque tampoco dentro de las descripciones de la coloración de la cola de *A. b. devillei* existe un consenso. Salvin y Godman (1892, 295-297) indican que existe considerable variación en el color de la cola de *A. beryllina* y en algunos especímenes la cola es violeta-púrpura profundo; como una regla los especímenes más oscuros son de las partes más al norte del oeste de México, pero no es siempre el caso. Según Ridgway (1911, 447-451) *A. beryllina* tiene las rectrices medias de color bronce-púrpura metálico (usualmente más oscuras y más púrpura terminalmente), las rectrices restantes tienen márgenes de color castaño oscuro o marrón con rojizo o bronce-púrpura metálicos o púrpura-bronce. Griscom (1932, 201) describió un espécimen macho colectado en Quiriguá (Departamento de Izabal) de *A. beryllina* como mucho más oscuro y más ricamente colorido que los especímenes de las laderas del Pacífico y la cola mucho más púrpura, sugiriendo que como esta es una localidad mucho más al este de donde la especie ha sido reportada, el carácter puede probar ser de valor subespecífico. Según Land (1970, 160) *A. beryllina* tiene la cola de color violeta-rojizo a violeta-bronce. Peterson y Chalif (1973, 101) dicen que la cola es de color castaño-púrpura en *A. beryllina*. Según Howell y Webb (1995, 410) el color de las plumas de la cola en *A. b. devillei* es bronce-púrpura a violeta-púrpura y en *A. b. beryllina* la cola es de color rojizo profundo y las rectrices centrales son púrpura oscuro. En la descripción de Pyle (1997, 125) las rectrices centrales (rectrices número 1) son de color uniformemente azuladas o bronce-violeta, las rectrices laterales son de color cobre a rojizo. Schuchmann (1999, 604) también sugiere que *A. beryllina* tiene el color de las plumas de la cola variable, generalmente cobre a rojizo; *A. b. viola* tiene la cola y las

supracaudales violeta-azul oscuros; *A. b. lichtensteini* tiene la cola y las supracaudales de color plateado y *A. b. sumichrasti* tiene la cola púrpura a bronce-castaño. Según Sibley (2000, 295) *A. beryllina* tiene la cola de color rojizo. Williamson (2001, 148) indica que el color de las plumas de la cola de *A. beryllina* es café-rojizo oscuro con fuerte brillo violeta-púrpura. Según National Geographic (2002, 264-265) la cola de *A. beryllina* es de color castaño. Según Howell (2002) el color de la cola de los machos *A. beryllina* es cobre púrpura yendo gradualmente a cobre castaño en las rectrices exteriores, la cola cerrada puede parecer casi negra desde arriba, la cola de las hembras es más cobre o bronce, menos púrpura. Según Floyd (2008, 261) *A. beryllina* presenta color oxidado en la cola.

Los individuos que se agruparon en el grupo *A. beryllina* tienen la cola con una coloración principalmente bronce-rojiza y algunos individuos tienen unos toques violáceos metálicos; este patrón de coloración coincide con las descripciones de varios autores (Ridgway, 1911, 447-451; Land, 1970, 160; Peterson y Chalif, 1973, 101; Howell y Webb, 1995, 410; Schuchmann, 1999, 604; Sibley, 2000, 295; Williamson, 2001, 148; National Geographic, 2002, 264-265; Floyd, 2008, 261). Las descripciones presentadas por otros autores (Salvin y Godman, 1892, 295-297; Griscom, 1932, 201; Pyle, 1997, 125; Howell, 2002) no coinciden con la coloración presentada por los individuos asignados como *A. beryllina*, ya que ellos mencionan que esta especie presenta coloración violeta-púrpura evidente.

El grupo obtenido de *A. beryllina* incluye seis especímenes colectados en el área de simpatria con *A. cyanura* (Suchitepéquez y Chimaltenango) y cinco especímenes colectados en Huehuetenango, área alopátrica de *A. beryllina*. En este grupo es importante notar que se están agrupando individuos que podrían pertenecer a la subespecie *A. b. sumichrasti* con los especímenes que comparten el hábitat con *A. cyanura*. Esto muestra como sí se están agrupando los individuos que fenotípicamente conforman la especie *A. beryllina* independientemente de su área de distribución. En este caso se incluyen dos poblaciones aisladas geográficamente, entre las cuales es muy probable que no exista flujo genético o que exista una tasa muy baja de intercambio debido a la cadena volcánica que las separa (**Figura 8**). En lo que respecta a las subespecies y a la variabilidad morfológica que presentan, es necesario tomar en cuenta que las diferencias geográficas en tamaño o color pueden deberse directamente a diferencias ambientales más que a

diferencias evolutivas genéticas entre las poblaciones (Gill, 2007, 575). Las diferencias ambientales pueden ser más frecuentes en organismos como estos colibríes que tienen una distribución tan amplia en términos de altitud, precipitación, temperatura, etc.

El grupo de *Amazilia* sp. está conformado por 12 especímenes colectados en el área de simpatria de *A. beryllina* y *A. cyanura* (Suchitepéquez y Chimaltenango). Los individuos que conforman este grupo presentan una coloración variable en las plumas de la cola, ésta puede ser bronce-rojiza con violeta, bronce-rojiza únicamente en la base y la mayor parte de la pluma de color violeta-púrpura-azul o púrpura-azul, principalmente las rectrices interiores (1 y 2) son de color violeta-púrpura más oscuro. Aunque se ha descrito que los individuos que poseen la coloración de la cola como estos individuos, pertenecen a *A. beryllina* (Salvin y Godman, 1892, 295-297; Griscom, 1932, 201; Pyle, 1997, 125; Howell, 2002), siendo únicamente una variación intraespecífica (Schuchmann, 1999, 604), en los análisis realizados están claramente separados del grupo *A. beryllina*, por el ápice de la rectriz derecha 1 (RD1A) y el ápice de la rectriz derecha 3 (RD3A. **Tabla 11**).

El color púrpura en las plumas de la cola de *A. beryllina* también es adjudicado a otra razón, ya que según Howell (2002) está presente cuando las plumas están nuevas y las mismas son más rojizas cuando están gastadas. Este patrón no pudo observarse en los especímenes colectados, ya que individuos asignados al grupo *Amazilia* sp. (RAJ113, RAJ127) que poseen coloración púrpura en la cola, presentaron señales de desgaste en plumas totalmente desarrolladas y éstas eran de coloración púrpura (**Figura 22**).

El Valle del Motagua es un área de distribución alopatrica de *A. beryllina* y según observaciones personales y un espécimen colectado en esta región (el espécimen fue revisado en el Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos de Guatemala), los individuos presentan una coloración en la cola mucho más púrpura que los *A. beryllina* colectados en Huehuetenango y el área de simpatria de las especies, siendo mucho más similares (visualmente) a los individuos del grupo *Amazilia* sp. Muy probablemente a esto se debe que se haya reconocido que la subespecie *A. b. motaguae* habita en esta región, aunque posteriormente esta subespecie ha sido unida a *A. b. devillei*, indicando que los cambios en coloración que presentan dichos individuos solamente se

deben a la variación presentada en los plumajes de juveniles y hembras (Griscom, 1932, 201; Schuchmann, 1999, 604).

No existe tanta incertidumbre en las descripciones de *A. cyanura*, ya que en general se menciona que tiene la cola de color azul metálico o azul profundo (Land, 1970, 161; Peterson y Chalif, 1973, 101; Howell y Webb, 1995, 411; Schuchmann, 1999, 604), aunque Ridgway (1911, 445-447) y Stiles y Skutch (2003, 254) indican que ésta puede ser de color azul violeta, especialmente en la porción basal de las rectrices exteriores. El grupo de *A. cyanura* está conformado por nueve especímenes que claramente muestran una coloración azul en la cola. No existe mayor problema con la determinación de los individuos pertenecientes a esta especie, ya que el color azul es muy evidente.

La coloración de la cola fue la única característica evaluada que permitió separar a los individuos en grupos: *A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp. Esta es la misma característica que ha sido utilizada por diferentes autores (Ridgway, 1911, 445-451; Howell y Webb, 1995, 410-411; Schuchmann, 1999, 604) para diferenciar a dichas especies. Por lo tanto, hasta donde sabemos esta es la característica física que debe tomarse en cuenta para separar a los individuos en diferentes grupos. Así también debe notarse que en los tres grupos definidos por los datos numéricos de la coloración de la cola, ciertas plumas y regiones de las plumas tienen mayor importancia para separar a los individuos en grupos:

- *A. beryllina* – *Amazilia* sp.: RD1A y RD3A, ya que estos fueron los sitios que permiten separar estos grupos.
- *A. cyanura* – *Amazilia* sp.: RD3B, RD5C, ya que estos fueron los sitios que según las comparaciones múltiples de Dunn presentaron mayor diferencia entre los grupos ( $p < 0.001$ ).
- *A. cyanura* – *A. beryllina*: se diferencian en todos los sitios analizados (**Tabla 11**).

Debe seguirse analizando el uso de estas secciones de la pluma para la asignación de individuos a los grupos de las diferentes especies del complejo *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.

## 9.2 Diversidad Genética

Los tres grupos designados de acuerdo a la coloración de la cola son evidentes, aunque no concordantes con los datos moleculares obtenidos. Los marcadores moleculares han sido utilizados para diferenciar especies de aves en general (Hackett, 1996, 369; Cicero y Johnson, 2001, 27-30; Irestedt y otros, 2002, 499-502; Marini y Hackett, 2002, 1115; Primmer y otros, 2002, 611; Allen y Omland, 2003, 963; Fjeldså y otros, 2003, S238; Borge y otros, 2005, 1862; McGuire y otros, 2007, 837; Tello y Bates, 2007, 137; Nguembock y otros, 2008, 397; Kimball y otros, 2009, 658) y en especial los marcadores ND2 y AK1 han sido muy valiosos en estudios de colibríes y otros grupos de aves (Marini y Hackett, 2002, 1115; McGuire y otros, 2007, 837; Parra, 2010, 326-327). Sin embargo, dentro del estudio se obtuvieron secuencias de genes idénticas entre diferentes organismos, tanto entre individuos del grupo *Amazilia* sp. e individuos pertenecientes a *A. beryllina* y *A. cyanura*, e incluso entre individuos de la especie *A. beryllina* y la especie *A. cyanura*. Entre todos los pares de secuencias idénticas encontrados, es notable mencionar a los individuos RAJ129 (*A. cyanura*), RAJ153 (*A. beryllina*), RAJ155 (*A. beryllina*) y RAJ159 (*A. cyanura*) que presentaron la secuencia del gen AK1 idéntica. Los especímenes RAJ129 y RAJ159 fueron colectados en las laderas del Pacífico (Suchitepéquez y Quetzaltenango, respectivamente) y los especímenes RAJ153 y RAJ155 fueron colectados en la Sierra de los Cuchumatanes (Huehuetenango). Como se ha mencionado, estas dos áreas están geográficamente aisladas por la cadena volcánica, lo que representa una gran barrera que dificulta el flujo genético entre las dos áreas. Así también, se encontraron secuencias idénticas entre un individuo *A. cyanura* colectado en Quetzaltenango (RAJ160) y un individuo de la especie *A. tzacatl* que fue utilizado como grupo externo; *A. tzacatl* es una especie que podría pertenecer a un linaje diferente al de *A. beryllina* – *A. cyanura*, razón por la que son asignadas a diferentes géneros por Schuchmann (1999, 604).

Situaciones similares ocurren con otros marcadores (ODC, TGFB2), habiendo secuencias idénticas no únicamente entre individuos que comparten el hábitat, ya sean *A. beryllina*, *A. cyanura* o *Amazilia* sp., sino entre individuos separados geográficamente. Es común que los marcadores nucleares (FIB5, TGFB2, AK1, ODC) no tengan un valor filogenético considerable debido a la baja variabilidad típica que existe a este nivel taxonómico y a que el ADN nuclear evoluciona más despacio que el ADN mitocondrial (Moore, 1995, 718; Marini y Hackett, 2002, 1114; Zink, 2002,

864). Tal como ya se mencionó, el mismo patrón presentado por los marcadores nucleares se encontró en el marcador mitocondrial utilizado (ND2).

La baja variabilidad genética encontrada en los individuos puede estar ocurriendo debido a diferentes situaciones:

- Los marcadores moleculares utilizados no son útiles para separar las especies analizadas, por lo que es necesario intentar con otros genes, por ejemplo MC1R, el cual es un gen asociado al color de las plumas (Theron, Hawkings, Bermingham, Ricklefs y Mundy, 2001, 550-551; Doucet, Shawkey, Rathburn, Mays y Montgomerie, 2004, 1663-1664).

Además, otras técnicas moleculares podrían implementarse. Dentro de éstas técnicas podría incluirse el Análisis de Microsatélites; esta es una técnica en que elementos cortos de ADN nuclear con alta variación y repetitivos son amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa y analizados por electroforesis. El Análisis de Microsatélites tiene múltiples ventajas, ya que se pueden producir datos exactos y reproducibles de frecuencias de alelos a partir de un gran número de individuos en corto tiempo. Además, los microsatélites permiten comparar niveles de diversidad entre poblaciones, y cualquier diferenciación inferida entre las poblaciones tiene mayor significado biológico al ser basada en múltiples caracteres independientes (Chambers y MacAvoy, 1999, 7-10; Shepherd y Perrie, 2011, 1391).

También podría utilizarse el Análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados. En esta técnica los productos de la reacción en cadena de la polimerasa son digeridos con enzimas de restricción y los tamaños resultantes de los fragmentos de ADN, determinados por electroforesis. Esta técnica permite analizar miles de polimorfismos dispersos en el genoma sin necesidad de tener acceso a la información de secuencias de ADN. Además, provee alta resolución y cobertura del genoma en especies poco estudiadas (Chambers y MacAvoy, 1999, 9-10; Vallender y otros, 2007, 2019-2021; Fischer, Foll, Excoffier y Heckel, 2011, 1451).

- Las especies *A. beryllina* – *A. cyanura* son de muy reciente especiación (en términos evolutivos) por lo que aun no existen diferencias genéticas entre ellas, incluso entre poblaciones aisladas geográficamente; ya que se ha reportado que el proceso de especiación comienza con diferencias vocales o visuales basadas en menores cambios genéticos, los cuales al irse acumulando a lo largo del tiempo generan una barrera reproductiva (Gill, 2007, 575; Welch y otros, 2011, 1371).
- La variabilidad morfológica en el complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* no es más que una amplia diversidad fenotípica dentro de un solo grupo de organismos. Esto puede observarse en otras aves, tal es el caso de los pinzones de Darwin, en que organismos con gran variación morfológica y que han sido considerados especies diferentes, no pueden ser separados genéticamente (Zink, 2002, 865). Si esto fuera lo que está ocurriendo en las especies estudiadas, la diversidad fenotípica no se debería a hibridación, sino que a variaciones intraespecíficas.

Las variaciones intraespecíficas en la coloración de las aves se deben a los genes o al ambiente. La variación genética proviene de los genes que codifican directamente para diferentes variantes del color, o alternativamente a través de genes que tienen efectos pleiotrópicos (pleiotropía: fenómeno por el cual un solo gen es responsable de efectos fenotípicos distintos y no relacionados) en el desarrollo del color. La variabilidad ambiental proviene de la interacción entre varios parámetros ambientales (ambiente social, parásitos, calidad del territorio, edad, época, alimentación) y de la penetrancia (frecuencia en que son expresados) de los genes que codifican para los diferentes fenotipos (Dale, 2006, 39). Los resultados obtenidos en este estudio, no mostraron variaciones genéticas entre los individuos, por lo que podría pensarse que las variaciones en la coloración de las plumas de la cola se deben a efectos ambientales. Cuando individuos con genotipos idénticos muestran fenotipos diferentes en ambientes diferentes, se dice que existe plasticidad fenotípica (Freeman y Herron, 2000, 291). A pesar de que los colibríes colectados mostraron poca variación genética y tres grupos morfológicos diferentes, no puede afirmarse que la variación en la coloración de las plumas de la cola se deba a plasticidad fenotípica. Individuos de los tres grupos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia*

sp.) fueron colectados en un mismo sitio, por lo que se supondría que están sujetos a los mismos efectos ambientales. Además, como se mencionó anteriormente, la baja variabilidad genética puede deberse a otros factores. Es necesario realizar investigación enfocada en este tema en el complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura*. En el caso de que las diferencias en la coloración de la cola se debieran a variaciones intraespecíficas, sería importante conocer cuál es la función adaptativa del color y si determinada coloración otorga mayor aptitud a ciertos individuos. Estos datos también proveerían evidencia que permita distinguir que tipo de selección (estabilizadora, direccional o disruptiva) estaría actuando en este carácter (Freeman y Herron, 2000, 291; Dale, 2006, 39).

La baja variabilidad genética entre los individuos del complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* podría ser un indicador de la hibridación entre ambas especies, en caso este proceso esté ocurriendo. El aislamiento reproductivo o la hibridación dependen de la extensión de la divergencia existente entre las especies (Gill, 2007, 578). Por lo tanto, la baja variabilidad genética entre los individuos de los tres grupos analizados, podría indicar que no hay aislamiento reproductivo entre estos grupos.

Aunque molecularmente no se observaron diferencias, fenotípicamente sí se diferencian tres grupos. Tomando en cuenta lo mencionado en relación a que las especies de aves han sido descritas basándose principalmente en características morfológicas, como lo es la coloración del plumaje, considero que es necesario contar con más evidencia molecular previo a concluir si los individuos del grupo *Amazilia* sp. deben ser considerados: híbridos, individuos con variación intraespecífica o una nueva especie.

Además, se debe tomar en cuenta la biología de los individuos. Es importante conocer las parejas que se forman durante la reproducción y evaluar si existen otras fuentes de diferenciación de los grupos (dieta, canto), ya que únicamente enlazando los diferentes aspectos se obtendrá una visión más acercada a la realidad.

## 10. Conclusiones

- 10.1 En *A. beryllina* se encontraron diferencias entre los individuos en la extensión del parche de coloración rojiza presente en las alas, incluso en individuos colectados en el mismo sitio (San Pedro Yepocapa, Chimaltenango); lo mismo ocurrió con el grupo *Amazilia* sp. (Patulul, Suchitepéquez). En el grupo *A. cyanura* existió diferencia en la extensión del parche dependiendo del sexo. Estas variaciones intraespecíficas hacen que la extensión del parche de color rojizo en las alas se traslape entre las diferentes especies, lo que impide el uso de esta característica para separarlas y menos aún detectar la presencia de híbridos.
- 10.2 El color de las plumas supracaudales presenta variación dentro de los grupos *A. beryllina* y *Amazilia* sp., siendo uniforme únicamente en *A. cyanura*. Por esta razón, esta característica solamente permite separar los individuos *A. cyanura* del grupo *A. beryllina* – *Amazilia* sp.
- 10.3 La coloración de la cola fue la única característica evaluada que permitió separar a los individuos en grupos: *A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp. Por lo tanto, esta es la característica física que debe tomarse en cuenta para separar a los individuos en diferentes grupos.
- 10.4 También debe notarse que en los tres grupos definidos (*A. beryllina*, *A. cyanura* y *Amazilia* sp.) por los datos numéricos de la coloración de la cola, ciertas plumas y regiones de las plumas tienen mayor importancia para separar a los individuos (RD3B, RD5C, RD1A y RD3A). Debe seguirse analizando el uso de estas regiones para la asignación de individuos a los grupos de las diferentes subespecies del complejo *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.
- 10.5 Los individuos del complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* analizados presentaron baja variabilidad genética. La baja variabilidad genética encontrada impidió diferenciar una especie de la otra y por lo tanto, distinguir si los individuos del grupo *Amazilia* sp. representan híbridos entre ambas especies o su coloración variable en las plumas de la cola se debe simplemente a variación intraespecífica.

- 10.6 La baja variabilidad genética entre los individuos del complejo de especies *A. beryllina* – *A. cyanura* podría ser un indicador de hibridación entre ambas especies, en caso este proceso esté ocurriendo. Por lo tanto, la baja variabilidad genética entre los individuos de los tres grupos analizados, mostraría que no hay aislamiento reproductivo entre estos grupos.
- 10.7 Aunque molecularmente no se observaron diferencias, fenotípicamente sí se diferencian tres grupos, por lo que la hipótesis propuesta que indica que existe hibridación entre las especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* no se puede rechazar.

