



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA
POBLACIONAL DEL COLIBRÍ DE XANTUS
(*Hylocharis xantusii*), ENDÉMICO DE LA PENÍNSULA
DE BAJA CALIFORNIA**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Ecología de Zonas Áridas)

Presenta

CRISTINA GONZÁLEZ RUBIO SANVICENTE

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2016

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 02 del mes de Marzo del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DEL COLIBRÍ DE XANTUS (*Hylocharis xantusii*), ENDÉMICO DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA"

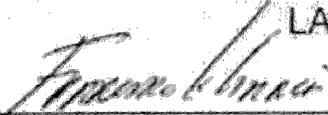
Presentada por el alumno:

CRISTINA GONZÁLEZ RUBIO SANVICENTE

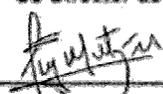
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN ECOLOGÍA DE ZONAS ÁRIDAS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

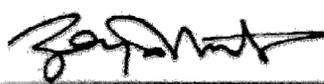
LA COMISIÓN REVISORA

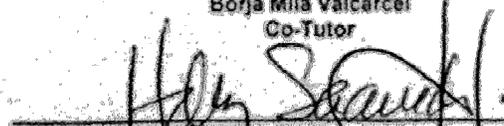

Francisco Javier García De León
Co-Director de Tesis


Ricardo Rodríguez Estrella
Co-Director de Tesis


Enrique Martínez Meyer
Co-Tutor


Juan Francisco Ornelas Rodríguez
Co-Tutor


Borja Mila Valcarcel
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

CONFORMACIÓN DE COMITÉS

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Francisco Javier García De León
Co-Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B. C. S.

Dr. Ricardo Rodríguez Estrella
Co-Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B. C. S.

Dr. Enrique Martínez Meyer
Co-Tutor
Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.

Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez
Co-Tutor
Instituto de Ecología, A. C., Xalapa, Veracruz.

Dr. Borja Mila Valcarcel
Co-Tutor
Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Francisco Javier García De León
Dr. Ricardo Rodríguez Estrella
Dr. Enrique Martínez Meyer
Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez
Dr. Borja Mila Valcarcel

JURADO EN EXÁMEN DE GRADO

Dr. Francisco Javier García De León
Dr. Ricardo Rodríguez Estrella
Dr. Enrique Martínez Meyer
Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez
Dr. Borja Mila Valcarcel

SUPLENTES

Dr. Eduardo Francisco Balart Paez
Dr. Pedro Cruz Hernández

RESUMEN

La Península de Baja California (PBC) ha sido objeto de diversos estudios filogeográficos debido a su compleja historia geológica, climática, y topográfica. La principal señal observada son discontinuidades genéticas o estructura filogeográfica de múltiples taxa, donde la distribución de filogrupos, representa una evidencia del impacto de los eventos vicariantes ocurridos durante la formación y separación de la PBC. Sin embargo, pocos trabajos han paleado hipótesis alternativas (e.g. fluctuaciones climáticas o eventos de dispersión), o han integrado distintas herramientas moleculares para comprender la influencia relativa de los procesos históricos antiguos y recientes, sobre los patrones de variación genética actual de las especies.

Este estudio presenta la primera investigación sobre los patrones de diversidad genética y morfológica de la única especie de colibrí endémica del centro y sur de la PBC, el colibrí de Xantus (*Hylocharis xantusii*). En una muestra de 154 individuos se estudio la variación genética de tres genes de ADNmit (Cyt-b, COI y ND2; 2,297 pb), 16 microsatélites polimórficos especie-específicos, información climática obtenida de la modelación de nicho ecológico (MNE), y de las proyecciones al último interglacial (UIG) y último máximo glacial (UMG), así como la variación de seis rasgos morfológicos relacionados al dimorfismo sexual de la especie. El objetivo fue determinar las relaciones entre el patrón de variación genética y morfológica con los eventos históricos antiguos (geológicos) y recientes (fluctuaciones climáticas del Pleistoceno y la heterogeneidad ambiental).

El análisis espacial de 56 haplotipos de ADNmit detectó tres poblaciones discretas espacialmente diferenciadas; una en la región Norte (población D), otra en la porción Central (población C y B) y una última en la región Sur (población A). Las estimaciones de tiempos de divergencia entre los haplotipos mitocondriales de seis especies de colibríes apoyan la hipótesis de dos eventos vicariantes: 1) la separación permanente de la península hace 5 ma, y 2) el aislamiento temporal de la región del Cabo hace 3 ma. El marco temporal de diferenciación genética intraespecífico, indicó que el 90% de los linajes comenzaron a divergir en los últimos 500,000 años, con una expansión poblacional hace 80,000 años. Los haplotipos con divergencia más antigua (ancestrales, ~2.2 ma), y los más recientes (12,500 a 16,200 años) ocurrieron en las poblaciones del Sur y Norte, las cuales presentaron altos niveles de diversidad genética. Debido a esto en este trabajo, a diferencia de estudios previos, se sugieren dos zonas de refugio para el colibrí de Xantus: la región del Cabo, y un refugio Norteño. Las proyecciones al pasado en la MNE, apoyan estas dos zonas de refugios: el refugio Norteño ocurrió durante el UIG (hace aprox. 130,000 años), y el refugio del Cabo durante el UMG (aprox. 21,000 años). El conjunto de los resultados de los haplotipos mitocondriales permitieron concluir que los patrones de variación genética dentro y entre especies de colibrí pueden ser explicados tanto por eventos históricos antiguos (formación del Golfo de California y separación del Cabo) como recientes (fluctuaciones climáticas del Pleistoceno).

Se diseñaron cebadores para 16 *loci* microsatélites a partir de pirosecuenciación. El polimorfismo fue alto comparado con otras especies de aves. No se detectó desequilibrio de ligamiento para ningún *loci*, y desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg solo fueron detectados en cuatro *loci*. El número promedio de alelos por locus varió de 4 a 10, y se observaron hasta 19 alelos por amplificación cruzada, sugiriendo que estos marcadores pueden ser utilizados para estudios comparativos; las especies filogenéticamente más emparentadas al colibrí de Xantus (e.g. *Hylocharis leucotis*, *Cynanthus latirostris*, *Calypte costae*) tuvieron el mayor rendimiento en la amplificación y polimorfismo (90%). El estudio de 111 alelos microsatélites en *H. xantusii*, reveló dos poblaciones genéticas geográficamente discretas: una en el Norte y otra en el Sur. Los análisis bayesianos mostraron que la población del Norte presentó menos mezcla genética entre individuos. La distribución de estas poblaciones fue concordante con la distribución de oasis. Los oasis del sur, más cercanos entre sí, promueven una tasa mayor de flujo genético y por lo tanto mayor intermezcla genética; mientras que en los oasis al norte más aislados, se promueve una mayor homogeneidad genética. Esta estructura poblacional sugiere que la heterogeneidad en la distribución de oasis, han dejado huellas genéticas en el colibrí de Xantus, evidencias que no habían sido observadas en otras especies de vertebrados peninsulares.

Por otro lado, se observó un dimorfismo morfológico en cuatro de los seis rasgos analizados; los machos fueron más grandes en tamaño (largo total) con alas más largas (cuerda alar y largo de cola) y pico más ancho. El análisis de Cluster permitió observar cuatro poblaciones geográficamente discretas: A) región sur, B) región sur-central, C) región central, y D) región norte. Individuos de la población A fueron en promedio más pequeños, mientras que los individuos de las poblaciones B y C, tuvieron el pico más largo y ancho. Los resultados del ANOVA, indicaron que las poblaciones y el sexo, influyen independientemente sobre las diferencias morfológicas del colibrí de Xantus. Estos resultados fueron parcialmente concordantes con el patrón de diferenciación genética de la especie; sin embargo, se sugiere que las condiciones locales relacionadas con la heterogeneidad ambiental y la distribución de los oasis son los factores más importantes que promueven niveles de diferenciación morfológica. El dimorfismo sexual en los rasgos morfológicos analizados en *H. xantusii* podría estar relacionado con el apareamiento y comportamiento social.

La información generada en esta investigación ofrece la oportunidad de entender procesos históricos y recientes, e identificar regiones de alta diversidad genética y variación intraespecífica, información pertinente que debe ser aplicable a las estrategias de conservación necesarias para asegurar el potencial evolutivo de las especies.

Palabras clave: *Hylocharis xantusii*, Península de Baja California, filogeografía, vicarianza, pleistoceno, heterogeneidad ambiental, dimorfismo morfológico

ABSTRACT

The Baja California Peninsula (BCP) has been the subject of study by a diverse research works on phylogeography, due to its complex topographic, geologic, and climatic history. The main signal encountered is genetic discontinuity or phylogeographic structure of multiple taxa, where the distribution of phylogroups, provides evidence of the impact of vicariant events during the formation and separation of the BCP. However, few studies have resorted to alternative hypothesis (e.g. climatic fluctuations or dispersal events), or have integrated different molecular tools for understanding the relative influence of ancient and recent historical processes have on current patterns of genetic variation in species.

This study constitutes the first research about genetic diversity and morphologic patterns of the single endemic hummingbird species of the BCP, the Xantus' hummingbird (*Hylocharis xantusii*). This species distributes from the middle portion of the BCP to Los Cabos. Using a sample of 154 individuals we studied the genetic variation of three genes mitDNA (Cyt-b, COI y ND2; 2,297bp), 16 polymorphic microsatellite species-specific, also climatic information obtained from the ecological niche modeling (ENM), Last Interglacial Predictions (LIG), and the Last Glacial Maximum (LGM), as well as the variation on six morphological traits linked to sexual dimorphism in the species. The aim was to determine the relationship between the morphologic and genetic variation patterns and ancient historical events (geologic) as well as recent historical processes (Pleistocene climatic fluctuations and environmental heterogeneity).

The spatial analysis of 56 haplotypes of mitDNA showed there are three mitochondrial lineages or populations that could be spatially differentiated; the phylogeographic structure consisting of a North (population D), Central (population C and B) and South (population A) regions. The estimated divergence times obtained between the mitochondrial haplotypes of six hummingbird species supports the hypothesis of two vicariant events: 1) the permanent separation of the peninsula and formation of the Gulf of California at 5 mya, and 2) temporary isolation of the southern region at the Isthmus of La Paz at 3 mya. The temporal frame of genetic differentiation of intraspecific haplotypes indicates that 90% of haplotypes diverged within the last 500,000 years, with a population increase 80,000 years ago. The haplotypes with the oldest divergence (ancestral, ~2.2 my) and most recent haplotypes (12,500 to 16,200 years) occurred in the South and North regions; both exhibit high levels of genetic diversity. As a result, unlike previous studies, in this work we suggest two refuge areas for the Xantus' hummingbird: The Cape Region and a Northern refuge. The past times predictions on the ENM, support this two areas of refuge. The Northern refuge occurred during the LIG (approximately 130,000 years ago), while the Cape Region refuge happened during the LGM (21,000 years ago). The results from the mitochondrial haplotypes allowed to conclude that genetic variation patterns within and among hummingbird species are explained by ancestral historic events (Gulf of California

formation and isolation of the Cape Region) as well as recent events (Pleistocene climatic fluctuations).

Primers were designed for 16 *loci* microsatellite by pyrosequencing. The polymorphism was high when compared to other bird species. No disequilibrium in linkage for any *loci* was detected, and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were detected only in four *loci*. The average number of alleles per locus ranged from 4 to 10, and we observed up to 19 alleles per cross amplification. The results suggested that these primers could be used for comparative studies: Since the phylogenetically related species of the Xantus' hummingbird (i.e. *Hylocharis leucotis*, *Cynanthus latirostris*, *Calypte costae*) had the best performance in the amplification and polymorphism (90%). The study of 111 microsatellite alleles in *H. xantusii* revealed two genetic populations geographically distinct: one in the North and one in the South. Bayesian analysis demonstrated there is less genetic mixing within individuals in the Northern population. The distribution of the latter is consistent with the oasis distribution. The Southern oases are closer to each other, which promotes a higher genetic flow rate, therefore a better genetic mixing within individuals, in contrast, northern oases are more isolated. This has influence over a higher genetic homogeneity. This population structure suggests that heterogeneity in the oases distribution, have left genetic signals in the Xantus' hummingbird; this evidence hasn't been observed in other vertebrate species of the Peninsula.

A morphological dimorphism was found in four over six traits analyzed in this study; males were bigger in size (total length) with larger wings (wing chord and tail length) and wider bills (bill width). Cluster analysis allowed observing four significant populations geographically discrete: A) south region; B) south-central region; C) central region; and D) north region. Individuals of population A were in average smaller, and individuals from populations B and C had larger and wider bills. ANOVA results indicated that populations and sex independently affect the morphological differences in Xantus' hummingbird. These results are partially consistent with the pattern of genetic differentiation of the species; however we suggest that local conditions related to environmental heterogeneity and oases distribution are the most important factors that promote levels of morphological differentiation. Sexual dimorphism on morphological traits observed in *H. xantusii* could be related to mating and social behavior.

The information obtained provides the opportunity to understand historical and recent processes and identify regions of high intraspecific genetic diversity and intraspecific variation, which is relevant information applicable to conservation strategies necessary to ensure the evolutionary potential of the species.

Keywords: *Hylocharis xantusii*, Baja California Peninsula, phylogeography, vicariance, pleistocene, environmental heterogeneity, morphological dimorphism

DEDICATORIA

A la vida, la salud y la pasión.

A mi familia, por ser mi ejemplo, mi motivación y la fortaleza para siempre salir adelante.

Al amor, la paz y tranquilidad presentes en mi vida.

A la memoria de mi eterna inspiración, mi Abue, quien siempre me acompaña.

AGRADECIMIENTOS

Quizas, la parte más difícil de escribir puesto que no hay palabras que describan la enorme gratitud, para lo que a mi representa este trabajo, un extraordinario trabajo en equipo.

Agradezco primeramente al CIBNOR, al departamento de posgrado, y todo su equipo de trabajo por el apoyo brindado para que pudiera realizar mis estudios de doctorado. Al CONACyT por la beca de manutención otorgada (registro 8492), y por el financiamiento de los proyectos que me brindaron todo lo necesario para que pudiera realizar la investigación tanto en el laboratorio como en el trabajo de campo, proyecto CB-2008-01-106925 otorgado a Francisco J. García De León, y proyecto 155956 otorgado a Ricardo Rodríguez Estrella.

