

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a large, circular emblem in the background. It features a central shield with a figure on horseback, surrounded by various heraldic symbols like castles, lions, and a crown. The Latin motto "CETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Diversidad genética y filogenia del Chipe Cejas Doradas *Basileuterus belli*
(Guiraud, 1841) (AVES, Parulidae) en México y Guatemala**

INFORME DE TESIS

Presentado por

Julio Alejandro Méndez López

Para optar al título de Biólogo

Guatemala, Marzo 2017

JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M. A Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
Msc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

DEDICATORIA

A mis padres Manuel de Jesús Méndez Raymundo y Zoila Victoria López , a mis hermanos Manuel, Marsy y Omar Méndez a quienes debo su incondicional apoyo durante todas las etapas de mi vida

A mi compañera de vida Alejandra Rojas Vargas, por su compañía, comprensión y apoyo incondicional en la elaboración de esta tesis.

A mi pequeño Ignacio quien llena de alegría y felicidad mi vida con sus sonrisas y abrazos.

AGRADECIMIENTOS

A Guatemala por permitirme conocer sus montañas, sus ríos, sus lagos y a los increíbles seres que en el habitan, por permitirme disfrutar de la calidez humana de sus habitantes y de su inmensa biodiversidad pilar de nuestra cultura y de nuestros pueblos.

A la Universidad San Carlos de Guatemala por ser Centro de formación profesional, donde más que forjar conocimientos también se forjan ideales.

La realización del presente estudio fue posible al apoyo Institucional y financiero del proyecto “Biotic inventory and evolution of the terrestrial vertebrate fauna of Nuclear Central America” (MVZ, 2009) del Museo de Zoología de Vertebrados (MVZ, por sus siglas en inglés) de la Universidad de California, Berkeley y el Museo de Historia Natural de la Escuela de Biología (MUSHNAT) de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Un especial agradecimiento al equipo de campo del proyecto (Lic. Sergio Pérez, Dr. Jorge Erwin López, Lic. Carlos Almazán, Dr. Juan Fernando Hernández, María Fernanda Asturias, Rodolfo Lima , Jorge Nicole, Dr. Sean Rovito y Dr. Ted Pappenfus), a Dr. Zach Hanna por su apoyo en la enseñanza de los métodos empleados durante la fase de Laboratorio, A Dr. Jorge Erwin López y a Dr. Sergio Melgar Valladares por sus valiosos aportes y apoyo en la elaboración y revisión de este documento en todas sus etapas. A Msc. Rosa Alicia Jiménez por sus valiosas observaciones y aportes en la interpretación de los análisis presentados en este estudio.

ÍNDICE

1. INTRODUCCION	4
2. ANTECEDENTES:	6
2.1 Planteamiento del Problema	6
2.2 Marco Teórico	10
2.2.1 Bosques Montanos de México y Norte de Centroamérica	10
2.2.2 Familia <i>Parulidae</i> : Características, Ecología y Taxonomía	11
2.2.3 Género <i>Basileuterus</i> :	13
2.2.4 <i>Basileuterus belli</i> :	14
2.2.5 Filogeografía (Filogenia y Diversidad genética).....	16
2.2.6 Estudios filogeográficos de la avifauna en bosques montanos de México y Guatemala	16
3. JUSTIFICACION.....	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2. Objetivos específicos.....	19
5. HIPOTESIS	20
6. MATERIALES Y METODOS.....	21
6.1 MATERIALES	21
6.1.1 Universo	21
6.1.2 Muestra	21
6.1.3 Área de Estudio	21
6.2 METODOS.....	24
6.2.1 Colecta de especímenes.....	24
6.2.2 Métodos de laboratorio	24
6.2.2.1. Extracciones de ADN	24
6.2.2.2 Amplificación de ADN empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	25
6.2.2.3 Revisión de Extracciones y Productos PCR.....	26
6.2.2.4 Purificación de productos del PCR	26
6.2.2.5 Purificación del Producto de los Ciclo secuenciación	26
6.2.2.6 Método de Secuenciación.....	27
6.2.2.7 Edición de electroferogramas (secuencias de ADN)	27
6.3 Análisis de datos.....	28

6.3.1 Análisis del tiempo de divergencia.....	31
6.3.2 Estructuración de poblaciones de <i>Basileuterus belli</i> :.....	28
6.3.2.1 Análisis de inferencia bayesiana	28
6.3.2 Análisis máxima verosimilitud (ML)	29
6.3.3 Diversidad genética:.....	30
Análisis de diversidad intra poblacionales	30
6.3.4 Análisis de diversidad entre Grupos.....	31
Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)	31
7. RESULTADOS	32
7.1 Análisis de divergencia del Tiempo	32
7.2 Estructura de la Población.....	34
Redes de Haplotipos.....	37
7.3 Diversidad Genética	40
7.4 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)	43
8. DISCUSION DE RESULTADOS	45
8.1 Análisis de divergencia del Tiempo (Reloj Molecular)	45
8.2 Estructuración de Poblaciones	47
8.3 Diversidad genética	48
8.4 Análisis de Varianza Molecular	48
9. CONCLUSIONES	50
9. RECOMENDACIONES	51
10. AGRADECIMIENTOS.....	52
9. Referencias Bibliográficas	52

Índice de Figuras y Tablas.

Figura 1. Distribucion geografica de subespecies de chipe cejas doradas <i>Basileuterus belli</i>	7
Figura 2. Barreras geográficas identificadas en la región de México y Norte de Centroamérica.-----	8
Figura 3. Relaciones filogenéticas entre 107 integrantes de la familia Parulidae basado en análisis de inferencia bayesiana a partir de datos moleculares y mitocondriales.	11
Figura 4 Características Fenotípicas del Chipe Cejas doradas <i>Basileuterus belli</i>	15
Figura 5. Localidades de colecta de especímenes de <i>Basileuterus belli</i> en México y Norte de Centro América.	22
Figura 6. Análisis de Reloj Molecular	31
Figura 7. Árbol de relaciones filogenéticas del Chipe cejas doradas a partir de análisis de Inferencia Bayesiana..	34
Figura 8. Árbol de relaciones filogenéticas elaborado a partir del análisis de Máxima Verosimilitud..	35
Figura 9. Red de Haplotipos " <i>Median Joining</i> " de las poblaciones del chipe cejas doradas de México y Norte de Centro América	37

Tabla 1. Localidad y número de individuos por localidad del Chipe Cejas Doradas <i>Basileuterus belli</i>	23
Tabla 2. Volúmenes empleados por reactivo para la Reacción en cadena de la Polimerasa PCR por muestra.	25
Tabla 3. Configuración de temperatura y duración de ciclos para uso de termocicladora en la reacción en cadena de la polimerasa PCR.	26
Tabla 4. Configuración de temperatura y duración de ciclos para uso de termocicladora en la purificación de productos PCR.	27
Tabla 5. Distancias Genéticas Φst basadas en análisis de pares, valores con asterisco cuenta con valores de $P < 0.001^*$ y Valores en negrita indican distancias genéticas con valores de $P > 0.05$.	31

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad de aves en la región de México y del norte de Centroamérica es reconocida por contar con un gran número de especies en un área relativamente pequeña (Howell y Webb, 1995), esta diversidad tiene estrecha relación con la gran cantidad de paisajes y hábitats en la región, además de ser un área de convergencia de especies endémicas, migratorias y de amplia distribución (García - Trejo & Navarro, 2004). Por su parte, las poblaciones de aves de alta montaña a nivel regional son consideradas de especial interés en estudios biogeográficos debidos a su relativo aislamiento geográfico y a la susceptibilidad de estas a cambios ambientales (Klicka y Barber, 2010).

El género *Basileuterus* cuenta con estudios sobre su ecología, comportamiento, distribución y relaciones filogeográficas (Chantellanaz, 2008; Gutiérrez - Pinto, Cuervo, Miranda, Pérez - Eman, Brumfield, y Cadena, 2012; García - Trejo y Navarro, 2004); además de la evaluación del efecto de barreras geográficas a nivel regional en sus poblaciones (Klicka y Barber, 2010). El chipe o reinita cejas doradas *Basileuterus belli* (Guiraud, 1841) es una especie restringida a tierras altas de la región central de México y norte de Centroamérica, su hábitat está conformado primordialmente por bosques montañosos dominados por especies de encinos, robles y pinos (Howell & Webb, 1995). Para esta especie son reconocidas cinco subespecies (*B. b. bateli*, *B. b. belli*, *B. b. clarus*, *B. b. scitulus*, *B. b. suboscurus*) de acuerdo a la clasificación del Consejo Ornitológico Internacional (OIC) (Gill y Donsker, 2015). El chipe cejas doradas ha sido identificado junto a otras especies del género como especies de interés para el desarrollo de estudios filogeográficos en la región (Lovette et al., 2012).

Se sugiere como hipótesis del presente estudio la existencia de patrones de divergencia genética en las poblaciones del chipe cejas doradas, debido a la presencia de grandes sistemas montañosos y volcánicos en su distribución y a la estrecha relación de éstas con su hábitat, el cual ha experimentado expansiones y contracciones a partir de eventos climáticos en la región (Hodell, et al., 2008).

Los objetivos planteados en el presente buscan describir las relaciones genealógicas de las poblaciones de *Basileuterus belli* en su área de distribución, describir su historia evolutiva y analizar su diversidad genética y. Para el estudio de las relaciones genéticas de las poblaciones del chipe cejas doradas se elaboraron árboles filogenéticos basados en los criterios de inferencia bayesiana (Ronquist, Huelsenbeck, & Teslenko, 2011), máxima verosimilitud (Stamatakis, 2006) y redes de haplotipos (Librado & Rozas, 2009), en el análisis del tiempo de divergencia de sus poblaciones se

empleó el método de reloj molecular (Drummond, Ho, Rawlence, & Rambaut, 2007). También, se describe la diversidad genética para los principales grupos encontrados.

Los análisis fueron realizados empleando secuencias moleculares del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa sub unidad 2 (ND2) obtenidas dentro del proyecto “Biotic inventory and evolution of the terrestrial vertebrate fauna of Nuclear Central America” (MVZ, 2009) del Museo de Zoología de Vertebrados (MVZ, por sus siglas en inglés) de la Universidad de California, Berkeley y el Museo de Historia Natural de la Escuela de Biología (MUSHNAT) de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

El estudio de las poblaciones de aves endémicas regionales como es el caso de *B. belli* y las interacciones de éstas con sus hábitats permiten plantear estrategias de conservación adecuadas a un entorno dinámico en términos ecológicos, económicos y sociales. El presente estudio busca incidir en el manejo de las poblaciones y hábitats de alta montaña a nivel regional, además de complementar estudios existentes del género *Basileuterus*.

2. ANTECEDENTES:

2.1 Planteamiento del Problema

El chipe o reinita cejas doradas *Basileuterus belli* (Guiraud, 1841) es una especie de distribución restringida a las tierras altas de la región central de México y norte de Centroamérica, su hábitat es primordialmente bosques montanos dominados por especies de encinos, robles y pinos.

La información disponible para *Basileuterus belli* consta de registros históricos, avistamientos, vocalizaciones y pieles de colección presentes en museos y bases de datos ornitológicas que dan cuenta de su distribución actual. *Basileuterus belli* cuenta con cinco subespecies reconocidas por la Comisión Ornitológica Internacional (IOC, por sus siglas en inglés), distribuidas primordialmente en sistemas montañosos y volcánicos (figura 1) (Gill & Donsker, 2015). *B. belli bateli* (Moore, 1946) distribuida en las tierras altas del oeste de México (sureste de Sinaloa hasta Jalisco y Michoacán), *B. belli clarus* (Ridway, 1902) distribuida en las tierras altas del sureste de México (sur del estado Morelos, Guerrero y oeste Oaxaca), *B. belli belli* (Giroud, 1841) en las tierras altas del este de México (suroeste de Tamaulipas al norte de Oaxaca), *B. belli scitulus* (Nelson, 1900) distribuido en las tierras altas del sureste de México (este de Oaxaca y Chiapas) hasta el noroeste de El Salvador y *B. belli suboscurus* (Wetmore, 1940) distribuida en los sistemas montañosos de del noreste de Honduras(figura1).

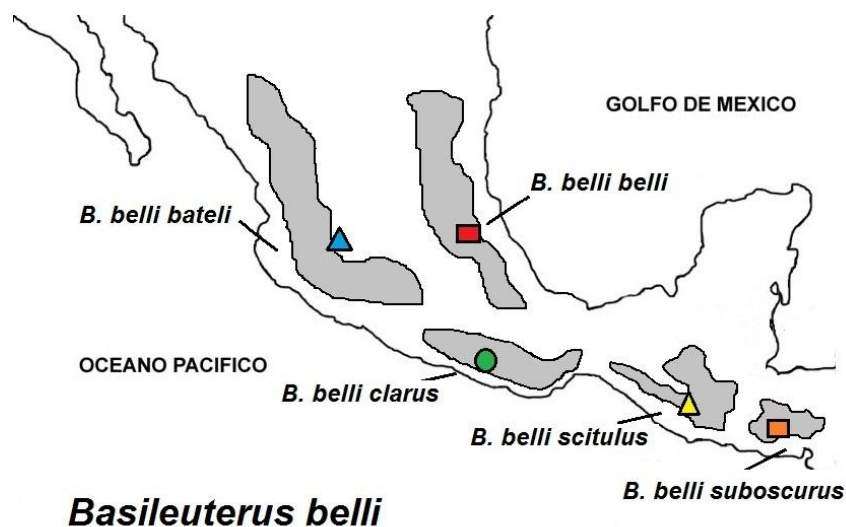


Figura 1. Distribución geográfica de sub especies *Basileuterus belli*. Fuente. Elaboración Propia

La presencia de sistemas montañosos y volcánicos junto a la presencia de barreras geográficas de gran magnitud constituyen factores importantes en el estudio de las relaciones de parentesco de especies de montaña. La relaciones genéticas en especies del género *Basileuterus* han mostrado susceptibilidad al aislamiento geográfico y barreras geográficas de gran tamaño como se ha demostrado en el estudio poblaciones del chipe triestriado, *Basileuterus triastiatu*, en centro y sur América (Gutiérrez - Pinto, Cuervo, Miranda, Pérez - Eman, Brumfield, y Cadena, 2012),

En la región de México y Centroamérica se han identificado barreras geográficas que constituyen barreras biológicas para poblaciones de aves de montaña, entre ellas al chipe cejas doradas *B. belli* (Ornelas J. F., et al., 2013) y serpientes del género *Crotalus*, *Bothrops*, (Castoe, et al., 2009). Entre las barreras de mayor tamaño e incidencia en la región se encuentran la depresión central del río Balsas en el estado de Chiapas, el Istmo de Tehuantepec en México y el valle del Motagua en la región este de Guatemala (Castoe, et al., 2009) (figura 2). También, se considera de gran importancia en el presente estudio la distribución de los bosques montanos, principal hábitat del chipe cejas doradas, dado su estrecha relación ecológica con las poblaciones de aves de montaña.