## 11.Recomendaciones

- 11.1 Los especímenes en que se han basado las descripciones morfológicas de las especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura* se encuentran depositados en diferentes museos alrededor del mundo. La revisión de estos especímenes permitiría tener una muestra grande de las colectas realizadas en el área de distribución de las especies y así lograr una estandarización en la descripción morfológica de los individuos del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*. Por lo tanto, se recomienda hacer una revisión de los especímenes depositados en museos y describir las especies y subespecies tomando en cuenta individuos de toda el área de distribución.
- 11.2 El estudio de diferentes aspectos de las especies permiten tener una visión más amplia de su separación ecológica, la cual guía muchas veces a procesos de especiación. Es importante conocer a fondo si existe diferencia en cuanto a la base alimentaria del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *Amazilia cyanura*, incluyendo las fuentes de néctar y artrópodos, ya que la competencia interespecífica por alimento guía muchas veces a la divergencia morfológica de los individuos. Así también se debe tomar en cuenta el estudio de la biología reproductiva, incluyendo: despliegues de cortejo, apareamiento y anidación, esto permitirá observar las parejas que se forman, la descendencia que producen, la viabilidad de sus huevos y polluelos. De esta manera se tendrá una visión más amplia de las especies involucradas y se podrá observar directamente si está ocurriendo hibridación entre ambas.
- 11.3 Debido a la baja variabilidad genética encontrada en los individuos colectados se debe continuar analizando la variabilidad genética del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *Amazilia cyanura*. Se sugiere utilizar otros genes o técnicas moleculares que permitan identificar las diferencias entre las especies y así poder determinar si existe hibridación o no entre ambas. Las técnicas moleculares que se sugiere trabajar son: Análisis de Microsatélites y Análisis de Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados, ya que por ser técnicas utilizadas en el estudio de genética de poblaciones, permiten detectar diferencias más finas entre los individuos.

## 12.Referencias

- Akaike, H. (1973). Information Theory and an Extension of the Maximum Likelihood Principle. En: Petrov, P.N. y Csaki, F. (Eds.) *Second International Symposium of Information Theory*. Budapest: (s.n.).
- Allen, E.S. y Omland, K.E. (2003). Novel intron phylogeny supports plumage convergence in orioles (*Icterus*). *The Auk*, 120(4), 961-969.
- American Veterinary Medical Association. (2007). Guidelines on euthanasia. Recuperado de: [http://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](http://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf)
- Baldrige, F.A., Kiff, L.F., Baldrige, S.K. y Hansen, R.B. (1983). Hybridization of a Blue-throated Hummingbird in California. *Western Birds*, 14, 17-30.
- Banks, R.C. y Johnson, N.K. (1961). A review of North American hybrid hummingbirds. *Condor*, 63, 3-28.
- Bassett, F. y Cubie, D. (2009). Wintering hummingbirds in Alabama and Florida: Species diversity, sex and age ratios, and site fidelity. *Journal of Field Ornithology*, 80(2), 154-162.
- Binford, L.C. (1985). Re-evaluation of the "hybrid" hummingbird *Cyanthus sordidus* x *C. latirostris* from Mexico. *Condor*, 87, 148-150.
- Borge, T., Webster, M.T., Andersson, G. y Saetre, G.P. (2005). Contrasting patterns of polymorphism and divergence on the Z chromosome and autosomes in two *Ficedula* flycatcher species. *Genetics*, 171, 1861-1873.
- Brice, A.T. (1992). The essentiality of nectar and arthropods in the diet of the Anna's Hummingbird. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101A(1), 151-155.

Camfield, A. (2004). Trochilidae. Animal Diversity Web. Universidad de Michigan. Recuperado de: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Trochilidae.html>.

Chambers, G.K. y McAvoy, E. (1999). Molecular genetics analysis of hybridisation. *Science for Conservation*, 105, 1-29.

Cicero, C. y Johnson, N.K. (2001). Higher-level phylogeny of new world vireos (Aves: Vireonidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20, 27-40.

Cortés-Ortiz, L., Duda, T.F., Canales-Espinosa, D., García-Orduña, F., Rodríguez-Luna, E. y Bermingham, E. (2007). Hybridization in large-bodied new world primates. *Genetics*, 176, 2421-2425.

Dale, J. (2006). Intraspecific variation in coloration. En: Gill, G.E. y McGraw, K.J. (Eds.). *Bird coloration, function and evolution*. Estados Unidos de América: Harvard University.

Daniel, W. (2002). *Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud* (4a. ed.). México: Limaza.

Doucet, S.M., Shawkey, M.D., Rathburn, M.K., Mays, H.L. y Montgomerie, R. (2004). Concordant evolution of plumage colour, feather microstructure and a melanocortin receptor gene between mainland and island populations of a fairy-wren. *Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences*, 271, 1663-1670.

Eisermann, K. y Avendaño, C. (2007). *Lista comentada de las aves de Guatemala*. España: Lynx.

Elliston, E.P. y Baltosser, W.H. (1995). Sex ratios and bill growth in nestling Black-chinned Hummingbird. *Western Birds*, 26, 76-81.

- Endler, J.A. (1990). On the measurement and classification of colour in studies of animal colour patterns. *Biological Journal of the Linnean Society*, 41, 315-352.
- Evans, S.R. y Sheldon, B.C. (2008). Interspecific patterns of genetic diversity in birds: correlations with extinction risk. *Conservation Biology*, 22(4), 1016-1025.
- Fischer, M.C., Foll, M., Excoffier, L. y Heckel, G. (2011). Enhanced AFLP genome scans detect local adaptation in high-altitude populations of a small rodent (*Microtus arvalis*). *Molecular Ecology*, 20, 1450-1462.
- Fjeldså, J., Zuccon, D., Irestedt, M., Johansson, U.S. y Ericson, P.G.P. (2003). *Sapayoa aenigma*: a new world representative of "old world suboscines". *Proceedings of the Royal Society, Biological Sciences*, 270, S238-S241.
- Floyd, T. (2008). *Smithsonian field guide to the birds of North America*. Singapur: Harper Collins.
- Foster, P.G. (2001). Likelihood in molecular phylogenetics. The Natural History Museum. Londres. Recuperado de: <http://bioinf.ncl.ac.uk/molsys/data/like.pdf>
- Fraser, K., Diamond, A.W. y Chavarría, L. (2010). Evidence of altitudinal moult-migration in a Central American hummingbird, *Amazilia cyanura*. *Journal of Tropical Ecology*, 26, 645-648.
- Freeman, S. y Herron, J.C. (2000). *Evolutionary analysis* (2nd. ed.). Estados Unidos de América: Prentice Hall.
- Garrigues, R. y Dean, R. (2007). *The birds of Costa Rica: A field guide*. Estados Unidos de América: Cornell University.

- Gaunt, A.S., Oring, L.W., Able, K.P., Anderson, D.W., Baptista, L.P., Barlow, J.C. y Wingfield, J.C. (1997). *Guidelines to the use of wild birds in research*. Estados Unidos de América: The Ornithological Council.
- Gill, F.B. (2007). *Ornithology* (3rd. ed.). Estados Unidos de América: W.H. Freeman and Company.
- Gill, F.B., Stokes, F.J. y Stokes, C. (1973). Contact zones and hybridization in the Jamaican Hummingbird, *Trochilus polytmus* (L.). *Condor*, 75, 170-176.
- Gotelli, N. y Ellison, A. (2004). *A primer of ecological statistics*. Estados Unidos de América: Sinauer.
- Goulet, H. y Huber, J.T. (1993). *Hymenoptera of the World: An Identification Guide to Families*. Canadá: Center for Land and Biological Resources Research.
- Grant, P.R. y Grant, B.R. (1992). Hybridization of bird species. *Science*, 256, 193-197.
- Graves, G.R. (2003). Diagnoses of hybrid hummingbirds (Aves: Trochilidae). 12. *Amazilia bangsi* Ridgway, 1910, is an intrageneric hybrid, *Amazilia tzacatl* x *Amazilia rutila*. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 116(4), 847-852.
- Graves, G.R. (2007). Diagnoses of hybrid hummingbirds (Aves: Trochilidae). 15. A new intergeneric hybrid (*Hylocharis leucotis* x *Selasphorus platycercus*) from the Huachuca Mountains, Southeastern Arizona. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 120(1), 99-105.
- Graves, G.R. y Zusi, R.L. (1990). An intergeneric hybrid hummingbird (*Heliodoxa leadbeateri* x *Heliangelus amethysticollis*) from northern Colombia. *Condor*, 92, 754-760.
- Griscom, L. (1932). The Distribution of Bird-Life in Guatemala. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 64, 1-458.

- Hackett, S. (1996). Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular phylogenetics and evolution*, 5(2), 368-382.
- Hackett, S., Kimball, R.T., Reddy, S., Bowie, R.C.K., Braun, E.L., Braun, M.J., et al. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320(5884), 1763-1768.
- Hardesty, J. (2009). Using Nitrogen-15 to examine protein sources in hummingbird diets. *Ornitología Colombiana*, 8, 19-28.
- Höglund, J. (2009). *Evolutionary Conservation Genetics*. Gran Bretaña: Oxford University.
- Howell, S.N.G. (2002). *Hummingbirds of North America: The photographic guide*. Estados Unidos de América: Academic.
- Howell, S.N.G. y Gardali, T. (2003). Phenology, sex ratios, and population trends of *Selasphorus* hummingbirds in central coastal California. *Journal of Field Ornithology*, 74(1), 17-25.
- Howell, S.N.G. y Webb, S. (1995). *A guide to the birds of Mexico and Northern Central America*. Estados Unidos de América: Oxford University.
- Idrobo, C.J. y Cortés Herrera, J.O. (2006). Colibríes cazando jejenes: el caso de dos especies de *Amazilia* en los Andes Colombianos. *Boletín SAO*, 16(2), 40-45.
- Irestedt, M., Fjeldså, J., Johansson, U.S. y Ericson P.G. (2002). Systematic relationships and biogeography of the tracheophone suboscines (Aves: Passeriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(3), 499-512.
- Jiménez, R.A. (2009). Comparación de la efectividad de dos métodos para capturar colibríes (Aves: Trochilidae) en un área neotropical. En: Jiménez, R.A. *Informe Final de Ejercicio Profesional Supervisado*. Guatemala.

- Kershaw, F.L.A. (2006). *The co-evolution of hummingbird bill morphology and floral structures with regard to both native and non-native flower species*. Reino Unido. University of Leeds.
- Kimball, R.T., Braun, E.L., Barker, F.K., Bowie, R.C.K., Braun, M.J., Chojnowski, J.L., et al. (2009). A well-tested set of primers to amplify regions spread across the avian genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50, 654-660.
- Land, H. (1970). *Birds of Guatemala*. Estados Unidos de América: Livingston.
- López B., E.A. (2009). Diseño y análisis de experimentos. Universidad de San Carlos de Guatemala. Recuperado de: <http://cete.iespana.es/cursos/estadap/emodest.pdf>.
- López-Calleja, M.V., Fernández, M.J. y Bozinovic, F. (2003). The integration of energy and nitrogen balance in the hummingbird *Sephanoides sephanoides*. *The Journal of Experimental Biology*, 206, 3349-3359.
- Marini, M.A. y Hackett, S.J. (2002). A multifaceted approach to the characterization of an intergeneric hybrid manakin (Pipridae) from Brazil. *The Auk*, 119(4), 1114-1120.
- McAlpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, H.J., Vockeroth, J.R. y Wood, D.M. (1981). *Manual of nearctic Diptera*. Canada: Canadian Government.
- McCarthy, E.M. (2006). *Handbook of avian hybrids of the world*. Estados Unidos de América: Oxford University.
- McGuire, J.A., Witt, C.C., Altshuler, D.L. y Remsen, J.V. (2007). Phylogenetic systematics and biogeography of hummingbirds: Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. *Systematics Biology*, 56(5), 837-856.

- McGuire, J.A., Witt, C.C., Renssen, J.V., Dudley, R. y Altshuler, D.L. (2009). A higher-level taxonomy for hummingbirds. *Journal of Ornithology*, 150, 155-165.
- Merritt, R.W., Cummins, K.W. y Berg, M.B. (2009). *An introduction to the aquatic insects of North America* (4th. ed.). Estados Unidos de América: Kendall/Hunt.
- Milá, B., Smith, T.B. y Wayne, R.K. (2007). Speciation and rapid phenotypic differentiation in the Yellow-rumped warbler *Dendroica coronate* complex. *Molecular Ecology*, 16, 159-173.
- Moore, W.S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49(4), 718-726.
- National Geographic. (2002). *Field guide to the birds of North America* (4th. ed.). Estados Unidos de América: National Geographic.
- Nguembock, B., Fjeldså, J., Couloux, A. y Pasquet, E. (2008). Phylogeny of *Laniarius*: molecular data reveal *L. liberatus* synonymous with *L. erlangeri* and “plumage coloration” as unreliable morphological characters for defining species and species groups. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 396-407.
- Nylander, J.A.A. (2004). *MrModeltest v.2*. Programa distribuido por el autor. Suecia: Evolutionay Biology Centre, Uppsala University.
- Opperdoes, F. (1997). Maximum likelihood. Instituto de Duve. Bélgica. Recuperado de: [http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/max\\_likeli.html](http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/private/max_likeli.html)
- Pálsson, S., Vigfúsdóttir, F. y Ingólfsson, A. (2009). Morphological and genetic patterns of hybridization of Herring gulls (*Larus argentatus*) and Glaucous gulls (*L. hyperboreus*) in Iceland. *The Auk*, 126(2), 376-382.
- Parra, J.L. (2010). Color evolution in the hummingbird genus *Coeligena*. *Evolution*, 64(2), 324-335.

- Peterson, R.T. y Chalif, L. (1973). *A field guide to Mexican birds*. Estados Unidos de América: Houghton Mifflin.
- Posadas, D. y Crandall, K.A. (1998). ModelTest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14, 817-818.
- Primmer, C.R., Borge, T., Lindell, J. y Saetre, G.P. (2002). Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Molecular Ecology*, 11, 603-612.
- Pyle, P. (1997). *Identification guide to North American birds* (Vols. 1 – 2). Estados Unidos de América: Slate Creek.
- Resh, V.H. y Cardé, R.T. (2009). *Encyclopedia of insects* (2nd. ed.). China: Macmillan.
- Ridgway, R. (1911). The birds of North and Middle America. *Bulletin of the United States National Museum*, 50(5), 1-964.
- Rodríguez-Flores, C. y Stiles, F.G. (2005). Análisis ecomorfológico de una comunidad de colibríes hermitaños (Trochilidae, Phaethorninae) y sus flores en la Amazonia colombiana. *Ornitología Colombiana*, 3, 7-27.
- Salvin, O. y Godman, F.D. (1892). *Biología Centrali-Americana* (Vols. 1-4). Inglaterra: Taylor and Francis. Recuperado de: <http://www.sil.si.edu/DigitalCollections/bca/explore.cfm>
- Salvin, O. y Hartert, E. (1892). *Catalogue of the birds in the British Museum Volumen 16*. Inglaterra: Taylor and Frances.
- Schuchmann, K.L. (1999). Family Trochilidae. En: *Handbook of the Birds of the World Volumen 5: Barn-owls to Hummingbirds*. (Eds.) del Hoyo, J., Elliott, A. y Sargatal, J. (pp. 468 – 680). Barcelona: Lynx.

- Sellas, A. (2008). *Bowie Lab Protocol: Museum of Vertebrate Zoology*. Estados Unidos de América.
- Shepherd, L.D. y Perrie, L.R. (2011). Microsatellite DNA analyses of a highly disjunct New Zealand tree reveal strong differentiation and imply a formerly more continuous distribution. *Molecular Ecology*, 20, 1389-1400.
- Sibley, D.A. (2000). *The Sibley guide to birds*. China: Alfred A. Knopf.
- Solomon, E.P., Berg, L.R. y Martin, D.W. (2001). *Biología* (5a. ed.). México: McGraw-Hill Interamericana.
- Stamatakis, A. (2006). Raxml-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688-2690.
- Stiles, F.G. (1980). The annual cycle in a tropical wet forest hummingbird community. *Ibis*, 122, 322-343.
- Stiles, F.G. (1995a). Intraspecific and interspecific variation in molt patterns of some tropical hummingbirds. *The Auk*, 112(1), 118-132.
- Stiles, F.G. (1995b). Behavioral, ecological and morphological correlates of foraging for arthropods by the hummingbirds of a tropical wet forest. *The Condor*, 97, 853-878.
- Stiles, F.G. y Skutch, A.F. (2003). *Guía de aves de Costa Rica* (3a. ed.). Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad (INBIO).
- Swofford, D.L. (2003). *PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tello, J.G. y Bates, J.M. (2007). Molecular phylogenetics of the Tody-tyrant and Flatbill assemblage of tyrant flycatchers (Tyrannidae). *The Auk*, 124(1), 134-154.

- Theron, E., Hawkins, K., Bermingham, E., Ricklefs, R.E. y Mundy, N.I. (2001). The molecular basis of an avian plumaje polymorphism in the wild: A melanocortin-1-receptor point mutation is perfectly associated with the melanic plumage morph of the bananaquit, *Coereba flaveola*. *Current Biology*, *11*, 550-557.
- Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza - WWF. (1999). *Lista de fauna de importancia para la conservación en Centroamérica y México: listas rojas, listas oficiales y especies en apéndices CITES*. Costa Rica: (s.n.).
- Vallender, R., Robertson, R.J., Friesen, V.L. y Lovette, J. (2007). Complex hybridization dynamics between Golden-winged and Blue-winged warblers (*Vermivora chrysoptera* and *Vermivora pinus*) revealed by AFLP, microsatellite, intron and mtDNA markers. *Molecular Ecology*, *16*, 2017-2029.
- Welch, A.J., Yoshida, A.A. y Fleischer, R.C. (2011). Mitochondrial and nuclear DNA sequences reveal recent divergence in morphologically indistinguishable petrels. *Molecular Ecology*, *20*, 1364-1377.
- Williamson, S. (2001). *Hummingbirds of North America*. Singapur: Houghton Mifflin Company.
- Wolf, L.L. (1969). Female territoriality in a tropical hummingbird. *The Auk*, *86*, 490-504.
- Zink, R.M. (2002). A new perspective on the evolutionary history of Darwin's finches. *The Auk*, *119*(3), 864-871.
- Zumbado, M.A. (2006). *Dípteros de Costa Rica y la América Tropical*. Costa Rica: Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio).

### **13. Anexos**

#### **Anexo 1**

##### **Procedimiento de Toma de Mediciones Cuantitativas de la Coloración de la Cola**

El procedimiento de toma de mediciones fue así:

- Se tomó un espectro de referencia utilizando el STAN-SSH High-reflectivity Specular Reference Standard (Ocean Optics, Dunedin, FL).
- Se tomó un espectro oscuro utilizando una franela negra.
- Se colocó un individuo sobre la franela negra y se tomaron las mediciones de una pluma (base, centro, ápice) utilizando el modo "Transmission" en la barra de herramientas del software OOIBase32 (Ocean Optics, Dunedin, FL).

NOTA: Después de tomar las tres mediciones de una pluma se volvió a marcar el espectro de referencia y el espectro oscuro.

## Anexo 2

### Procedimiento Detallado de la Obtención de Secuencias de ADN

#### Extracción de ADN de los Tejidos

El ADN fue extraído de tejidos preservados en Etanol o Buffer DMSO con NaCl 20% (músculo, hígado). La extracción del ADN de 12 de las 32 muestras se realizó con el método estándar con Cloruro de Sodio (NaCl). El ADN de las 20 muestras restantes fue extraído con el equipo *DNAeasy Blood & Tissue* (Qiagen). El ADN fue cuantificado en todas las muestras utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE). El ADN presentó concentraciones muy altas en las extracciones realizadas con Cloruro de Sodio, con excepción de la muestra RAJ115 (**Tabla A2.1**).

Procedimiento de Extracción de ADN utilizando el equipo de extracción *DNAeasy Blood & Tissue* (Qiagen):

- Rotular tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, un tubo para cada muestra.
- Agregar 180  $\mu$ L de Buffer ATL a cada tubo.
- Agregar 20  $\mu$ L de solución de Proteinasa K a cada tubo.
- Colocar 1 mm<sup>3</sup> de tejido en los tubos.
- Digerir por una noche en el horno a 55°C. Colocar los tubos en los giradores dentro del horno.
- Calentar Buffer AE a 55°C.
- Agregar 200  $\mu$ L de Buffer AL a cada tubo.
- Vortex.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 14,000 rpm por pocos segundos.
- Agregar 200  $\mu$ L de etanol 100° a cada tubo.
- Vortex.

**Tabla A2.1.** Método de extracción de ADN utilizado en las diferentes muestras y concentración de ADN obtenida en cada una de ellas.

<b>Extracción estándar con Cloruro de Sodio</b>		<b>Equipo <i>DNAeasy Blood &amp; Tissue</i> (Qiagen)</b>	
Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)	Muestra	Concentración de ADN (ng/ $\mu$ L)
RAJ111	437.0	RAJ133	85.8
RAJ112	146.4	RAJ134	66.4
RAJ113	146.8	RAJ136	70.4
RAJ115	7.7	RAJ137	58.4
RAJ116	145.7	RAJ140	66.8
RAJ124	165.2	RAJ150	50.1
RAJ127	153.4	RAJ152	117.5
RAJ128	157.3	RAJ153	71.6
RAJ129	190.8	RAJ154	70.1
RAJ130	372.0	RAJ155	61.2
RAJ131	373.6	RAJ156	83.9
RAJ132	370.7	RAJ157	141.5
		RAJ158	117.0
		RAJ159	135.7
		RAJ160	79.4
		RAJ161	86.7
		RAJ162	54.5
		RAJ163	62.2
		RAJ164	79.9
		RAJ165	118.5

- Centrifugar los tubos Eppendorf a 14,000 rpm por pocos segundos.
- Calentar los tubos a 55°C por 5 minutos.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 14,000 rpm por pocos segundos.
- Pasar 600  $\mu$ L del líquido a tubos con filtro. Un nuevo tubo por cada muestra.