A mis directores, a quien tanto debo. Francisco y Ricardo, gracias por aceptarme como estudiante. Quiero que sepan que valoro enormemente su tiempo, sus esfuerzos, sus consejos, sus regaños. Quiero que tengan la certeza, que todo ha valido la pena, puesto que han dejado huella en una estudiante más; todo para mi ha sido enseñanza y motivación, para ser una buena investigadora comprometida con la ciencia y la naturaleza.

A mi comité de tesis, Borja Mila, Juan Francisco Ornelas, Enrique Martínez Meyer, gracias por sus consejos y comentarios, por su tiempo y comprensión, por ser una parte fundamental para la finalización de esta etapa académica. Enrique, muchísimas gracias por brindarme la oportunidad de realizar una estancia académica en tu laboratorio; y sí, tienes un excelente grupo de estudiantes. Gracias a todo el Laboratorio de Análisis Espaciales del Instituto de Biología de la UNAM, por hacerme sentir como en casa.

Al Dr. Eduardo F. Balart y Dr. Pedro Cruz, por su buena disposición para ser suplentes en el exámen de grado.

A quienes me adentraron en el fascinante y divertido mundo del trabajo de campo. Mis queridos técnicos Abelino Cota y Franco Cota, por su invaluable apoyo en los muestreos, por su amplio conocimiento de tan bella tierra, mi Baja, por compartir sus experiencias, y por estar siempre con buena disposición y buena actitud. A Laura Rivera y Ricardo, y a todos mis compañeros del Laboratorio de Análisis Espacial, Ecología y Conservación del CIBNOR, por brindarme de todo el equipo necesario para las salidas de campo.

A mis compañeros, amigos, hermanos académicos, a mi gran familia GENCON. Mi Charis (Saraí), Cari, Tania, Caro, Pau, Adriano, David, Fausto, Emiliano, Ricardo, Leo, Miguel. Son para mí un regalo de la vida. Y como siempre dije, somos un excelente y maravilloso equipo. Extraordinarias personas que siempre voy a extrañar. De quienes seguiré aprendiendo, con quienes seguiré trabajando, quienes me regalaron sonrisas, abrazos, apoyo, palabras, con quienes compartí innumerables momentos, y a quienes debo mucho de todo lo que aprendí en estos 4.5 años. Jamás me voy a cansar de agradecerles todo lo que hicieron y siguen haciendo por mí. Los quiero, los admiro, y les deseo una vida llena de éxitos, salud y amor.

A Patricia Vázquez del Laboratorio de Genética para la Conservación, no sabes cuanto tiempo te esperamos y nos hacías falta en el labo. Gracias Patty por tan buena disposición en apoyarnos en lo que sea. Gracias por llegar a poner orden a tan preciable área de trabajo. Gracias por estar siempre pendiente de nuestras necesidades. Espero que tu estancia en el laboratorio sea siempre divertida. Mucho éxito y suerte.

A los compañeros de vigilancia del CIBNOR, gracias por hacerme sentir segura cuando salía tarde del laboratorio.

A mis amigos-hermanos de toda la vida, quienes me han acompañado siempre, quienes me han visto crecer, llorar y sonreír a lo largo de muchas etapas. Mi querida y siempre roomie, Mabilia, gracias por creer en mí y por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo posible. Gracias por regalarme de tu tiempo al final de este proceso de tesis. Mi querida amiga (Ale), gracias por siempre estar dispuesta a ser cómplice de mis aventuras (buenas o malas), y por las porras para terminar este “inche” doctorado. Siempre logras sacar miles de sonrisas en momentos complicados. A mi pechocha (Marisol), por ser ese respiro cargado de buena vibra, durante incontables jornadas de trabajo en el CIBNOR; a toda la familia Jaime Green, gracias por siempre recibirme con una enorme y hermosa sonrisa, y por su total interés en los colibríes. A todos mis amigos de la “Secu”, por recordarme que aunque el tiempo pase, el alma siempre será joven.

A Yuliana, George, Sandy, Miki, Michelle, Dany, quiero que sepan que sus palabras y abrazos siempre han logrado que mi corazón recobre la paz y tranquilidad en momentos difíciles. Jamás habrá tiempo suficiente que alcance, para ponernos al día. Siempre están en mis pensamientos.

A todos mis compañeros y maestros del curso ReGeneC 2013; sin duda una experiencia que marco la pauta para mucho de lo que realice en mi trabajo de tesis doctoral. A mis compañeros y maestros del Curso “Modelado de Nichos Ecológicos y Distribuciones Geográficas” 2015, por contagiarme de esa alegría e interés nato por aprender nuevas cosas de la naturaleza.

A mí amada familia. Quisiera llevarlos conmigo siempre. Ahora entiendo el enorme esfuerzo y sacrificio que fue, el dejarme ir a realizar mis sueños y cumplir mis metas. No creo que la vida me alcance para agradecerles todo lo que me han dado. Mis papis, mis abuelos, mis hermanos, mis tios, mis primos, mis adorados sobrinos; la vida no pudo haberme dado mejor familia. El estar lejos de ustedes, o casi no verlos, es el mayor sacrificio que he hecho en la vida. Es una de las cosas más difíciles con la que tengo que aprender a vivir. Gracias por ser la fuerza extraordinaria que me motiva e impulsa para salir adelante. Gracias por haberme hecho una mujer de bien. Los amo infinitamente.

A mi persona especial. Llegaste a mi vida en el preciso momento. Luis, gracias por llenar mis días de paz, de tranquilidad, de armonía. Gracias por todo ese amor que demuestras con tus cuidados, con empatía, comprensión y un sinfín de detalles que alegran mis días. Sin ti no hubiera logrado esto. Gracias a toda tu bella familia, Alonso Iglesias, por recibirme con los brazos abiertos. Besos al cielo.

A mis chiquirringuis (los colibríes), y todas las aves que tuve oportunidad de tocar y sentir. Que la vida nos perdone por los inconvenientes que provocamos durante los muestreos, y por todos los daños que los seres humanos causamos a su hábitat. Ojala que algún día, aprendamos a vivir en completa armonía con la naturaleza.

A todos aquellos que por descuido no nombre. Gracias por los buenos días, por las buenas tardes y por las buenas noches durante todo este tiempo.

¡A TODOS USTEDES, MUCHÍSIMAS GRACIAS,
Y QUE LA VIDA SIEMPRE LES SONRÍA!

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
CONTENIDO	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABLAS	xvi
LISTA DE ANEXOS	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA.....	5
2.2. FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA.....	6
2.3. MODELACIÓN DE NICHO ECOLÓGICO.....	10
2.4. ÁREA DE ESTUDIO.....	12
2.4.1. Historia Geológica de la Península de Baja California.....	12
2.4.2. Aspectos Climáticos de la PBC.....	14
2.4.3. Aspectos Ecológicos de la PBC.....	15
2.4.4. Patrones Filogeográficos en la PBC.....	18
2.5. MODELO DE ESTUDIO.....	20
2.5.1. El colibrí de Xantus endémico de la PBC.....	20
2.5.2. Historia Evolutiva de <i>Hylocharis xantusii</i>	21
2.5.3. Estudio de la variación morfológica.....	23
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	28
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	28
5.2. Objetivos particulares.....	28

6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	30
6.2. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL.....	31
6.3. MARCADORES MOLECULARES.....	32
6.3.1. ADN Mitocondrial.....	32
6.3.2. Diseño de <i>loci</i> microsatélite.....	33
6.3.3. Pruebas de polimorfismo y genotipificación de <i>loci</i> microsatélite.....	35
6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
6.4.1. PATRÓN FILOGEOGRÁFICO.....	36
6.4.1.1. Estimación de la diversidad genética.....	36
6.4.1.2. Reconstrucciones filogenéticas.....	36
6.4.1.3. Análisis Bayesiano de la estructura poblacional (BAPS).....	37
6.4.1.4. Análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA).....	38
6.4.2. EVENTOS HISTÓRICOS.....	39
6.4.2.1. Estimación de tiempos de divergencia.....	39
6.4.2.2. Historia demográfica.....	40
6.4.2.3. Dinámica poblacional a través del tiempo.....	41
6.4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS <i>LOC/</i> MICROSATÉLITE.....	42
6.4.3.1. Calidad y utilidad de los <i>loci</i> microsatélite.....	42
6.4.4. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....	44
6.4.4.1. Análisis de agrupación Bayesiana.....	44
6.4.5. MODELACIÓN DE NICHOS ECOLÓGICOS.....	45
6.4.6. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA.....	46
7. RESULTADOS	48
7.1. PATRÓN FILOGEOGRÁFICO DEL COLIBRÍ DE XANTUS.....	48
7.1.1. Diversidad genética.....	48
7.1.2. Análisis filogenético.....	49
7.1.3. Análisis espacial de la estructura genética (BAPS y SAMOVA).....	52

7.2. MARCO TEMPORAL DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	54
7.2.1. Demografía histórica.....	57
7.3. DIVERSIDAD GENÉTICA Y UTILIDAD DE LOS <i>LOC</i> / MICROSATÉLITE.	59
7.3.1. Amplificación cruzada.....	60
7.3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....	64
7.3.3. Análisis de agrupación Bayesiana.....	64
7.4. MODELACIÓN DE NICHOS ECOLÓGICOS.....	66
7.5. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA.....	67
8. DISCUSIÓN.....	74
8.1. HISTORIA EVOLUTIVA DEL COLIBRÍ DE XANTUS.....	74
9. CONCLUSIONES.....	80
10. LITERATURA CITADA.....	82
11. ANEXOS.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Eventos vicariantes propuestos para la diferenciación genética de especies y poblaciones en la Península de Baja California (modificado de Riddle <i>et al.</i> , 2000).....	2
Figura 2.	Esquema representativo de la reacción de pirosecuenciación 454-Roche: 1) construcción de la librería de ADN, 2) emulsión de PCR, y 3) reacción de secuenciación en placa de fibra óptica (modificado de Mardis, 2008).....	9
Figura 3.	Diagrama BAM que ilustra los factores que interactúan para determinar la distribución geográfica potencial de la especie: B) factores bióticos que influyen o delimitan la distribución de la especie, A) representa las condiciones abióticas que la especie requiere para sobrevivir y crecer; M) representa la región que puede ser accesible para la especie a través de un periodo de tiempo; G) representa el espacio geográfico, G _o) área ocupada por la especie; G _i) área que contiene las condiciones favorables, pero que no ha sido explorada por la especie (tomado de Barve <i>et al.</i> , 2011).....	11
Figura 4.	Historia Geológica de la Península de Baja California. a) región del cabo se separa del continente, b) baja norte se separa del continente y se desplaza hacia Estados Unidos, c) baja norte se une a Estados Unidos, y d) la península se une en una gran masa de tierra formando el Golfo de California. LA: Los Ángeles, LP: La Paz (tomado de Mulcahy y Macey, 2009).....	13
Figura 5.	Ecorregiones biogeográficas propuestas para la Península de Baja California (tomado de González-Abraham, 2010).....	16
Figura 6.	Principales oasis del centro y sur de la Península de Baja California (modificado de Rodríguez-Estrella, 2005).....	17
Figura 7.	Eventos de dispersión propuestos para la biota de la Península de Baja California. (a) flechas grises indican dispersión Norteña, rodeando el Golfo de California e ingresando en dirección sur hacia la península. (b) flechas negras indican vicarianza Sureña, con la separación de la región del Cabo del continente. (c) hipótesis de “Anillo”, que implica tanto el origen sureño como norteño para un complejo de especies formando un anillo alrededor del Golfo de California (tomado de Mulcahy y Macey, 2009).....	19
Figura 8.	Relaciones filogenéticas entre especies de colibríes analizadas en este trabajo (modificado de Hernández-Baños <i>et al.</i> , 2014). Puntos rojos indican la posición filogenética de las especies. Fotografía de <i>H. xantusii</i> fue tomada por CGRS; para el resto de las especies las imágenes fueron tomadas de la base de datos de la CONABIO (http://naturalista.conabio.gob.mx/ , http://bios.conabio.gob.mx/ , http://bdi.conabio.gob.mx/).....	23
Figura 9.	Localidades de muestro para el colibrí de Xantus, endémico de la Península de Baja California. GC) evento vicariante de formación del Golfo de California, RC) región del Cabo separado por el Istmo de La Paz, MT) canal marino medio trans-peninsular.....	30

- Figura 11.** Reconstrucción filogenética para los 56 haplotipos del colibrí de Xantus (identificados como “Hxan”) basado en secuencias mitocondriales concatenadas (Cyt-b, COI, ND2), bajo el modelo de evolución de secuencias TrN + I + G. Número entre parentésis después de los haplotipos, indican la localidad donde los haplotipos se encuentran distribuidos (ver mapa en parte inferior izquierda). Se señalan los haplotipos ancestrales, identificados mediante las estimaciones de tiempos de divergencia. Se indican valores de soporte estadístico con base en los diferentes análisis: bootstrap de MV / probabilidad a posterior de IB..... 51
- Figura 12.** Agrupamientos jerárquicos identificados por BAPS (izquierda) y SAMOVA (derecha) para el colibrí de Xantus, usando secuencias concatenadas de ADNmit (Cyt-b, COI, ND2). Cuatro poblaciones son identificadas (A, B, C, D). Líneas negras punteadas en el mapa (señaladas 1 - 3), indican posibles quiebres filogeográficos entre las poblaciones identificadas..... 52
- Figura 13.** Estimaciones de tiempos de divergencia en años (intervalos de confianza al 95%) para las especies analizadas en este trabajo, basados en secuencias concatenadas de ADNmit (Cyt-b, COI, ND2), utilizando un reloj molecular log-normal no correlacionado relajado implementado en BEAST (Drummond *et al.*, 2012). Puntos de calibración fueron: a) registro fósil (12 m.a., Bleiweiss, 1998), b) formación de los arcos volcánicos (10 m.a., Ferrari *et al.*, 2000), c) completa separación de la PBC (5 m.a., Riddle *et al.*, 2000). El marco temporal de diferenciación genética para los haplotipos del colibrí de Xantus, se encuentran señalados en recuadros y corresponden a las poblaciones indicadas en el mapa: azul: población A, amarillo: población B, rojo: población C, y verde: población D. La línea gruesa negra punteada, indica el periodo de divergencia para la mayoría de los haplotipos (500,000 años). Haplotipos se muestran como clados terminales, y el tiempo al ancestro común más reciente se señala después de cada terminal. Entre paréntesis se señala la localidad a la que pertenecen los haplotipos. Asteriscos rojos indican los haplotipos ancestrales..... 56
- Figura 14.** Distribución de diferencias pareadas (izquierda), Red de mínima separación (centro), y análisis Bayesiano de “skyline plots” (derecha; líneas punteadas indican intervalos de confianza al 95%), son generadas para cada una de las poblaciones del colibrí de Xantus, mediante el uso de secuencias concatenadas de ADNmit (Cyt-b, COI, ND2). En las redes de haplotipos, los círculos son proporcionales a la frecuencia, y la conexión entre ellos es proporcional al número de diferencias entre haplotipos. Los análisis de “skyline plots” revelaron que las poblaciones A y D, pasaron por un evento de expansión reciente que comenzó hace 80,000 años..... 58
- Figura 15.** Número de grupos genéticamente homogéneos (K) calculado a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud ΔK (Evanno *et al.*, 2005)..... 64