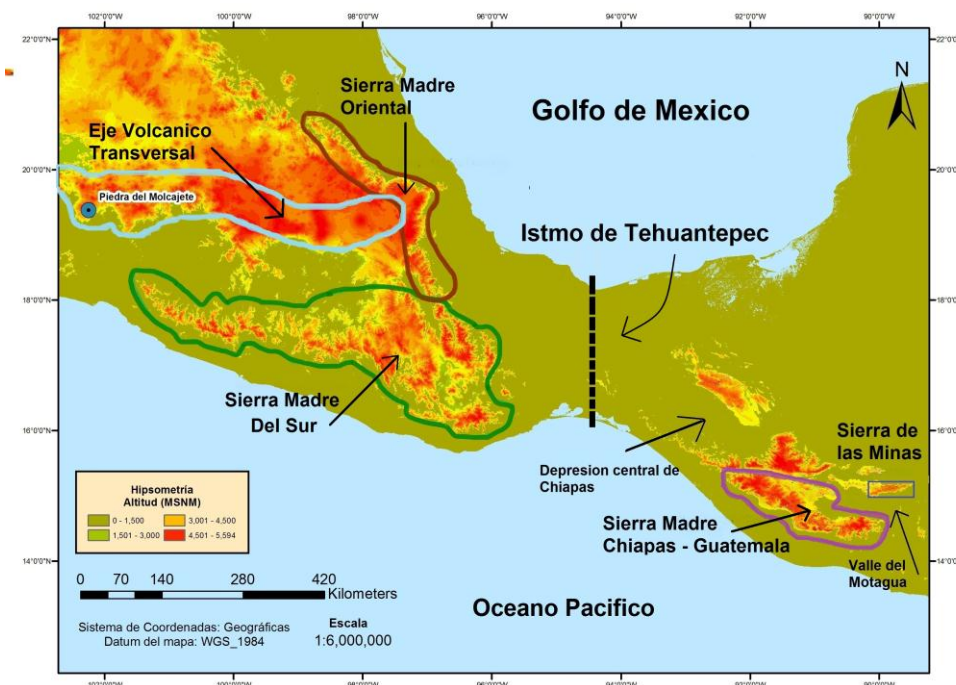


Figura No2. Barreras geográficas identificadas en la región de México y Norte de Centroamérica (Fuente: Elaboración propia).

En este marco de antecedentes y considerando que la distribución de los bosques montanos ha sido dinámica, en el presente estudio se busca identificar las relaciones de parentesco genético y su relación con la presencia de barreras geográficas previamente identificadas así como otras barreras a nivel local, tal como el valle del río Negro y la cadena volcánica del pacífico en Guatemala, identificadas como barreras locales para grupos de salamandras del género *Bolitoglossa* (Rovito, Parra, Almazán, Wake, y Luna, 2012).

El género *Basileuterus* presenta un interesante panorama para la investigación en la región del norte de Centro América y México dado su grado de endemismo y su estrecha relación con los bosques montanos de la región; generando oportunidades únicas para la conservación de este ecosistema así como posibilidades de estudios futuros que describan con mayor detalle sus características fenotípicas, distribución, relaciones ecológicas y las relaciones genéticas entre sus poblaciones, las cuales son el propósito fundamental del presente estudio.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Bosques Montanos de México y Norte de Centroamérica.

Los bosques de encino de la región montañosa Neotropical se distribuyen desde el centro de México hacia el sur, a través de Centroamérica, hasta la parte andina de Colombia y la frontera con Ecuador. La elevación de estos bosques oscila entre los 500 y 3500 msnm, se caracterizan por una mezcla tropical – templada de especies de plantas, animales y microorganismos (Kapelle, 2008).

Las familias con mayor presencia en los bosques montanos de Centro América son Lauracea, Melastomatácea, Rubiaceae, Araliaceae, Compositae, Myrcinaceae, Ericaceae y Fagácea. Fagácea es la octava familia con mayor riqueza de especies y el género *Quercus* representa el 5.3% de individuos por muestra y es el segundo género centroamericano con mayor número de especies. Claramente *Fagácea* es un elemento muy importante en los bosques montanos de Centroamérica (Gentry, 1993).

Entre los árboles dominantes de los bosques montanos están los robles o encinos (*Quercus*), las especies de encinos rojos (*Quercus* – Sección Lobatea) en la región de México y Centroamérica presentan los valores de diversidad más altos para el nuevo mundo, también son consideradas de

gran importancia debido a que son especies dominantes y especies claves en los bosques montanos y subtropicales de la región (Torres, Luna, y Oyama, 2011).

A menudo están acompañados por árboles de pino (hasta el norte de Nicaragua), magnolias y muchos otros árboles latifoliados como *Achornea latifolia*, *Alnus acuminata*, *Cornus disciflora* (llorón), *Drymys granadensis*, *Guatteria olviformis* (anonillo), *Ilex palida*, *Inga punctata* (guaba), *Persea vestricula* (aguacatillo), *Vaccinium consanguineum* (arrayán) entre otros. Esta compleja composición de especies es el resultado de una larga historia de cambios geológicos y climáticos, fuertemente influenciados por el origen del istmo centroamericano que conectó Norteamérica y Suramérica permitiendo un gran intercambio de especies entre ambos subcontinentes (Kappelle, 2008).

Evidencia palinológica sugiere que la vegetación característica a los bosques montanos experimentó desplazamientos altitudinales debidos a eventos climáticos. Cambios significativos en las áreas ocupadas por los bosques montanos fueron evidenciados a partir de estudios de la composición florística de las tierras bajas de Petén en el norte de Guatemala, donde se registra que especies vegetales que conforman el hábitat actual del chipé cejas doradas, como encinos (*Quercus*) y pinos (*Pinus*) formaron parte del paisaje de las tierras bajas de Petén (80 -150 msnm) durante periodos interglaciares correspondientes a los 18- 22 Ka (miles de años antes del presente), periodo también conocido como Pleistoceno tardío, seguidos de épocas de mayor aridez acontecidas entre 18 - 10 Ka al periodo del Plioceno, 10,000 años antes del presente (Hodell, et al., (2008). Asimismo, regiones de mayor altitud como la Sierra de los Cuchumatanes en Guatemala (3000 -3837 msnm), en el cuaternario tardío o el último glacial máximo cuentan con registros de presencia de glaciares (Roy y Lachniet, 2010).

2.2.2 Familia Parulidae: Características, Ecología y Taxonomía

La familia Parulidae se encuentra distribuida en todo el continente Americano, la mayor diversidad conocida de esta ocurre en América del Sur (Lovette, et al., 2010), incluye a aves conocidas como reinitas, chipés y birijitas. Es parte de los Oscines del nuevo mundo junto a Emberizidae, Drepanididae, Vireonidae, Icteridae y Fringillidae. Incluye aves pequeñas y muy activas que presentan plumajes coloridos, pico delgado, nueve plumas primarias (carácter diagnóstico de la familia); existe

variación estacional del plumaje entre sexos, edades y géneros, son primordialmente insectívoras (Howell y Webb, 1995).

Las relaciones taxonómicas y filogenéticas dentro de Parulidae y sus géneros han sido muy estudiadas ya que corresponden a buena parte de la avifauna Norteamericana (Lovette *et al.* 2010). Son considerados 22 géneros en la clasificación propuesta por la Unión Ornitológica Americana (AOU, por sus siglas en inglés), esta incluye a *Microligea*, *Teretistris*, *Zeledonia*, *Granatellus* y *Xenoligea*, *Vermivora*, *Oreothlypis*, *Catharopeza*, *Mniotilta*, *Setophaga*, *Protonotaria*, *Helmitheros*, *Limnothlypis*, *Seiurus*, *Geothlypis*, *Wilsonia*, *Cardellina*, *Myioborus*, *Euthlypis*, *Basileuterus* y *Phaeothlypis* (Lovette, *et al.*, 2010; AOU 2011) (Figura 3).



Fuente: (Lovette *et al.*, 2012)

Figura 3. Relaciones filogenéticas entre 107 integrantes de la familia Parulidae basado en Análisis de inferencia bayesiana a partir de datos moleculares y mitocondriales. **El recuadro rojo encierra el filogrupo que integra las especies del género *Basileuterus*.**

2.2.3 Género *Basileuterus*:

El género *Basileuterus* consta de siete especies de acuerdo al orden filogenético del Congreso Ornitológico Internacional -IOC- (Gill & Donsker, 2015). El género tiene su centro de diversidad en México y Centro América, en donde cuatro especies presentan distribución restringida (*B. lachrymosa*, *B. belli*, *B. melanogenys*, *B. ignotus*) y cuatro adicionales (*B. rufifrons*, *B. culicivorus*, *B. tristriatus* y *B. hypoleucus*) se encuentran distribuidas en Centro y Sur América, de acuerdo a la reconstrucción filogenética de la familia Parulidae (Lovette, et al., 2010).

La distribución de las especies del género en la región corresponde primordialmente a bosques húmedos tropicales y bosques montanos, *B. belli* se distribuye en los bosques montanos húmedos del Norte de México hasta Honduras en altitudes comprendidas entre los 1200 a los 3000 msnm (Howell y Webb, 1995); *B. lachrymosa* se distribuye en bosques húmedos tropicales y subtropicales desde el sur de Norte América hasta el norte de Colombia en altitudes comprendidas entre los 1600 -2200 (Stiles y Skutch, 2006); *B. culicivorus* se distribuye en bosques tropicales desde México a Argentina en altitudes comprendidas entre los 300 – 1500 msnm; *B. rufifrons* se distribuye en bosques montanos desde México a Venezuela en altitudes comprendidas entre los 600 – 1500 msnm; *B. tristriatus* se distribuye desde Costa Rica al norte de Bolivia en altitudes comprendidas entre los 1000 – 2200 msnm y *B. melanogenys* Costa Rica y Panamá 1600 a 3600 msnm distribuidas primordialmente en hábitats montanos, *B. culicivorus* y *B. rufifrons* corresponde a las especies con presencia en ecosistemas de menor altitud como los bosques tropicales, en el caso de *B. melanogenys* está presente en hábitats de bosques montanos y páramos de Costa Rica y Panamá (Stiles & Skutch, 2006) . En la región de México y Guatemala *B. belli* y *B. rufifrons* presenta traslape en su distribución geográfica y altitudinal parcial de acuerdo a registros de campo y la guía de aves de México y el Norte de Centro América (Howell y Webb, 1995).

Por su parte las especies restringidas a Sur América, *B. hypoleucus*, es filogenéticamente cercana *B. culicivorus*, quien se encuentra ampliamente distribuido en Centro y Sur América . Se estima que el género *Basileuterus* tuvo origen en un tiempo anterior al periodo de transición entre el Pleistoceno Temprano (2.59 millones de años) y Plioceno Tardío (5.33 millones de años), debido a que este género se encuentra anidado a la radiación de *Basileuterus* de acuerdo a la filogenia de Parulidae presentada por (Lovette, et al., 2010).

Las especies de *Basileuterus* presentes en un mismo ecosistema presentan una separación del nicho ecológico relacionado al volumen corporal, comportamiento y largo de estructuras como alas, picos y tarsos, como se ha demostrado en estudios de la Reinita coronidorada, *B. culicivurus* y *Myiothlypis leucoblepharus* (ex *B. leucoblepharus*) en el noreste de Argentina (Chantellanaz, 2008). Por su parte, *B. leucoprys*, *B. flavescens* y *B. hypoleucus*, difieren en al menos dos de los cuatro componentes de sus nichos ecológicos (tipo de vegetación, altura de forrajeo, tipo y ángulo de sustrato empleado) evaluados en un bosque de galería del ecosistema denominado “Cerrado” en el centro de Brasil, encontrándose que estos componentes guardan estrecha relación al volumen corporal y largo de estructuras corporales (Marini & Calvacanti, 1997).

Para el género *Basileuterus* también ha sido registrada la conducta de acicalamiento por insectos, en esta el ave permite la llegada de hormigas, orugas y otros a las alas, dorso y otras partes del cuerpo para presumiblemente combatir ectoparásitos o bien mitigar el efecto del cambio de plumaje debido a la acción de agentes pungentes presentes en estos. Esta actividad ha sido registrada para el chipe triestriado *Basileuterus triestriatus* con orugas en los bosques nubosos del Parque Nacional Monteverde en Costa Rica, el autor sugiere que esta actividad es realizada en el suelo para la misma especie en Norte América, pero es usualmente realizada en el sotobosque en regiones tropicales (Wenny, 2008).

2.2.4 *Basileuterus belli*:

Es endémica de bosques montanos húmedos entre los 1200 a 3500 msnm se distribuye en forma discontinua en México y Norte de Centro América. Su forma adulta presenta superciliar amarillo con borde inferior negro, contrastando con corona y auriculares rojo-canela, partes superiores olivo a olivo oscuro en los costados, garganta y partes interiores amarillas. (Figura 4) No existe diferencia entre sexos, plumaje efímero en juveniles (Howell y Webb, 1995).



Figura 4. Características fenotípicas del chipe cejas doradas, *Basileuterus belli*.

Fuente: elaboración propia

Esta especie se puede apreciar en pares o de forma individual merodeando en vegetación densa del sotobosque. Es una especie común a muy común, la lista roja de la IUCN la considera de baja preocupación para su conservación (B. I, 2012).

La información disponible para *Basileuterus belli* consta de registros históricos, avistamientos y pieles de colección presentes en colecciones de museo y bases de datos de museos y colecciones, la OIC sugieren que *Basileuterus belli* está constituida por sub-grupos a lo largo de su área de distribución que corresponden a ***B. belli belli*** para el norte de la Sierra Madre Oriental de México, ***B. belli bateli*** en la región Central de la Sierra Madre Oriental, ***B. belli clarus*** (Sierra Madre Occidental de México), ***B. belli scitulus*** en la Sierra Madre del Sur de Guatemala y ***B. belli subobscurus*** para montañas de Honduras. (Gill y Donsker, 2015) .