- Centrifugar los tubos Eppendorf a 8,000 rpm por 1 minuto.
- Pasar los filtros a nuevos tubos.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW1 con etanol.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 8,000 rpm por 1 minuto.
- Pasar los filtros a nuevos tubos.
- Agregar 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 con etanol.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 14,000 rpm por 3 minutos.
- Pasar los filtros a nuevos tubos, en este caso se utilizarán tubos con rosca.
- Agregar 180  $\mu\text{L}$  de Buffer AE a 55°C a cada tubo.
- Calentar los tubos a 55°C por 15 minutos.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 8,000 rpm por 1 minuto.
- Quitar la parte del tubo que tiene el filtro.
- Cerrar los tubos y congelar (Sellas, 2008).

#### Procedimiento de Extracción de ADN con Cloruro de Sodio (NaCl):

- Rotular tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, un tubo para cada muestra.
- Agregar 410  $\mu\text{L}$  de Buffer de extracción a cada tubo.
- Agregar 80  $\mu\text{L}$  de SDS 10% a cada tubo.
- Agregar 25  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K a cada tubo.
- Colocar 1  $\text{mm}^3$  de tejido en los tubos.
- Digerir por una noche en el horno a 55°C. Colocar los tubos en los giradores dentro del horno.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 13,000 rpm por 5 minutos.
- Verter el líquido en un nuevo tubo.
- Agregar 180  $\mu\text{L}$  de Cloruro de Sodio (NaCl) 5M a cada tubo.
- Mezclar suavemente alrededor de 50 veces.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 13,000 rpm por 5 minutos.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 13,000 rpm por 5 minutos (no hacer un solo paso de 10 minutos).

- Verter el líquido en un nuevo tubo.
- Agregar 420 µL de Isopropanol frío a cada tubo.
- Mezclar suavemente alrededor de 50 veces.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 13,000 rpm por 15 minutos.
- Descartar el líquido de los tubos Eppendorf.
- Agregar 250 µL de Etanol 80% a cada tubo.
- Mezclar suavemente alrededor de 25 veces.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 13,000 rpm por 10 minutos.
- Descartar el etanol de los tubos Eppendorf.
- Agregar 250 µL de Etanol 80% a cada tubo.
- Mezclar suavemente alrededor de 25 veces.
- Centrifugar los tubos Eppendorf a 13,000 rpm por 10 minutos.
- Descartar el etanol de los tubos Eppendorf.
- Colocar los tubos Eppendorf abiertos en el horno a 55°C para remover el Etanol. Esperar hasta que no se pueda oler el Etanol.
- Agregar 50 µL de Buffer AE a cada tubo.
- Permitir que el ADN se resuspenda durante una noche a temperatura ambiente (Sellas, 2008).

#### Amplificación de ADN

Se utilizó la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) para amplificar el ADN. Se amplificó 1 gen mitocondrial y 9 genes nucleares (**Tabla A2.2**).

**Tabla A2.2.** Genes que se amplificaron para evaluar la diversidad genética del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*.

No.	Gen	Abreviatura	Origen
1	NADH deshidrogenasa subunidad 2	ND2	Mitocondrial
2	$\beta$ Fibrinógeno intrón 5	BFIB5	Nuclear
3	Factor transformador del crecimiento $\beta$ 2	TGFB2	Nuclear
4	Músculo, esqueleto, tirosina quinasa receptor	MUSK	Nuclear
5	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH	Nuclear
6	Mioglobina	MYO	Nuclear
7	Brahma intrón 15	BRM	Nuclear
8	Adenil quinasa 1	AK1	Nuclear
9	$\beta$ Fibrinógeno intrón 7	BFIB7	Nuclear
10	Ornitina descarboxilasa	ODC	Nuclear

### **ND2**

Cebadores: H6312 (CTTATTTAAGGCTTTGAAGGCC; Cicero y Johnson, 2001, 27-30; Tello y Bates, 2007, 137)

L5204 (TAACTAAGCTATCGGGCGCAT; diseñado por S. Hackett)

Mezcla para PCR – 9  $\mu$ L mezcla + 1  $\mu$ L ADN

Protocolo del Termociclador

		T (°C)	Tiempo
Agua	5.63 $\mu$ L	94	3 min
Buffer 10X Invitrogen	1.00 $\mu$ L	94	30 seg
50mM MgCl <sub>2</sub>	0.30 $\mu$ L	50 <sup>1</sup>	30 seg
dNTPs	0.25 $\mu$ L	72	45 seg
BSA	0.60 $\mu$ L	72	10 min
H6312	0.60 $\mu$ L	8	$\infty$
L5204	0.60 $\mu$ L		
Taq Invitrogen	0.12 $\mu$ L		
ADN	1.00 $\mu$ L		

<sup>1</sup> El gen mitocondrial ND2 no fue posible amplificarlo con el protocolo propuesto, por lo que se modificó la temperatura de unión del cebador, se disminuyó de 54 °C a 50°C, obteniéndose de esta manera buena amplificación del gen.

**BFIB5**

Cebadores: Fib5 (CGCCATACAGAGTATACTGTGACAT; Marini y Hackett, 2002, 1115; Tello y Bates, 2007, 137)

Fib6 (GCCATCCTGGCGATTCTGAA; Marini y Hackett, 2002, 1115; Tello y Bates, 2007, 137)

Mezcla para PCR – 12  $\mu$ L mezcla + 2.5  $\mu$ L ADN

Agua	7.20 $\mu$ L
Buffer 10X Invitrogen	1.50 $\mu$ L
50mM MgCl <sub>2</sub>	3.00 $\mu$ L
dNTPs	0.50 $\mu$ L
Fib5	0.25 $\mu$ L
Fib6	0.25 $\mu$ L
Taq Invitrogen	0.15 $\mu$ L
ADN	2.50 $\mu$ L

Protocolo del Termociclador

T (°C)	Tiempo
94	3 min
94	30 seg
54	30 seg
72	45 seg
72	10 min
8	$\infty$

35x

**TGFB2**

Cebadores: 5F (TTGTTACCCTCTACAGACTTGACTC; Primmer y otros, 2002, 611)

6R (GACGCAGGCAGCAATTATCC; Primmer y otros, 2002, 611)

Mezcla para PCR – 12  $\mu$ L mezcla + 2.5  $\mu$ L ADN

Agua	7.20 $\mu$ L
Buffer 10X Invitrogen	1.50 $\mu$ L
50mM MgCl <sub>2</sub>	3.00 $\mu$ L
dNTPs	0.50 $\mu$ L
5F	0.25 $\mu$ L
6R	0.25 $\mu$ L
Taq Invitrogen	0.15 $\mu$ L
ADN	2.50 $\mu$ L

Protocolo del Termociclador

T (°C)	Tiempo
94	3 min
94	30 seg
60	30 seg
72	45 seg
72	8 min
8	$\infty$

35x

**MUSK**

Cebadores: MUSK-I3F (CTTCCATGCACTACAATGGGAAA; Kimball y otros, 2009, 658)

MUSK-I3R (CTCTGAACATTGTGGATCCTCAA; Kimball y otros, 2009, 658)

Mezcla para PCR – 9 $\mu$ L mezcla + 1 $\mu$ L ADN		Protocolo del Termociclador	
		T ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
Agua	5.63 $\mu$ L	94	3 min
Buffer 10X Invitrogen	1.00 $\mu$ L	94	45 seg
50mM MgCl <sub>2</sub>	0.30 $\mu$ L	94	45 seg
dNTPs	0.25 $\mu$ L	50 <sup>2</sup>	45 seg
BSA	0.60 $\mu$ L	72	45 seg
H6312	0.60 $\mu$ L	72	5 min
L5204	0.60 $\mu$ L	8	$\infty$
Taq Invitrogen	0.12 $\mu$ L		
ADN	1.00 $\mu$ L		

35x

**GAPDH**

Cebadores: G3P13b (TCCACCTTTGATGCGGGTGCTGGCAT; Fjelds  y otros, 2003, S238)

G3P14b (AAGTCCACAACACGGTTGCTGTA; Fjelds  y otros, 2003, S238)

Mezcla para PCR – 9 $\mu$ L mezcla + 1 $\mu$ L ADN		Protocolo del Termociclador	
		T ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
Agua	5.63 $\mu$ L	94	3 min
Buffer 10X Invitrogen	1.00 $\mu$ L	94	30 seg
50mM MgCl <sub>2</sub>	0.30 $\mu$ L	94	30 seg
dNTPs	0.25 $\mu$ L	64	30 seg
BSA	0.60 $\mu$ L	72	45 seg
Gapd3P13b	0.60 $\mu$ L	72	5 min
Gapd3P14b	0.60 $\mu$ L	8	$\infty$
Taq Invitrogen	0.12 $\mu$ L		
ADN	1.00 $\mu$ L		

35x

<sup>2</sup> La temperatura de unión del cebador fue disminuida para obtener la amplificación del gen MUSK, de 52  $^{\circ}$ C a 50  $^{\circ}$ C.

**MYO**

Cebadores: Myo2 (GCCACCAAGCACCAAGATCCC; Irestedt y otros, 2002, 499-502; Fjeldså y otros, 2003, S238)

Myo3F (TTCAGCAAGGACCTTGATAATGACTT; Irestedt y otros, 2002, 499-502; Fjeldså y otros, 2003, S238)

Mezcla para PCR – 9 µL mezcla + 1 µL ADN

Agua	5.63 µL
Buffer 10X Invitrogen	1.00 µL
50mM MgCl <sub>2</sub>	0.30 µL
dNTPs	0.25 µL
BSA	0.60 µL
Myo2	0.60 µL
Myo3F	0.60 µL
Taq Invitrogen	0.12 µL
ADN	1.00 µL

Protocolo del Termociclador

T (°C)	Tiempo
94	3 min
94	30 seg
55	30 seg
72	45 seg
72	10 min
8	∞

35x

**BRM**

Cebadores: 15F (AGCACCTTTGAACAGTGGTT; Borge y otros, 2005, 1862; Nguembock y otros, 2008, 397)

15R (TACTTTATGGAGACGACGGA; Borge y otros, 2005, 1862; Nguembock y otros, 2008, 397)

Mezcla para PCR – 12 µL mezcla + 2.5 µL ADN

Agua	7.20 µL
Buffer 10X Invitrogen	1.50 µL
50mM MgCl <sub>2</sub>	3.00 µL
dNTPs	0.50 µL
15F	0.25 µL
15R	0.25 µL
Taq Invitrogen	0.15 µL
ADN	2.50 µL

Protocolo del Termociclador

T (°C)	Tiempo
94	3 min
94	30 seg
54	30 seg
72	45 seg
72	10 min
8	∞

35x

**AK1**

Cebadores: AK5b<sup>+</sup>extended (ATTGACGGCTACCCTCGCGAGGTGAAACAG; McGuire y otros, 2007, 839)

AK6c<sup>-</sup>extended (CACCCGCCCGCTGGTCTCTCTCTCG; McGuire y otros, 2007, 839)

Mezcla para PCR – 11.7 µL mezcla + 0.8 µL ADN

Protocolo del Termociclador

		T (°C)	Tiempo	
Agua	8.37 µL	95	10 min	
Buffer 10X	1.25 µL	92	45 seg	40x
50mM MgCl <sub>2</sub>	0.63 µL	55	1 min	
dNTPs	0.75 µL	72	1 min	
AKB <sup>+</sup> ext	0.25 µL	72	7 min	
AKC <sup>-</sup> ext	0.25 µL	10	∞	
Gold Taq	0.20 µL			
ADN	0.80 µL			

**BFIB7**

Cebadores: FIB-B17U-long (GGAGAAAACAGGACAATGACAATTCACAATGG; McGuire y otros, 2007, 839)

FIB-B17L-long (TCCCCAGTAGTATCTGCCATTAGGGTTGGC; McGuire y otros, 2007, 839)

Mezcla para PCR – 24.2 µL mezcla + 1 µL ADN

Protocolo del Termociclador

		T (°C)	Tiempo	
Agua	17.5 µL	95	2 min	
Buffer 10X Invitrogen	2.50 µL	95	30 seg	40x
50mM MgCl <sub>2</sub>	1.50 µL	50	30 seg	
dNTPs	1.50 µL	72	1.5 min	
BFibu-long	0.50 µL	72	7 min	
BFibL-long	0.50 µL	10	∞	
Taq Invitrogen	0.20 µL			
ADN	1.00 µL			

**ODC**

Cebadores: OD6 (GACTCCAAAGCAGTTTGTCTCAGTGT; Allen y Omland, 2003, 963)

OD8 (ATTGGTGGTGGCTTCCCTGGCTCTGAAGA; Allen y Omland, 2003, 963)

Mezcla para PCR – 24.2 $\mu$ L mezcla + 1 $\mu$ L ADN		Protocolo del Termociclador	
		T ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
Agua	17.0 $\mu$ L	95	2 min
Buffer 10X Invitrogen	2.50 $\mu$ L	95	30 seg
50mM MgCl <sub>2</sub>	1.50 $\mu$ L	56	30 seg
dNTPs	1.50 $\mu$ L	72	1 min
BSA	0.50 $\mu$ L	72	7 min
OF	0.50 $\mu$ L	10	$\infty$
OR	0.50 $\mu$ L		
Taq Invitrogen	0.20 $\mu$ L		
ADN	1.00 $\mu$ L		

40x

**Comprobación de la Amplificación de ADN Mediante Electroforesis**

La amplificación del ADN fue evidenciada utilizando el método de electroforesis. Para esto se preparó un gel de agarosa. La presencia de una banda indicó una correcta amplificación.

- Preparar la solución: 0.80 g de Agarosa/100 mL de Buffer 1XTBE o 2.00 g de Agarosa/250 mL de Buffer 1XTBE.
- Calentar en el horno microondas hasta que la agarosa esté completamente disuelta.
- Enfriar la solución.
- Verter la solución en el marco para preparación de geles.
- Dejar solidificar.
- Cuando el gel se ha solidificado agregar el Buffer para correr (1XTBE reciclado) en la plataforma del gel. Agregar la cantidad de Buffer que permita cubrir completamente al gel.
- Retirar los peines del gel. Cortar y guardar el gel que no será utilizado en el momento.

- Preparar las muestras: tomar 3  $\mu\text{L}$  de Dye y agregarle 2  $\mu\text{L}$  del producto de PCR.
- Agregar las muestras al gel.
- Correr el gel a 100 mV por 30 minutos.
- Utilizar guantes de nitrilo y llevar el gel al baño de Bromuro de Etilo. Dejarlo allí alrededor de 15 – 20 minutos.
- Utilizando una espátula sacar el gel y colocarlo en la caja de luz ultravioleta.
- Observar la imagen en la computadora, guardarla e imprimirla (Sellas, 2008).

El gen mitocondrial ND2 y los genes nucleares BFIB5, TGFB2, MUSK, MYO, AK1 y ODC fueron amplificados correctamente. Los genes nucleares GAPDH, BRM y BFIB7 no se amplificaron con los protocolos utilizados por lo que ya no se continuó trabajando con los mismos.

#### Purificación del ADN Amplificado

Se utilizó el método Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de Camarón (Exo/SAP, por sus siglas en inglés). Es importante purificar el producto del PCR previo a secuenciar para poder obtener secuencias limpias. La Exonucleasa I degrada el exceso de los cebadores utilizados en el PCR. La Fosfatasa Alcalina de Camarón desfosforila los dNTPs utilizados en el PCR.

- Utilizar Exo/SAP diluido. Tomar 50  $\mu\text{L}$  de Exo/SAP puro y agregarle 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada.
- Tomar una nueva placa. Colocar 2.5  $\mu\text{L}$  del Exo/SAP diluido en cada una de las celdas que se utilizará.
- Agregar 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR.
- Sellar la placa y centrifugarla al máximo por 20 segundos.
- Colocar la placa en el termociclador.

### Protocolo del Termociclador

T (°C)	Tiempo
37	30 min
80	15 min
10	∞

(Sellas, 2008)

### Ciclos de Secuenciación

Se utilizaron los ciclos de secuenciación para amplificar el ADN. Cada uno de los cebadores fue trabajado por separado, es decir, se tuvo una mezcla maestra de cada uno.

#### **ND2**

Cebadores: H6312 y L5204

Mezcla – 8  $\mu\text{L}$  mezcla + 2  $\mu\text{L}$  producto Exo/SAP

Agua	5.20 $\mu\text{L}$
Buffer Big Dye	1.50 $\mu\text{L}$
Cebador	0.30 $\mu\text{L}$
Big Dye	1.00 $\mu\text{L}$
Producto Exo/SAP	2.00 $\mu\text{L}$

### Protocolo del Termociclador

T (°C)	Tiempo
96	1 min
96	10 seg
50	5 seg
60	4 min
8	∞

30x

#### **BFIB5**

Cebadores: Fib5 y Fib6

Mezcla – 8  $\mu\text{L}$  mezcla + 3  $\mu\text{L}$  producto Exo/SAP

Agua	4.50 $\mu\text{L}$
Buffer Big Dye	2.50 $\mu\text{L}$
Cebador	0.50 $\mu\text{L}$
Big Dye	0.50 $\mu\text{L}$
Producto Exo/SAP	3.00 $\mu\text{L}$

### Protocolo del Termociclador

T (°C)	Tiempo
96	1 min
96	10 seg
50	5 seg
60	4 min
8	∞

30x

**TGFB2**

Cebadores: 5F y 6R

Mezcla – 8  $\mu\text{L}$  mezcla + 3  $\mu\text{L}$  producto Exo/SAP

Agua	4.50 $\mu\text{L}$
Buffer Big Dye	2.50 $\mu\text{L}$
Cebador	0.50 $\mu\text{L}$
Big Dye	0.50 $\mu\text{L}$
Producto Exo/SAP	3.00 $\mu\text{L}$

Protocolo del Termociclador

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
96	1 min
96	10 seg
54	5 seg
60	4 min
8	$\infty$

35x

**MUSK**

Cebadores: MUSK-I3F y MUSK-I3R

Mezcla – 8  $\mu\text{L}$  mezcla + 2  $\mu\text{L}$  producto Exo/SAP

Agua	4.50 $\mu\text{L}$
Buffer Big Dye	2.50 $\mu\text{L}$
Cebador	0.50 $\mu\text{L}$
Big Dye	0.50 $\mu\text{L}$
Producto Exo/SAP	2.00 $\mu\text{L}$

Protocolo del Termociclador

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
96	1 min
96	10 seg
50	5 seg
60	4 min
8	$\infty$

30x

**MYO**

Cebadores: Myo2 y Myo3F

Mezcla – 8  $\mu\text{L}$  mezcla + 3  $\mu\text{L}$  producto Exo/SAP

Agua	4.00 $\mu\text{L}$
Buffer Big Dye	2.50 $\mu\text{L}$
Cebador	0.75 $\mu\text{L}$
Big Dye	0.75 $\mu\text{L}$
Producto Exo/SAP	3.00 $\mu\text{L}$

Protocolo del Termociclador

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
96	1 min
96	10 seg
50	5 seg
60	4 min
8	$\infty$

30x

**AK1**Cebadores: AK5b<sup>+</sup>extended y AK6c<sup>-</sup>extendedMezcla – 9  $\mu\text{L}$  mezcla + 1  $\mu\text{L}$  producto Exo/SAP

Agua	5.70 $\mu\text{L}$
Buffer Big Dye	1.80 $\mu\text{L}$
Cebador	1.00 $\mu\text{L}$
Big Dye	0.50 $\mu\text{L}$
Producto Exo/SAP	1.00 $\mu\text{L}$

Protocolo del Termociclador

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
95	2 min
95	15 seg
50	15 seg
60	4 min
10	$\infty$

25x

**ODC**

Cebadores: OD6 y OD8

Mezcla – 8  $\mu\text{L}$  mezcla + 2  $\mu\text{L}$  producto Exo/SAP

Agua	4.20 $\mu\text{L}$
Buffer Big Dye	1.80 $\mu\text{L}$
Cebador	1.00 $\mu\text{L}$
Big Dye	1.00 $\mu\text{L}$
Producto Exo/SAP	2.00 $\mu\text{L}$

Protocolo del Termociclador

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo
95	2 min
95	15 seg
54	15 seg
60	4 min
10	$\infty$

25x

**Purificación del Producto de los Ciclos de Secuenciación**

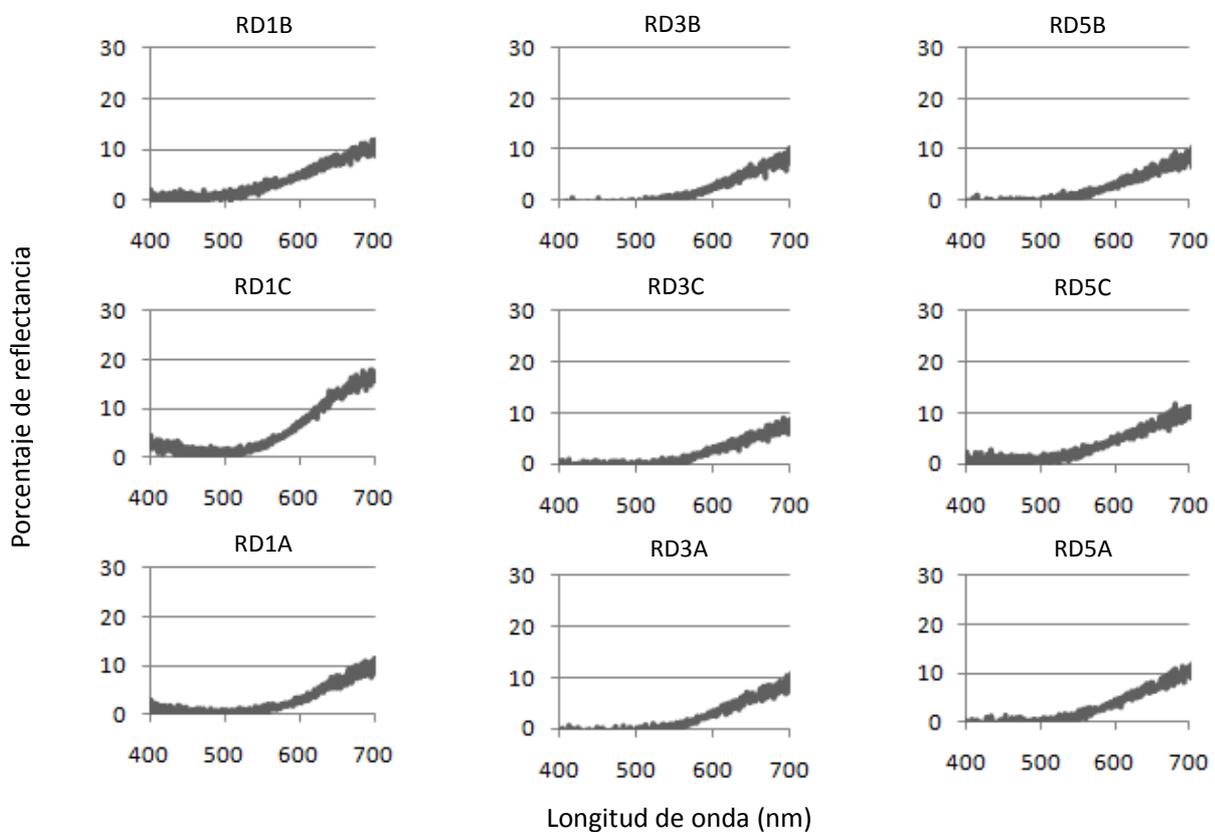
El producto obtenido de los ciclos de secuenciación fue purificado utilizando Sephadex. Se preparó una solución de Sephadex (50 mL de agua + 3 gr de Sephadex). Posteriormente se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de Sephadex en cada celda de una placa. Se centrifugó a 1,500 rpm durante 2 minutos. Se agregó la muestra y se centrifugó de nuevo a 1,500 rpm por 2 minutos, colocando debajo de la placa con Sephadex y la muestra, una placa de secuenciación (Sellas, 2008).