Figura 16.	Coefficientes de identidad para a) K = 2, y b) K = 4 como número de grupos genéticos homogéneos, donde cada barra vertical corresponde a un individuo y cada color corresponde a la proporción de probabilidad de pertenecer a cada grupo. Los números de la parte inferior corresponden a las localidades de origen; para su correspondencia ver Figura 9.....	65
Figura 17.	Modelación de nicho ecológico y distribución potencial de <i>Hylocharis xantusii</i> . Periodos: último interglacial (LIG), último máximo glacial (LGM), holoceno medio y distribución potencial al presente. Regiones en color verde representan las regiones geográficas con las condiciones favorables para que la especie ocurra.....	66
Figura 18.	Variables morfológicas analizadas en este trabajo (derecha). Se indican las localidades estudiadas y el número de individuos machos y hembras identificados (M y F respectivamente).....	67
Figura 19.	Análisis de cluster entre las variables morfológicas (a), y entre los individuos analizados (b) para el colibrí de Xantus.....	68
Figura 20.	Análisis de componentes principales de las variables morfológicas asociadas a las diferentes localidades de muestreo para el colibrí de Xantus. Los números romanos (I, II, III, IV), indican mayor presencia de individuos de esas localidades (se señalan en el mapa). Las letras en el mapa (A, B, C y D) hacen referencia a las agrupaciones identificadas en el análisis de cluster.....	69
Figura 21.	Diferencias en los rasgos morfológicos (promedio \pm error estándar) entre machos (azul) y hembras (verde) del colibrí de Xantus. Se indican los tamaños de muestra para machos y hembras utilizado en cada comparación. Diferencias significativas de la prueba "t", ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, en a) largo total, b) cuerda alar, c) largo de cola, y f) ancho de pico.....	70
Figura 22.	Diferencias en los rasgos morfológicos (promedio \pm error estándar) de los individuos machos entre las agrupaciones identificadas por el análisis de cluster. Agrupaciones con diferencias significativas se muestran con diferentes letras en: a) largo total, b) cuerda alar, d) nostril, e) culmen, y f) ancho de pico.....	72

LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Valores de diversidad genética y estadísticos demográficos para el colibrí endémico de la Península de Baja California, basados en el análisis de secuencias mitocondriales (Cyt-b, COI, ND2, secuencias concatenadas).....	49
Tabla II.	Resultado de los análisis de SAMOVA y porcentaje de variación dependiendo de los grupos K definidos.....	53
Tabla III.	<i>Loci</i> microsatélites polimórficos aislados para <i>Hylocharis xantusii</i> . Incluye el número de acceso al GenBank, la secuencia del cebador, el motivo repetido, temperatura de alineamiento (Ta), concentración de MgCl ₂ , intervalo de la talla alélica (bp), el número de alelos observados (Na), heterocigosidad observada y esperada (H _o y H _E respectivamente), y probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (P _{HW}).....	61
Tabla IV.	Diversidad genética y niveles de polimorfismo obtenidos a partir de la amplificación cruzada de los <i>loci</i> microsatélites diseñados <i>de novo</i> para el colibrí de Xantus. Se incluye el número y porcentaje del polimorfismo (Polym), número de alelos observados (Na), y heterocigosidad observada y esperada (H _o y H _E respectivamente).....	63
Tabla V.	Resultados del ANOVA de dos vías examinando el efecto de las diferencias en sexo (machos vs hembras), y de las 10 localidades del colibrí de Xantus en los rasgos morfológicos analizados. df: grados de libertad, MS: valor promedio cuadrado, NS: no significativo.....	73

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Información obtenida en campo de los individuos del colibrí de Xantus (<i>Hylocharis xantusii</i>) endémico de la Península de Baja California. Se indican el ID del ADN total, la localidad y sus coordenadas geográficas, ID de la fotografía, sexo, peso y las variables morfológicas analizadas en este trabajo.....	96
Anexo 2.	Cebadores microsateles obtenidos por pirosecuenciación, sintetizados para pruebas de polimorfismo en el colibrí de Xantus (<i>Hylocharis xantusii</i>), endémico de la Península de Baja California.....	101
Anexo 3.	Valores de diversidad genética de secuencias de ADN mitocondrial comparada entre distintas especies de aves.....	104
Anexo 4.	Comparación del uso de <i>loci</i> microsatélite entre distintas especies de aves. Se indica el tamaño de muestra (n), el número de <i>loci</i> polimórficos, el número de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada.....	106
Anexo 5.	Artículos científicos	
	Aceptado:	
	Genetic diversity of the endemic Xantus' hummingbird using 16 novel polymorphic microsatellite <i>loci</i> , and the cross amplification between six related species. Open Journal of Genetics.	
	Morphological dimorphism and population differences of the endemic Xantus' hummingbird (<i>Hylocharis xantusii</i>) in the Baja California Peninsula. Acta Zoológica Mexicana.	
	Sometido:	
	Phylogeography of endemic Xantus' hummingbird (<i>Hylocharis xantusii</i>) show a different history of vicariance in the Baja California Peninsula. Molecular Phylogenetics and Evolution.....	107

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de los patrones filogeográficos, ha contribuido considerablemente a comprender que factores han influido sobre la estructura poblacional y la divergencia de especies y poblaciones (Knowles y Maddison, 2002). Los análisis filogeográficos envuelven procesos históricos, y reflejan la interacción entre los procesos demográficos y genealógicos, y la dinámica de los procesos de la tierra (geológicos o climáticos; Avise, 2000); por tal motivo, los métodos filogeográficos son capaces de identificar señales de eventos históricos, como barreras geográficas, discontinuidades genéticas, fragmentación de hábitats, patrones de dispersión o expansión de la distribución de especies y poblaciones, eventos de migración, vicarianza, extinción de linajes genéticos, y zonas de refugio, dentro de las poblaciones contemporáneas (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez, 2009; Scoble y Lowe, 2010.).

Se ha observado que los eventos históricos geológicos y las fluctuaciones climáticas, han dejado señales en la estructura genética de las poblaciones, las cuales han persistido hasta el tiempo presente (Hewitt, 2000; 2004). Por un lado, las fluctuaciones climáticas, son un factor importante en los procesos de diversificación y especiación (Lovette, 2005; Avise, 2009); en términos generales, en el hemisferio norte, la alternancia de los cambios climáticos entre periodos glaciares e interglaciares, propios del Pleistoceno, resultaron en múltiples contracciones y expansiones de la distribución de muchos taxa que encontraron resguardo en zonas de refugio o zonas con menor impacto en la intensidad de los cambios globales, hacia el frío o el calor, según sea el caso, regiones que además, han sido consistentes para muchas especies (Hewitt, 1996; 2000).

En la Península de Baja California (PBC), que es en particular una región con una compleja historia geológica y climática caracterizada por una amplia heterogeneidad ambiental contemporánea, se distribuyen múltiples taxa,

incluyendo especies endémicas, crípticas, de amplia distribución, restringidas, exóticas, vulnerables, que han sido objeto de estudios filogeográficos acerca de la distribución de la variación genética (e.g. Zink, 1996; Riddle *et al.*, 2000; 2008; Nason *et al.*, 2002; Riddle y Hafner, 2010). La idea principal sugerida para explicar la estructuración genética espacial, es mediante el proceso de vicarianza, debido a la historia geológica de la PBC (ver Murphy, 1983; Upton y Murphy, 1997; Grismer 2000; Riddle *et al.*, 2000; Lindell *et al.*, 2006).

En general, se ha planteado una hipótesis temporal y espacialmente explícita sobre los eventos vicariantes de la PBC, donde se señalan cuatro eventos puntuales que se piensa han promovido la divergencia genética de las especies adaptadas al ambiente árido-desértico (Figura 1, Riddle *et al.*, 2000): 1) la formación del Golfo de California hace 4 millones de años (m.a.); 2) la incursión marina a través del Istmo de La Paz (3 m.a.); 3) la transgresión del Golfo de California hacia las áreas bajas del sur de California y Arizona (3 m.a.); y 4) la presencia de un canal medio peninsular que separó la parte norte y central de la Península (1.6 m.a.).

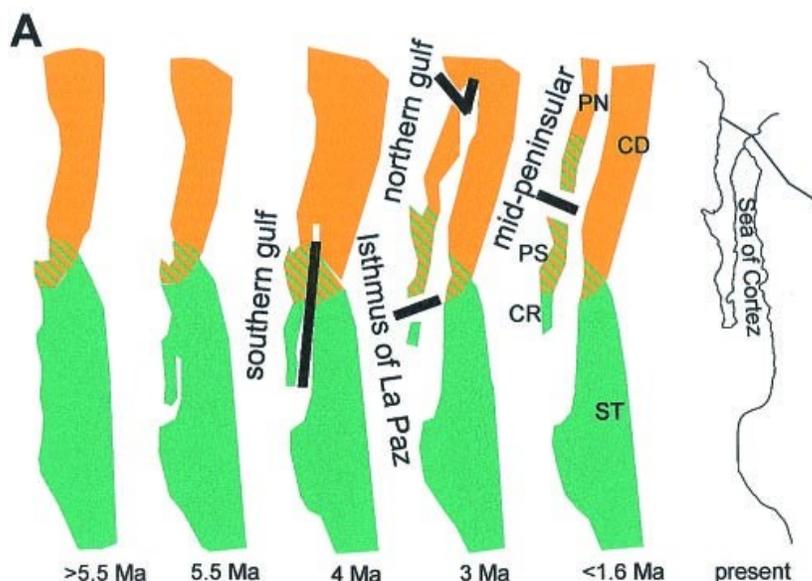


Figura 1. Eventos vicariantes propuestos para la diferenciación genética de especies y poblaciones en la Península de Baja California (modificado de Riddle *et al.*, 2000).

Contrario a explicaciones basadas en eventos históricos, diversos estudios han concluido que especies con poblaciones altamente diferenciadas, pueden representar una etapa reciente del proceso de especiación, y no necesariamente un efecto directo de los eventos históricos; por ejemplo, la deriva y la selección ecológica pueden inducir cambios en aspectos relacionados con el comportamiento social y la selección de pareja, promoviendo el aislamiento reproductivo, y eventualmente a la especiación (Edwards *et al.*, 2005); además, la especiación ecológica puede actuar sobre caracteres morfológicos y de comportamiento, generalmente en especies distribuidas en ambientes heterogéneos, donde el flujo genético entre localidades es reducido, favoreciendo así la diversificación (Nosil *et al.*, 2008). Así, pese a que los análisis filogeográficos pueden revelar patrones comunes en la estructura genética de numerosas especies, sugiriendo que al menos un evento histórico tuvo gran influencia a nivel de comunidad, existen algunos aspectos especie-específicos más complejos de explicar, y que pueden depender no solo de la interacción de eventos históricos con el comportamiento y ecología de las especies, sino además con la capacidad de dispersión, hábitat, el nicho ecológico, y la selección sexual (Neto *et al.*, 2012).

El presente trabajo forma parte integral del proyecto “Filogeografía Comparada en el Noroeste de México”, dirigido por el Dr. Francisco J. García De León, que tiene como objetivo general analizar los efectos que han dejado los eventos históricos vicariantes y climáticos, sobre la estructura genética y filogeografía de algunas especies de plantas y animales co-distribuidos en la región del Noroeste de México. En particular, en este estudio de tesis doctoral, se analiza la distribución de la variabilidad genética del colibrí de Xantus endémico de la PBC a diferentes escalas espacio-temporales, por medio de marcadores moleculares de ADN mitocondrial y *loci* microsatélite diseñados a partir de pirosecuenciación, para verificar si existe un patrón filogeográfico que se relacione con eventos vicariantes históricos, o si la estructura genética poblacional puede explicarse bajo el contexto de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Al

mismo tiempo, mediante proyecciones al pasado en la modelación de nicho ecológico, investigar la influencia relativa de las variables ambientales sobre el patrón filogeográfico y de estructura genética del colibrí; finalmente, determinar si la heterogeneidad ambiental de la Península, en conjunto con características propias de la biología de la especie como el comportamiento social o el dimorfismo sexual, promueven niveles diferenciación en caracteres morfológicos.

2. ANTECEDENTES

2.1. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN GENÉTICA

La genética de poblaciones se encarga de cuantificar la diversidad y estructura genética de las poblaciones, así como su cambio a través del tiempo evolutivo. El estudio de la variación genética juega un papel muy importante dentro de la biología evolutiva, ya que involucra procesos a partir de los cuales ocurre la evolución de las poblaciones (Futuyma, 2005; Templeton, 2006).