2.2.5 Filogeografía (Filogenia y Diversidad genética)

Es el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes de genes, sobre todo aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas (Avice J., 2004). La filogeografía enfatiza aspectos históricos de la distribución espacial actual de linajes de genes utilizando información temporal (histórica) que ha sido posible obtener a partir del uso y análisis de la información contenida en las moléculas de ADN. Esto es, trata de interpretar la extensión y el modo en que los procesos demográficos históricos han dejado marcas evolutivas en la distribución geográfica actual de caracteres. (Vázquez Domínguez, 2009)

Dos aspectos de la biología evolutiva moderna han permitido el avance de la filogeografía: Uno tecnológico, promovido por la secuenciación, análisis y almacenamiento de la variabilidad del ADN, y otro conceptual o teórico, que implicó la aplicación de la teoría de la coalescencia al estudio de procesos microevolutivos (Avice, et al., 1987). Dado que enfatiza los aspectos históricos de la actual distribución de los linajes génicos, la filogeografía puede considerarse como una subdisciplina de la biogeografía histórica, que integra enfoques y técnicas desde biología molecular, ecología y geología histórica, y busca interpretar las dinámicas históricas y ecológicas de las poblaciones de un organismo.

La filogeografía trabaja con los componentes históricos o filogenéticos de la distribución espacial de linajes de genes, y considera como ejes el tiempo y el espacio, en los cuales se mapean las genealogías de estudio (Domínguez, 2009).

2.2.6 Estudios filogeográficos de la avifauna en bosques montanos de México y Guatemala

La diversificación de las aves en regiones de altura y con distribución de bosques montanos en Mesoamérica es atribuida a aumentos del doble en las tasas de divergencia (2 al 5 %) del Plioceno hasta el Pleistoceno tardío, en relación con las tasas de divergencia en periodos anteriores, resultando de estos, los procesos de diversificación del último millón de años (Wierd, 2006). Para especies de tierras bajas las tasas de divergencia son constantes sugiriéndose procesos distintos de diversificación (Wierd, 2006).

El impacto del Istmo de Tehuantepec como barrera geográfica para un ensamble de aves de alta montaña formado por *Cyanocitta stelleri* (Corvidae), *Certhia americana* (Certhiidae), *Piranga flava* (Thraupidae), *Myadestes occidentalis* (Turdidae), *Parula supercilliosa*, *Basileuterus belli*, *Myioborus miniatus* (Parulidae) y *Atlapetes albinucha* (Emberizidae) fue evaluado empleando el Test de Computo Bayesiano Aproximado o (ABC) por su siglas en Inglés, probándose la hipótesis de divergencia intra e inter específica simultánea en poblaciones distribuidas en ambos lados de esta barrera (Klicka y Barber, 2010). Se encontró que *Basileuterus belli* junto a otras especies de bosques montanos en la región de México y Centroamérica experimentaron dos eventos de divergencia correspondiente a periodos comprendidos entre el Pleistoceno y el Plioceno tardío, sugiriendo que las fluctuaciones en los hábitats montanos han sido inducidas por ciclos climáticos (Klicka y Barber, 2010).

En otros estudios a nivel local se ha evaluado la diversidad genética y estructuración de las poblaciones del colibrí serrano de garganta verde *Lampornis viridipallens* identificando como barreras geográficas para sus poblaciones a los valles de Motagua y Polochic en Guatemala. (Asturias, 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La región de América Central Nuclear (Sur de México, Guatemala, Honduras y Belice) presenta un mosaico geográfico y geológico complejo que permite el estudio de las relaciones filogenéticas, espaciales y temporales de especies de alta montaña como el chipe cejas doradas, *Basileuterus belli*. Por su parte los sistemas montañosos y volcánicos habitas primordiales del chipe cejas doradas en la región constituyen sitios de gran diversidad biológica regularmente amenazados por actividades humanas.

Los avances y accesibilidad de herramientas y técnicas moleculares permiten determinar la estructuración, la historia evolutiva, diversidad genética y variación genética de las poblaciones de *Basileuterus belli*, mejorando de esta forma nuestro entendimiento de su distribución actual, la edad posible de origen de sus poblaciones y los factores que incidieran en la diversidad de esta especie y de otras especies propias de los bosques montanos de la región.

El estudio de las relaciones genéticas en poblaciones de aves endémicas regionales como las del chipe cejas doradas también nos permiten identificar posibles amenazas a sus poblaciones, identificar área prioritarias para su conservación a nivel local, plantear estrategias de conservación de los bosques montanos de la región, reconocidos como entornos dinámico en términos ecológicos, económicos y sociales. Finalmente el presente también constituiría una base para futuros estudios sobre la especie y una contribución a los estudios biogeográficos existentes a nivel regional.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Establecer las relaciones filogenéticas entre poblaciones de *Basileuterus belli* de México y Guatemala

4.2. Objetivos específicos

- Describir la estructuración de las poblaciones de *Basileuterus belli* empleando los métodos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud
- Describir la historia evolutiva de las poblaciones de *Basileuterus belli* presentes en la región de México y Guatemala.
- Proponer una hipótesis que explique las relaciones genéticas entre las poblaciones de *Basileuterus belli* de México y Guatemala.
- Analizar la diversidad genética de cada uno de los clados mayores identificados.

5. HIPOTESIS

La estructuración genética de las poblaciones del chipe cejas doradas (*Basileuterus belli*) es congruente con la presencia de barreras geográficas en su distribución como el Istmo de Tehuantepec, el altiplano central, la depresión del Río Balsas en México, Río Negro y cuenca del Río Motagua en Guatemala.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Universo

Poblaciones del chipe cejas doradas *Basileuterus belli*.

6.1.2 Muestra

Individuos de la especie del chipe cejas doradas *Basileuterus belli* generadas en el proyecto “Biotic inventory and evolution of the terrestrial vertebrate fauna of Nuclear Central America” del Museo de Zoología de Vertebrados (MZV) de la Universidad de California en Berkeley y el Museo de Historia Natural de la Escuela de Biología (MUSHNAT) de la Universidad de San Carlos de Guatemala de las cuales se extrajeron secuencias del gen mitocondrial ND2, otras secuencias genéticas de este gen fueron obtenidas en el sitio Web Genbank.

6.1.3 Área de Estudio

El área de estudio con presencia de *Basileuterus belli* en la región conocida como Centro América Nuclear (México, Guatemala, El Salvador, Honduras y Nicaragua) fue establecido dentro del proyecto “Biotic inventory and evolution of the terrestrial vertebrate fauna of Nuclear Central America” y además se tomó otras localidades con presencia de *Basileuterus belli* dentro de su área de distribución en México (Figura 5, y Tabla 1).

Diversidad genética y genealogía del Chipe Cejas Doradas *Basileuterus belli* en México y Guatemala

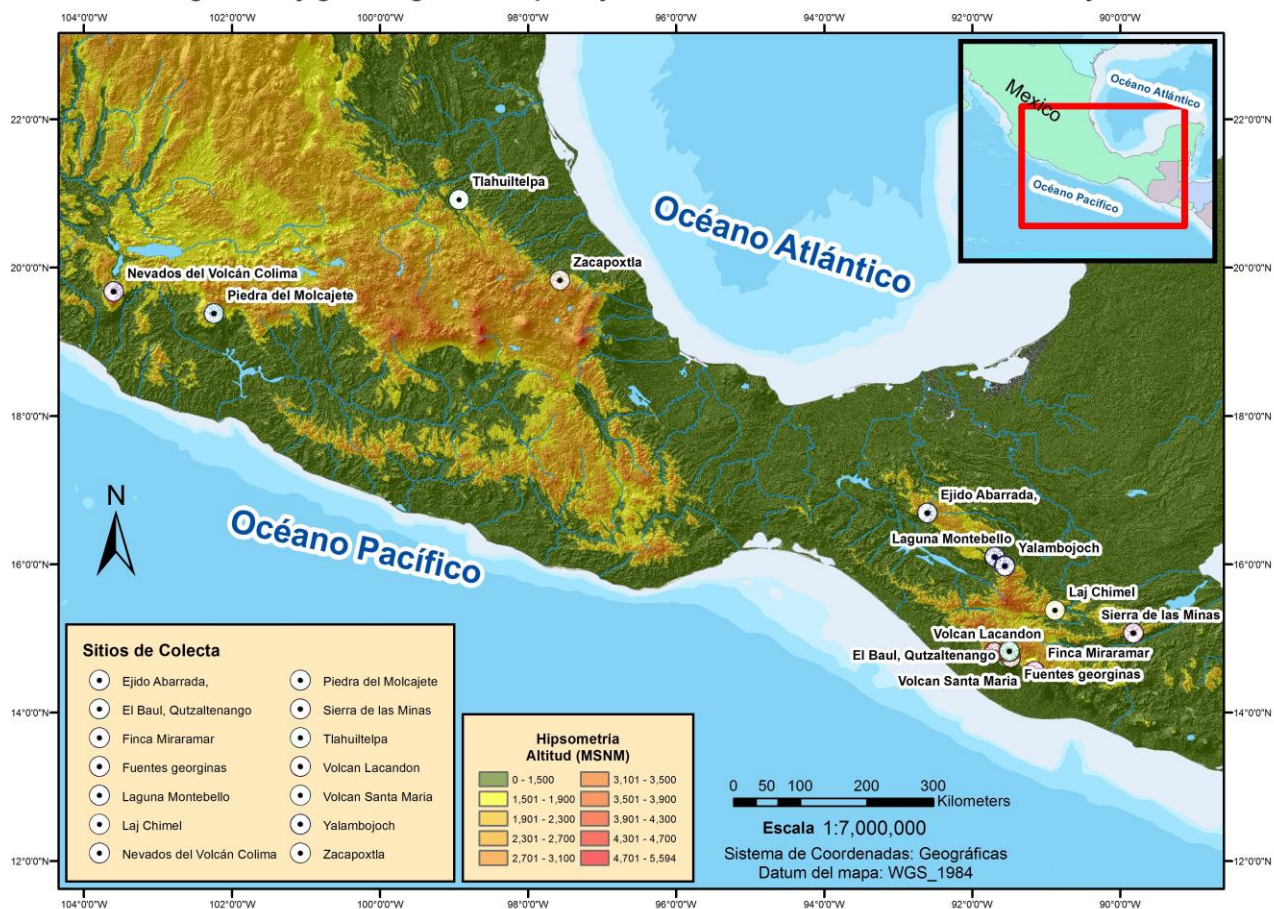


Figura5. Localidades de colecta de especímenes de *Basileuterus belli* en México y Norte de Centro América.

Fuente. Elaboración propia

Tabla 1. Procedencia de especímenes, Coordenas geográficas y número de individuos por localidad para el estudio de la diversidad genética y filogenia del Chipe Cejas Doradas *Basileuterus belli* en México y Guatemala

Procedencia de especímenes del Chipe Cejas Doradas	Coordenas Geográficas	No
Volcán de Fuego, Municipio de Colima, estado de Jalisco, México	19.5336°N, 103.5429°O	8
Sierra Madre Oriental, Municipio de Tlahuítelpa, Estado de Hidalgo, México	20.91899°N, 98.934639°O	10
Sierra Madre Occidental , Municipio de Zacapoaxtla, Estado de Hidalgo, México	19°49.82'N, 97°34.29'O	19
Piedra del Molcajete, Estado de Michoacán, México	19°25.86'N 102°15.87'O	11
Ejido de Abarrada, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México	16° 41'28"N 92° 36' 21"O	4
Reserva Lagunas de Monte Bello, Chiapas, México	16°39'04"N 90°52'10.71O	11
Yalambojoch, San Mateo Ixtatán, Quiche, Guatemala	15°58'49"N 91°34'22.6"O	10
Comunidad Laj Chimel, Uspatán, Quiche, Guatemala	15°23'23"N 90°52'10.71"O	7
Volcán Lacandón, Municipio de San Carlos Sija, Quetzaltenango , Guatemala	14°48.0'N 91°42' 59.62"O	2
Fuentes Georginas, Municipio de Zunil, Quetzaltenango, Guatemala	14°45.0'N 91°28'41'O	2
Volcán Santa María, Quetzaltenango , Guatemala	14°43.0'N 91°32.1'O	4
Cerro el Baúl, Municipio de Quetzaltenango, Quetzaltenango, Guatemala	14°49.7'N 91°29.7'O	7
Finca San Jerónimo Miramar, Municipio de Patulul Suchitepéquez, Guatemala	14°33'21.21"N 91° 9'38.09'O	2
Sierra de Las Minas, Aldea Gaitán, Izabal, Guatemala	15°9'15"N 90°29'11.54"O	6
TOTAL		96

6.2 METODOS

6.2.1 Colecta de especímenes

Se colectaron especímenes del chipe cejas doradas en las localidades correspondientes a Guatemala empleando redes de niebla, los especímenes colectados se prepararon para su resguardo en la colección ornitológica del Museo de Historia Natural de la Universidad de San Carlos de Guatemala (MUSHNAT) y del Museo de Zoología de vertebrados de la Universidad de California en Berkeley MVZ. Además se tomaron muestras de tejidos (músculo, corazón, hígado y, riñón) para su posterior uso en investigación. Los tejidos fueron preservados en viales (Nalgene®) conteniendo alcohol etílico al 95% en solución.

6.2.2 Métodos de laboratorio

6.2.2.1. Extracciones de ADN

Previo a la extracción las muestras de músculo e hígado fueron sometidas a un proceso de limpieza, maceración y purificación. La extracción se realizó siguiendo los pasos indicados por (Bowie, 2011) empleado el **Kit DNA Easy** de Quiagen. La verificación de calidad de extracción se realizó mediante una electroforesis. El ADN obtenido se cuantificó en todas las muestras empleando un espectrofotómetro de la serie NanoDrop 1000 de la marca Thermo Scientific.

Los procesos de extracción, purificación y amplificación de las muestras fueron realizados de acuerdo a los procedimientos descritos en el manual de procedimientos de laboratorio del Museo de Zoología de Vertebrados de la Universidad de California en Berkeley (Bowie, 2011), en el presente informe se describen los conceptos generales de cada procedimiento para mayor detalle y traducción de los métodos consultar (Jiménez-Barrios, 2011).

6.2.2.2 Amplificación de ADN empleando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Este procedimiento permite el aislamiento y amplificación de una región específica de ADN. Esencialmente permite hacer millones de copias de un fragmento de ADN o un gen específico, empleando desnaturalización, alineamiento y extensión de fragmentos de ADN correspondientes al

gen ND2, se emplearon los cebadores H6312 y L5204 (Cícero & Johnson, 2001) y la mezcla de reactivos indicada en la tabla 2, la configuración y temperatura de ciclos de PCR son detallados en la tabla 3. La amplificación de cada una de las muestras se comprobó por medio de una electroforesis. Para mayor detalle de los métodos consultar (Bowie, 2011) y (Jiménez-Barrios, 2011)

Tabla 2. Volúmenes empleados por reactivo para la Reacción en cadena de la Polimerasa PCR utilizada para determinar la diversidad genética y filogenia del Chipe Cejas Doradas *Basileuterus belli*.