### Secuenciación

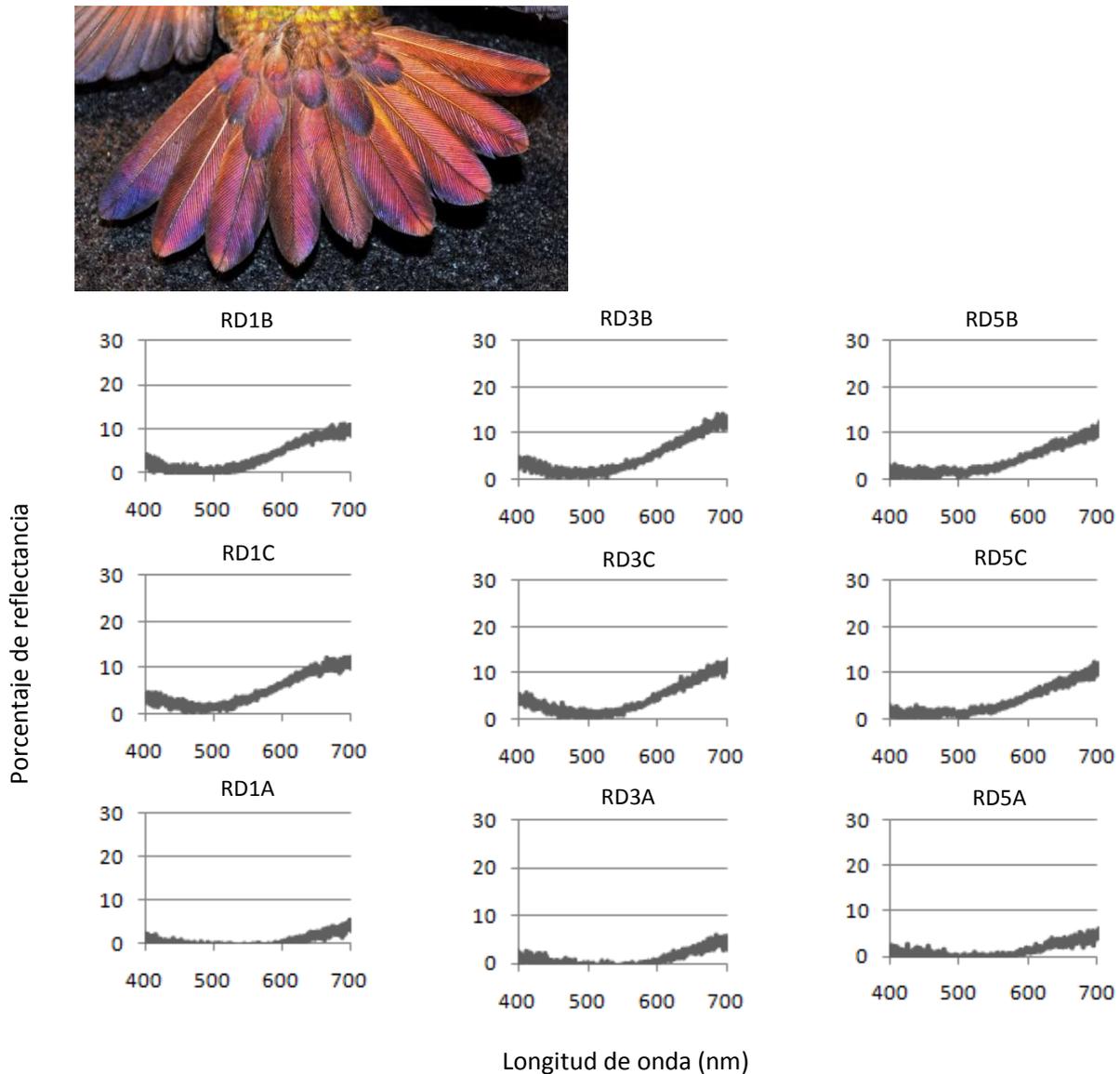
Se utilizó una máquina secuenciadora ABI 3730 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) para obtener las secuencias. De los siete genes que fue posible amplificar, se obtuvieron secuencias de buena calidad del gen mitocondrial ND2 y de los genes nucleares BFIB5, TGFB2, AK1 y ODC. Los genes nucleares MUSK y MYO no fue posible secuenciarlos con los cebadores utilizados.

## Anexo 3

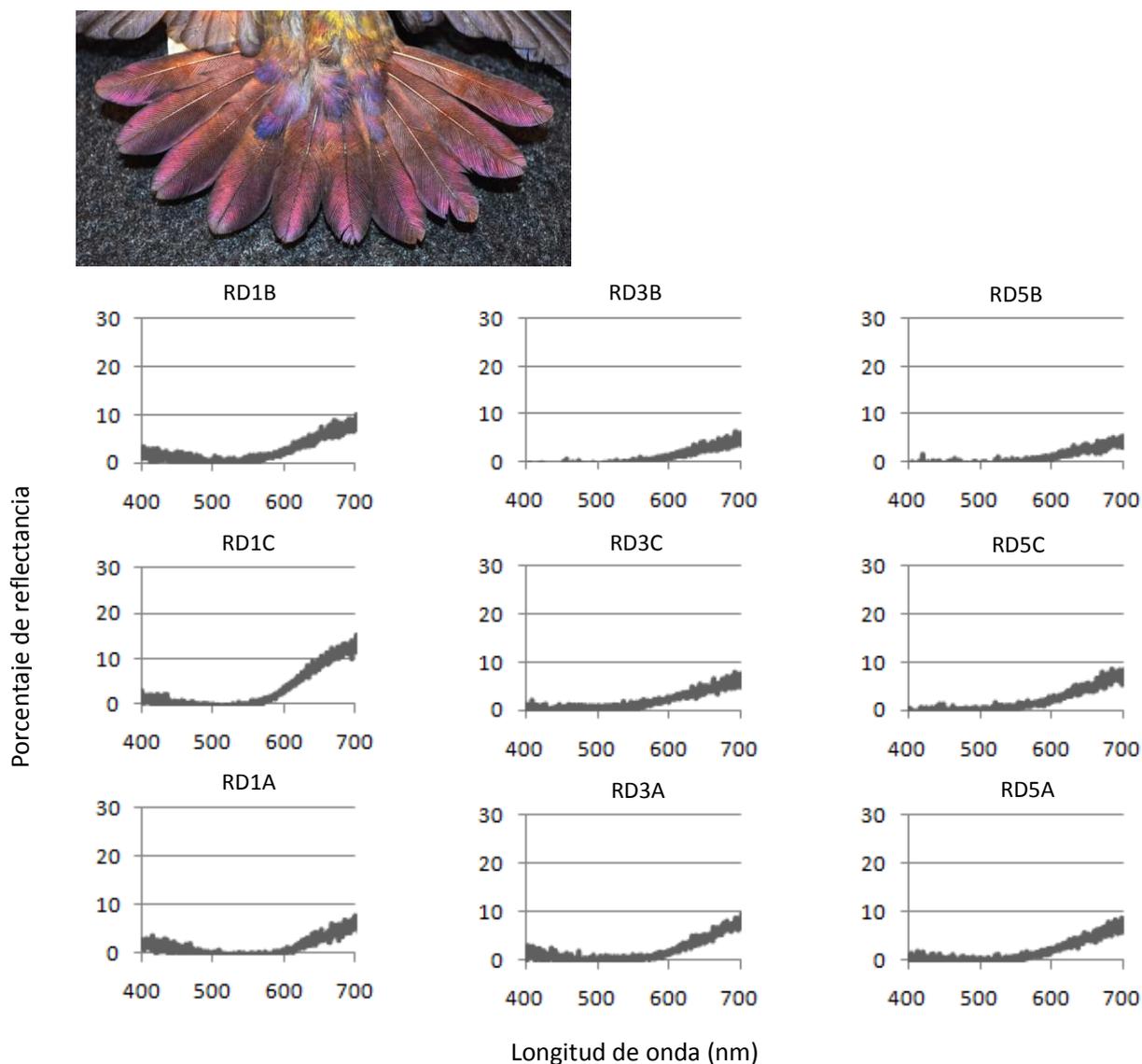
## Coloración de las Plumas de la Cola y Curvas de Reflectancia de los Especímenes Colectados



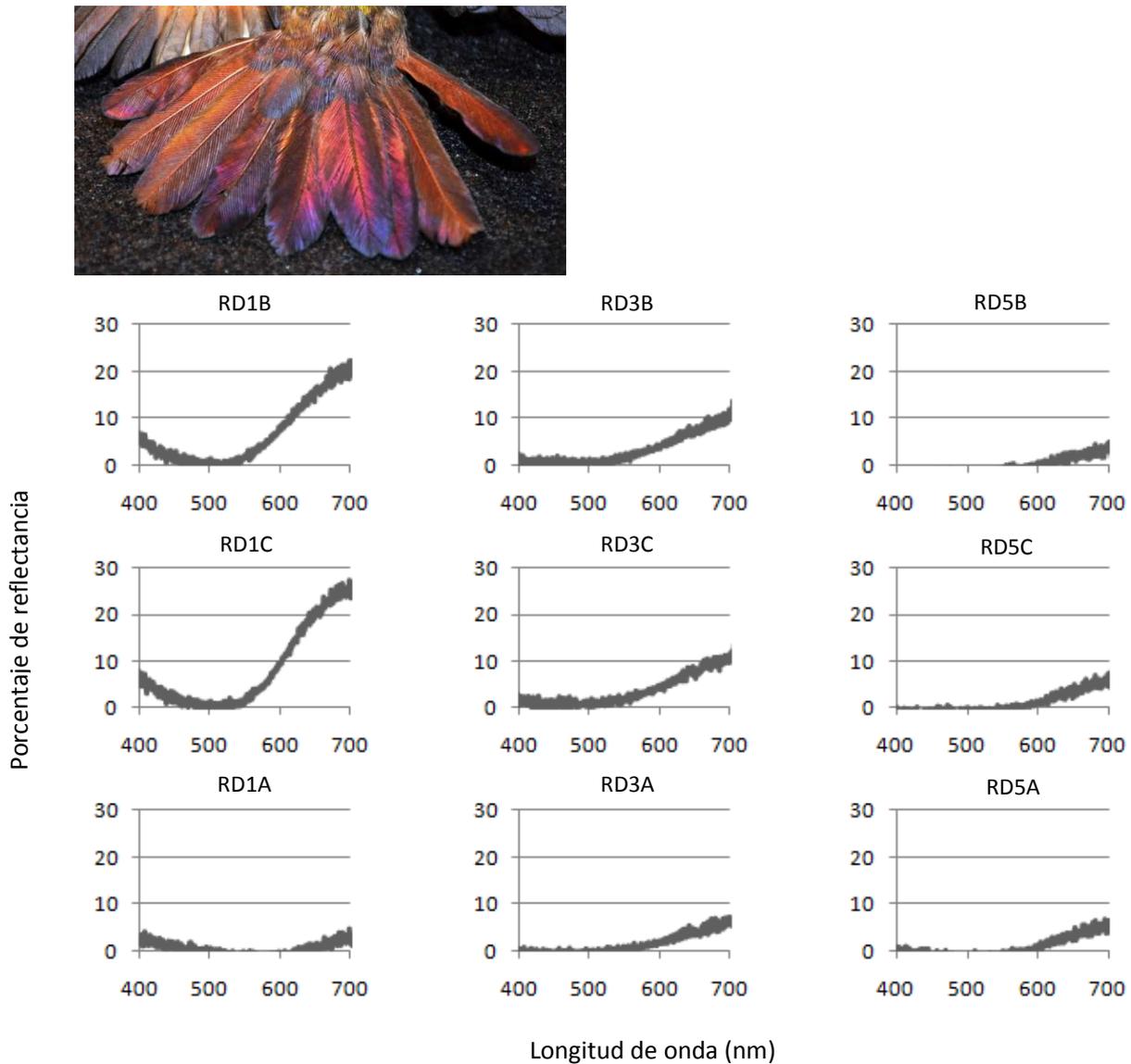
**Figura A3.1.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ115). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



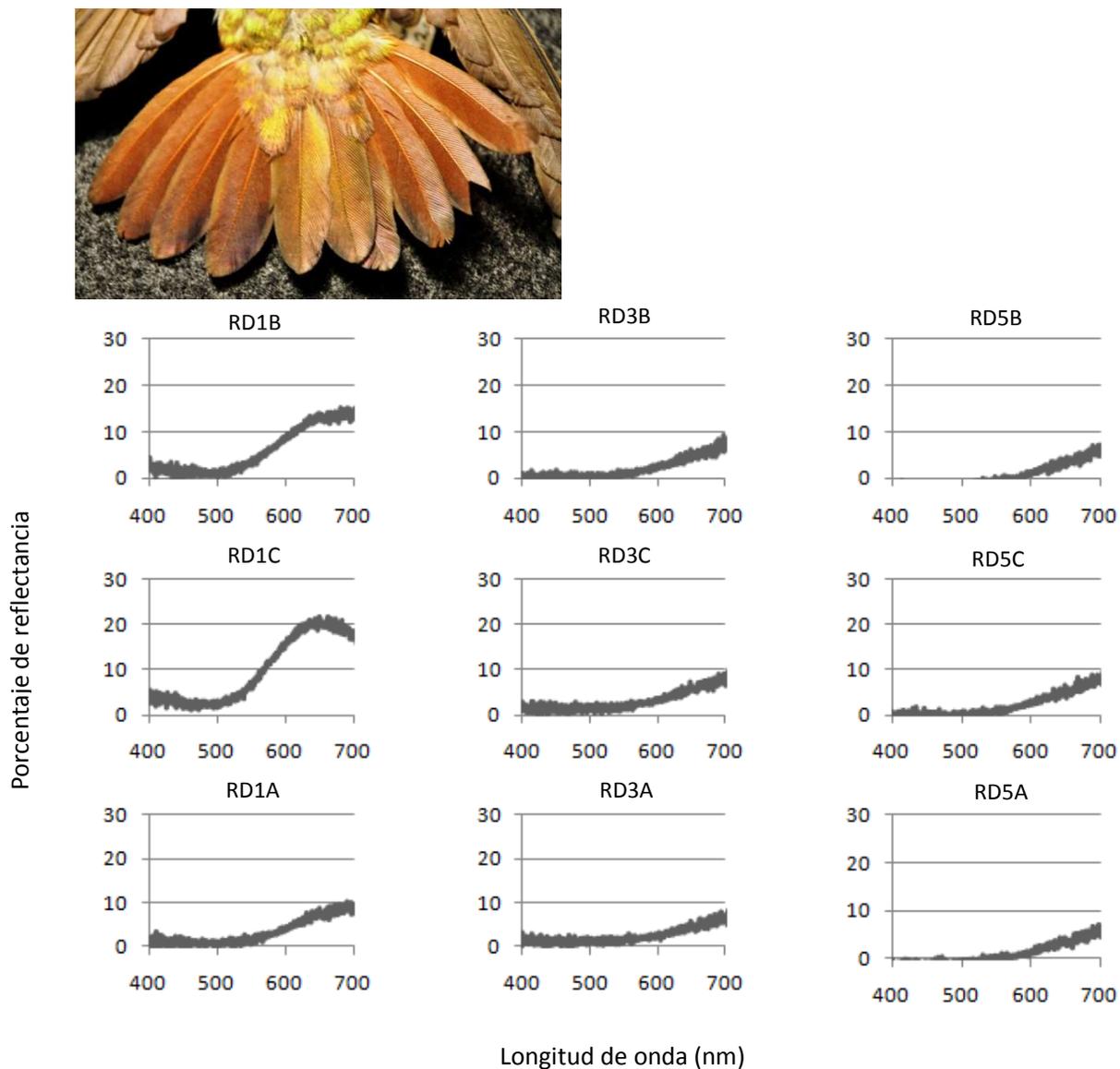
**Figura A3.2.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ116). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



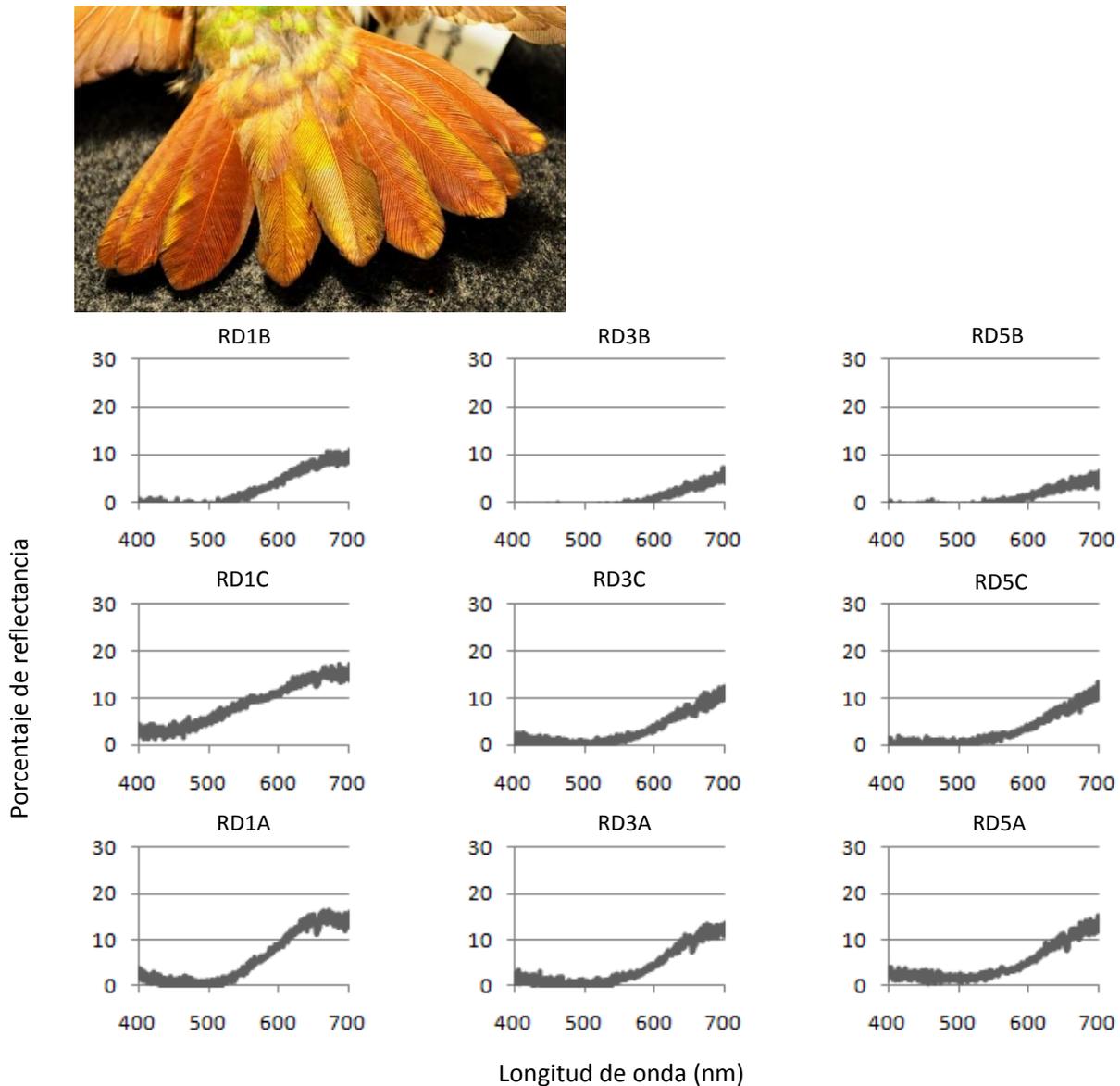
**Figura A3.3.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ134). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