La dinámica evolutiva de las especies en condiciones naturales está medida principalmente por la estructura genética espacial de sus poblaciones, es decir por la distribución de las frecuencias alélicas en una región determinada, como resultado de la acción de las fuerzas evolutivas (mutación, deriva génica, migración y selección natural). Por ejemplo, un patrón homogéneo de estructura genética sugiere reproducción al azar o panmixia, mientras que un patrón discontinuo sugiere reproducción no aleatoria y acción independiente o diferencial de las fuerzas evolutivas (Templeton, 2006). La influencia de estas fuerzas evolutivas varía dependiendo de diversos factores que pueden ser históricos como la dispersión y vicarianza, ecológicos como la preferencia del hábitat, así como aspectos biológicos y de la historia de vida de las especies, como el comportamiento, y la selección sexual (Hewitt, 1996; Templeton, 2006).

Para comprender la historia evolutiva de los patrones de diversificación o especiación, el uso conjunto de marcadores moleculares como el ADN mitocondrial y nuclear, con diferentes tasas de mutación, es importante porque nos permite hacer inferencias a diferentes escalas temporales, y proveen de información más confiable y sólida de los procesos históricos, ecológicos y biológicos que promueven niveles de variación genética (Rull, 2007; Neto *et al.*, 2012; Scoble y Lowe, 2012).

2.2. FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA

Cuando la historia evolutiva de las poblaciones se analiza desde la perspectiva de la biogeografía histórica asociada a eventos geológicos o climáticos de los patrones espaciales de la diversidad genética, se habla de filogeografía, la cual se encarga del estudio de los procesos históricos que rigen las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos o filogenéticos (Avise, 2000). Tradicionalmente estos análisis se han llevado a cabo a nivel interespecífico o entre especies relacionadas, por lo que el ADN mitocondrial (ADNmt), que se caracteriza por presentar alta tasa de mutación con resolución temporal más antigua, no recombina y su herencia es casi exclusivamente materna, se ha mantenido como principal molécula informativa (Avise, 2008).

En el sentido histórico, los patrones filogeográficos pueden ser explicados en el contexto de dos hipótesis: la vicarianza y la dispersión. En los eventos geológicos como la vicarianza, el surgimiento de una barrera física como cadenas montañosas, cuencas o canales, fragmenta la distribución de las especies y promueve su diferenciación genética; y con el tiempo suficiente y en ausencia de flujo génico y la acción independiente de las fuerzas evolutivas, puede resultar en un proceso de especiación (Avise, 2000). Por el contrario, bajo el contexto de la hipótesis de dispersión, el patrón filogeográfico de las especies es el resultado de la expansión del intervalo de distribución, atravesando cualquier barrera física. Por otro lado, eventos históricos como el régimen del cambio climático provocado por periodos glaciales e interglaciales durante el Pleistoceno, a menudo resultan en la contracción y expansión de las poblaciones. Cuando la contracción del intervalo de distribución ocurre hacia la zona de refugio, se espera que los valores de diversidad genética más altos se localicen en esa zona, seguido de una reducción gradual en dirección a la ruta de dispersión (Hewitt, 1996; 2000).

A nivel intraespecífico, las poblaciones de la mayoría de las especies muestran diferentes grados de estructuración genética (Hewitt, 2000), por lo que recientemente, los análisis filogeográficos han ido implementado nuevas herramientas genéticas y estadísticas para determinar cambios en la estructura genética de las especies debido a procesos evolutivos en una escala temporal más fina (procesos microevolutivos; e.g. Guillot *et al.*, 2005). Como se mencionó anteriormente, además de los eventos históricos vicariantes y de dispersión, un patrón genético discontinuo puede deberse a la influencia de factores ambientales ecológicos (e.g. altitud, topografía, temperatura, precipitación; Storfer *et al.*, 2007), así como a la biología e historia de vida propia de las especies. En este sentido, los avances tecnológicos, se han dirigido al desarrollo de marcadores con diferente resolución espacial y temporal, que puedan responder a preguntas en una escala reciente. Usualmente marcadores altamente variables como los microsatélites, son necesarios para detectar discontinuidades genéticas, o niveles de estructuración a nivel poblacional, y correlacionarlas con los factores ambientales (Guillot *et al.*, 2005).

Cuando las poblaciones de una especie se encuentran diferenciadas geográficamente, la principal fuerza evolutiva responsable de la estructuración espacial de las poblaciones, es el flujo genético. Si el flujo genético es alto, es decir alta conectividad poblacional, las poblaciones tenderán a ser homogéneas y sin adaptaciones locales, lo cual impide el proceso de especiación (Templeton, 2006). Por el contrario, cuando el flujo genético es bajo, se producirá una diferenciación genética entre las poblaciones dando origen a linajes evolutivos distintos. Así, la estructuración genética poblacional, y el establecimiento de linajes evolutivamente independientes, está fuertemente influenciada por los patrones de intercambio genético dentro y entre poblaciones (Schaal *et al.*, 1998).

Las barreras geográficas y/o ecológicas acentúan la subdivisión poblacional, y en combinación con las características biológicas de la especie,

como la capacidad de dispersión, el comportamiento social o la selección sexual, pueden reducir la panmixia en una o varias poblaciones, promoviendo niveles de diferenciación genética, observando frecuencias y distribución de alelos heterogéneos (Templeton, 1998). Por ende, un factor limitante es sin duda la falta de marcadores moleculares con polimorfismo suficiente a nivel intraespecífico, que permita identificar tales diferencias. Con el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación masiva, como la pirosecuenciación 454-Roche, es posible la obtención de cientos de miles de fragmentos del genoma, a partir de los cuales se pueden diseñar cebadores microsatelitales *de novo* especie-específicos, con suficiente información genética, sobre todo para especies donde los datos genéticos son limitados (Abdelkrim *et al.*, 2009).

De manera general la pirosecuenciación consiste en tres pasos fundamentales (Figura 2): 1) preparación de una librería donde el ADN de un individuo es fragmentado y se adhieren adaptadores a los extremos; 2) emulsión y PCR donde a cada fragmento se incorpora una gota de aceite que contiene todos los elementos para realizar una PCR, y microesferas con secuencias complementarias a los adaptadores; y 3) secuenciación masiva, donde las microesferas se cargan en una placa de fibra óptica con 96 pozos. En cada pozo cabe una microesfera y la enzima luciferasa. La secuenciación inicia cuando los nucleótidos con pirofosfatos se van inyectando de manera secuencial a través de la placa y cada vez que un nucleótido es adherido a la hebra complementaria la luciferasa libera un haz de luz que es detectado por la cámara CCD (“Change coupled device” por sus siglas en inglés). Este proceso se repite varias veces hasta agotar los reactivos (Mardis, 2008).

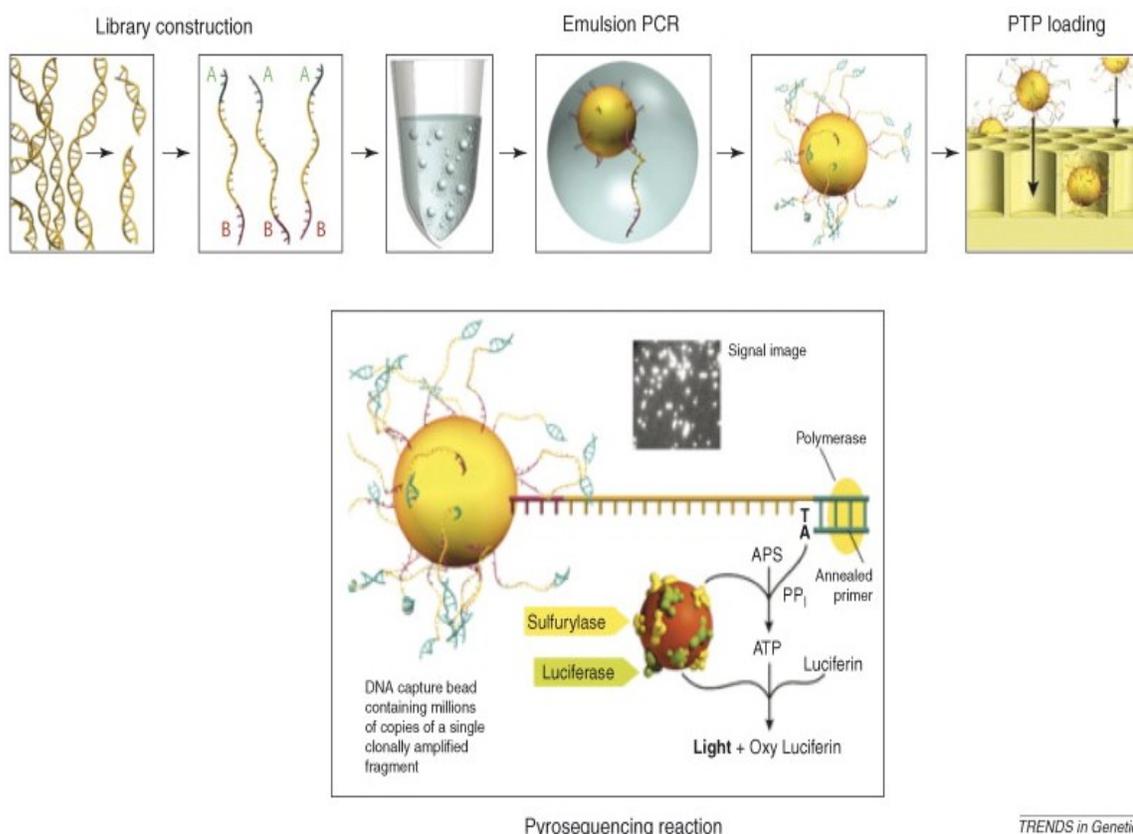


Figura 2. Esquema representativo de la reacción de pirosecuenciación 454-Roche: 1) construcción de la librería de ADN, 2) emulsión de PCR, y 3) reacción de secuenciación en placa de fibra óptica (modificado de Mardis, 2008).

Una vez determinado el patrón genético espacial de las poblaciones, es posible, 1) cuantificar la influencia de las variables ambientales sobre la variación genética, 2) identificar barreras para el flujo genético, 3) identificar como la pérdida de hábitat (calidad) afecta la dispersión, 4) comprender la escala temporal y espacial de un proceso ecológico, y 5) probar hipótesis ecológicas específicas (Storfer *et al.*, 2007).

En años recientes, han surgido una amplia gama de herramientas de análisis que nos permiten contrastar hipótesis sobre procesos microevolutivos, como cambios o variación a nivel intraespecífico, o discontinuidades genéticas, debido a factores ambientales y ecológicos, como la altitud, topografía,

desertificación, fragmentación, precipitación y temperatura entre otros (Manel *et al.* 2003, Guillot *et al.* 2005, Storfer *et al.* 2007, Thomassen *et al.* 2009, Scoble y Lowe 2010). Existe evidencia creciente de que la información detallada del ambiente, es importante para comprender la variación y diversificación en las poblaciones naturales (e.g. Thomassen *et al.* 2009, Alvarado-Serrano y Knowles 2013).

2.3. MODELACIÓN DE NICHO ECOLÓGICO

La modelación de nicho ecológico (MNE) permite obtener la distribución potencial de la especie en función de las variables medioambientales (Kearner y Porter, 2009), y se basa en detectar las relaciones no aleatorias entre dos conjuntos de datos: 1) los registros georreferenciados de la presencia de una especie, y 2) la información digitalizada de variables ambientales (e.g. climáticas, topográficas) que potencialmente determinen los patrones de distribución de la especie de estudio en una determinada escala de análisis (Alvarado-Serrano y Knowles, 2013).

La idea general de “nicho”, se refiere a las condiciones ecológicas que una especie requiere para mantener sus poblaciones en una región determinada, en conjunto con los impactos que otras especies tienen sobre sus recursos, el hábitat y el ambiente (Peterson *et al.*, 2011). De esta idea general, derivan dos conceptos que han sido ampliamente discutidos, y que forman parte crucial en la teoría de nicho ecológico: el nicho fundamental y el nicho realizado. El nicho fundamental lo podemos definir según Hutchinson (1957), como el conjunto de todos los factores ambientales que permiten a las especies subsistir; por otro lado, el nicho realizado lo define como la parte del nicho fundamental donde las especies son restringidas debido a las interacciones bióticas (Peterson *et al.*, 2011).

a través del paisaje (Alvarado-Serrano y Knowles, 2013), debido a que la MNE genera información sobre las preferencias y tolerancias bióticas de las especies, y se pueden realizar estimaciones de la distribución potencial de las especies, al pasado, presente y futuro (Peterson *et al.*, 2011). En filogeografía, el MNE ha sido empleado para evaluar sitios de refugio, asociando la distribución potencial de las especies al último máximo glacial con la diversidad genética (Garrick *et al.*, 2013; Alvarado-Serrano y Knowles, 2013; Jezkova *et al.*, 2014), para identificar el nicho potencial de linajes cercanamente emparentados (Leaché *et al.*, 2009; Valdivia-Carrillo, 2014) y su asociación a presiones selectivas (Manel *et al.*, 2010), para caracterizar preferencias y tolerancias ambientales (Wooten y Gibs, 2012), así como para identificar la segregación espacial de sexos asociada a condiciones medioambientales diferenciales (Gutiérrez-Flores, 2015).

2.4. ÁREA DE ESTUDIO

2.4.1. HISTORIA GEOLÓGICA DE LA PENÍNSULA DE BAJA CALIFORNIA

La Península de Baja California (PBC) comprende una gran variedad de hábitats, que van desde bosques templados, tropicales, hasta desiertos arbustivos montañosos y planos bajos áridos; esta gran diversidad, es el resultado de sucesos geológicos muy dinámicos y de cambios climáticos que dieron origen al alto número de endemismos que se encuentran en la región (Riddle *et al.*, 2000). A partir de estudios geológicos se determinó que la actividad de las placas tectónicas (de Norteamérica, de Farallón y del Pacífico), provocó la formación de la península y del Golfo de California (Mulcahy y Macey, 2009). Como consecuencia de estos movimientos tectónicos, la región del Cabo se separó de la costa este de la parte continental de México (Figura 4), entre 5.5 y 14 millones de años (m.a.) según distintas estimaciones. Posteriormente, durante el Pleistoceno (2 m.a.) la región del Cabo se unió a la PBC (Murphy y Aguirre-León, 2002; Mulcahy y Macey, 2009).