Reactivo	Volumen
H ₂ O desionizada	5.63 µl
Buffer 10x PCR Invitrogen	1.0 µl
50 mM MgCl ₂	0.3 µl
10 mg/ml BSA	0.5 µl
10 uM ND2 L5204	0.6 µl
10 uM ND2 H6312	0.6 µl
10 mM Dd Tps	0.25 µl
5u /ul Free Taq	0.12 µl
DNA	1.0 µl

Tabla 3. Configuración de temperatura y duración de ciclos para uso de termocicladora en la reacción en cadena de la polimerasa PCR utilizada para determinar la diversidad genética y filogenia del Chipe Cejas Doradas *Basileuterus belli*.

Temperatura en °C	Duración
94	3 m
94	30 s X 35
50	30 s
72	45 s
72	45 s X 35
8	∞

6.2.2.3 Revisión de Extracciones y Productos PCR

Este procedimiento se empleó para verificar que la muestra presenta ADN y si el fragmento de ADN corresponde al tamaño del gen analizado. Se empleó electroforesis de extracciones y productos de PCR.

6.2.2.4 Purificación de productos del PCR

Se empleó el método de Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina de Camarón (EXO/SAP por sus siglas en Inglés) para la purificación de los productos PCR que presentaron únicamente una banda en la prueba de electroforesis. La exonucleasa I degrada el exceso de los cebadores utilizados en la PCR. La Fosfatasa Alcalina de Camarón desfosforila los dnTPS utilizados en la PCR. La configuración de temperatura y ciclos para purificación de productos de PCR se detalla en la tabla 4.

Tabla 4. Configuración de temperatura y duración de ciclos para uso de termocicladora en la purificación de productos PCR utilizada para determinar la diversidad genética y filogenia del Chipe Cejas Doradas *Basileuterus belli*.

Temperatura en °C	Duración
37	30 min
80	15 min
10	Infinito

6.2.2.5 Purificación del Producto de los Ciclo secuenciación

El producto de los ciclos de secuenciación se purificó utilizando Sephadex. Se preparó una solución de Sephadex (50 mL de agua + 3 gr de Sephadex), posteriormente, se agregó 400 µL de Sephadex en cada celda de una placa centrifugándose a 1,500 rpm durante 2 minutos. La muestra se centrifugó de nuevo a 1500 rpm por 2 minutos, colocando debajo de la placa con Sephadex y la muestra, una placa de secuenciación. (Jiménez-Barrios, 2011).

6.2.2.6 Método de Secuenciación

Este procedimiento se realizó en todas las muestras previamente amplificadas y purificadas (productos PCR). Se utilizó para este propósito una máquina secuenciadora ABI 3739 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) para obtener las secuencias. Esta reacción implica el uso cebadores y un

tipo especial de nucleótidos conocidos como didesoxinucleótidos o **ddNTPs**. Estos están marcados fluorescentemente y al momento de ser agregados detienen la síntesis de la hebra de ADN en la cual son incorporados (terminadores). Cada ddNTP emite un color con amplitud de onda característico que es registrado en un electroferograma. Los ddNTPs se unen a los sitios de cada par de bases de la secuencia objetivo durante la ciclo secuenciación (Bowie, 2011).

6.2.2.7 Edición de electroferogramas (secuencias de ADN)

Consistió en la depuración de fragmentos de ADN ilegibles o incongruencias observados en los electroferogramas obtenidos en el proceso de ciclos de secuenciación. La edición consistió en el recorte de extremos (nucleótidos que se encuentran más allá de los codones de inicio y finalización de la secuencia objetivo).- Como producto final se buscó obtener una secuencia de consenso a partir de cada una de las hebras presentes en una doble hélice de ADN del gen o fragmento de interés. Las secuencias obtenidas y sin procesar se inspeccionaron, editaron y alinearon empleando el programa Geneious 7.4 (Drummond, Ho, Rawlence, y Rambaut, 2007).

6.3 Análisis de datos

Se emplearon un total de 96 secuencias de ADN mitocondrial correspondientes a la segunda sub unidad del gen NDH2 deshidrogenasa ND2 1041 pb, obtenidas en este estudio, y de la base de datos GenBank provenientes de datos colectados en diferentes regiones de México y otras localidades disponibles en el sitio GenBank para el chipe cejas doradas *Basileuterus belli*.

Adicionalmente se emplearon 6 secuencias de especies del género *Basileuterus* como grupo externo *B. rufifrons* (Swaison, 1938), *B. melanogenys* (Baird, 1865), *B. culicivurus* (Deppe, 1930), *B. ignotus* (Nelson, 1918) y *B. tristriatus* (Von Tuschudi, 1844) dado que estas constituyen las especies más cercanamente emparentados con *B. belli* (Guiroud, 1948).

6.3.1 Estructuración de poblaciones de *Basileuterus belli*:

Este análisis se empleó para determinar los principales grupos presentes en la región, para ello se evaluaron los siguientes procedimientos.

6.3.1.1 Análisis de inferencia bayesiana

Se utilizó el programa MrBayes versión 3.2.2 (Ronquist, Huelsenbeck, y Teslenko, 2011) disponible el sitio web CIPRES SCIENCE GATEWAY (<http://www.phylo.org>). MrBayes es un programa para la estimación bayesiana de filogenias, la inferencia bayesiana de una filogenia está basada en la distribución de la probabilidad a posteriori de un árbol. Los árboles son etiquetados como T1, T2, T3 ... Tn donde n es el número de árboles posibles, donde la probabilidad posterior es calculada a partir del teorema de Bayes.

$$\Pr[T_i: X] = \Pr \frac{[X: T_i]X \Pr[T_i]}{\Pr [X]}$$

Donde X es un carácter de matriz, Pr [Ti: X] es la probabilidad a posteriori de un árbol inicial, Pr[X:Ti] es la probabilidad del árbol inicial y Pr [Ti] es la probabilidad a priori de el árbol inicial, el denominador de la fórmula de Bayes (Pr [X]) es una constante de normalización que involucra una sumatoria de todos los árboles posibles. La similitud no puede ser calculada con el conocimiento de una sola topología de árbol (Huelsenback y Bollback, 2001).

En la práctica es imposible calcular la distribución de probabilidad a posterior analíticamente, en lugar de esto la probabilidad a posteriori debe ser aproximada. Mr bayes usa el método conocido como “Cadenas de Markov y permutaciones de Monte Carlo” para aproximar la probabilidad a posterior de los árboles (Huelsenbeck y Ronquist, 2001).

Las muestras empleadas en este análisis se identificaron de acuerdo al sitio de procedencia, Como grupos externos se emplearon secuencias de las especies *B. triastriatus* JQ727425.1 (Sudamérica cordillera central de Colombia y Andes occidentales) *B. coronatus* JQ727427.1 (Sudamérica – Cordillera central de Colombia y Andes peruanos occidentales), *B. melanogenys* GU932051.1 (Sistemas montañosos de Costa Rica y Panamá) y *B. rufifrons* AF383128.1 (Sistemas montañosos de México y Guatemala).

La configuración de parámetros, se definieron a partir de diferentes modelos de sustitución nucleotídica para las posiciones 1, 2 y 3 de los codones, empleando el programa J Model Test (Posada, 2008), se encontró que los modelos que mejor describen cada posición son los siguientes HKY + G, HKY, GTR + G, respectivamente.

El análisis consideró como base corridas MCMC de 10 millones de generaciones, muestreadas a cada 1000 generaciones y 2500 generaciones de descarte o periodo de "Burn in", otros parámetros y condiciones son preestablecidos por el programa. Los árboles obtenidos fueron visualizados como árboles filogenéticos el programa FigTree5.3 (Drummonds, HO, Matthew, y Rambaut, 2006.) Por su parte, las relación entre los haplotipos encontrados en las poblaciones de *B belli* se analizaron en el programa DnaSP (Librado y Rozas, 2009).

6.3.1.2 Análisis máxima verosimilitud (ML)

Los análisis de máxima verosimilitud realizan una búsqueda heurística del mejor árbol posible basado en el método de trepamiento de cerros o “Hill Climbing” este combina la inserción escalonada de taxa en un árbol creciente y re arreglos de la topología del árbol. Para cada posición posible de inserción y re arreglo, el largo de las ramas resultante es optimizado y la similitud del árbol es computada, cuando el re arreglo mejora al árbol inicial o cuando la inserción de posición es la mejor entre todas las posibles, este árbol será el nuevo árbol inicial. (Guindon y Gascuel, 2003).

En el presente análisis se implementó el modelo de sustitución nucleotídica GTR+G (General Time Reversible Model) con una tasa de heterogeneidad gama, selección de la 1era ,2da o 3era posición dentro del codón , un árbol inicial en el modelo de Neighbor Joining y 10,000 réplicas de muestreo Bootstrap otros parámetros fueron predeterminados por el programa MEGA 6.0 (Tamura, Stecher, Peterson , Filipski, & Kumar, 2013) .

6.2.3.3 Redes de Haplotipos:

Una forma alternativa de representar las relaciones filogenéticas de una población son las redes de haplotipos, Se basan en la reconstrucción de árboles multibifurcados arreglados a manera de redes de haplotipos bajo métodos filogenéticos o métodos de coalescencia (Domínguez y Vázquez - Domínguez, 2009).

Estas describen la distancia entre poblaciones, la frecuencia y presencia de un determinado haplotipo en una población. Estas cualidades permiten representar las relaciones filogenéticas en poblaciones con cercanía geográfica. Las distancias entre los grupos de una red es representada por el número de mutaciones entre cada uno de los haplotipos encontrados y la frecuencia por el tamaño de los círculos, los círculos en colores sólidos muestran haplotipos encontrados en una sola localidad, círculos multicolor muestran haplotipos con individuos de diferentes procedencia (Posada y Crandall, 2001) para la elaboración de las redes de haplotipo se empleó el algoritmo *median Joining* empleando el software Network. (Bendelt, Foster, & Rohl, 1999)

6.3.2 Análisis del tiempo de divergencia

El análisis del tiempo de divergencia o análisis del “Reloj Molecular” permite estimar el tiempo de divergencia entre poblaciones de una especie, el análisis estima la cantidad de diferencias en los nucleótidos de una secuencia de ADN en cada población, la tasa evolutiva de divergencia encontrada en estas coincide en la tasa basada en la evidencia fósil. La tasa de cambio evolutivo de cualquier proteína específica se supone que es constante a lo largo del tiempo y de diferentes linajes (Drummonds, HO, Matthew, y Rambaut, 2006).

Para este análisis fue necesaria la generación de un archivo de inicio empleando el programa BEUTI 1.6 (Drummond, Ho, Rawlence y Rambaut, 2006). Se tomó como base la edad general de la especie la sugerida por Klica y Barber de 2.6 Millones de Años antes de presente (MYA). Este dato fue ingresado en el segmento de prioridades de distribución en (PRIOR PANEL), los subgrupos *B. belli*, *B. scitulus*, *B. bateli* y se les asignó una distribución normal. La configuración general del análisis empleó el cálculo de reloj molecular a partir de un modelo relajado no correlacionado log normal, con prioridad para un árbol de especiación de Yule, un árbol de inicio UPGMA, y los parámetros adicionales predefinidos por el programa. El archivo de inicio fue corrido con el software BEAST 1.6.1 (Drummond, Ho, Rawlence, & Rambaut, 2007).

El soporte estadístico de la edad de los grupos resultantes de *B. belli* fue evaluado en el programa Tracer, en el que se verificó que la SSD (Sample Size Distribution) fuera mayor a 200 según lo recomendado por (Rambaut & Drummond, 2009) El árbol resultante es obtenido con el programa Tree Annotator (Drummond, Ho, Rawlence, & Rambaut, 2007) y la edición del árbol resultante fue realizada en Fig Tree (Drummond, Ho, Rawlence, & Rambaut, 2007).

Este análisis fue corrido por 50 millones de generaciones, documentándose cambios cada 1000 pasos, se consideraron 10000 generaciones de descarte o periodo de "*Burn in*". La significancia estadística de los resultados obtenidos se revisaron en el programa Tracer 1.6 (Drummond, Ho, Rawlence, y Rambaut, 2007).

6.3.3 Diversidad genética:

Se generaron valores de diversidad estándar para las poblaciones encontradas a partir de los análisis de estructuración filogenética en poblaciones del chipe cejas doradas del sur de México y Guatemala, calculando el sumario de los siguientes estadísticos: número de sitios polimórficos (*var*), número de Haplotipos (H), diversidad de haplotipos (Hd), diversidad de nucleótidos (π), Theta (Φ) μ , Theta (Φ)S, calculados a partir de una matriz de distancia de comparación de pares (Pairwise difference).

Adicionalmente se realizó un test neutralidad empleando el estadístico D de Tajima para determinar desviaciones de neutralidad, El test distingue entre una secuencia de ADN en evolución al azar "neutral" y una evolución en virtud de un proceso no aleatorio, incluyendo selección direccional o el equilibrio de selección, la expansión o contracción demográfica, autostop genética, o introgresión, están basados en la comparación de los estimadores Theta (Φ) S y Theta (Φ) π .

Para el presente estudio se empleó un número de 10000 muestras simuladas y definidas a partir de los haplotipos originales; ambos análisis se realizaron en el software de libre acceso Arlequin 3.5 (Excofier, 2009).

6.3.4 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis AMOVA permite estimar la variación molecular dentro de una especie, se basa en un modelo jerárquico o anidado, se diferencia de un análisis de varianza en que puede tener diferentes suposiciones evolutivas sin modificar la estructura básica de análisis.

El análisis molecular reconoce la variabilidad genética dentro de regiones o grupos reconocidos para una especie (FCT), de las poblaciones dentro de una misma región (FSC) y la variabilidad general entre poblaciones (FST), estos valores son conocidos como índices de fijación y están basados en el estadístico F de Wright, sus valores son expresados en rango de 0 al 1, donde el cero indica que no existen diferencia genética en las subpoblaciones y 1 indica la fijación de alelos alternos para diferentes poblaciones (Excofier, Smouse, y Quattro, 1992).

La hipótesis utiliza método de permutación que no requiere la suposición de una distribución normal. Para el presente estudio, se evaluó si la diferencias entre los haplogrupos encontrados es

significativa, se empleó el modelo estándar para datos haplotípicos calculado a partir de un número de 20,000 permutaciones, empleando el software Arlequin 3.5.1 (Excofier, 2009).