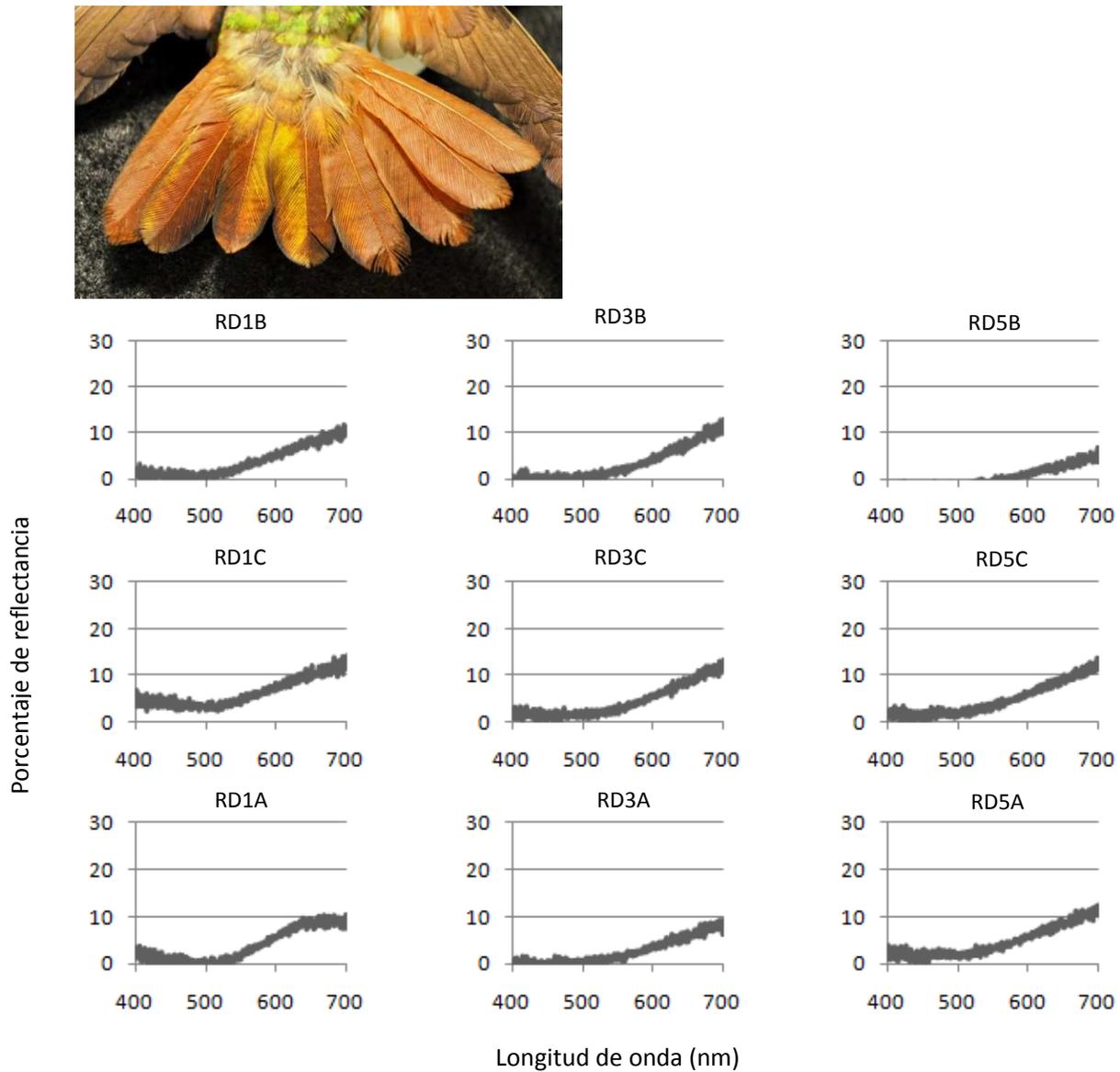
**Figura A3.4.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ137). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



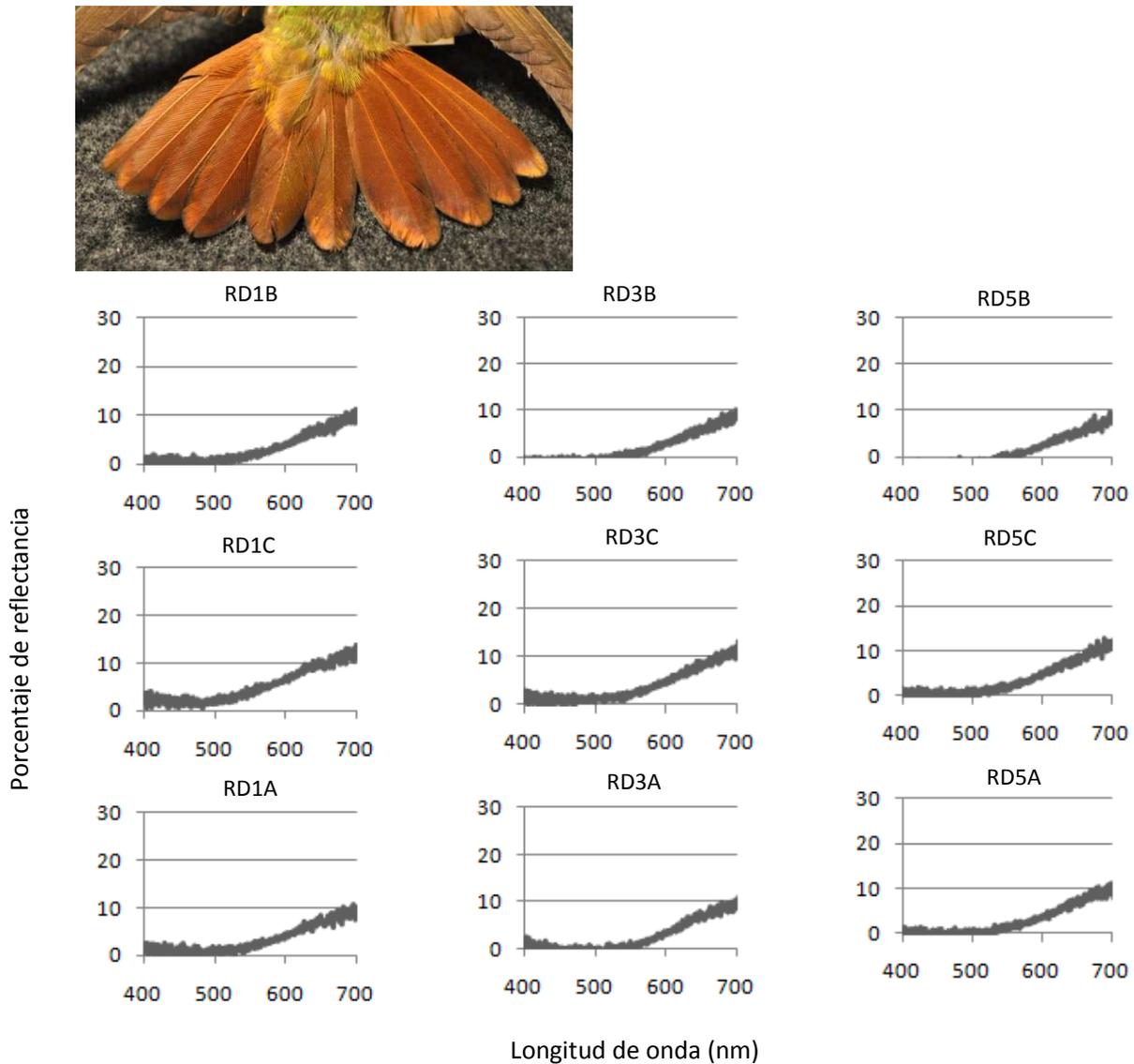
**Figura A3.5.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ150). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



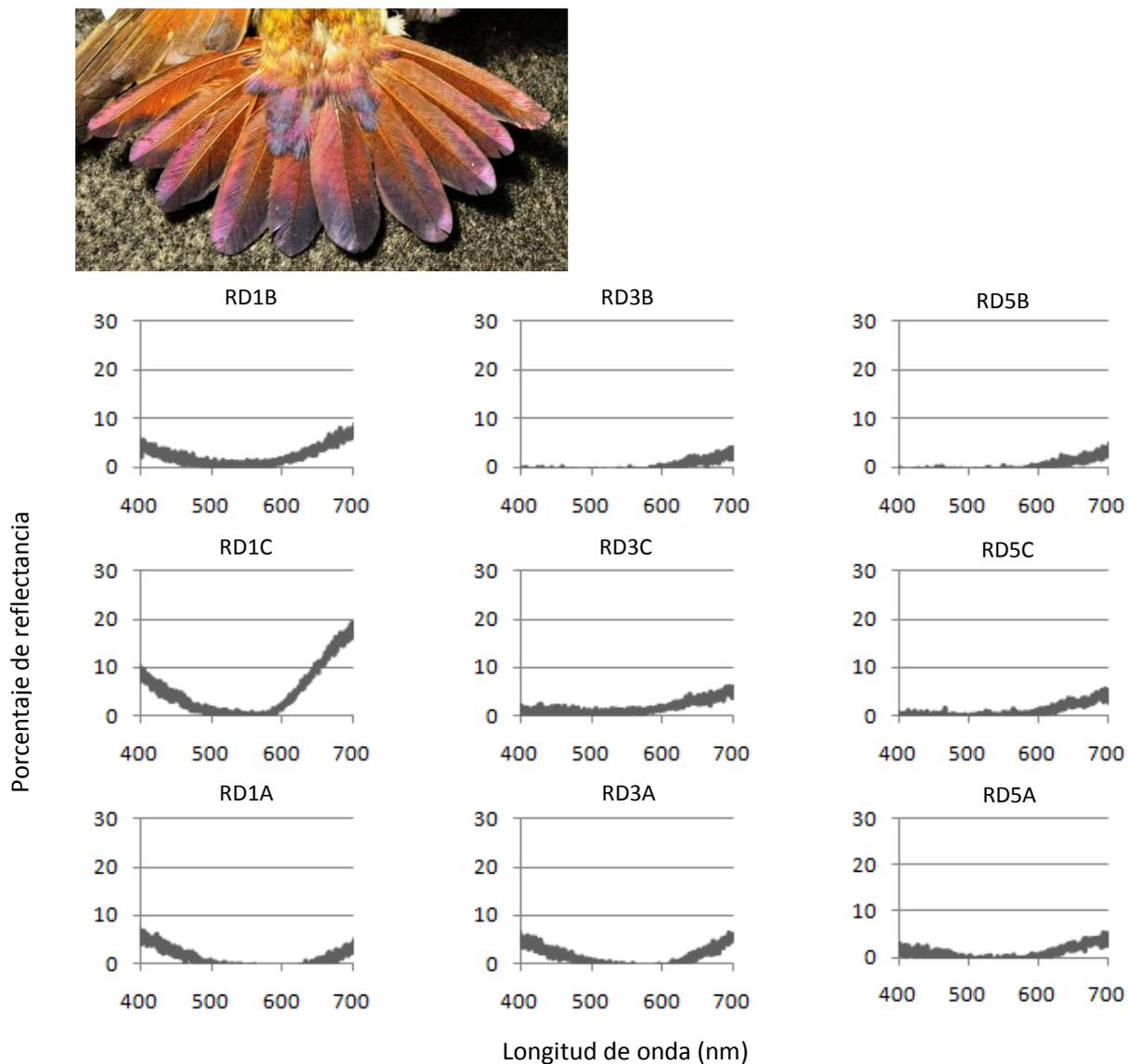
**Figura A3.6.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ153). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



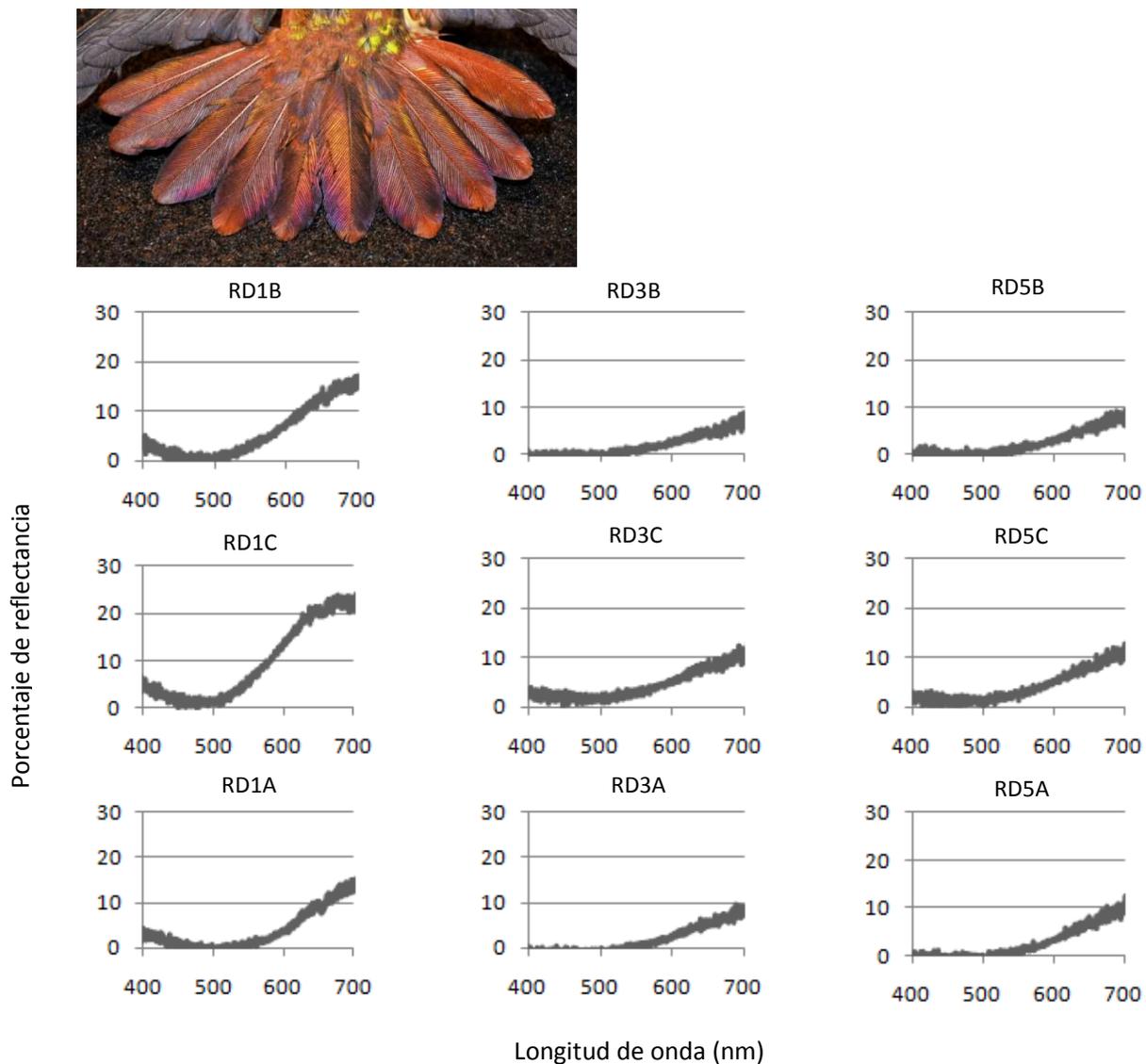
**Figura A3.7.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ154). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



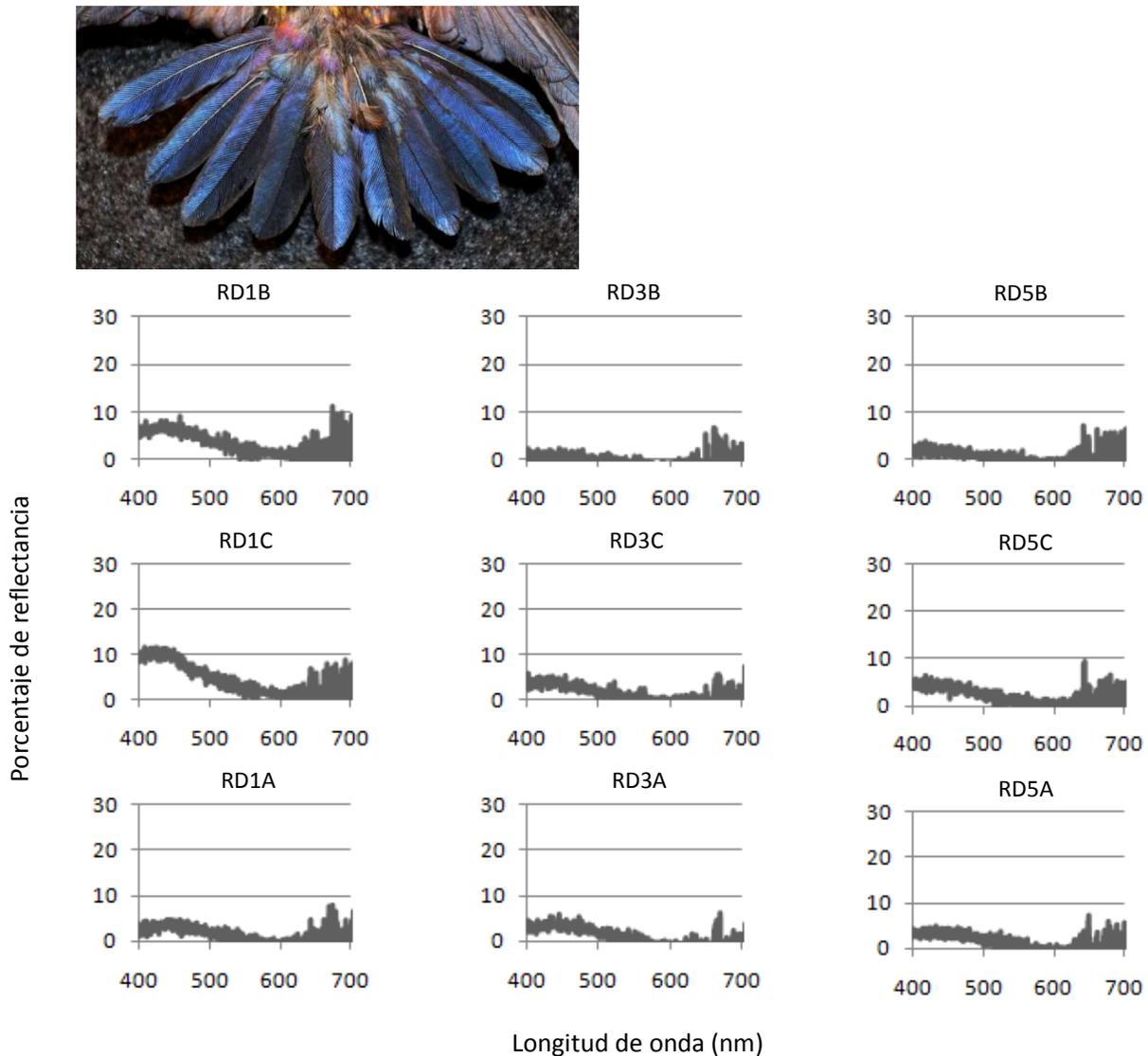
**Figura A3.8.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ155). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