Durante el proceso de formación de la PBC, la presencia de canales marinos transpeninsulares han sido ampliamente citados en estudios filogeográficos (Riddle *et al.*, 2000; Riddle y Hafner, 2006; Munguía-Vega, 2011). La evidencia geológica a partir de depósitos marinos sugiere que durante el Mioceo tardío (7 m.a.) en la región central de la PBC existió un canal transpeninsular (desde Laguna San Ignacio hacia el proto-Golfo), conectando el Océano Pacífico y el Golfo de California. Este canal pudo haber existido en más de una ocasión, siendo el último evento hace 1 m.a. (Oskin y Stock, 2003).

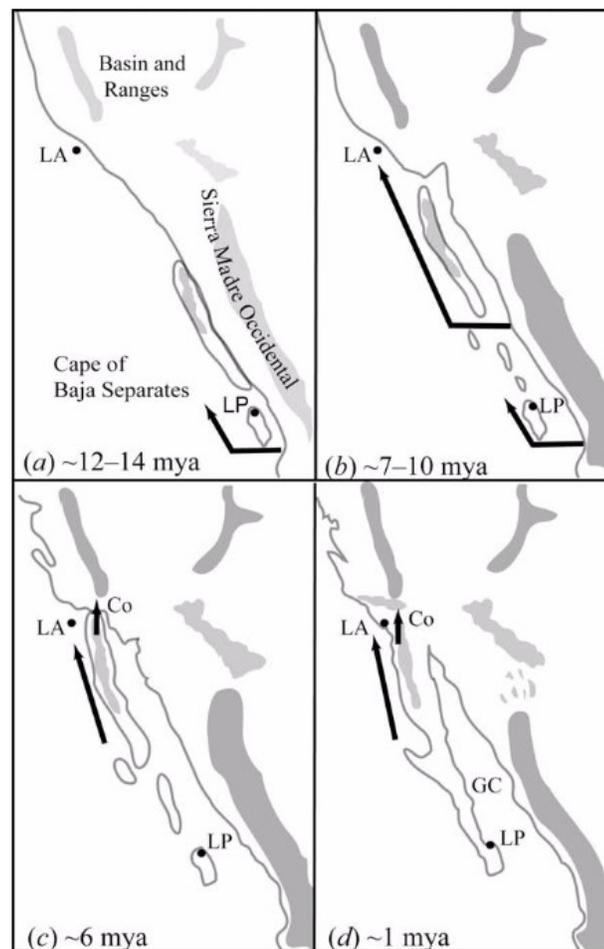


Figura 4. Historia Geológica de la Península de Baja California. a) región del cabo se separa del continente, b) baja norte se separa del continente y se desplaza hacia Estados Unidos, c) baja norte se une a Estados Unidos, y d) la península se une en una gran masa de tierra formando el Golfo de California. LA: Los Ángeles, LP: La Paz (tomado de Mulcahy y Macey, 2009).

2.4.2. ASPECTOS CLIMÁTICOS DE LA PBC

Las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno (2.5 m.a. – 11,000 años atrás), se caracterizaron por ciclos periódicos muy marcados con alternancia de etapas más frías que el clima actual (8°C menos), periodos glaciales, con etapas cálidas similares al presente (2°C a 3°C mayor), conocidas como periodos interglaciares (Caballero *et al.*, 2010). Se cree que en periodos glaciales, las especies con afinidad tropical pudieron sobrevivir a los cambios climáticos habitando zonas de refugio en donde las condiciones no fueran tan extremas, recolonizando posteriormente cuando el clima fue óptimo (Hewitt, 1996; 2000). Estudios moleculares han revelado que los refugios del Pleistoceno han promovido la generación y mantenimiento de la diversidad genética, resultando en regiones con alta diversidad genética (Hewitt, 1996; 2004).

En especies adaptadas a climas cálidos, los refugios usualmente ocurren en regiones con una heterogeneidad topográfica alta, al retener cierta estabilidad climática durante los periodos glaciales (Hewitt, 1996; 2000). Sin embargo, se ha observado que la fisiografía de la PBC, en conjunto con la historia geológica compleja y el régimen climático presente, han ocasionado el aislamiento de organismos a otras regiones de la península fuera de los refugios sureños, indicando que los patrones filogeográficos encontrados en especies de reptiles y mamíferos, probablemente fueron causados por aspectos como adaptaciones locales y la selección natural, o incluso por la permanencia de regiones áridas más localizadas a lo largo de la península (e.g. Grismer, 2002; Valdivia-Carrillo, 2014; Gutiérrez-Flores, 2015).

Un aspecto importante que se debe considerar, y que no había sido contemplado en estudios previos para la PBC, es que las regiones áridas y semi-áridas como lo es la península, son las áreas más sensibles al cambio climático, particularmente durante los periodos interglaciares, puesto que la escasa

precipitación conlleva a una expansión de las zonas áridas, con el decremento en la cantidad y calidad de agua subterránea, degradación del suelo, salinización, y reducción de la cobertura vegetal (Gutiérrez-Elorza, 1998). Desde el inicio del Holoceno (11,500 años atrás al presente, Gibbard y Van Kolfshoten, 2004), reciente periodo interglacial, muchas poblaciones animales pueden estar restringidas a regiones más estables, dadas las condiciones áridas presentes en la PBC. En las regiones más áridas, la temperatura puede llegar a más de 50°C, mientras que en las zonas húmedas de la Sierra de La Laguna y los oasis, la temperatura no excede los 30°C (Arriaga y Rodríguez-Estrella, 1997; Rodríguez-Estrella *et al.*, 1997).

2.4.3. ASPECTOS ECOLÓGICOS DE LA PBC

Dadas las características geológicas y climáticas históricas de la PBC, en conjunto con la compleja topografía y localización, hacen que la península presente distintas regiones biogeográficas, resultado de las interacciones ecológicas entre el suelo, el clima y la biota (Grimer, 2002; González-Abraham *et al.*, 2010). González-Abraham y colaboradores (2010), realizaron una revisión y regionalización de la península, a partir de la cual proponen regiones ecológicas (14 ecorregiones, Figura 6), agrupadas en tres grandes regiones:

1. Mediterránea, se encuentran las ecorregiones 1-5, presentan dos periodos de precipitación, invierno y primavera, con clima de tipo mediterráneo con inviernos fríos y lluviosos, y veranos secos y cálidos;
2. Desértica, ecorregiones 6-11, la cual comprende una zona de transición entre los ecosistemas templado mediterráneo del norte y tropical del sur. Tiene precipitación escasa e irregular, y presenta elevada cobertura arbórea;
3. Tropical, ecorregiones 12-14 que ocupan todo el extremo sur de la PBC, la precipitación es principalmente deriva de tormentas ciclónicas a finales de

verano y otoño, y se caracteriza por ambientes de selva baja caducifolia, matorrales, y el bosque de pino-encino de la Sierra de Laguna (2,090 m de altitud).

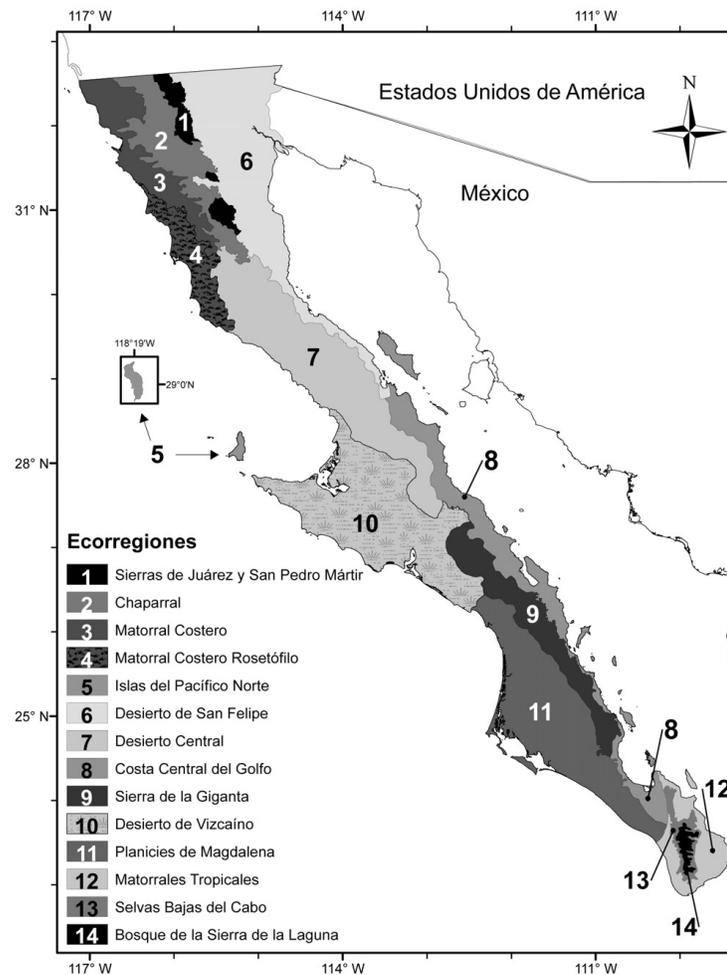


Figura 5. Ecorregiones biogeográficas propuestas para la Península de Baja California (tomado de González-Abraham *et al.*, 2010).

Otro aspecto ecológico muy peculiar de la PBC, es la presencia de regiones de oasis a lo largo de la península. Estas regiones corresponden a cuerpos de agua dulce inmersos en el desierto, y son considerados como refugios ya que contienen condiciones de ambientes méxicos relictos desde el Pleistoceno (Maya *et al.*, 1997; Valero *et al.*, 2014). Los oasis son de gran importancia ecológica y

biológica, debido al tipo de especies que soporta, ya que incluye una variedad de fuentes de alimentos, por lo que han sido propuestos como zonas prioritarias para la conservación debido a la riqueza de especies de animales y plantas que ahí se distribuyen (Arriaga *et al.*, 1997; Rodríguez-Estrella *et al.*, 1997; 1999; 2005).

En términos de especies de aves, la PBC ha sido categorizada como un área de aves endémicas del mundo; y con base al número de especies endémicas, y aquellas enlistadas como amenazadas o en peligro, los oasis del centro y sur de la península (Figura 7), son las áreas más importantes para la conservación de aves terrestres (Rodríguez-Estrella, 2005).



Figura 6. Principales oasis del centro y sur de la Península de Baja California (modificado de Rodríguez-Estrella, 2005).

2.4.4. PATRONES FILOGEGRÁFICOS EN LA PBC

Bajo el contexto de la teoría de la tectónica de placas en la formación de la PBC, se han puesto a prueba hipótesis relacionadas tanto a eventos de separación vicariante, como de dispersión, entre especies asociadas a la PBC y el continente (Riddle *et al.*, 2000a; 2000b; Zink *et al.*, 2002; 2001; 2000; Crews y Hedin, 2006, Devitt, 2006; Riddle y Hafner, 2006a; Leaché y Mulcahy, 2007; Mulcahy y Macey, 2009; Leaché *et al.*, 2009; Munguía-Vega, 2011). Por un lado, diversos trabajos han observado discontinuidades genéticas en base al análisis de la estructura filogeográfica de múltiples taxa distribuidos a lo largo de la PBC (mamíferos, aves, reptiles, anfibios, plantas e invertebrados; ver Riddle *et al.*, 2000; Riddle y Hafner, 2006; Mulcahy y Macey, 2009; Munguía-Vega 2011); la distribución de los diferentes filogrupos, representan una fuerte evidencia de los eventos vicariantes históricos: 1) Istmo de La Paz, con la separación de la región del Cabo del resto de la península por un camino marino trans-peninsular (hace 3 m.a.); 2) el Golfo Norte, con el aislamiento del desierto peninsular del continental, por una transgresión del Golfo de California hacia California y Arizona (hace 3 m.a.); y 3) el medio-peninsular, donde ocurre el aislamiento del norte y sur de la península por un camino marino trans-peninsular en la región central de Vizcaíno (hace 1.6 m.a.; ver Figura 1; Riddle *et al.*, 2000; Munguía-Vega, 2011).

Por otro lado, en cuanto a las hipótesis basadas en eventos de dispersión, se proponen tres tipos de movimientos (Figura 5): (a) dispersión Norteña que va desde el norte en las montañas peninsulares; (b) separación vicariante Sureña debido a la separación de la región del cabo; y (c) efecto dual-peninsular, hipótesis de “anillo”, que implica una dispersión sobre el agua, y que pudo haber ocurrido en cualquier tiempo durante y después de la formación de la PBC (ver Mulcahy y Macey, 2009). Adicionalmente, y en contraste con los eventos vicariantes, se ha observado que los cambios en las condiciones ambientales locales, en conjunto con las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno y Holoceno (2.6 m.a. al presente)

también han influido sobre la estructura genética de las poblaciones naturales (Lindell *et al.*, 2006; Leaché *et al.*, 2009; Garrick *et al.*, 2013, 2009).

Particularmente, son pocos los estudios filogeográficos con especies de aves de la PBC. En general, se ha observado que la región sureña de la península se ha mantenido como zona refugio, para la perla californiana (*Polioptila californica*; Zink *et al.*, 2013; 2002, 2001), y la codorniz californiana (*Callipepla californica*; Zink, 2002); regiones donde además, se ha observado una alta diversidad genética comparada con las localidades norteñas de la península.

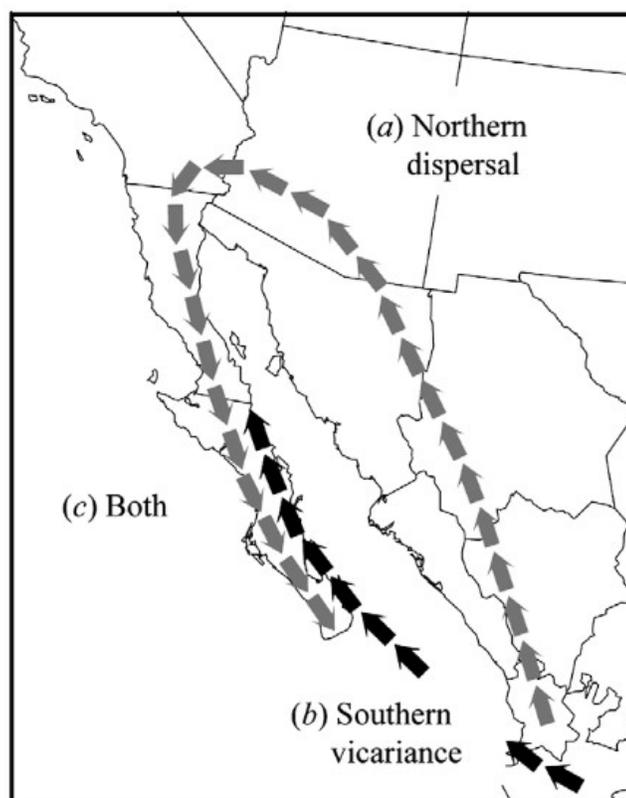


Figura 7. Eventos de dispersión propuestos para la biota de la Península de Baja California. (a) flechas grises indican dispersión Norteña, rodeando el Golfo de California e ingresando en dirección sur hacia la península. (b) flechas negras indican vicarianza Sureña, con la separación de la región del Cabo del continente. (c) hipótesis de “Anillo”, que implica tanto el origen sureño como norteño para un complejo de especies formando un anillo alrededor del Golfo de California (tomado de Mulcahy y Macey, 2009).