A partir de la estructuración observada en los análisis de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud, se sometieron al análisis de varianza molecular tres regiones formados por poblaciones de *Basileuterus belli* a lo largo de su distribución conformada de la siguiente forma:

Sierra Madre Oriental de México (*Basileuterus belli bateli*) conformado por individuos de las poblaciones de Tlahuitelpa y Zacapoaxtla.

Sierra Madre Occidental de México (*Basileuterus belli belli*) conformado por individuos de las poblaciones de la Piedra del Molcajete y Nevados del Volcán Colima.

Sierra Madre de Chiapas y Guatemala (*Basileuterus belli scitulus*) conformado por individuos de las poblaciones de Yalambojoch, Sierra de las Minas, Laj Chimel, Volcán Santa María, Finca San Jerónimo, Lagunas de Montebello y Ejido Abarrada en Chiapas México.

7. RESULTADOS

7.1 Estructura de la Población

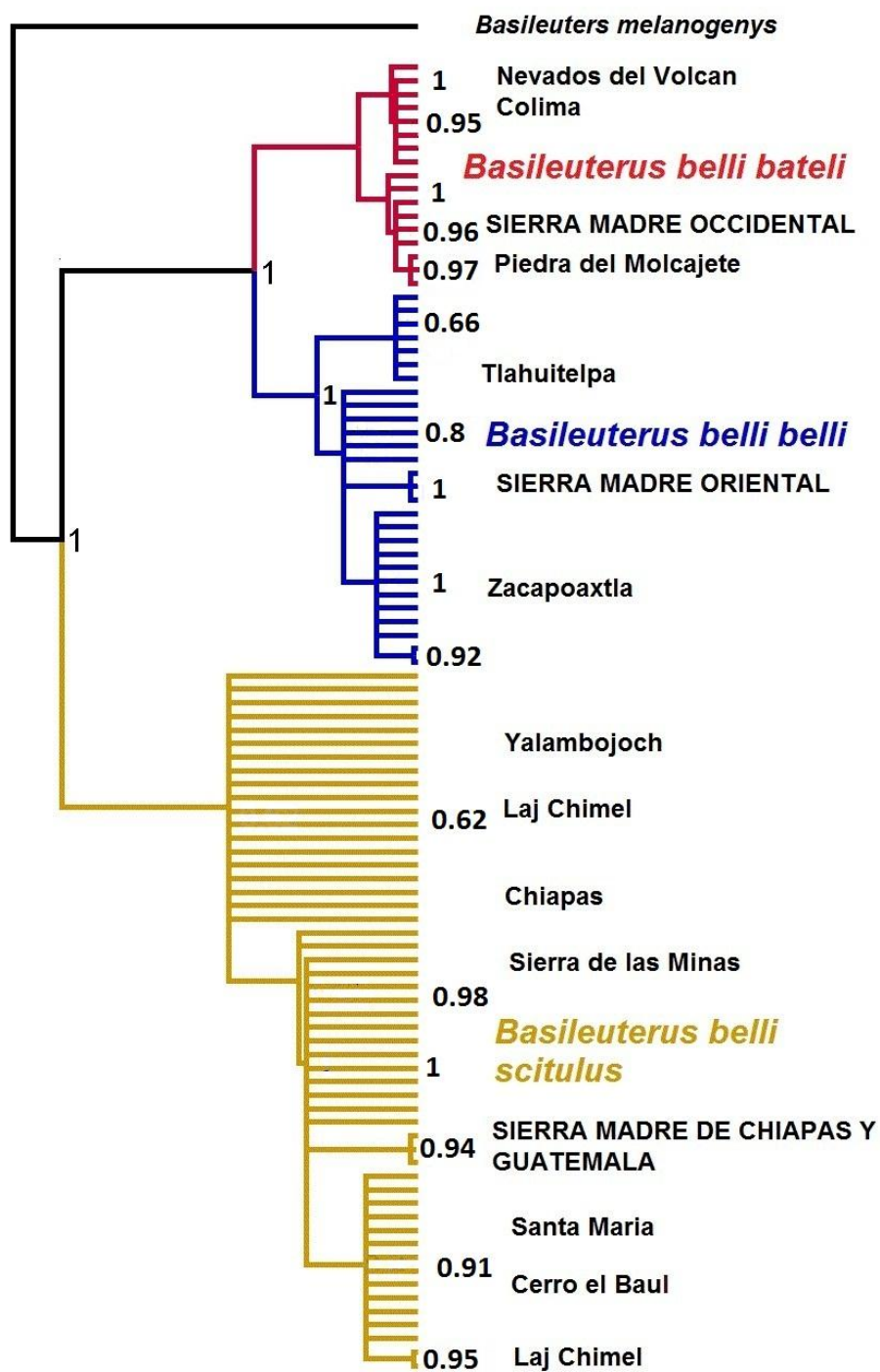
Se identificaron tres de los cinco grupos o subespecies propuestas para *Basileuterus belli*, empleando el análisis de inferencia bayesiana y el análisis de máxima verosimilitud ambos análisis mostraron un mismo patrón y topología de árbol, no se contaron con especímenes de las subespecies *B. belli clarus* de la Sierra Madre del sur de México ni de *B. belli suboscurus* distribuida en los sistemas montañosos de Honduras.

Los principales linajes son separados geográficamente por el valle central y el eje neo volcánico transversal e istmo de Tehuantepec en México. En la parte superior del árbol se identificó un grupo integrado por las poblaciones de la Sierra Madre Occidental de México (*B. belli bateli*) con una probabilidad a posteriori (PP) de **0.79 y 98 %** de Bootstrap (figuras 7 y 8) Las poblaciones que conforman este sub grupo son volcán Colima (**0.95 PP- 94 %**) y la Piedra del Molcajete (**0.99 y 98%**) ver figuras 7 y 8, estas forman linajes con una fuerte estructuración y respaldo basado en altos valores de probabilidad posterior y proporciones de sus réplicas Bootstrap. Ambos grupos son integrados por individuos de una misma población, estas poblaciones están separadas geográficamente por regiones de baja altitud y marcada aridez dentro de la cuenca del río Grande de Santiago en los estados de Jalisco y Nayarit.

El grupo formado por las poblaciones de la sierra Madre Oriental de México (*B. belli belli*), es integrado por las poblaciones de Tlahuitelpa y Zacapoaxtla formando un linaje con alto respaldo estadístico (**1 PP y 95 %**). Sin embargo no se observó la formación de subgrupos integrados por individuos de una misma población, tanto en el análisis de inferencia bayesiana como en el de máxima verosimilitud. En términos generales el subgrupo está claramente definido pero grandemente distribuido en la región, tanto Tlahuitelpa como Zacapoaxtla constituyen las poblaciones con mayor distanciamiento geográfico (500 km) dentro de un subgrupo. Geográficamente ambas localidades presentan similares características, altitud superior a los 1800 msnm y los mayores remanentes del bosque pino encino de la región Caribe de México.

Se identificó un tercer linaje formado por las poblaciones de la sierra madre de Chiapas y Guatemala (***B. belli scitulus***) **0.62 PP y 83.9 %**. Las biparticiones observadas en el análisis de máxima verosimilitud son justificadas por los datos según indican los porcentajes de sus réplicas de Bootstrap. Las poblaciones de Sierra Madre de Chiapas y Guatemala (***B. belli scitulus***) constituyen un grupo hermano al grupo formado **por *B. belli belli* y *B. belli bateli***, este grupo presenta con moderado respaldado estadístico 0.62 PP y 84 % de bootstrap. Este subgrupo agrupa a las poblaciones de San Jerónimo, Cerro Baúl, Santa María en la cadena volcánica de Guatemala, Abarrada en Chiapas, las poblaciones de Laj Chimel y sierra de las Minas En ambos análisis se observa escasa estructuración para este subgrupo

Los grupos formados por ***B. belli scitulus*** (Sierra madre de Chiapas y Guatemala) y los grupos formados por ***B. belli belli* y *B. belli bateli*** (Sierra Madre Oriental y occidental de México) son separados por las tierras bajas del istmo de Tehuantepec.



Fuente: Datos Experimentales

Figura7. Árbol de relaciones filogenéticas del Chipe cejas Doradas (*Basileuterus belli*) a partir de Análisis de Inferencia Bayesiana. Los valores representan valores de probabilidad a posteriori en cada nodo.

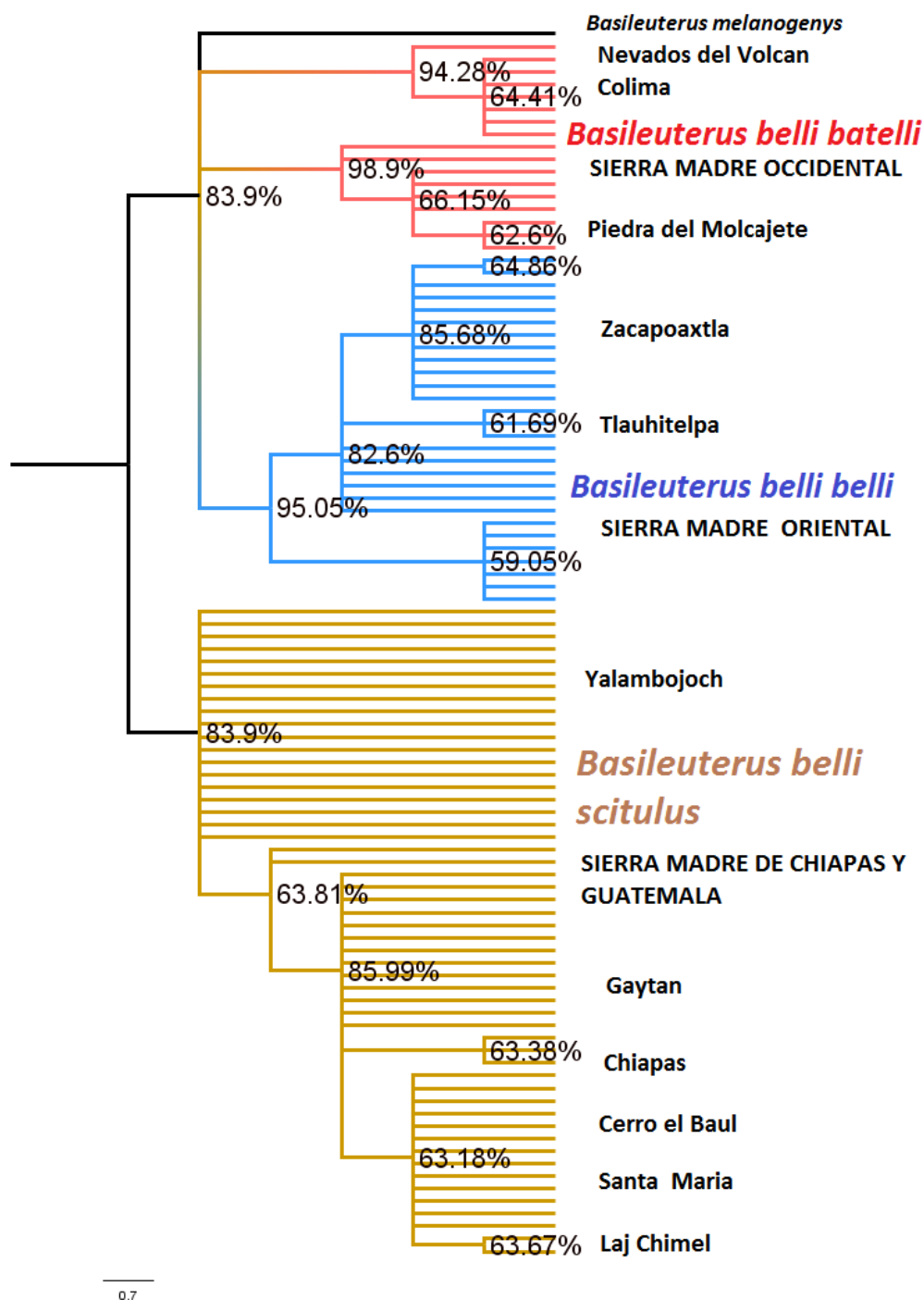


Figura 8. Árbol de relaciones filogenéticas de poblaciones del Chipe Cejas Doradas (*Basileuterus belli*) a partir del análisis de Máxima Verosimilitud, porcentajes indican No de réplicas Bootstrap.

Redes de Haplotipos

En las 96 secuencias del gen ND2 de *Basileuterus belli* se encontró un total de 35 haplotipos, los haplotipos de mayor frecuencia en población corresponde a los identificados como H1 y H3 presente en la región de la Sierra Madre de Chiapas – Guatemala, el haplotipo H10 presente en la región formada por la cadena volcánica del Pacífico de Guatemala (Santa María , Cerro Baúl, San Jerónimo), los haplotipos H20 , H22 y H28 presentes en la Sierra Madre Oriental de México y el haplotipo H32 presente en la Sierra Madre Occidental de México. Solamente un haplotipo correspondiente al haplotipo H28 (Tlahuitelpa) fue compartido entre clados mayores, encontrándose agrupado en las poblaciones de la cordillera de Chiapas y Guatemala.

Se observó la formación de tres grupo principales que corresponden a las mayores áreas de distribución de las sub especies *Basileuterus belli*, *B. belli belli* *B. belli clarus* y *B. belli scitulus*.

Sierra Madre Oriental de México (*B. belli belli*) Los haplotipos de esta región son representados en color azul y celeste para las poblaciones de Zacapoaxtla y Tlahuitelpa respectivamente(figura 9). A esta región corresponden un total de 28 especímenes. Los haplotipos con mayor frecuencia corresponden a H18, H19, H22 con 9 individuos, H6 con 6 individuos por haplotipo, en todos los casos presentan individuos de ambas procedencias, los círculos en color solido corresponden a individuos que tienen una única procedencia (figura 9).

Sierra Madre Occidental de México (*B. belli bateli*): Los haplotipos de esta región son representados en color Rojo y Violeta, los haplotipos con mayor frecuencia corresponden a H23, H25 y H34 de las poblaciones de Nevados del volcán Colima y la Piedra del Molcajete (figura 9). Los haplotipos corresponden únicamente a un solo sitio de procedencia.

Sierra Madre de Chiapas y Guatemala (*B. belli scitulus*): Los haplotipos de esta región son representados en variantes de color verde, están integradas por haplotipos de diferentes procedencias (figura 9). Los haplotipos con mayor frecuencia corresponden al H1, H3 y H8 presentan entre una y dos mutaciones que separan a los haplotipos que conforman este grupo, los haplotipos se encontraron en la mayoría de localidades que conforman este grupo.