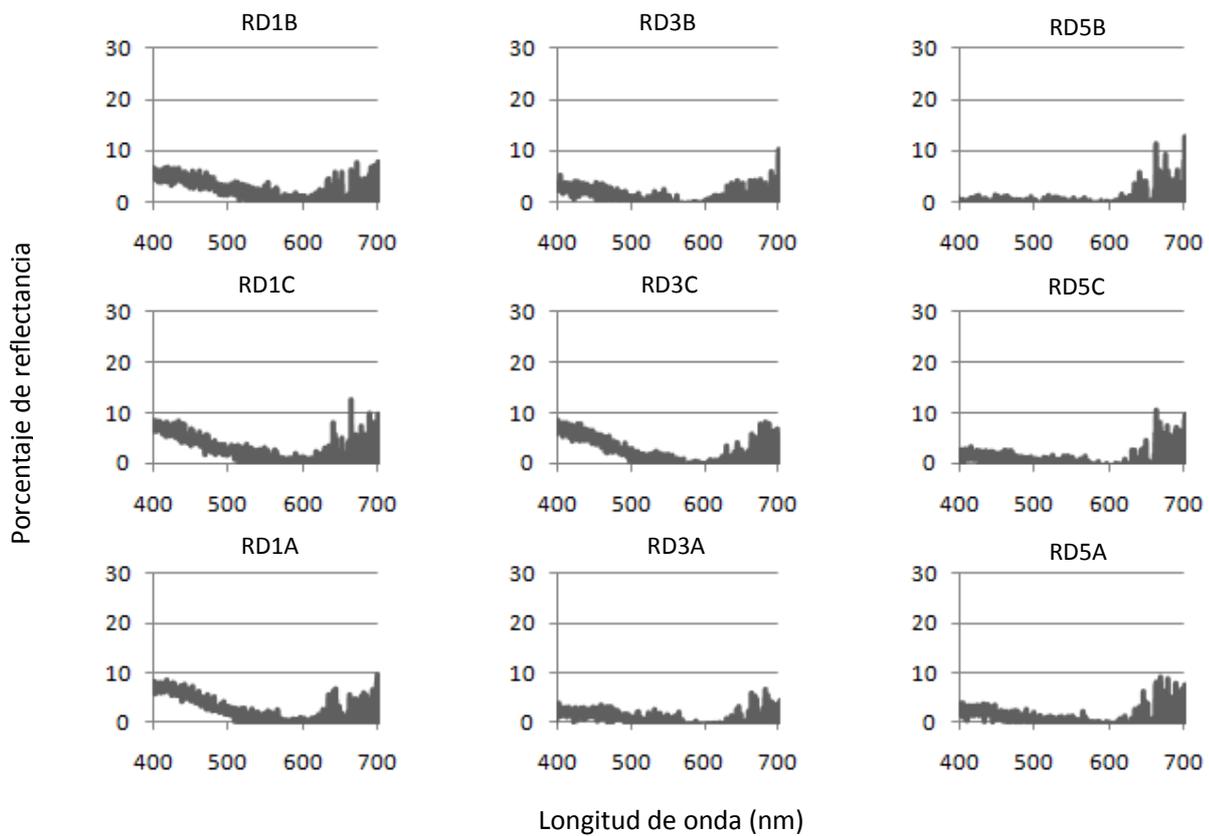
**Figura A3.9.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ163). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



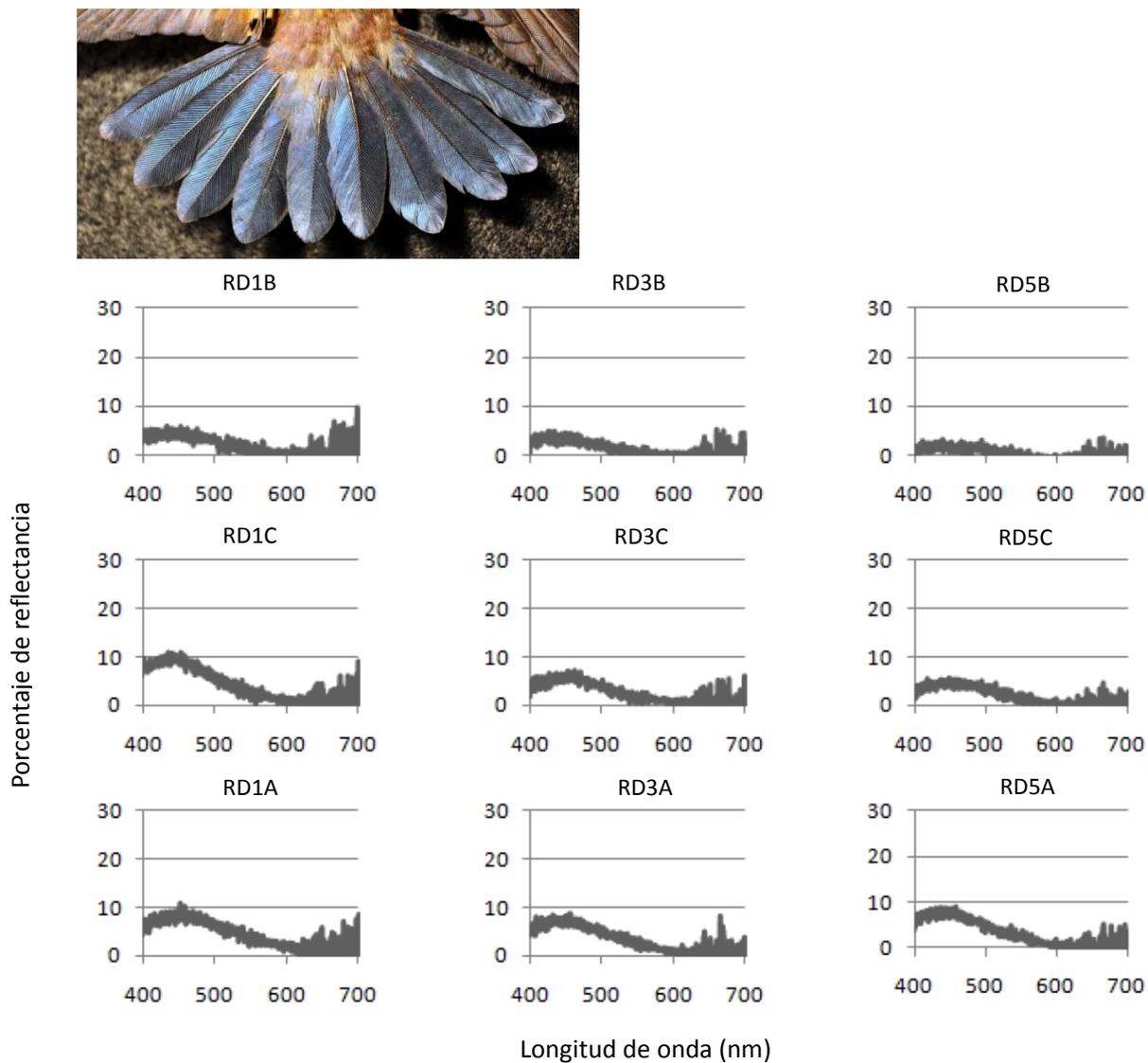
**Figura A3.10.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia beryllina* (RAJ164). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



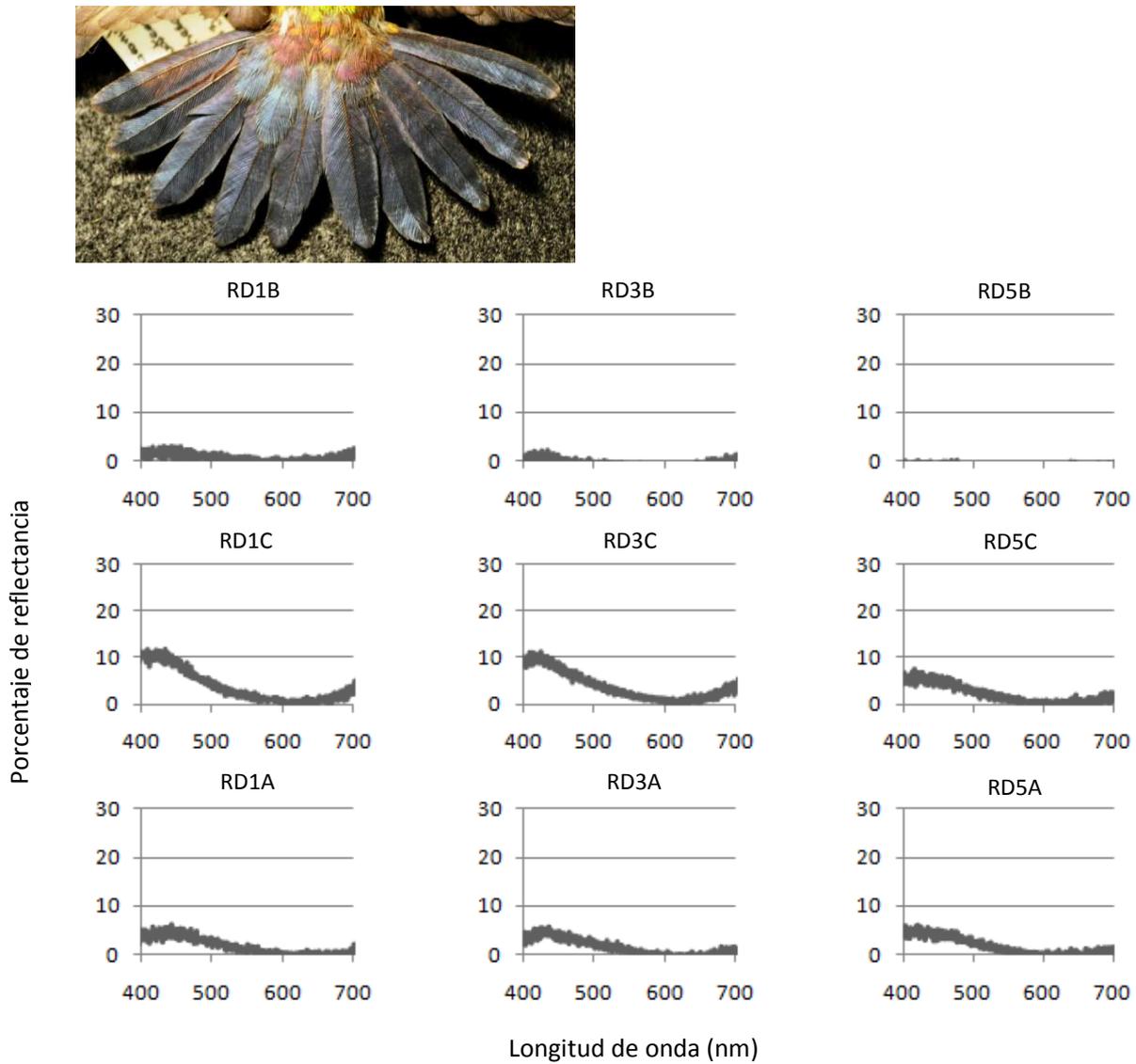
**Figura A3.11.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ129). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



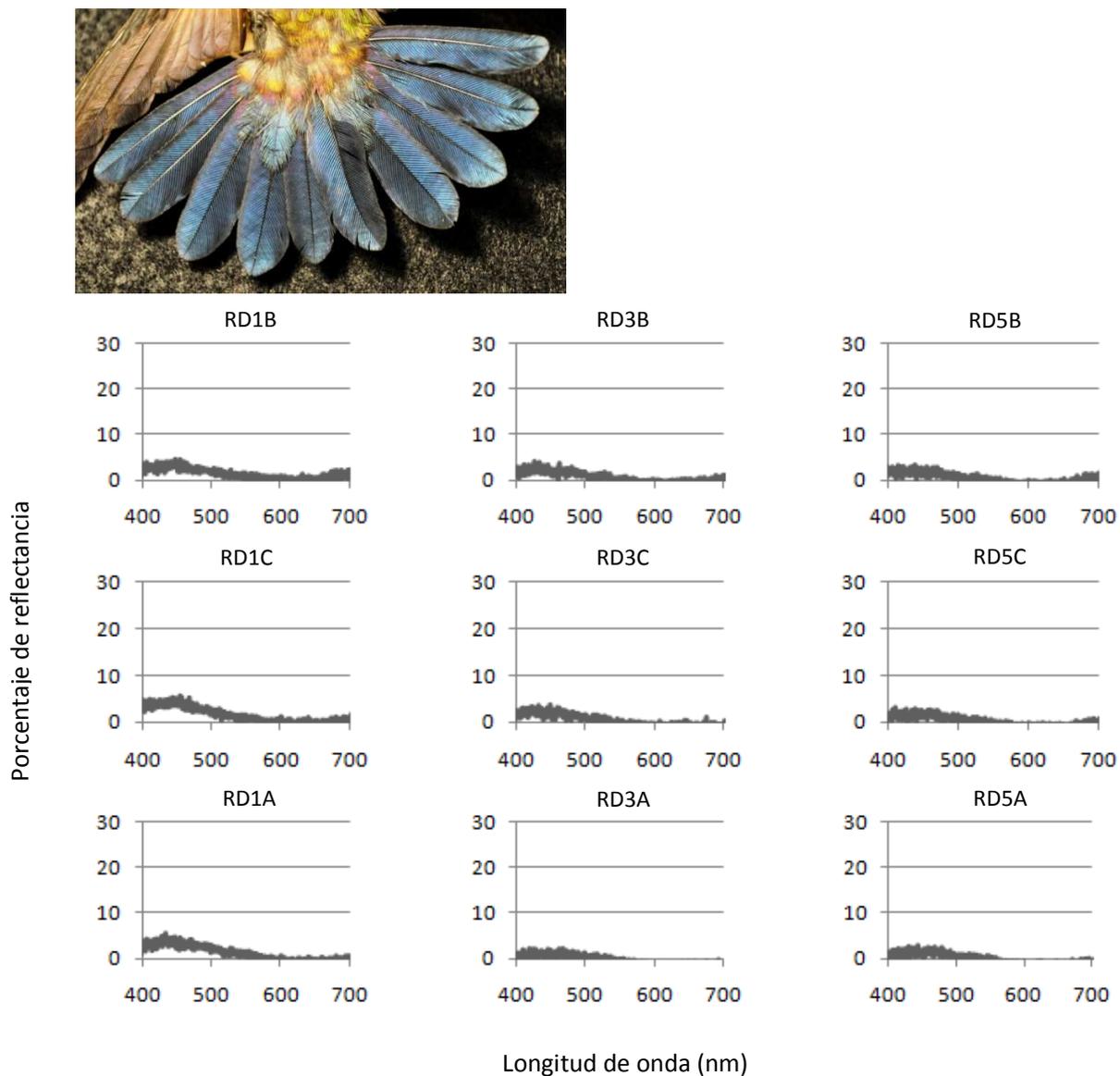
**Figura A3.12.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ132). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



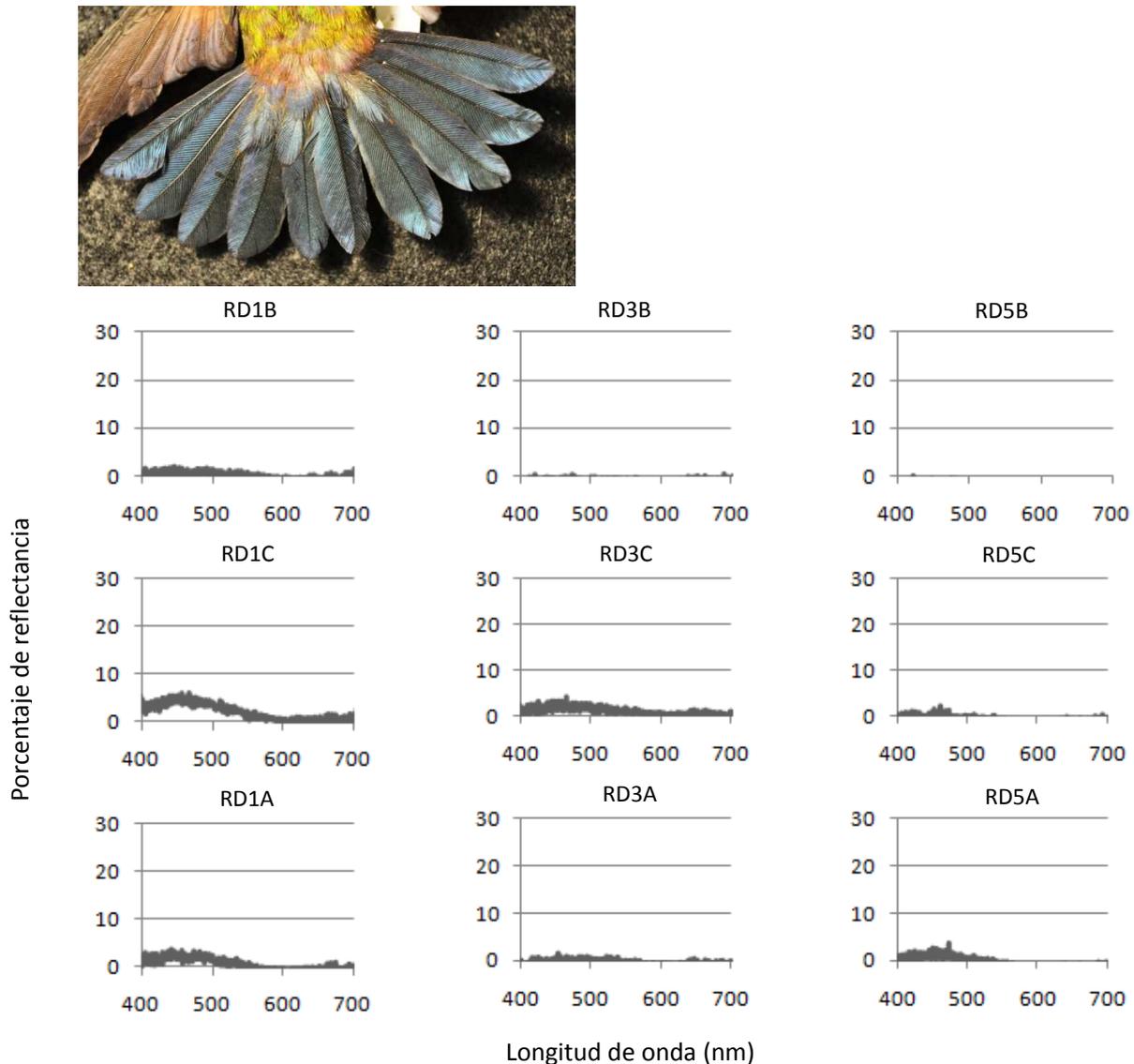
**Figura A3.13.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ133). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



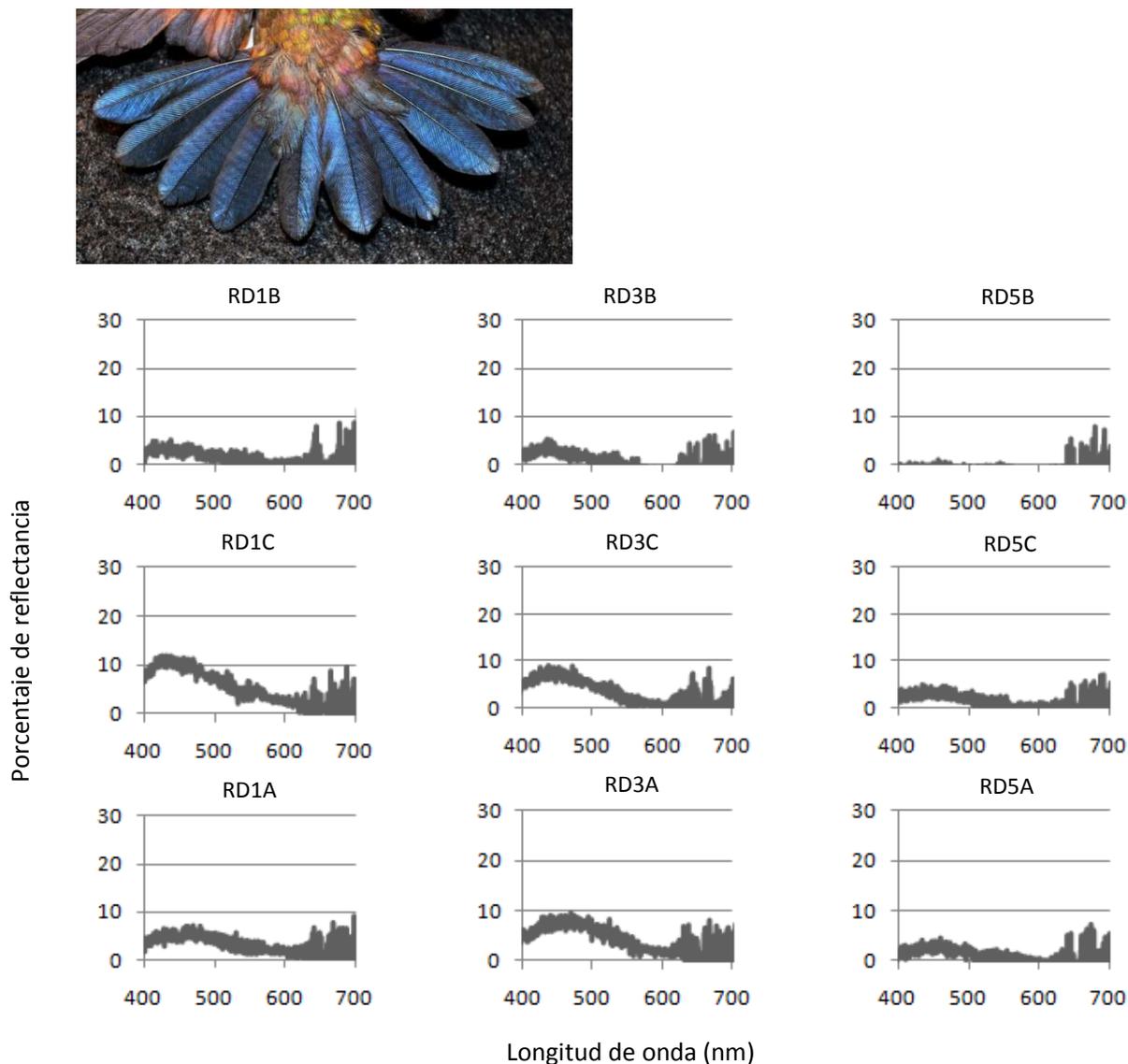
**Figura A3.14.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ156). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