2.5. MODELO DE ESTUDIO

2.5.1. El colibrí de Xantus endémico de la PBC

El colibrí endémico *Hylocharis xantusii* (Lawrence, 1860), pertenece a la familia Trochilidae, la cual es de las más numerosas en especies y variedades de aves (Johnsgard, 1983); es considerado un colibrí de talla media con una máscara negruzca auricular, una franja blanca postocular, y un marcado dimorfismo sexual, donde los machos presentan el pico de coloración rojo-naranja y un plumaje más colorido (Figura 8). Se distribuye principalmente en el sur y centro de la PBC, desde la región del Cabo, hasta los 29° latitud norte (Figura 9). Su distribución no es continua, pero puede ser encontrada en distintos hábitats, desde áreas montañosas (sobre los 1,500 m) de la Sierra de La Laguna, Sierra de La Giganta y Sierra de Guadalupe, hasta en Islas del Golfo, y en zonas de laderas con arbustos, cañones, jardines, huertos y matorrales áridos que se encuentran a menudo cerca de oasis o zonas de arroyo temporal (Howell y Howell, 2000).

Pese a que es considerado un colibrí endémico de la PBC, existe un registro en 1988 de su presencia y anidación en San Diego, CA, y otro registro en 1998 en British Columbia, Canadá (Howell y Howell, 2000). Se consideran registros raros e infrecuentes, pero representan una evidencia de la capacidad de dispersión de esta especie. Respecto a su biología, ecología, y patrones de distribución, se tiene poca información publicada, estando la mayoría sin publicar (Rodríguez-Estrella, datos no pub). En un estudio de esta especie, se observó que una de las principales fuentes de néctar para el colibrí de Xantus, es el madroño *Arbutus peninsularis* endémico de la PBC, el cual parece requerir del colibrí para su polinización (Arriaga *et al.*, 1990). Por otro lado, se sabe que *H. xantusii* tiene dos picos reproductivos, uno en primavera-verano y el otro en el otoño; sus nidos los coloca en árboles grandes, en palmas y hasta en arbustos, y logra un

promedio de dos pollos volantones por cada nido (Rodríguez-Estrella, datos no pub).

En cuanto a su relación con otras especies de colibríes, en la PBC se distribuye el colibrí cabeza violeta *Calypte costae*, especie no endémica y residente en todo el noroeste de México (CONABIO 2008). Actualmente no existe información sobre aspectos de interacción o competencia entre estas especies, u otras no residentes pero migratorias (e.g. *Archilochus alexandri*, CONABIO 2008). Mediante observaciones personales realizadas en campo (Rodríguez-Estrella, datos no pub.), se ha visto que la especie predominante en la región central y sur de la PBC, es el colibrí endémico *Hylocharis xantusii*, el cual presenta en general un mayor tamaño en relación a las otras especies.

2.5.2. Historia Evolutiva de *Hylocharis xantusii*

En cuanto a su sistemática, solo se conoce una especie relacionada al colibrí de Xantus, el colibrí de orejas blancas *Hylocharis leucotis* (Figura 8). Estas dos especies comparten características únicas respecto a su ecología, comportamiento, vocalización y plumaje, lo que ha provocado que desde 1918 haya incertidumbre sobre su parentesco con otras especies, y su posición dentro del taxa (Howell y Howell, 2000, Hernández-Baños *et al.*, 2014). En particular, *H. leucotis* tiene una distribución continental, que va desde el sureste de Arizona en EUA, Sierras de Sonora, Sinaloa, Chihuahua, San Luis Potosí, Durango, Tamaulipas y Tlaxcala en México, Guatemala y Nicaragua (Johnsgard, 1983); aparentemente no presenta zonas de traslape con la distribución de *H. xantusii*, lo que podría indicar que al menos desde la formación de la península, estas dos especies divergieron completamente.

El género *Hylocharis* pertenece a la familia con el mayor grado de especialización en todo el mundo; viven exclusivamente en América y presentan

un gran polimorfismo en cuanto a su apariencia externa (Zamudio-Beltrán, 2011). La clasificación de los colibríes, se basa principalmente en características morfológicas externas, como el pico y el plumaje, y en caracteres conductuales como el forrajeo; los primeros estudios sobre las relaciones filogenéticas de esta familia (utilizando 26 especies de colibríes; ver Bleiweiss, 1998), establecieron una escala de tiempo para la radiación de las especies, con estimaciones de distancias genéticas y datos de registro fósil. Se propone que una de las principales causas de diversificación, fue la habilidad ecológica generalista, para radiar hacia las áreas montañosas.

En un estudio más reciente, McGuire y colaboradores (2007), generaron una filogenia más robusta, utilizando 151 especies de colibríes, dos genes nucleares (AK1 y AK5) y dos genes mitocondriales (ND2 y ND4), encontrando para algunos géneros un origen parafilético; sin embargo, los arreglos filogenéticos no mostraron buenos soportes para validar hipótesis, y a pesar de que estos estudios han aportado información sobre las relaciones dentro y fuera de la familia, son pocas las modificaciones taxonómicas que se han hecho a nivel genérico y específico, enfocándose éstos arreglos taxonómicos a las jerarquías mayores (McGuire *et al.*, 2007). En particular para el género *Hylocharis*, Hernández-Baños y colaboradores (2014) observaron que también representan un grupo parafilético; sin embargo, de las especies descritas para éste género, solo *H. xantusii* y *H. leucotis* resultaron ser un clado monofilético (Figura 8).

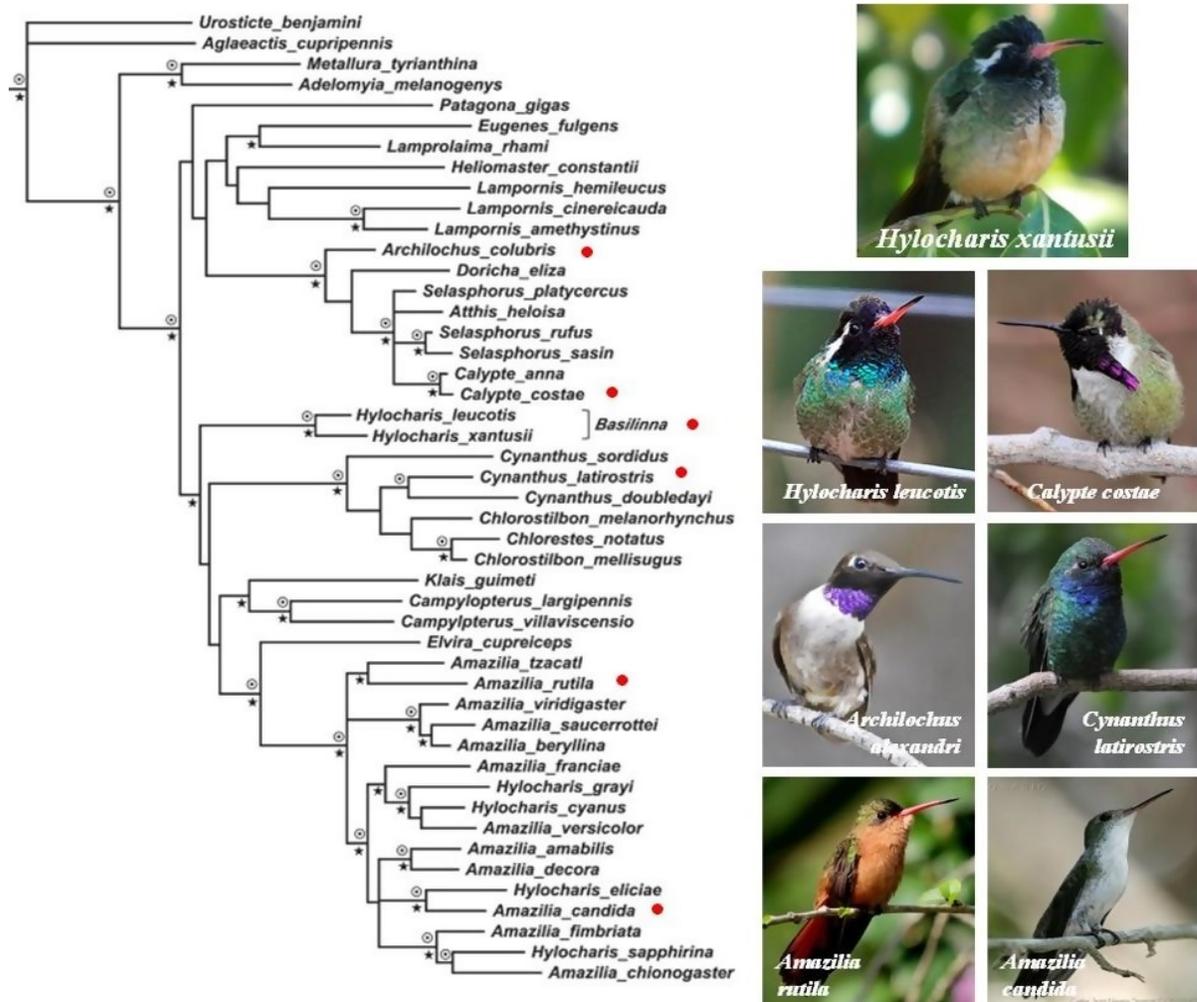


Figura 8. Relaciones filogenéticas entre especies de colibríes analizadas en este trabajo (modificado de Hernández-Baños *et al.* 2014). Puntos rojos indican la posición filogenética de las especies. Fotografía de *H. xantusii* fue tomada por CGRS; para el resto de las especies las imágenes fueron tomadas de la base de datos de la CONABIO (naturalista.conabio.gob.mx/, bios.conabio.gob.mx/, bdi.conabio.gob.mx/).

2.5.3. Estudio de la variación morfológica

El estudio del papel potencial de la variación geográfica de un rasgo fenotípico dentro de una especie, es un tema crucial en la biología evolutiva, debido a que tal variación puede conducir a la adaptación a ecologías divergentes,

como un subproducto de la adaptación morfológica, o bien por adaptación directa al medio ambiente (Boughman, 2002, Fisher-Reid y Wiens, 2015); en casos donde existen poblaciones a lo largo de gradientes ambientales, los individuos suelen restringirse a condiciones locales, y posteriormente promover variación en características fenotípicas entre las poblaciones (Ribeiro *et al.*, 2014).

En colibríes de la familia Trochilidae, los caracteres morfológicos juegan un papel importante en el conocimiento sobre el origen, evolución, y delimitación de especies o poblaciones (Bleiweiss, 1998, Roy *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2012), ya que están relacionados con la capacidad de vuelo, fisiología y adaptaciones alimenticias, comportamiento y dimorfismo sexual (Bleiweiss, 1998; Roy *et al.* 1998, Temeles *et al.*, 2010, Graham *et al.*, 2012, Berns y Adams, 2013). En particular el dimorfismo sexual, puede ocurrir en diferentes rasgos, tales como tamaño y forma del cuerpo, morfología de alas y de pico, plumaje y ornamentaciones, dependiendo de las funciones ecológicas que realizan machos y hembras, como alimentación y cuidado parental, apareamiento, y otras características de la historia de vida (Berns y Adams, 2010, 2013). Por ejemplo, las hembras realizan tanto el cuidado parental, como la selección de pareja, por lo que "prefieren" machos con fenotipos que "signifiquen" mayor aptitud, para asegurarse de que sus hijos tendrán mayor éxito (Berns, 2013); así, en este caso, los machos tienden a ser generalmente más grandes, con plumaje u ornamentaciones llamativas que maximicen el éxito reproductivo (Berns y Adams, 2013).

Como se mencionó anteriormente, el colibrí de Xantus presenta un dimorfismo sexual muy marcado, donde los machos tienen el pico naranja y un plumaje más colorido; y que además de ser una especie con distribución restringida dado su endemismo, habita en un gradiente ambiental muy heterogéneo, desde ambientes costeros y áridos sobre el nivel del mar, hasta los 1,400 m del bosque de pino encino de la Sierra de la Laguna (Howell y Howell, 2000; Rodríguez-Estrella *et al.*,

1997, 2005). *H. xantusii* de origen neotropical es una especie que claramente se ha adecuado a las condiciones xéricas de la PBC; sin embargo, existe poca información sobre qué aspectos ecológicos y biológicos influyen sobre la distribución de los individuos, por lo que esta especie ofrece una oportunidad interesante para examinar si las diferencias ambientales sobre la peculiar topografía de la PBC, pueden determinar patrones de variación geográfica intraespecífica, tanto de caracteres genéticos como morfológicos, y por lo tanto, contribuir a la divergencia de las poblaciones.

3. JUSTIFICACIÓN

La historia de las especies que se distribuyen en la Península de Baja California, ha sido principalmente abordada por hipótesis sobre eventos vicariantes geológicos, que implican millones de años, explicando así la distribución espacial de la diversidad genética de los organismos distribuidos en esta región. Recientemente, pocos trabajos resaltan la importancia de los eventos climáticos del último millón de años (Pleistoceno), y particularmente de los últimos 11,000 años (Holoceno), aspectos que no habían sido considerados anteriormente a esta escala regional. Además, estudios que involucran estimaciones de la variación genética asociada al ambiente, pueden ayudar a priorizar medidas de conservación biológica, identificando y delimitando áreas con historias evolutivas singulares, para establecer unidades geográficas para la conservación, no solo de los patrones de biodiversidad, sino de los procesos evolutivos que generan dicha diversificación.