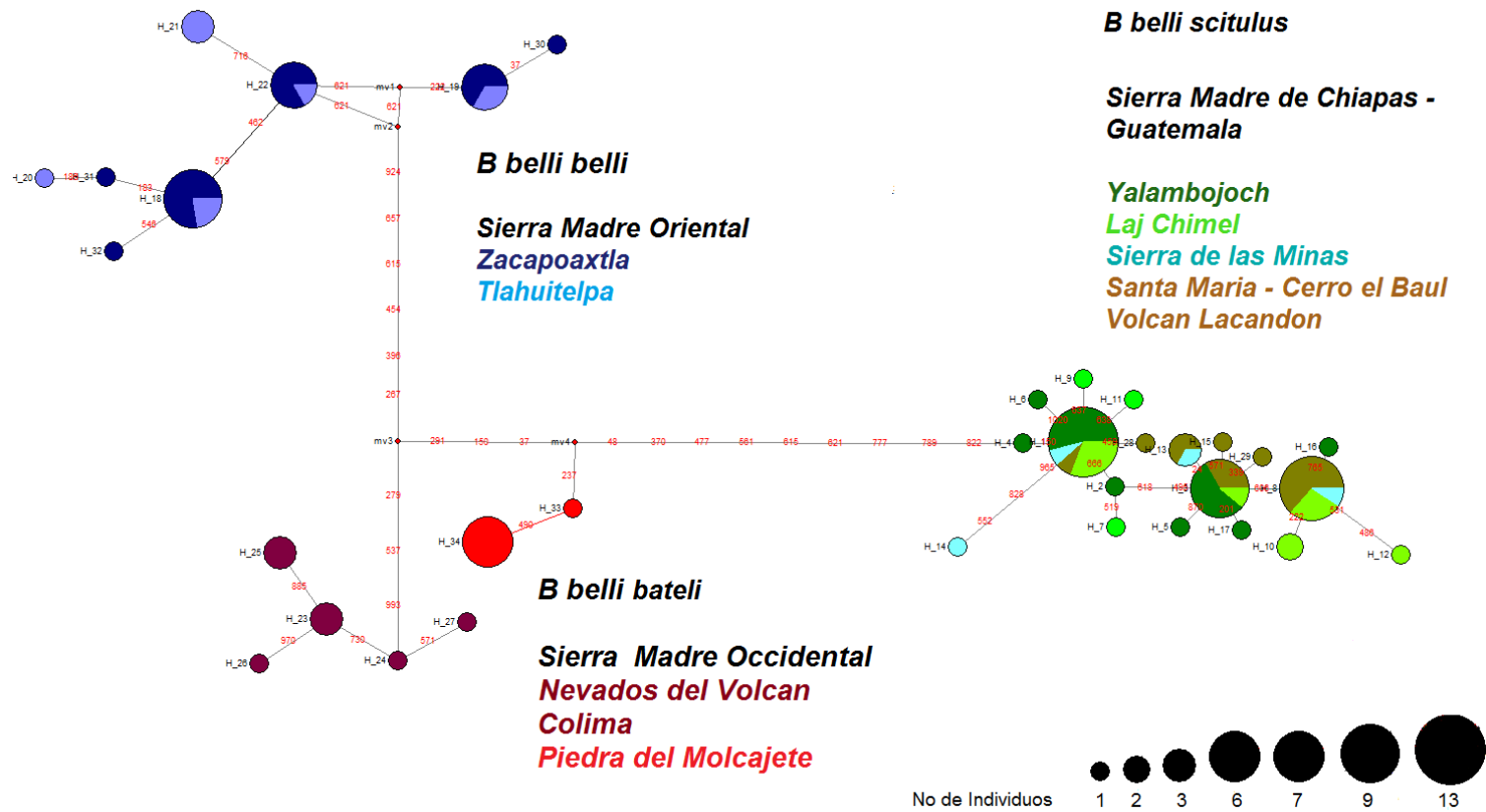


Figura9. Red de Haplotipos " Median Joining" de las poblaciones del Chipe Cejas Doradas (*Basileuterus belli*) de México y Norte de Centro América.

7.1 Análisis del tiempo de divergencia

Se sugiere que *Basileuterus belli* se formó como especie en un intervalo posible de 1.72 – 2.50 Millones de años atrás MYA con un 95 % del intervalo superior de densidad posterior (HPD) por sus siglas en ingles y **2.104 MYA** como valor promedio junto a *B. melanogenys*. Los diferentes complejos o linajes que comprenden *B. belli* se originan en un tiempo posterior a los 2.02 MYA ~ en el periodo conocido como Pleistoceno 2.0 y 0.1 MYA.

El grupo correspondiente a *B. belli bateli* está constituido por las poblaciones de los nevados del volcán Colima y Piedra del Molcajete surgiendo en un intervalo posible de 0.62 – 1.82 MYA (95% HPD) y como valor promedio **1.223 MYA** (figura 6 grupo rojo). Por su parte, el linaje formado por *B. belli belli* constituido por las poblaciones de Tlahuitelpa y Zacapoaxtla surgen en un intervalo posible de 1.81 – 2.89 MYA (95% HPD) y como valor promedio de **2.006 MYA** (ver figura 6 grupo azul). Este grupo constituye el de mayor antigüedad entre las subespecies conocidas de *B. belli*.

Por su parte los linajes correspondientes a *B. belli scitulus* formado por las poblaciones de la Sierra Madre de Chiapas y Guatemala surgieron un origen de formación de en un intervalo posible de 0.94 -2.84 MYA (95% HPD) y un valor promedio de **1.84 MYA**.

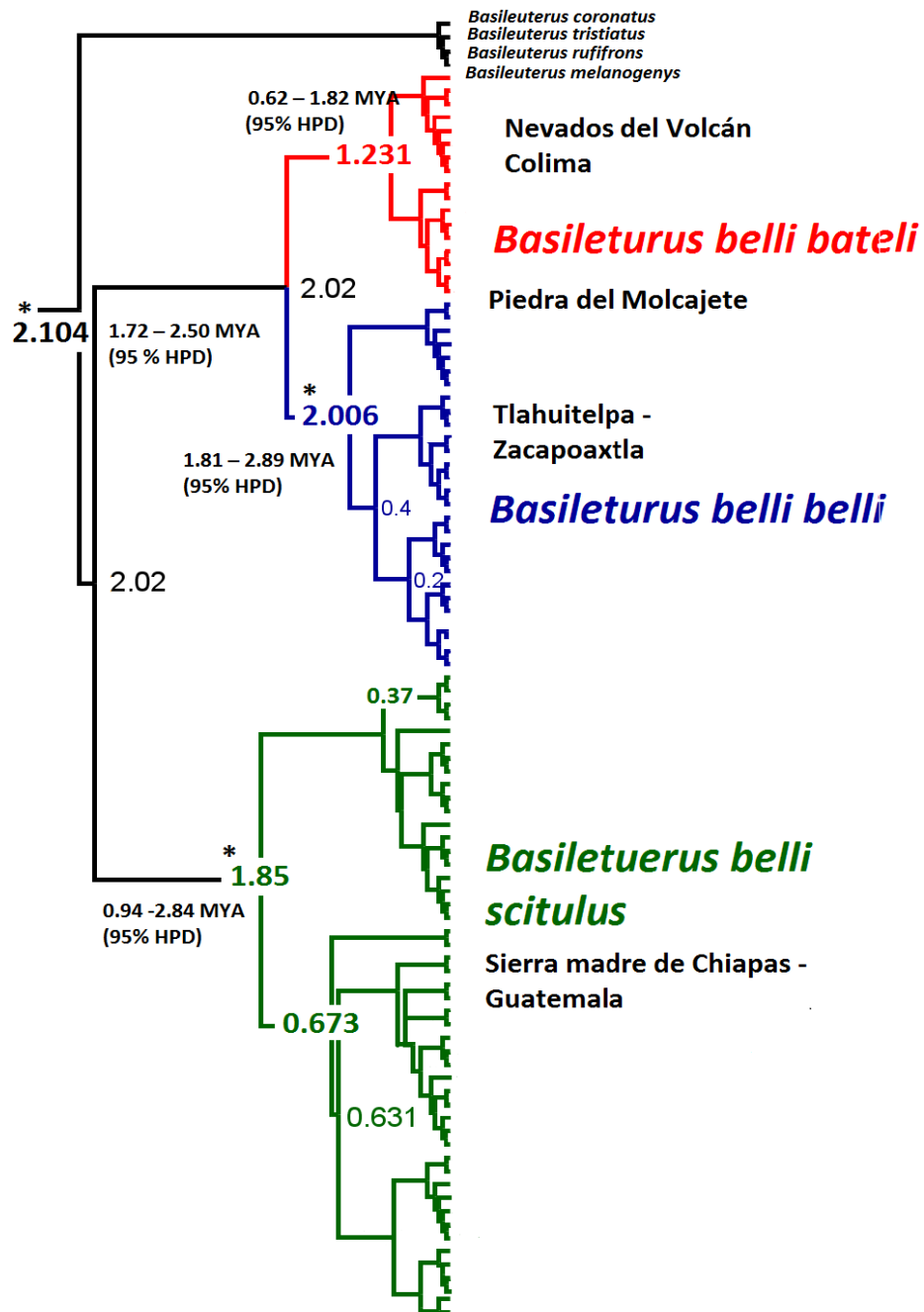


Figura 6. Análisis de Reloj Molecular, los nodos indican edad estimada para cada nodo en Millones de años. MYA los valores resaltados con asterisco corresponde a los valores promedio de formación del grupo.

7.3 Diversidad Genética

Del total de 96 secuencias del gen ND2 de *Basileuterus belli* se encontró un total de 35 haplotipos.

La cantidad de sitios variables (*var*) están asociados a las medidas de diversidad genética, en el presente estudio se encuentran valores máximos de 19 *var* correspondientes a la localidad de Tlahuitelpa, seguida por la población de Laj Chimel 18 *var* y de Ejido Abarrada 15 *var*, un valor de 0 *var* fue registrado para la población de Nevados del volcán Colima en la sierra madre Oriental (Ver Tabla 5)

Las diversidad haplotípica (*Hd*) corresponde a la probabilidad de encontrar dos haplotipos idénticos en una misma muestra (Nei, 1987) en el presente estudio se identificó que los valores máximos de diversidad haplotípica corresponden a poblaciones de Laj Chimel con 0.94 *Hd*, Sierra de las Minas con 0.9 *Hd*, Chiapas con 0.88 *Hd* esto dentro de la Sierra Madre de Chiapas y Guatemala y Tlahuitelpa 0.8 *Hd* en la Sierra Madre de Oriental de México, la que presentan un mayor número de sitios polimórficos y mayor número de haplotipos en todas las poblaciones de *B.belli*. La población con menor diversidad corresponde al de los Nevados del Volcán Colima 0.25 *Hd* que muestra únicamente dos haplotipos. En términos generales la mayoría de poblaciones muestran valores de diversidad genética en el ámbito de los 0.625 a 1 *Hd*, en ambos casos cabe señalarse que los resultados son sensibles al tamaño de la muestra. La diversidad haplotípica y nucleotídica se resumen en el cuadro. Ver tabla 5.

La diversidad de nucleótidos (π) corresponde a la probabilidad de que dos sitios (posiciones del nucleótido en un secuencia) seleccionados al azar sean iguales. Asumiendo que no existe recombinación ni selección neutral y es equivalente al valor de la heterocigosidad esperada. Los valores de diversidad genética encontrados muestran valores en el ámbito de los 0.00 a los 0.0097, los valores mayores corresponden a poblaciones presentes en la sierra madre de Chiapas – Guatemala (Ejido Abarrada, Laj Chimel Y Tlahuitelpa) valores iguales o cercanos a cero están presentes en las poblaciones de Nevados del Volcán Colima y Yalambojoch (ver Tabla 5).

Los valores observados a partir del test D de Tajima muestran que las poblaciones de Santa María-Baúl y Volcán Colima muestran valores superiores > 1.0 , por su parte Laj Chimel, Sierra de las Minas, Yalambojoch en Guatemala, Chiapas y Piedra del Molcajete en México, muestran valores en el ámbito de 0.0 a los -1.145 (Las poblaciones con resultados inferiores a cero sugieren poblaciones en expansión, con frecuencia de nucleótidos relativamente baja que indican eventos recientes de separación (Perfecti, Picó, y Gómez, 2009) en los casos de poblaciones con valores igual a 0 A Barrada, y Finca San Jerónimo el test indica que las poblaciones se encuentran en equilibrio o bien han mantenido tasas de mutación constantes en el tiempo, el valor obtenido en el test de neutralidad fue sometido a una prueba P que indica la significancia de la prueba.

Tabla 5 Diversidad genética de poblaciones del Chipe Cejas Doradas (*Basileuterus belli*). Localidad, No de especímenes por localidad (N), No de sitios polimórficos (S), sitios variables (var), haplotipos (H), Diversidad Haplotípica (Hd) + - desviación estándar (σ), Diversidad nucleotídica (π) + - desviación estándar (σ), D de Tajima y correspondiente valor de P, Los valores resaltados en negrita indican valores de diversidad genética mayores a 0.5

Localidad	N	H/S	Var	H	(Hd) + - σ	(π) + - σ	D de Tajima/(P)
Yalambojoch	10	6	6	H1,H3,H5,H6, H7, H8	0.77+ - 0.13	0.0001 + - 0.0012	-0.669 (0.28)
Sierra de las Minas	10	5	9	H1, H2,H3 H4, H9, H10	0.88+ - 0.07	0.0028 +- 0.0018	-0.310 (0.4)
Chiapas	5	4	6	H1,H3,H14, H16	0.90+ - 0.16	0.0023 +- 0.0017	-1.145 (0.08)
Ejido A Barrada	3	2	15	H1, H28	0.66+ - 0.31	0.0097 +- 0.0076	0.000 (0.69)
Laj Chimel	9	7	18	H1,H12 H17H18	0.94+ - 0.07	0.0053 +- 0.0032	-0.828 (0.22)
Finca San Jerónimo	2	2	5	H10	1.00+ - 0.50	0.0048 + - 0.0053	0.000 (1.00)
Tlahuitelpa	10	4	19	H21, H22,H23, H24	0.80+ - 0.07	0.0050 +- 0.0030	-1.057 (0.15)
Piedra del Molcajete	9	4	4	H26,H27, H30,H31	0.75+ - 0.11	0.0011 +- 0.0091	-0.842 (0.25)
Zacapoaxtla	18	7	8	H20,H22, H23,H28,H29 H34,H35	0.79+ - 0.071	0.0021 +- 0.0013	-0.223 (0.45)
Santa María Cerro el Baúl	13	5	4	H1,H2,H3,H10, H19	0.6026+/- 0.0302	0.0010 +- 0.000	1.61 (0.17)
Volcán Colima	8	2	0	H32,H33	0.25+/- - 0.18	0.0000 +- 0.0000	1.00 (1.00)

7.4 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

Se determinó que la variación genética entre regiones del 73% (**FCT 0.73, $p < 0.001$, tabla 6**) la cual es interpretada como una reducción de la heterocigosidad, escaso flujo genético entre las regiones. La variabilidad entre poblaciones de una misma región corresponde a **10.25% (FSC 0.39 $p < 0.005$,)** que indica moderada variación y flujo genético en las poblaciones que conforman las regiones evaluadas debido al reducido intercambio genético entre sus poblaciones.