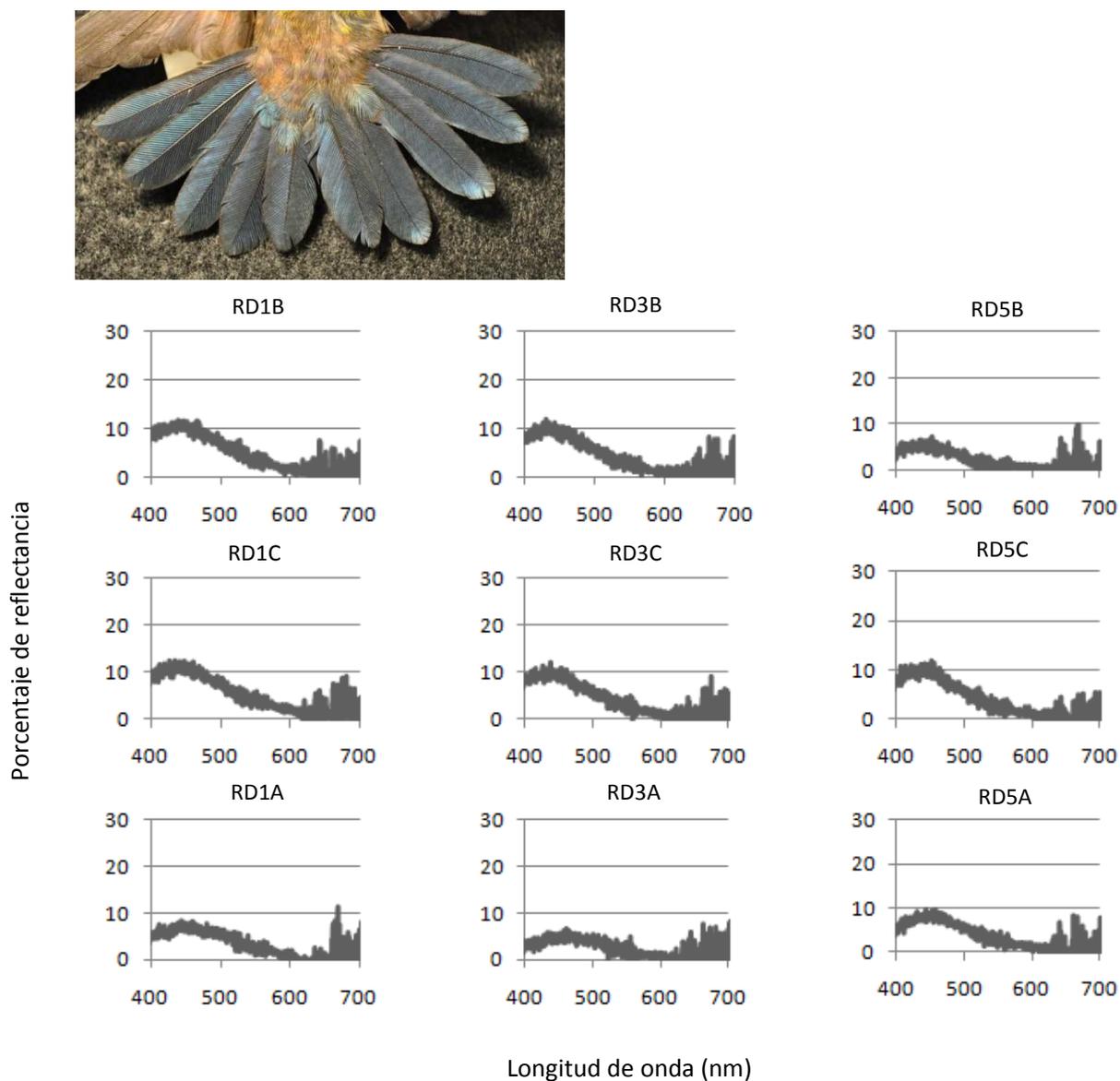
**Figura A3.15.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ157). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



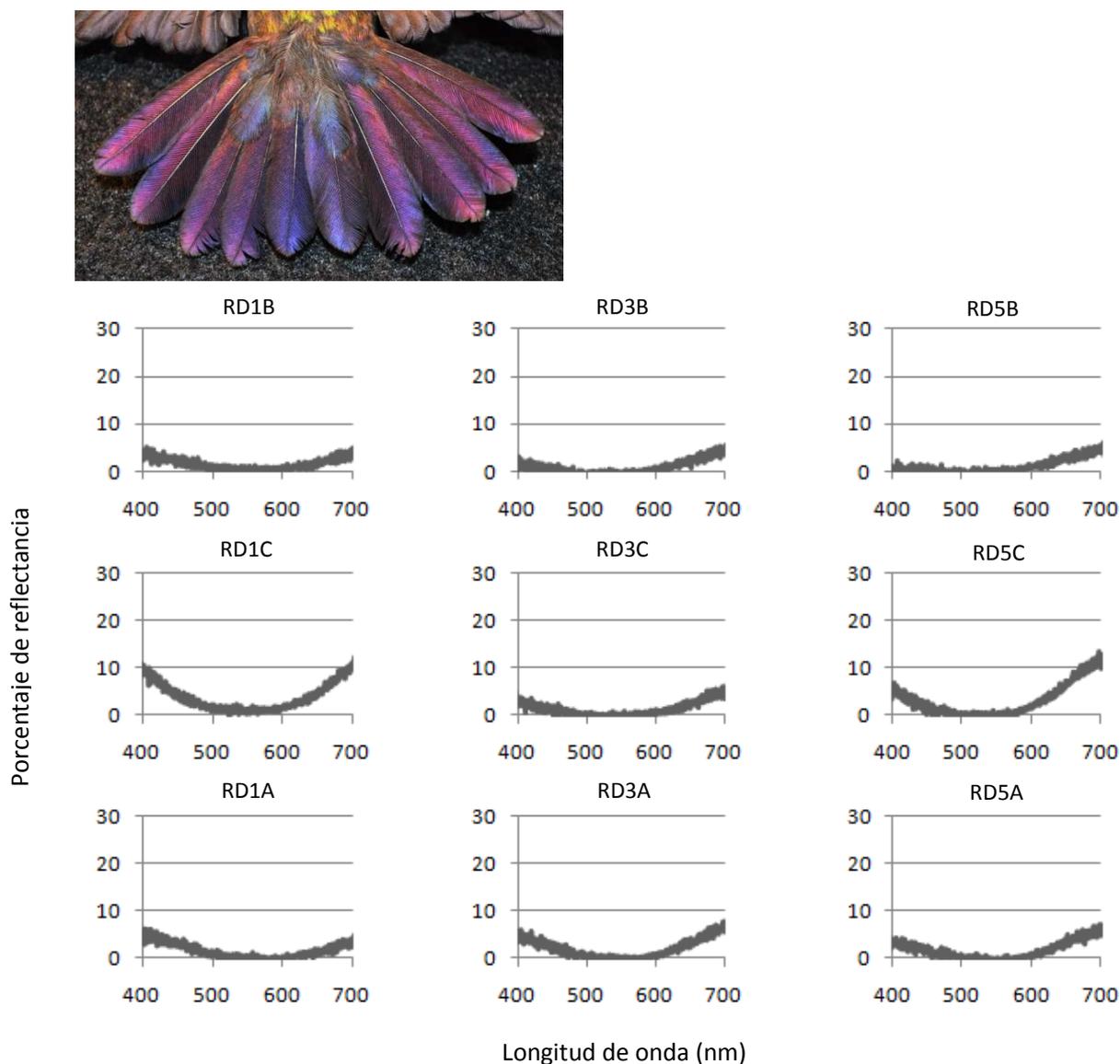
**Figura A3.16.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ158). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



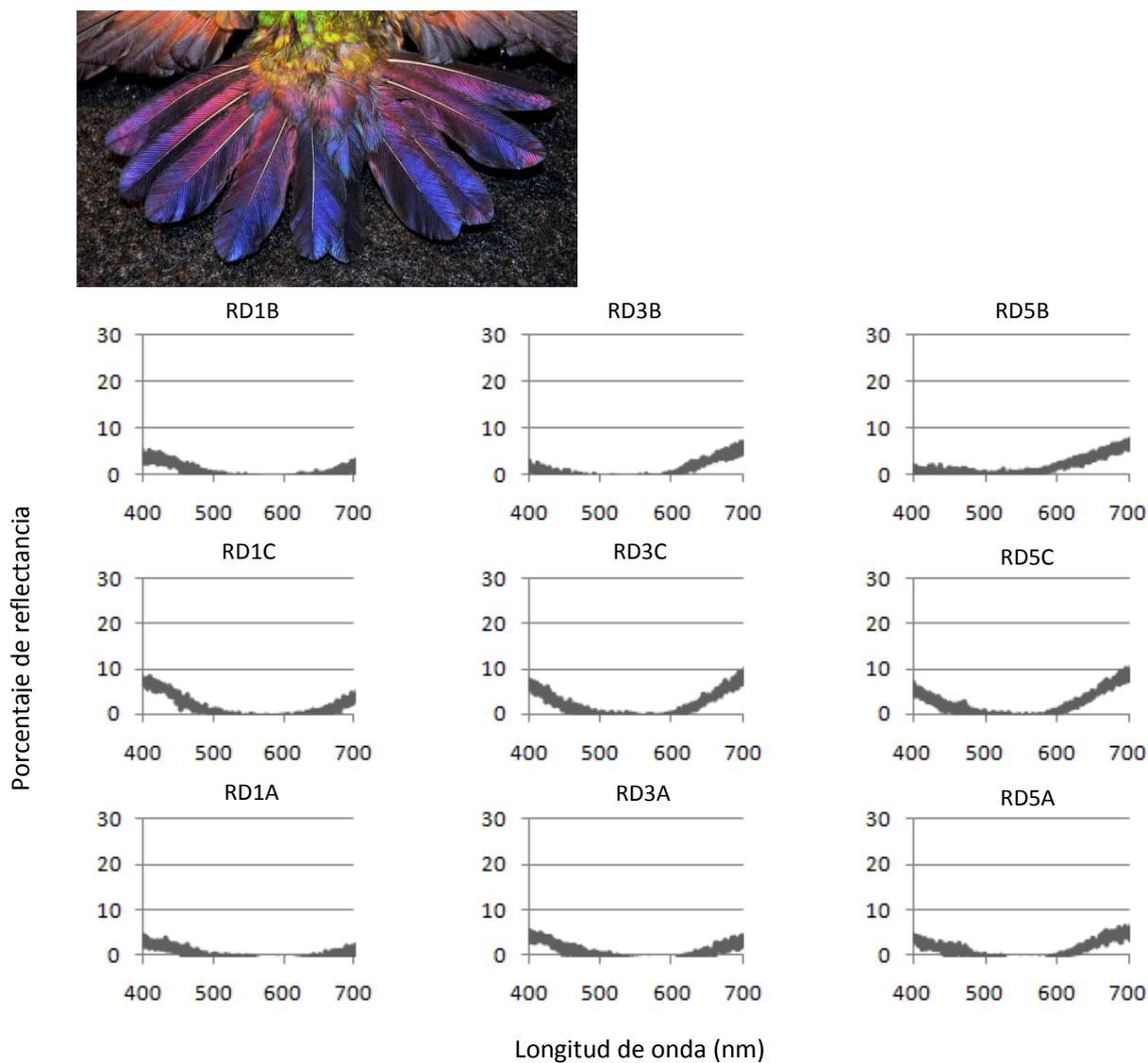
**Figura A3.17.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ159). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



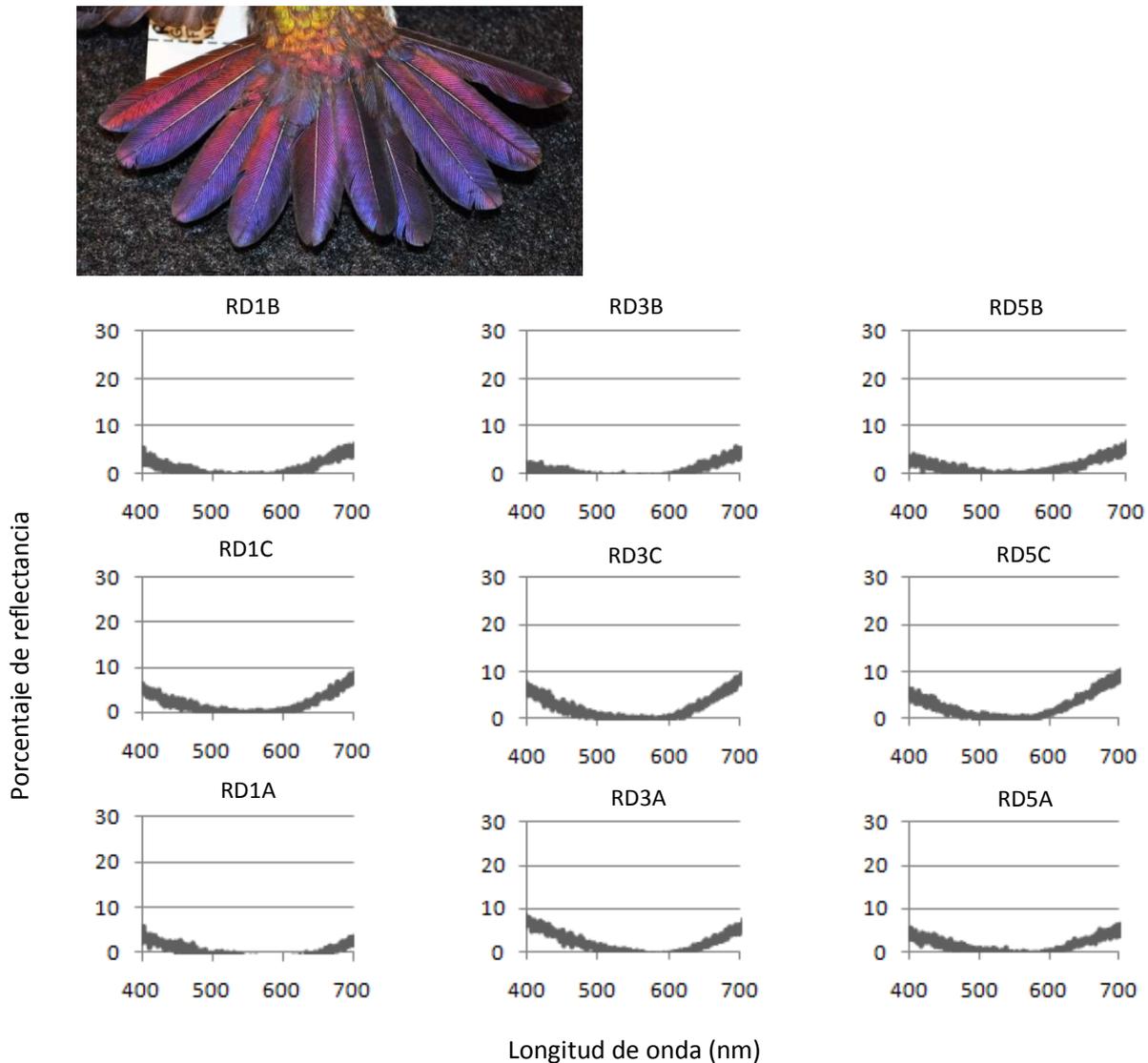
**Figura A3.18.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia cyanura* (RAJ161). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



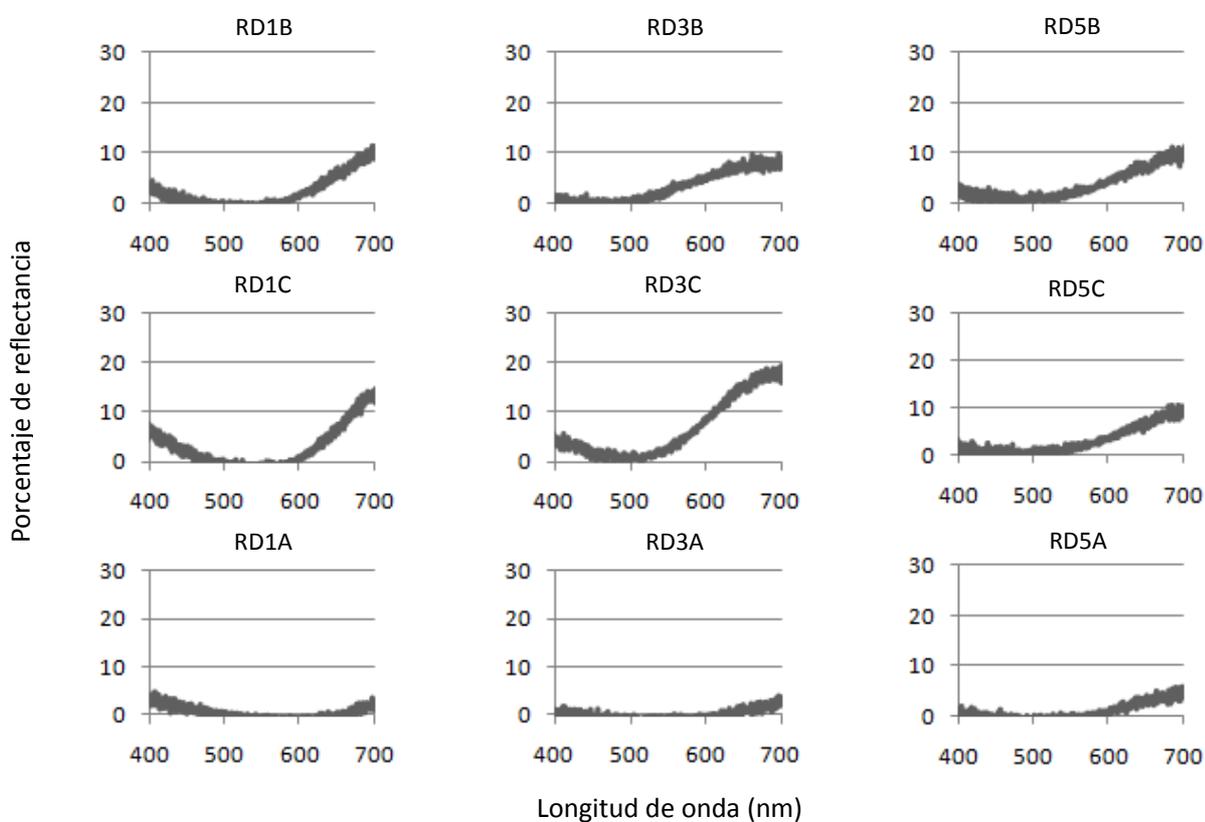
**Figura A3.19.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ111). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