Así, generar información para explicar la distribución de la variabilidad genética a distintas escalas temporales, y analizar las características ecológicas del hábitat, y de la variación morfológica a lo largo de la distribución de una especie con características particulares, como lo es el colibrí de Xantus, endémico de la PBC, puede contribuir al conocimiento con bases sólidas, sobre los principales factores que modelan la distribución de las especies en la región de la península.

Por último, *Hylocharis xantusii* es la primera especie de colibrí para la que se describe el patrón filogeográfico a lo largo de su intervalo de distribución, y para la que se desarrollan marcadores microsatélite especie-específicos con una técnica de secuenciación masiva (de segunda generación), lo que permitirá continuar con investigaciones genéticas y genómicas con otros alcances, a partir de la información generada en este trabajo doctoral.

4. HIPÓTESIS

- 1) Si los eventos históricos vicariantes acontecidos en varios periodos geológicos durante la formación de la PBC, dejaron señales genéticas en los linajes de *H. xantusii*, se observarán interrupciones en la distribución de los haplotipos mitocondriales, y así mismo, los tiempos de divergencia obtenidos para la especie, coincidirán con el tiempo de separación y formación de la península;
- 2) Si las condiciones climáticas de la PBC influyeron en la estructura genética del colibrí endémico, se espera encontrar una relación entre el patrón espacial de la estructura genética, y el patrón espacial de las condiciones climáticas: si la región del Cabo representó un área de refugio en respuesta a las fluctuaciones climáticas (e.g. periodos glaciales), se espera encontrar una mayor diversidad genética tanto a nivel del ADNmit como de *loci* microsatélite en el sur de la península, con una expansión poblacional reciente;
- 3) Si la MNE y la distribución geográfica potencial de la especie proyectada hacia el pasado permite identificar el nicho ecológico en distintos periodos de tiempo, se espera encontrar diferentes zonas de refugio en respuesta a los cambios climáticos predominantes de la PBC (periodos glaciares e interglaciares);
- 4) Por otro lado, si no se detectaran discontinuidades filogeográficas relacionadas con los eventos históricos vicariantes y climáticos, y son los factores ecológicos presentes en la PBC los que tienen mayor importancia e influencia sobre los niveles de variación de la especie, el uso de *loci* microsatélite, con resolución espacial y temporal más fina, permitirá identificar niveles de variación intraespecífica a nivel local;
- 5) Por último, si los factores ecológicos han promovido la diversificación de la especie a condiciones más locales, se espera observar diferencias en rasgos morfológicos asociados a aspectos biológicos y ecológicos como el comportamiento y el dimorfismo sexual del colibrí endémico de la PBC.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar la distribución de la variabilidad genética del colibrí de Xantus endémico de la PBC a diferentes escalas espacio-temporales, por medio de marcadores moleculares de ADN mitocondrial y *loci* microsatélite, para verificar si existe un patrón filogeográfico que se relacione con eventos históricos, o si la estructura genética poblacional puede explicarse bajo el contexto de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Al mismo tiempo, mediante proyecciones al pasado en la MNE, investigar la influencia relativa de las variables ambientales sobre el patrón filogeográfico y de estructura genética del colibrí; finalmente, determinar si las características ecológicas de la heterogeneidad ambiental de la península, en conjunto con características propias de la biología de la especie como el comportamiento o el dimorfismo sexual, promueven niveles de diferenciación en caracteres morfológicos, y por ende diferencias entre las poblaciones de la especie.

5.2. Objetivos particulares

- 1) Evaluar la distribución de la diversidad genética de *Hylocharis xantusii* en las localidades de estudio, mediante el uso de genes de ADN mitocondrial, para determinar si existe un patrón filogeográfico en la PBC;
- 2) Determinar si el patrón filogeográfico de la especie, se relaciona con los eventos históricos, mediante el análisis de las estimaciones de tiempos de divergencia derivados de las relaciones filogenéticas a nivel intra e interespecífico;

- 3) Obtener marcadores especie-específicos para *H. xantusii* con resolución espacial y temporal más fina, mediante la técnica de pirosecuenciación (secuenciación masiva de segunda generación);
- 4) Caracterizar los *loci* microsatélite polimórficos diseñados *de novo*, para identificar niveles de variación geográfica intraespecífica del colibrí de Xantus;
- 5) Obtener información de datos de ocurrencia de la especie, así como de las variables climáticas y ambientales del intervalo de distribución de la especie, para realizar la MNE;
- 6) Mediante la MNE y las proyecciones al pasado (último interglacial, último máximo glacial, Holoceno), determinar las áreas con condiciones climáticas óptimas (zonas de refugio) para el mantenimiento de las poblaciones del colibrí endémico del PBC, en distintos periodos de tiempo;
- 7) Contrastar los resultados de la MNE con la información obtenida sobre los patrones de distribución geográfica de la variación genética del colibrí de Xantus;
- 8) Cuantificar la variación morfológica entre las localidades muestreadas del colibrí de Xantus, e identificar que rasgos morfológicos tienen una contribución significativa al dimorfismo sexual;
- 9) Determinar si existen diferencias en el patrón morfológico entre las localidades de la especie a lo largo del gradiente de la heterogeneidad ambiental, promoviendo niveles de diferenciación intraespecífica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

El colibrí de Xantus al ser endémico de la parte central y sur de la PBC, la obtención de muestras a lo largo de su intervalo de distribución, permitirá palear hipótesis sobre patrón filogeográfico de la especie, asociado a tres eventos vicariantes (Figura 9). Mediante el uso de redes de niebla, se colectaron muestras de de sangre y plumas en un total de 154 individuos georreferenciados, distribuidos en 17 localidades de muestreo (Figura 9). Adicionalmente, se tomaron medidas de seis rasgos morfológicos (largo total, largo de cola, cuerda alar, nostril, culmen y ancho del pico), y se identificó el sexo de los individuos adultos en base al dimorfismo sexual de la especie (ver Anexo 1).

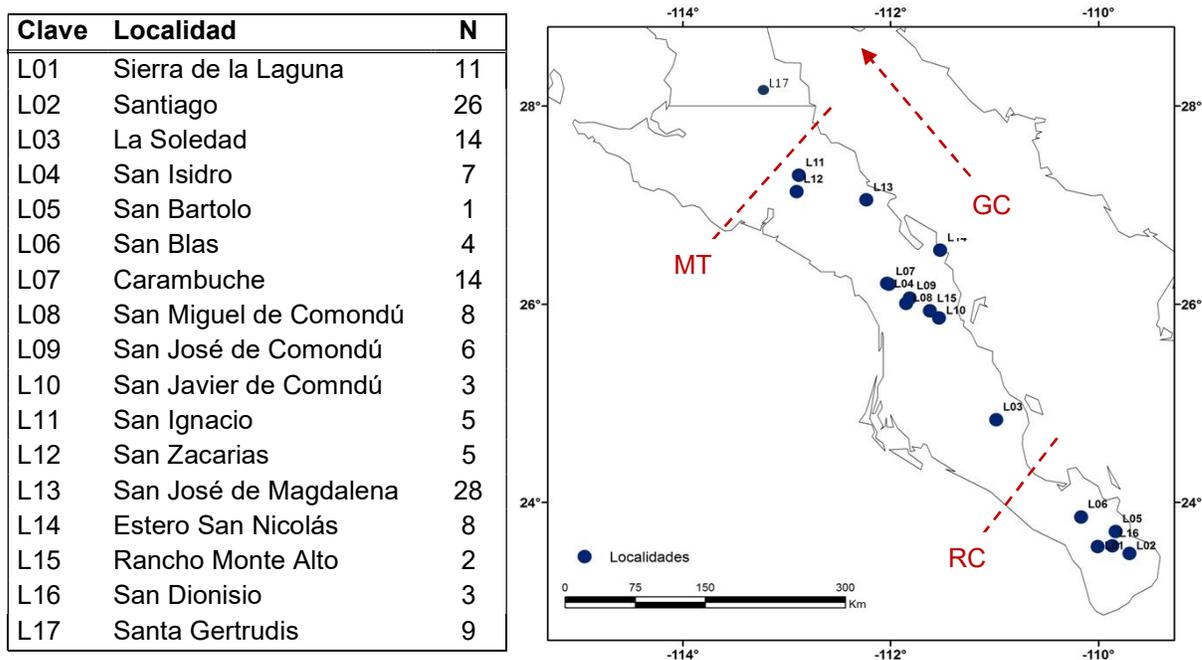


Figura 9. Localidades de muestro para el colibrí de Xantus, endémico de la Península de Baja California. GC) evento vicariante de formación del Golfo de California, RC) región del Cabo separado por el Istmo de La Paz, MT) canal marino medio trans-peninsular.

Adicionalmente, para determinar el efecto de los eventos vicariantes históricos y establecer los tiempos de divergencia y diversificación intraespecífica de *H. xantusii*, se seleccionaron individuos de cinco especies de colibríes relacionados filogenéticamente (McGuire *et al.*, 2007; 2014; Hernández-Baños *et al.*, 2014). La selección de especies, fue en base a los siguientes criterios:

- 1) *Hylocharis leucotis* es la única especie hermana de *H. xantusii*;
- 2) *Cyananthus latirostris* que se co-distribuye con *H. leucotis*;
- 3) *Calypte costae* es la única especie co-distribuida con *H. xantusii*;
- 4) *Amazilia versicolor* pertenece a uno de los géneros que se encuentra filogenéticamente más cercano a las especies de *Hylocharis*;
- 5) *Archilochus colubris* pertenece a uno de los géneros cercanamente emparentados con especies de *Calypte*.

Para las primeras tres especies, se colectaron muestras en campo (ver secciones posteriores); las últimas dos especies fueron utilizadas además, como genomas de referencia para delinear las secuencias mitocondriales que fueron generadas en este trabajo; número de acceso al GenBank al genoma completo KF624601 y EF532935 respectivamente.

6.2. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL

Para la extracción de ADN total a partir de sangre y plumas, se empleó el protocolo de sales propuesto por Aljanabi y Martínez (1997). La calidad de ADN se valoró mediante geles de agarosa al 2%, y la concentración (ng/μl) mediante un nanodrop Eppendorf. El ADN concentrado se almacenó en tubos de 1.5 ml a -20°C, etiquetados y depositados en la colección de ADN del Laboratorio de Genética para la Conservación del CIBNOR. Posteriormente, se prepararon diluciones de trabajo con agua milliQ (Millipore, Billerica, MA, EUA) a una concentración de 40 ng/μl.

6.3 MARCADORES MOLECULARES

6.3.1. ADN Mitocondrial

Los marcadores moleculares neutrales, como el ADN Mitocondrial (ADNmit), sin recombinación y de herencia materna, han sido usados para estimar la cantidad de variación genética presente en los individuos, y comprender la dinámica poblacional de diversas especies de vertebrados silvestres (ver Milá *et al.*, 2000; Avise *et al.*, 2002; Zink, 2002). En particular, ciertos genes del genoma mitocondrial, como el citocromo b (Cyt-b, componente fundamental de la cadena respiratoria), y el citocromo c oxidasa subunidad I (COI, componente en el transporte de electrones), tienen regiones conservadas que permiten amplificar esos genes en un gran número de especies. Por su parte, el gen NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2; componente del complejo de la cadena transportadora de electrones), tiene una elevada tasa de sustitución, comparada con otras regiones del genoma mitocondrial, y se ha observado que presenta variación a nivel intraespecífico.

Para el análisis de estos fragmentos de ADNmit, se utilizaron los siguientes cebadores: para el gen ND2 se utilizaron los cebadores H6313 y L5219 (Sorenson *et al.*, 1999); el gen COI se amplificó con los cebadores H8191 y L7165 (De Filippis y Moore, 2000); mientras que el Cyt-b fue amplificado mediante el uso de H16065 y L14841 (Kocher *et al.*, 1989). Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen final de 14 μ L, conteniendo alrededor de 40 ng de ADN, buffer de PCR al 1X (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl a pH 8.4), 0.2 mM de cada dNTP, 0.4 μ M de cada cebador, 2.0 μ M de cloruro de magnesio (MgCl₂), y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los perfiles de temperatura incluyeron un periodo de desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 min, y 30 s a 55 °C (temperatura de alineamiento), y una extensión final a 72 °C por 5 min.

Las secuencias fueron obtenidas mediante el servicio de secuenciación de Genewiz (Plainfield, NJ; <http://www.genewiz.com/>), y MacroGen (Seoul, South Korea; <http://www.macrogen.com/eng/>). Las secuencias fueron editadas con el programa ChromasPro 1.7.6, y alineadas con MUSCLE en el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Adicionalmente las secuencias fueron revisadas manualmente con el programa UltraEdit Professional 14.20.1. Todas las secuencias fueron depositadas en la base de datos del GenBank.

6.3.2. Diseño de *loci* microsatélite

Los microsatélites, son secuencias repetidas en tándem de 1 a 6 pb. Generalmente se encuentran en regiones no codificantes del ADN, son neutrales, co-dominantes, y de herencia biparental que gracias a su relativamente alta tasa mutacional (10^{-3} y 10^{-6} mutaciones / *locus* / generación; Schlötterer, 2000) resultan en altos niveles de polimorfismo que provee de resolución estadística a niveles intraespecíficos. Ésta última característica, permite a los *loci* microsatélite, cuantificar los patrones que no son aparentes con marcadores menos variables, y además, permite realizar estudios de diversidad genética en una escala espacial y temporal más fina, comparada con genes del ADNmit (Hedrick, 2004).

Para la obtención de *loci* microsatélites específicos para *H. xantusii*, se utilizaron 50 ng de ADN libre de ARN de una muestra de colibrí correspondiente a la localidad de Santiago (Figura 9), para determinar secuencias de regiones no aleatorias del genoma total por pirosecuenciación 454-Roche con la química GS-FLX Titanium del Centro de Secuenciación de la Universidad de California en Santa Cruz. La corrida fue realizada bajo las condiciones recomendadas por el prestador de servicios.