La variación entre todas las poblaciones corresponde a 16 % (**FST: 0.83 $p < 0.001$**) que indica alta variabilidad entre las poblaciones, gran parte de esta variabilidad es aportada por las diferencias mostradas entre las regiones (tabla 6). Los valores observados muestran congruencia con los grupos encontrados, pero debemos recordar que esta hipótesis es evaluada a partir una estructuración genética basada en único marcador molecular.

Tabla 6 Análisis de Varianza Molecular de principales grupos encontrados para poblaciones del chipe cejas Doradas (*Basileuterus belli*)

Origen de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de Variación	Índices de Fijación
Entre Regiones	2	374.94	6.088 Va	73.71	FCT: 0.73**
Poblaciones dentro de una misma región	8	64.76	0.84 Vb	10.25	FSC: 0.39*
Entre todas las Poblaciones	86	113.93	1.32 Vc	16.04	FST: 0.83**
Total	96	553.64	8.2674		

¹Agrupación de las poblaciones: (1) Sierra Madre Occidental de México, (2) Sierra Madre Oriental de México (3) Sierra Madre de Chiapas y Guatemala

* Valores de significancia de $p < 0.005$, ** valores de significancia de $p < 0.001$

Además se evaluó la diferenciación genética entre las poblaciones empleando una matriz de distancia empleando el estimador **Fst Φ** a partir de un análisis de pares realizado en el programa Arlequin (Excoffier, 2009).

Fuente Datos Experimentales

Las distancias genéticas basadas en el análisis de pares muestran que a *B belli bateli* conformado por las poblaciones volcán Colima (10) y Piedra del molcajete (11) en la sierra Madre Occidental de México presentan la mayor diferenciación genética entre poblaciones de un mismo grupo $F_{st} \Phi$ 0.910 significativas a un nivel de $p < 0.005$ y entre las demás poblaciones de *B belli* mostrando un $F_{st} \Phi$ en el ámbito de los 0.732 y 0.904 $p < 0.005$ (tabla 7).

Por su parte, *B. belli belli* conformado por las poblaciones Zacapoaxtla (8) y Tlahuítelpa (9) en la Sierra Madre Oriental de México presentan la menor diferenciación genética entre grupos $F_{st} \Phi$ - 0.004 $p > 0.005$ y una diferenciación con relación a los demás grupos mostrando un valor de $F_{st} \Phi$ en el ámbito de los 0.369 y 0.909. Los valores bajos de diferenciación genética son de gran interés debido al distanciamiento geográfico que presentan ambas poblaciones.

Las poblaciones de la Sierra Madre de Chiapas - Guatemala presentan valores en el ámbito de $F_{st} \Phi$ 0.110 y 0.016, que indican cercanía geográfica o poco aislamiento dentro de las poblaciones que forman este grupo.

Tabla 7. Distancias Genéticas basadas en análisis de pares, $F_{st} \Phi$ para poblaciones del Chipe Cejas Doradas (*Basileuterus belli*) valores con asterisco cuentan con valores de $P < 0.001^*$ y

Localidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1) Yalambojoch	-										
2) Sierra Minas	0.110	-									
3) Laj chimel	0.139	0.016	-								
4) Chiapas	0.512	0.106	0.068	-							
5) Santa María	0.555*	0.196	0.091	0.093	-						
6) San Jerónimo	0.054	-0.156	-0.271	0.198	0.216	-					
7) Abarrada	0.261	0.312	0.224	0.471	0.632	-0.071	-				
8) Tlahuítelpa	0.767*	0.754*	0.706*	0.778*	0.832*	0.683	0.368	-			
9) Zacapoaxtla	0.878*	0.864*	0.831*	0.897*	0.909*	0.866	0.670	-0.004	-		
10) Nevados volcán Colima	0.912*	0.877*	0.811*	0.961*	0.947*	0.937	0.765	0.763*	0.877*	-	
11) Molcajete	0.904*	0.877*	0.825	0.932*	0.935*	0.898	0.753	0.732*	0.848*	0.910*	-

Valores en negrita indican distancias genéticas con valores de $P > 0.05$

8. DISCUSION DE RESULTADOS

8.1 Estructuración de Poblaciones

La estructuración observada empleando los diversos métodos de agrupamiento confirma la presencia de tres grupos principales constituidos por ***B. belli belli***, ***B. belli bateli*** y ***Belli scitulus*** los cuales muestran fuerte relación con la presencia de barreras geográficas a lo largo de su distribución principalmente por regiones de marcada aridez y baja altitud.

Para las poblaciones ***B. belli belli*** distribuidas en las Sierra Madre Occidental de México, se sugiere como factor de mayor incidencia en la estructuración observada la presencia de sistemas vegetales de mayor aridez como los valles centrales de Oaxaca (Cervantes, 2002), estas estas poblaciones mostraron un alto soporte estadístico (PP=1 y 95%) y distanciamiento geográfico de estos con áreas con presencia de bosque nuboso. Por su parte, para las poblaciones de ***B. belli bateli*** se sugiere como barrera importante la cuenca del río Zacatula – Balsas identificada como regiones áridas (Cervantes, 2002).

El Istmo de Tehuantepec constituye una barrera para los bosques montanos, hábitat primario del chipe cejas doradas, separando las poblaciones de la Sierra Madre Occidental ***B. belli bateli*** y Sierra Madre Oriental ***B. belli belli*** de sus pares distribuidos en la Sierra Madre de Chiapas – Guatemala ***B. scitulus*** como se demostró a partir del fuerte soporte estadístico observado en estas poblaciones. El istmo de Tehuantepec ha sido identificado como barrera previamente para grupos de reptiles (Castoe, 2012), mamíferos y aves (Barber y Klicka, 2010).

Las poblaciones de la Sierra Madre de Chiapas y Guatemala ***B. belli scitulus*** mostraron moderada estructuración (0.62 PP y 83.9 %) contrario al planteamiento inicial del presente estudio donde se sugería que la cuenca del río Negro actuaría como barrera para las poblaciones al norte de esta como Yalambojoch, Laj Chimel y Abarrada; de aquellas establecidas al sur de la cuenca como las poblaciones de Cerro Baúl, Santa María, Miramar y volcán Lacandón. Esta cuenca ha sido reconocida como una barrera para grupos de salamandras (Rovito, Parra, Almazán y Luna, 2012).

Otros estudios del género *Basileuterus* indican que barreras geográficas como regiones de poca altitud y considerable distanciamiento geográfico entre regiones con condiciones para el establecimiento de vegetación de alta montaña similares a las encontradas en el presente estudio han resultado determinantes para la estructuración de sus poblaciones (Torres Vilaca y Rodríguez Santos, 2010; Gutiérrez - Pinto, Cuervo, Miranda, Pérez - Eman, Brumfield, y Cadena, 2012). Considerándose entonces que la estructuración en las poblaciones tiene dependencia con los elementos biológicos de su entorno.

A pesar que aún no se cuentan con estudio sobre las características morfológicas, conductuales y ecológicas en las poblaciones de *B. belli* la estructuración observada a partir de análisis moleculares presenta un fuerte respaldo estadístico. Estudios futuros podrían evidenciar y respaldar la estructuración de estas poblaciones como ya se ha demostrado en *Basileuterus triastiatu*s y sus poblaciones de marcada diferenciación morfológica, conductas y vocalizaciones (Gutiérrez - Pinto, Cuervo, Miranda, Pérez - Eman, Brumfield, y Cadena, 2012). Los resultados presentados constituyen la base para futuros estudios ecológicos para el enriquecimiento o confrontación con los resultados hoy observados.

8.2 Análisis de divergencia del Tiempo (Reloj Molecular)

El género *Basileuterus* es reconocido como un grupo de origen reciente (plioceno tardío) y con un centro de origen en Centroamérica y México junto a otros géneros de la familia Parulidae (*Myoborus*, *Cardellina* y *Eutlypys*) (Lovette, et al., 2010). Es adecuado considerar que los eventos de cladogenesis observados en el presente estudio 2.006 MYA para los subgrupos ***B. belli belli*** y ***B. belli bateli*** y 1.84 MYA para *Basileuterus belli scitulus* son congruentes con estudios que indican tiempos menores a 2 Mya como probables eventos de radiación del género para en el Istmo de Tehuantepec (Klicka y Barber, 2010).

Así mismo, estudios biogeográficos realizados con subespecies de *Basileuterus tristriatus* con distribución en Sur y Centro América, establecen un periodo menor a 2 mya como fechas de origen de los diferentes grupos que le conforman (Gutiérrez - Pinto, Cuervo, Miranda, Pérez - Eman, Brumfield, y Cadena, 2012), ya que las especies de *Basileuterus* con distribución en América del Sur son consideradas producto de la eventos de radiación posterior al de la formación de los grupos centroamericanos (Lovette, et al., 2010).

A la luz de esta evidencia es plausible proponer que la interrupción de los bosques montanos en Mesoamérica en periodos anteriores o durante los cambios climáticos acontecidos durante el Pleistoceno guardan estrecha relación con eventos de radiación genética en las poblaciones de *Basileuterus belli* en la región de México y Guatemala y otras aves de montaña como *Atlapetes albinucha*, *Lampornis Amethystinus*, *Picoide villosus* (Klicka y Barber, 2010) e *Icterus crysaster* (Cortez - Rodríguez, Jacobsen, Hernández - Baños, Navarro , y Peters, 2013) así como en poblaciones mamíferos dado el ámbito temporal en el que ambos se desarrollan .

Si bien existe evidencia del efecto de los eventos climáticos durante el pleistoceno para poblaciones de aves, también se considera importante el efecto del flujo genético y la distancia geográfica en el surgimiento y en la divergencia las poblaciones de aves de montaña como se demuestra en estudios realizados con el colibrí *Amazilia cyanocephala* en la región (Rodríguez, Gutiérrez, y Ornelas, 2013).

A pesar que el presente estudio no considera el flujo genético y el aislamiento por distancia dentro de las poblaciones de *Basileuterus belli* cabe resaltar que la estrecha relación de estas poblaciones con los bosques montanos de la región (Howell & Webb ,1995), el aislamiento por la presencia de sistemas geográficos y zonas de vida como el matorral espinoso (Cervantes, 2002) y la historia climática en la región incidirían en la formación de los grupos hoy conocidos para *Basileuterus belli*. Estudios futuros que consideren estos métodos de análisis del flujo genético serán de gran utilidad para la comprensión detallada de la historia demográfica de las poblaciones de *B belli*.

Finalmente, se reconoce que el uso de un único marcador molecular puede limitar la dimensión y alcances del presente trabajo, sin embargo constituye un aporte sustancial dado que constituye un primer acercamiento para una especie del género *Basileuterus* en la región de Centro América Nuclear.

8.3 Diversidad genética

La diversidad genética encontrada en las poblaciones de *B. belli* se sugiere responde principalmente a la permeabilidad de las barreras geográficas que delimitan a sus poblaciones y al distanciamiento entre las áreas con presencia de bosques montano principal hábitat de *B. belli*.

Se considera que las poblaciones de *B. belli belli* en Zacapoxtla y Tlahuitelpa en la Sierra Madre Oriental de México presentan un patrón similar de diversidad haplotípica 0.800 y 0.790 (*hsd*) respectivamente y una distribución homogénea de sus haplotipos en la región, se propone como principal factor de esta condición las condiciones geográficas constantes (Cervantes, 2002) y la ausencia de barreras geográficas entre ambas localidades que permitirían un flujo genético constante a pesar de su distanciamiento geográfico. Valores altos de diversidad genética ha sido observada en poblaciones de aves de montaña como *Basileuterus tristriatus* en condiciones de distanciamiento geográfica pero con continuidad en sus hábitats (Gutiérrez - Pinto, Cuervo, Miranda, Pérez - Eman, Brumfield, y Cadena, 2012).

Las población de *B. belli bateli* en Volcán Colima y presentan baja diversidad haplotípica (*hsd*) 0.250 en relación con resto de poblaciones de *B. belli*, siendo una posible explicación el aislamiento de esta por regiones circundantes con vegetación asociadas a condiciones de aridez (Cervantes, 2002) y el distanciamiento con sitios con presencia de bosques montanos. Los cambios climáticos ocurridos durante y después del pleistoceno permitiría la continuidad de los bosques montanos en tierras bajas permitirán la colonización de *B. belli* y el posterior aislamiento de sistemas (Hodell et al, 2008), en periodos recientes favorecería el intercambio o colonización de nuevas las poblaciones de *B. belli*.

Las poblaciones de *B. belli scitulus* muestran los mayores valores de diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) (Sierra de las Minas, 0.88 Laj Chimel 0.94, Chiapas 0.9 y el mayor número de haplotipos para *B. belli*, distribuidos de manera homogénea entre los sitios de colecta de la región de la Sierra Madre Chiapas - Guatemala. La distribución de los haplotipos en toda la región sugiere un flujo genético constante entre las poblaciones, siendo la explicación principal la presencia de barreras franqueables. En la región algunas barreras fueron evaluadas para el colibrí *Lampornis viridipallens* donde sugieren que el cañón del río Xacbal puede ser permeable para sus poblaciones. (Asturias, 2013). La conservación de los hábitats del chipe cejas doradas y otras especies de montaña permiten la continuidad de los procesos evolutivos.

8.4 Análisis de Varianza Molecular

La variabilidad entre regiones (86 %), apoya la idea de distanciamiento geográfico de las subespecies de *B. belli* y escaso flujo genético entre estas, confirma estructuración de los grupos encontrados a partir de los análisis de estructuración y coincide la marcada distribución geográfica de aves de montaña distribuidas en ambos lados del istmo de Tehuantepec como el Oriol *Icterus crysaster* en. (Cortez - Rodríguez, Jacobsen, Hernandez - Baños, Navarro, & Peters, 2013), *Atlapetes albinucha*, *Lampornis amethystinus* *Myadestes occidentalis* (Barber y Klicka, 2010). La interrupción temporal de hábitats anteriormente continuos para *Basileuterus belli* debido a cambios climáticos acontecidos en el pleistoceno han jugado un papel importante de las poblaciones de la región.