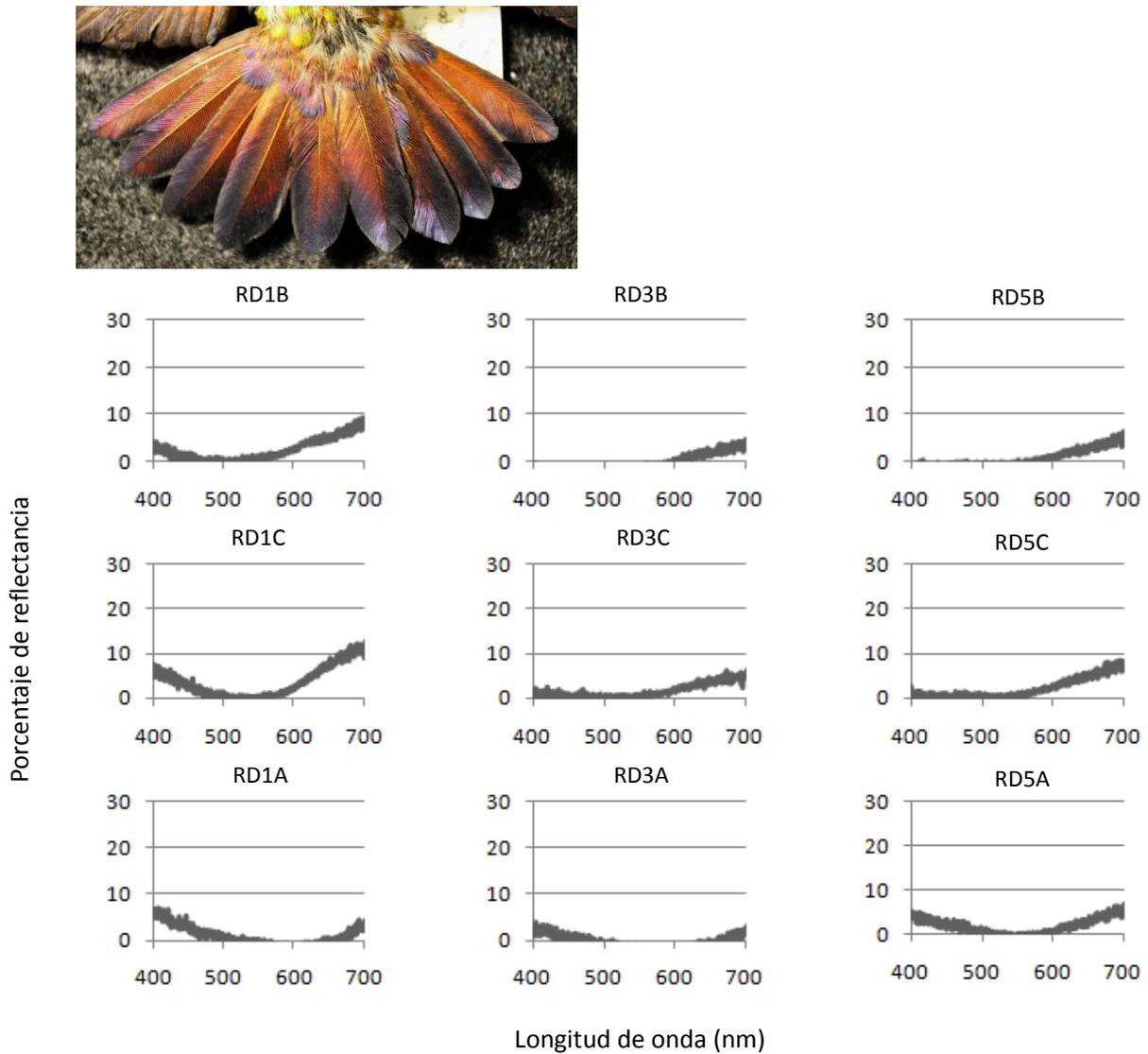
**Figura A3.20.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ112). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



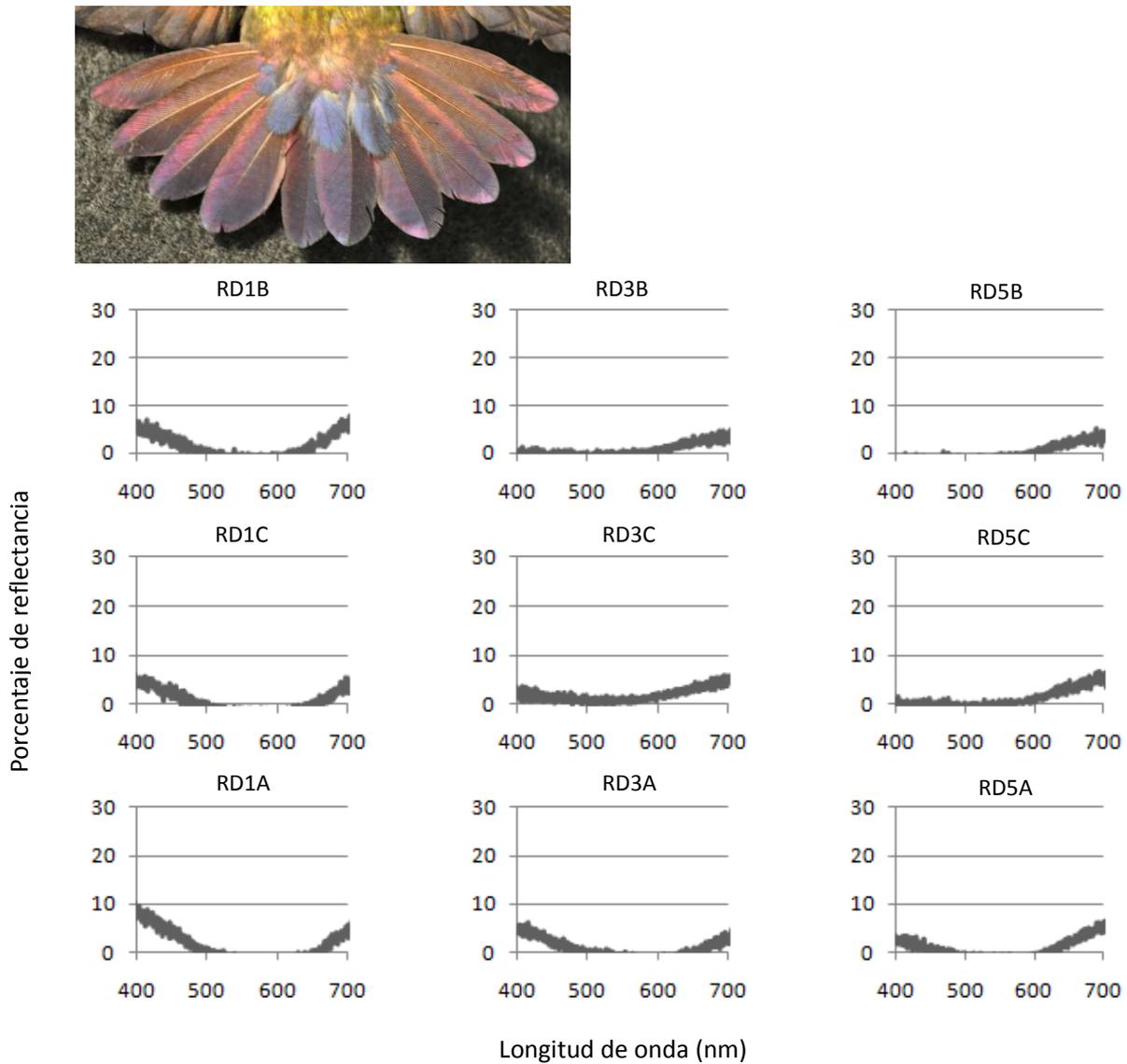
**Figura A3.21.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ113). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



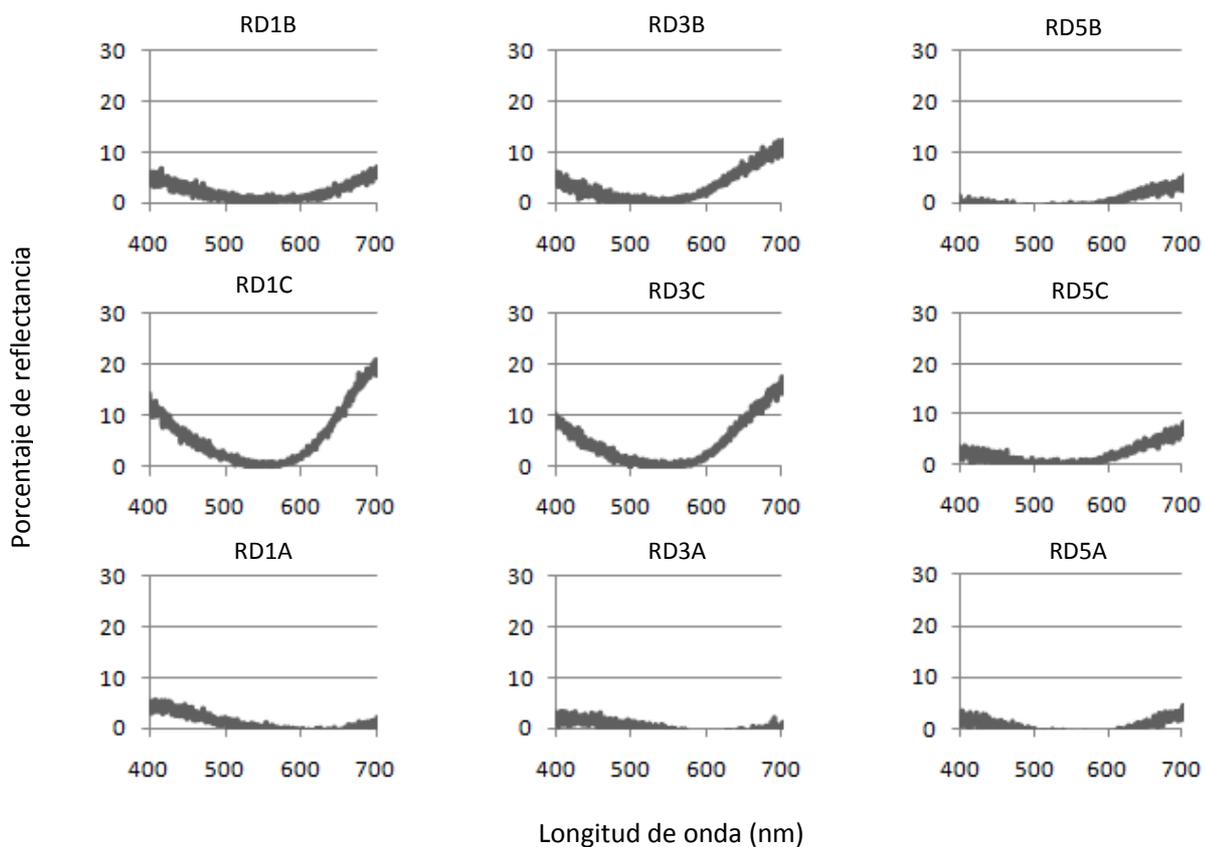
**Figura A3.22.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ127). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



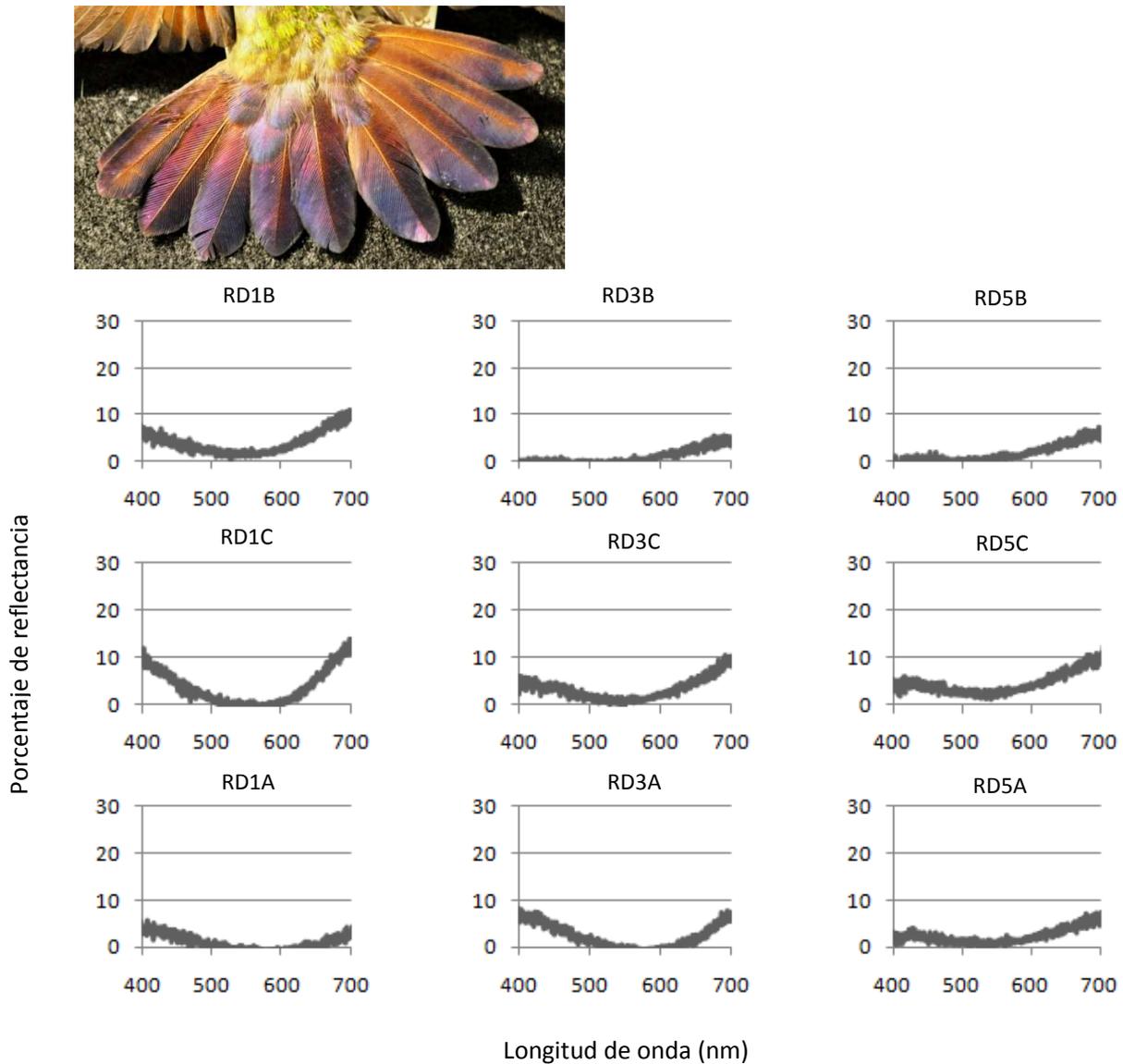
**Figura A3.23.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ130). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



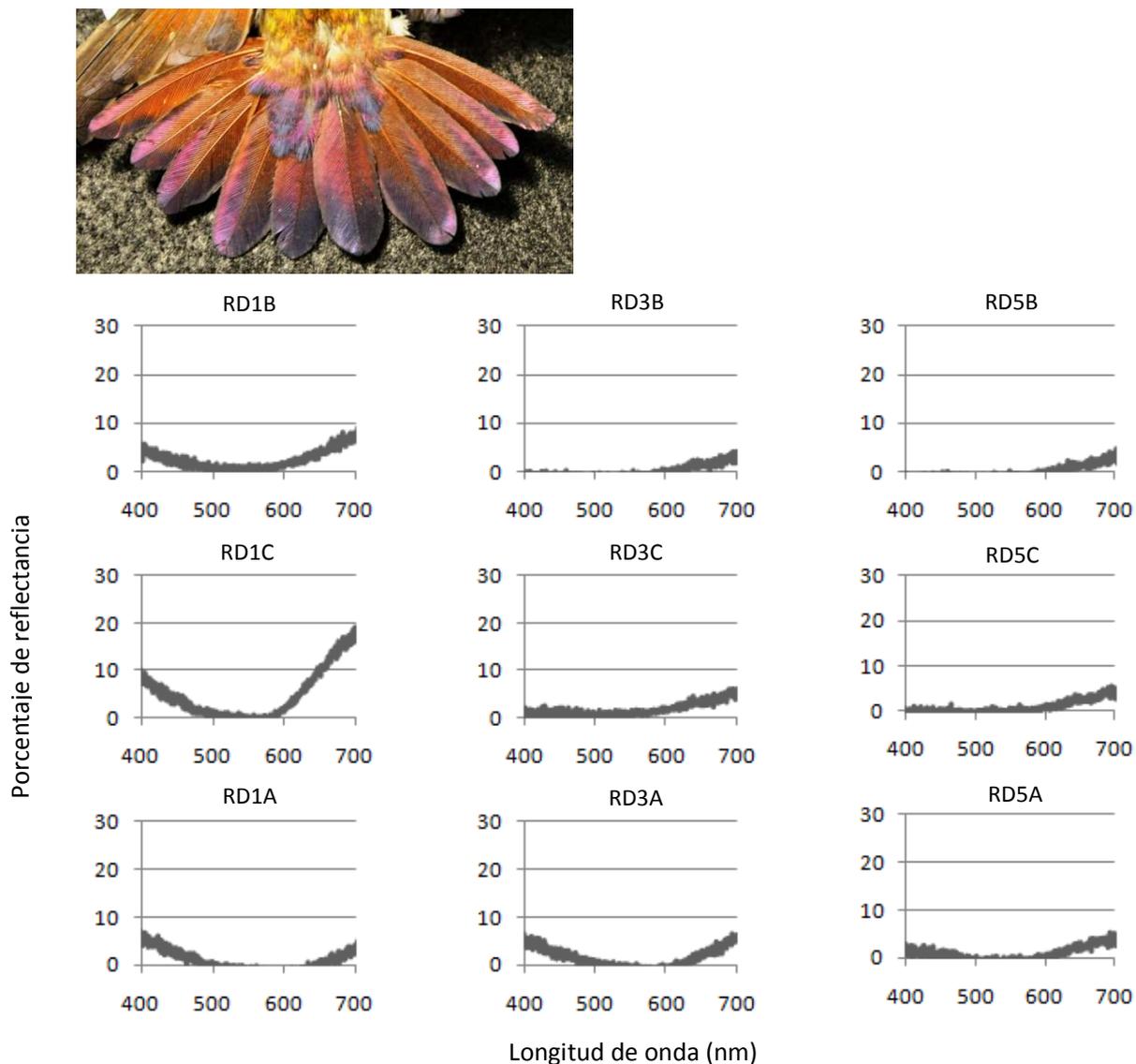
**Figura A3.24.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ131). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



**Figura A3.25.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ136). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



**Figura A3.26.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ140). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.



**Figura A3.27.** Coloración de las plumas de la cola y curvas de reflectancia de *Amazilia* sp. (RAJ165). Cada una de las curvas de reflectancia representa el promedio de las tres mediciones realizadas en cada sitio de las plumas. (RD1B = Rectriz derecha 1 Base; RD1C = Rectriz derecha 1 Centro; RD1A = Rectriz derecha 1 Ápice; RD3B = Rectriz derecha 3 Base; RD3C = Rectriz derecha 3 Centro; RD3A = Rectriz derecha 3 Ápice; RD5B = Rectriz derecha 5 Base; RD5C = Rectriz derecha 5 Centro; RD5A = Rectriz derecha 5 Ápice). Fotografía: Rosa Alicia Jiménez.

## Anexo 4

**Especímenes colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*  
durante el período 2009 – 2010**

No.	No. de Colecta	Especie	Sexo	Sitio de Colecta
1	RAJ115	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
2	RAJ116	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
3	RAJ134	<i>Amazilia beryllina</i>	Macho	Patulul, Suchitepéquez
4	RAJ137	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
5	RAJ150	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango
6	RAJ152	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango
7	RAJ153	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango
8	RAJ154	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango
9	RAJ155	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	Todos Santos Cuchumatán, Huehuetenango
10	RAJ163	<i>Amazilia beryllina</i>	Macho	San Pedro Yepocapa, Chimaltenango
11	RAJ164	<i>Amazilia beryllina</i>	Hembra	San Pedro Yepocapa, Chimaltenango
12	RAJ129	<i>Amazilia cyanura</i>	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
13	RAJ132	<i>Amazilia cyanura</i>	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
14	RAJ133	<i>Amazilia cyanura</i>	Macho	Patulul, Suchitepéquez
15	RAJ156	<i>Amazilia cyanura</i>	Hembra	El Palmar, Quetzaltenango
16	RAJ157	<i>Amazilia cyanura</i>	Hembra	El Palmar, Quetzaltenango
17	RAJ158	<i>Amazilia cyanura</i>	Macho	El Palmar, Quetzaltenango
18	RAJ159	<i>Amazilia cyanura</i>	Macho	El Palmar, Quetzaltenango
19	RAJ160	<i>Amazilia cyanura</i>	Hembra	El Palmar, Quetzaltenango
20	RAJ161	<i>Amazilia cyanura</i>	Hembra	El Palmar, Quetzaltenango

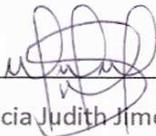
Fuente: Datos de campo.

## Continuación Anexo 4

Especímenes colectados del complejo de especies *Amazilia beryllina* – *A. cyanura*  
durante el período 2009 – 2010.

No.	No. de Colecta	Especie	Sexo	Sitio de Colecta
21	RAJ111	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
22	RAJ112	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
23	RAJ113	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
24	RAJ124	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
25	RAJ127	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
26	RAJ128	<i>Amazilia</i> sp.	Macho	Patulul, Suchitepéquez
27	RAJ130	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
28	RAJ131	<i>Amazilia</i> sp.	Macho	Patulul, Suchitepéquez
29	RAJ136	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
30	RAJ140	<i>Amazilia</i> sp.	Hembra	Patulul, Suchitepéquez
31	RAJ162	<i>Amazilia</i> sp.	Macho	San Pedro Yepocapa, Chimaltenango
32	RAJ165	<i>Amazilia</i> sp.	Macho	San Pedro Yepocapa, Chimaltenango

Fuente: Datos de campo.



---

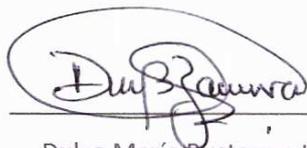
Rosa Alicia Judith Jiménez Barrios



---

Juan Fernando Hernández, Ph.D.

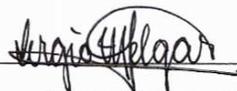
Asesor



---

Dulce María Bustamante, Ph.D.

Revisora



---

Sergio Melgar, Ph.D.

Director – Escuela de Biología



---

Oscar Cobar Pinto, Ph.D.

Decano