Por su parte la alta diversidad genética **Fst** observada dentro de las regiones identificadas apunta como principal explicación a la permeabilidad de las barreras existentes dentro de cada región y la cercanía geográfica y flujo genético constante entre estas, (Rodríguez, Gutiérrez, & Ornelas , 2013) .

Otras opciones que contempla el análisis de varianza son, que las poblaciones con menor grado de diversidad genética como volcán colima son atribuibles a la reducción y recolonización de una población o “efecto de botella” o bien al efecto fundador que caracteriza a poblaciones de formación reciente (Excofier, Smouse, y Quattro, 1992). El uso marcadores moleculares como micro-satélites en futuros estudios podría aportar claves para describir las relaciones entre poblaciones cercanas. Se dice que una mayor diversidad indica mayor antigüedad del grupo, los grupos con baja diversidad pueden ser explicados a través del efecto fundador, lo cual puede ser confirmado con la fecha aproximada de formación de los grupos.

9. CONCLUSIONES

- La estructuración de las poblaciones presenta congruencia y soporte estadístico con la propuestas taxonómicas existentes para *Basileuterus belli*.
- La divergencia de los grupos que conforman a *Basileuterus belli* se encuentra en un periodo de 4.0 – 6.6 miles de años de la actualidad asociado a cambios climáticos en la región
- Las poblaciones de *B. belli* con mayor diversidad genética corresponde a aquellas poblaciones en las que existen continuidad del bosque montano principal hábitat de *B. belli* y menor distanciamiento entre sus poblaciones.
- Las poblaciones con mayor distanciamiento geográfico presentan valores bajos de diversidad.
- Barreras geográficas presentes en la sierra madre de Chiapas – Guatemala como los valles del Río Negro y Motagua no han tenido una fuerte incidencia en la estructuración de sus poblaciones.
- El istmo de Tehuantepec constituye la mayor barrera geográfica en los linajes actuales de *Basileuterus belli* a lo largo de su distribución.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda pruebas de divergencia simultánea para cada uno de los grupos encontrados para determinar si se cumple con una hipótesis de divergencia similar entre grupos o diferente.
- Vincular la información generada por estudios genéticos existentes y buscar la inclusión y promoción de futuros estudios en la gestión e implementación de estrategias de conservación de especies claves a nivel nacional
- Implementar estrategias de conservación que promuevan la interconectividad entre remanes de bosques montanos de las localidades de Santa María, Cerro Baúl y Lacandón en la cadena volcánica del Pacífico así como de la poblaciones de Laj Chimel, Yalambojoch y Sierra de las Minas al norte de la cuenca del Rio negro, debido a cercanía geográfica y sus altos valores de diversidad genéticas para las poblaciones del chipe cejas doradas *B. belli scitulus*.
- El uso y afinamiento de los modelos que puedan aportar mayor resolución a las investigaciones de especies distribuidas localmente mediante la implementación de estudios que empleen una mayor cantidad de marcadores moleculares.
- Integrar a futuros estudios poblaciones de la sub especie *B.belli clarus* y *B. belli suboscurus* de la región montañosas de Honduras y el Salvador.

9. Referencias Bibliográficas

- Asturias, M. (2014). Diversidad Genética y Distribución de Poblaciones del colibrí Serrano de Garganta Verde (*Lampornis viridipallens*) En bosques montanos en Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Avise, J. C., Arnold, J., Martin Ball, R., Birmingham, E., Lamb, T., Neigel, J. C., y otros. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecologic systematics*, 489 -522.
- Avise, J. (2004). What is phylogeography? And where is it going on. *International Association of plant Taxonomy*, 893 -898.
- B. I. (2012). *Basileuterus belli*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de <www.iucnredlist.org>
- Bowie, R. (2011). *Bowie Lab Protocol*. Berkeley, California: MVZ.
- Cabanne, G., d'Horta, F., Sari, E., Santos, F., y Miyaki, C. (2008). Nuclear and Mitochondrial phylogeography of Atlantic forest endemic *Xiphorinchus fuscus* (Aves; Dendrocolaptidae) Biogeography and systematic implications. *Molecular phylogenetics and evolution*. , 760 -773.
- Castoe, T. A., Maza, J. M., Smith, E. M., Mahmood, M. S., Kuch, E., Campbell, J., y otros. (2009). Comparative phylogeography of pit vipers suggests a consensus of ancient Middle America highland biogeography. *Journal of Biogeography* , 88-113.
- Chantellanaz, M. L. (2008). Ecología Alimentaria de dos especies simpátricas del género *Basileuterus* en el noreste de Argentina. *Hornero*, 87 -93.
- Cervantes, M. C. (2002). Plantas de Importancia Económica en las zonas áridas y semiáridas de México. México: UNAM.
- Cícero, C., y Johnson, N. (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. .
- Contreras-González, A. M., Rodríguez-Flores, C., Soberanes-González, C., y Arizmendi, M. (2010). *Golden-browed Warbler (Basileuterus belli) Neotropical Birds Onlines* (T. (T. Schulenberg., Editor) Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de http://neotropical.birds.cornell.edu/portal/species/overview?p_p_spp=579116
- Cortez - Rodríguez, N., Jacobsen, F., Hernández - banos, B., Navarro, A., y Peters, J. (2013). Coalescent analyses show isolation without migration in two closely related tropical orioles: the case of *Icterus graduacauda* and *Icterus chrysater*. *Ecology and Evolution*, 4377– 4387.

Domínguez, O., & Vázquez - Domínguez, E. (2009). Filogeografía: Aplicaciones en la taxonomía y la conservación. *Animal Biodiversity y Conservation.*, 59 - 70.

Drummond, A. J., Ho, S. Y., Rawlence, N., & Rambaut, A. (2007). *A Rough Guide to BEAST 1.4*. The University of Auckland, Department of Computer Science, Auckland.

Drummonds, A., HO, S., Matthew, P., y Rambaut, A. (2006). Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLOS biology*, 0699- 0710.

Excofier, L. (2009). *An integrated software package for population genetics data Analysis*. Berna, Suiza: Swiss Institute of Bioinformatics.

Excofier, L., Smouse, P. E., y Quattro, J. M. (1992). Analysis of Molecular Variance inferred from metric variace among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 2(132), 479 - 291.

García - Trejo, E. A., y Navarro, A. G. (2004). Patrones biogeográficos de la riqueza de especies y el endemismo de la avifauna en el oeste de México. *Acta Zoológica Mexicana*, 20, 167 -185.

Gentry, A. H. (1993). Patterns of diversity and floristic composition in Neotropical montane forest. En S. P. Churchill, H. Balslev, E. Forero, y J. L. Lutey, Biodiversity y Conservation in Neotropical Montane Forest (págs. 103- 126). New York: The New York Botanical Garden.

Gill, F., y Donsker, D. (2015). IOC World Bird List. 5.1. Recuperado el 10 de Agosto de 2014, de www.iocworldlist.com

Guindon, S., y Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies. *Systematic Biology* , 5 (52), 696 - 704.

Gutiérrez - Pinto, N., Cuervo, A. M., Miranda, J., Pérez - Eman, D., Brumfield, R. T., y Cadena, C. D. (2012). Non-monophyly and deep genetic differentiation across low-elevation barriers in a Neotropical montane bird (*Basileuterus tristriatus*; Aves: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* (64), 164 -175.

Hocahthka, Lovette, I., & Wesley, M. (2006). Simultaneous Effects of Phylogenetic Niche Conservatism and Competition on Avian Community Structure. *Ecology, Vol. 87, Supplement: Phylogenetic Approaches to Community Ecology* (No. 7), S14-S28.

Hodell, D. A., Anselmetti, F. S., Brenner, M., Curtis, J. H., Gilli, A., Grzesik, D. A., y otros. ((2008)). An 85-ka record of climate change in lowland Central America. *Quaternary Science Reviews*, 27, 1152– 1165.

Howell, y Webb, S. (1996). *A Guide to the Birds of Mexico and Northern Central America* (1st Ed.). San Francisco: Oxford University Press.

Huelsenback, J. P., & Bollback, J. P. (2001). Empirical and Hierarchical Bayesian Estimation of Ancestral States. *Systematic Biology*, 351 - 366.

Huelsenbeck, J. P., y Ronquist, F. (2001). Bayesian Inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754 -755.

Jiménez-Barrios, R. (2011). Diversidad Morfológica y Genética del Colibrí de Berillo (*Amazilia cyanura*) en Guatemala, Hibridación o Variaciones intraespecíficas? Escuela de Biología. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.

Kappelle, M. (2008). *Diversidad de los Bosques de Roble (encino) de la América Tropical* (1era ed.). Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: INBIO.

Klicka, J., y Barber, B. (2010). Two pulse of diversification across the Isthmus of Tehuantepec in a montane Mexican bird fauna. *Proceedings of the Royal Society*, 2675-2681.

Lachniet, M. S., y Vazquez-Selem, L. (2005). Last Glacial Maximum equilibrium line altitudes in the circum-Caribbean (Mexico, Guatemala, Costa Rica, Colombia, and Venezuela). *Quaternary International*, 129–144.

Librado, P., y Rozas, J. (2009). DNA sp V5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 1451-1952.

Lovette, I. J., Pérez-Emán, J. L., Sullivan, J. P., Banks, R. C., Fiorentino, I., Córdoba-Córdoba, S., y otros. (2010). A comprehensive multilocus phylogeny for the wood-warblers and a revised classification of the Parulidae (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 753–770.

Lovette, I. (2004). Molecular phylogeny and plumage signal evolution in a Trans Andean and circum Amazonian avian species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 512 -523.

Lovette, I., y Bermingham, E. (2002). What is a wood warbler? A Molecular characterization of a monophyletic Parulidae. *The Auk*, 695–714.

Marini, M. A., y Calvacanti, R. B. (4 de 1997). Habitat and foraging substrate use of three Basileuterus warblers in central Brazil. *Ornitología Tropical*, 69-76.

MVZ, U. B. (2009). Biotic inventory and evolution of terrestrial vertebrate fauna of nuclear Central America. *Distribuido por el Autor*, 1-16.

Ornelas, J. F., Sosa, V., Soltis, D. E., Daza, J. M., Gonzalez, C., Soltis, P. S., y otros. (2013). Comparative Phylogeographic Analyses Illustrate the Complex Evolutionary History of Threatened Cloud Forests of Northern Mesoamerica. *PLoS One*, 8, 1-11.

Perfecti, F., Picó, F. X., y Gómez, J. M. (2009). La huella genética de la selección natural. *Revista Técnica y científica de Medio Ambiente*, 10-16.

- Posada, D. (2008). *jModelTest: phylogenetic Model Averaging*. Departamento de Genética, Bioquímica e Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo España. Vigo: Oxford University Press.
- Posada, D., y Crandall, K. (2001). Intraespecific gene genealogies: tree graffiting into networks. *Trends in Ecology & Evolution.*, 37- 46.
- Rodriguez, F., Gutierrez, C., y Ornelas, J. (2013). Genetic, phenotypic and ecological divergence with gene flow at the Isthmus of Tehuantepec: the case of the azure-crowned hummingbird (*Amazilia cyanocephala*). *Journal of Biogeography*, 1360 - 1373.
- Ronquist, F., Huelsenback, J., y Teslenko, M. (2011). *Draft MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries*. EEUU: Mr Bayes. .
- Rogers*, R. D., y Mann, P. (2007). Tectonic terranes of the Chortis block based on integration of regional aeromagnetic and geologic data. *The Geological Society of America (Special Paper 428)*, 65 - 89.
- Rosito, J. C., Pérez, G., Mass, R., Gándara, A., Y Gálvez, J. (2012). Bases para el Seguimiento y Evaluación del Cambio Climático en Guatemala. En IARNA, *Perfil Ambiental Guatemala 2010-2012* (págs. 296 -332). Guatemala : IARNA - URL.
- Rovito, S., Parra, G., Almazán, C., Wake, D., Y Luna, R. (2012). Deep divergences and extensive phylogeographic in a clade of lowland tropical salamanders. *BMC evolutionary Biology*.
- Roy, A. J., & Lachniet, M. S. (2010). Late Quaternary glaciation and equilibrium-line altitudes of the Mayan Ice Cap, Guatemala, Central America. *Quaternary Research* 74, 1–7.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML- VI- HPC, Maximum likelihood bases phylogenetic analyses with thousands of taxas and mixed models. *Bioinformatics*, 2688-2690.
- Stiles, F. G., & Skutch, A. F. (2006). *A Guide to the birds of Costa Rica*. New York: Comstock Publishing Associates.
- Swofford, D. L. (2002). *PAUP; Phylogenetic Analysis using Parsimony and other methods*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associated.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson , D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2725-2729.
- Technology, F. (2012). *Network 4.6.1.1 User Guide*. Fluxus Technology Ltd.

Torres Vilaca, S., & Rodríguez Santos, F. (2010). Biogeographic history of the species complex; *Basileuterus culicivorus* (Aves Parulidae) in the Neotropics. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 585 -597.

Torres, A., Luna, I., y Oyama, K. (2011). Conservation Biogeography of the red Oaks (*Quercus*-Sección Lobatea) in Mexico and Central America. *American Journal of Botany* , 290 -305.

Vázquez Domínguez, E. (2009). Filogeografía y Vertebrados. En *La Ecología Molecular de Plantas y Animales*.

Vidal, R. M., Macías- Caballero, C., & Duncan, C. D. (1994). The Occurrence and Ecology of the Golden-Cheeked Warbler in the Highlands of Northern Chiapas, Mexico. *The Condor*, . 96, 684-691.

Wenny, D. (2008). Three striped Warbler (*Basileuterus triastriatus*) "Anting" With a Caterpillar. *The Willson Bulletin*, 128 -131.

Wierd, J. (2006). Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland Neotropical birds. *Evolution* (60 (4)), 842–855.

Wierd, J. T. (2009). Implications of genetic differentiation in Neotropical montane birds. *Annals of the Missouri Botanical Garden* , Volume 96 (3) 410 – 2.




Julio Alejandro Méndez López

Autor




Dr. Jorge Erwin López

Asesor



Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares

Revisor



Licda. Rosalito Barrios de Rodas

Directora de Escuela de Biología



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

Decano