Todas las lecturas 454 fueron convertidas para el diseño de cebadores siguiendo las metodologías de Abdelkrim et al., (2009), y Lozano-Garza et al., (2015). En corto, los flujogramas fueron convertidas a formato fasta para la lectura de todas secuencias; posteriormente el programa Msatcommander (Faircloth, 2008) fue utilizado para identificar secuencias con microsatélites perfectos con unidades repetidas de 2-6 pb, y que tuvieran al menos cinco repeticiones para tetranucleótidos. A partir de este conjunto de *loci* potenciales, los cebadores fueron diseñados utilizando el programa Primer3 en QDD (Megléczy et al., 2010), utilizando las siguientes especificaciones: 1) temperatura de alineamiento entre 50-70°C con un máximo de 2°C de diferencia entre cada par de cebadores, 2) productos de PCR entre 90 y 320 pb de longitud, 3) contenido de GC > 40%, 4) longitud de cebadores entre 17 y 27 nucleótidos, y 5) parámetros por defecto para la auto-complementariedad de los cebadores y complementariedad entre ellos. Se mandaron sintetizar a Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA) 55 cebadores (Anexo 2) que cumplieron con los parámetros de calidad. Los nombres fueron asignados según las iniciales de la especie como “Hxan”.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total fue de 10 µL, con aproximadamente 40 ng de ADN, 1X de Buffer para PCR Invitrogen (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.3 mM de cada dNTP, 0.2 µM de cada iniciador, entre 0.3 y 0.4 Unidades de Taq Polimerasa (Invitrogen), y un gradiente de concentración de MgCl₂ entre 1.5-2.5 mM. Los perfiles de temperatura fueron: un periodo de desnaturalización a 95°C por 5 min, 35 ciclos de 94°C por 1 min, y 45 s en el gradiente de temperatura de alineamiento (entre 60 y 70 °C según el locus), con una extensión final de 20 min a 72°C para minimizar la presencia de picos +A/-A.

6.3.3. Pruebas de polimorfismo y genotificación de *loci* microsatélite

Las pruebas de estandarización y la identificación de *loci* polimórficos, se realizaron electroforesis desnaturizantes en geles de acrilamida al 6% y Urea 7.5 M, a 1700 V, 40 mA y 45 W por 100-120 min, para posteriormente ser visualizados por tinción de plata (Bassam y Caetano-Anollés, 1993). Las tallas alélicas fueron determinadas en comparación con el estándar de talla molecular 10 pb ladder (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) con el programa Gel Analyzer (www.sequentix.de), una vez que los geles fueron digitalizados. Según la facilidad de determinación de las bandas correspondientes al producto blanco de cada reacción, se eligieron las condiciones óptimas para continuar con las pruebas de polimorfismo. Para identificar el polimorfismo alélico de los *loci* microsatélite que se logró determinar las condiciones óptimas de PCR, se seleccionaron 10 individuos para amplificar los *loci*.

Una vez determinados los *loci* polimórficos, se mandaron marcar los cebadores *forward* de los *loci* tetranucleótidos (ver sección de resultados), para realizar la lectura de los tamaños alélicos mediante electroforesis en capilar automatizada, en el secuenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se utilizó un arreglo de capilares de 50 cm, polímero POP-7™, marcador molecular GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, California, EUA), y un tiempo de inyección de ocho milisegundos. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 8.5 µL de Hi-Di Formamida, 0.5 µL de marcador molecular 600 LIZ®, y un µL de producto de PCR.

Se realizaron pruebas con diferente factor de dilución de productos de PCR (1:3, 1:5, 1:10, 1:20), a partir de las que se determinó que un factor de 1:10 es el más adecuado, ya que se podían leer los tamaños de los fragmentos sin producir una saturación del laser. El análisis de fragmentos se llevó a cabo en el Roy J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois, con un secuenciador

ABI 3730xl (Applied Biosystems) de 96 capilares. Una vez obtenidos los electroferogramas se realizó la genotipificación utilizando el software de análisis de fragmentos GeneMapper Versión 5.0 (Applied Biosystems). Únicamente se utilizaron los picos con una intensidad mayor a 100 unidades de fluorescencia relativa (RFU por sus siglas en inglés). Durante la genotipificación, los individuos fueron considerados como heterocigotos siempre y cuando el pico de mayor tamaño fuera al menos un 25% más grande respecto al pico menor.

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.4.1. PATRÓN FILOGEOGRÁFICO

Para determinar si existe un patrón filogeográfico para el colibrí de Xantus, se describió la diversidad genética de las secuencias mitocondriales, y se realizaron análisis filogenéticos, análisis Bayesianos de la estructura poblacional, así como análisis de la distribución espacial de la varianza molecular.

6.4.1.1. Estimación de la diversidad genética

Para describir la variación genética a nivel intraespecífico, se estimó la diversidad nucleotídica y haplotídica, número de sitios segregantes, y el número de haplotipos, utilizando el programa DnaSP 5 (Librado y Rozas, 2009). Todos los análisis genéticos con ADNmit, fueron realizados con las secuencias concatenadas de los genes mitocondriales (Cyt-b, COI, ND2).

6.4.1.2. Reconstrucciones filogenéticas

Una vez concatenadas las secuencias en un solo alineamiento para cada individuo, se realizaron dos análisis filogenéticos. En primer lugar, un análisis filogenético de máxima verosimilitud fue llevado a cabo en el programa Garli 2.0

(Zwickl, 2011) para obtener los valores de bootstrap de soporte estadístico de los nodos. Los árboles individuales resueltos fueron seleccionados después 10,000,000 generaciones, y cuando el valor de verosimilitud total fue de 0.05. Se realizaron 1,000 repeticiones de bootstrap, cada uno con dos cadenas independientes. En segundo lugar, se utilizó la inferencia Bayesiana para obtener la reconstrucción filogenética y los valores de probabilidad *a posteriori* utilizando el programa MrBayes 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Se utilizaron dos corridas paralelas, una cadena "fría" y tres cadenas "calientes" para 20,000,000 generaciones, muestreando cada 10,000 generaciones, hasta que la desviación estándar de frecuencias fuera menor a 0.01. Los datos fueron particionados por genes mitocondriales y analizados bajo el modelo de mejor ajuste, utilizando el criterio de información de Akaike corregido en el programa jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012). Se utilizó un periodo de calentamiento del 25%, y se calculó un árbol consenso de mayoría. En cada análisis filogenético, se incluyeron secuencias concatenadas (Cyt-b, COI, ND2) de cinco especies como grupo externo: *Hylocharis leucotis* (siete haplotipos, este estudio), *Cynanthus latirostris* (un haplotipo, este estudio), *Amazilia versicolor* (un haplotipo, número de acceso KF624601), *Calypte costae* (cinco haplotipos, este estudio), y *Archilochus colubris* (un haplotipo, número de acceso EF532935).

6.4.1.3. Análisis Bayesiano de la estructura poblacional (BAPS)

En ausencia de criterios geográficos para delinear las poblaciones, se utilizó el programa BAPS 6 (Cheng *et al.*, 2013; Willems *et al.*, 2012). BAPS permite la agrupación jerárquica de los datos de secuencias de ADN (hierBAPS), el cual proporciona una mayor resolución de la estimación de la estructura genética de la población. El análisis de agrupamiento se realizó con L niveles en la jerarquía, y maxK como el límite superior del número de agrupaciones. Se utilizó L = 2, bajo la hipótesis vicariante del aislamiento de la región del Cabo, separando el sur del resto de la localidades. L = 3, en el supuesto de dos eventos vicariantes, región

del Cabo y camino medio trans-peninsular, separando el sur, centro y norte de la distribución del colibrí de Xantus. $L = 11$, suponiendo que cada oasis soporta un linaje filogeográfico (once en total). Estos oasis son: Santa Gertrudis, San Ignacio (incluyendo San Ignacio y San Zacarías), San José de Magdalena, San Nicolás, La Purísima (incluyendo Carambucho y San Isidro), Los Comondús (incluyendo San José y San Miguel), San Javier, La Soledad, San Blas, Sierra de la Laguna, y Santiago. En todos los análisis de agrupamiento, se utilizó $\text{maxK} = 17$, suponiendo que todos los sitios de muestreo alcanzaron el límite superior para el número de poblaciones. Por último, se utilizó la herramienta drawSnpMat en hierBAPS para visualizar la variación genética dentro y entre las poblaciones inferidas.

6.4.1.4. Análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA)

Se utilizó el programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002), y las distancias K2P para detectar las principales discontinuidades genéticas entre los sitios de muestreo, y de manera explícita probar la estructura filogeográfica en *H. xantusii*. Este método maximiza la proporción de la variación genética de las diferencias entre un número de grupos (K) definido por el usuario, y la asignación de localidades a poblaciones, en el supuesto de que deben ser geográficamente adyacentes y genéticamente homogéneos (Dupanloup *et al.*, 2002). Se utilizaron diferentes valores de K para encontrar el K óptimo, con los valores más altos y significativos de F_{CT} (i.e. variación genética debido a las divergencias entre los grupos). Se establecieron las hipótesis propuestas para el análisis de BAPS: $K = 2$ (evento vicariante de separación de la región del Cabo), $K = 3$ (dos eventos vicariantes separando tres regiones geográficas, sur, centro y norte); y $K = 11$ (oasis muestreados para *H. xantusii*). Para verificar la consistencia del K óptimo, se realizó el análisis cinco veces para cada valor de K, con 1000 permutaciones para la significancia estadística.

6.4.2. EVENTOS HISTÓRICOS

Para determinar si el patrón filogeográfico del colibrí de Xantus está relacionado a los eventos vicariantes propuestos durante la formación de la PBC, se realizaron estimaciones de tiempos de divergencia para establecer el marco temporal de diferenciación genética, así como la historia demográfica del colibrí endémico.

6.4.2.1. Estimaciones de tiempos de divergencia

Las estimaciones de los tiempos de divergencia del colibrí de Xantus, mediante las relaciones filogenéticas de las especies utilizadas en este trabajo, se empleó el programa BEAST 1.8 (Drummond *et al.*, 2012), estableciendo tres puntos de calibración derivados del registro fósil y de eventos biogeográficos históricos: 1) punto de calibración ancestral, establecido en 12 millones de años (m.a.), fecha calibrada con registro fósil (ver Bleiweiss, 1998); 2) fecha aproximada de formación de los principales arcos volcánicos, Sierra Madre Occidental y cinturón volcánico Trans-Mexicano, hace 10 m.a. (Ferrari *et al.*, 2000), evento que separa a las especies de colibríes del Norte de Mesoamérica, respecto a las especies del centro y Norteamérica; y 3) evento geológico que separa a las especies peninsulares del macizo continental, con la separación y formación de la Península de Baja California (5.5 m.a.; Riddle *et al.*, 2000).

Para calibrar la tasa de sustitución de los linajes intraespecíficos de *H. xantusii*, se utilizó 2.07×10^{-8} sustituciones / sitio / año para el Cyt-b; $1,6 \times 10^{-8}$ sustituciones / sitio / año para COI, y el $2,9 \times 10^{-8}$ sustituciones / sitio / año para ND2, de acuerdo con las tasas reportadas previamente para esos genes en especies de aves (Weir y Schluter, 2008; Qu y Lei, 2009; Sly *et al.*, 2011; Arbeláez-Cortés *et al.*, 2014; Licona-Vera y Ornelas, 2014). Los análisis se realizaron durante 1×10^8 generaciones, muestreando cada 10,000 iteraciones,

utilizando como valores “prior” un árbol de especiación de “Yule”, un árbol inicial de UPGMA, y un reloj molecular no correlacionado relajado logarítmico normal (Drummond y Rambaut, 2007). Posterior al análisis, se utilizó el programa TreeAnnotator 1.7.4 (Rambaut y Drummond, 2012) para generar un archivo “tree” con los datos compilados, tras un periodo de calentamiento del 25%, y un valor de probabilidad *a posteriori* de 0.5. Para evaluar la convergencia de las cadenas, y determinar que la muestra de la distribución *a posteriori* de las probabilidades ha alcanzado un tamaño de muestra efectivo suficientemente (ESS, por sus siglas en ingles), y por lo tanto estacionalidad, se utilizó el programa Tracer 1.6 (Rambaut y Drummond, 2009).

6.4.2.2. Historia demográfica

Para evaluar la demografía histórica del colibrí del Xantus, los haplotipos fueron separados en las poblaciones resultantes de los análisis de BAPS y SAMOVA. Cada población se analizó de forma independiente. Se buscaron evidencias de crecimiento poblacional (expansión) en cada población mediante el análisis de la distribución de diferencias pareadas (Mismatch distribution) utilizando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Las distribuciones de diferencias pareadas, son por lo general caóticas o desordenadas en poblaciones en equilibrio demográfico, pero unimodales en las poblaciones que han experimentado una expansión reciente (Rogers y Harpending, 1992). Se estimó el índice de “rugosidad” (Harpending, 1994), el cual muestra valores grandes en poblaciones relativamente estables, y exhibe una distribución multimodal. La bondad de ajuste del modelo de expansión espacial se evaluó calculando la significancia estadística del índice de rugosidad, a partir de 1000 simulaciones para estimar la probabilidad de obtener un índice menor que el valor observado (Harpending, 1994).

Adicionalmente, se obtuvo evidencia para la expansión poblacional mediante pruebas de neutralidad del estadístico D (Tajima, 1989), con valores positivos significativos correspondientes a poblaciones que han pasado por un reciente cuello de botella, mientras que valores negativos significativos pertenecientes a poblaciones que han pasado en la historia recientemente por un proceso de expansión. Eventos de expansión poblacional, también fueron analizados mediante el estadístico F_s (Fu, 1997). Un número negativo de F_s es evidencia de un número excesivo de variantes genéticas, como se esperaría en una población que ha pasado por un proceso de expansión reciente, mientras que un número positivo de F_s es evidencia de una deficiencia de variantes genéticas, como se esperaría en una población que ha pasado por un cuello de botella reciente, o en población estructuradas (Fu, 1997). Todos los análisis se realizaron en el programa Arlequin 3.5.

Por último, se analizó la distribución espacial entre los haplotipos muestreados, mediante la reconstrucción de una red de mínima separación (Bandelt *et al.*, 1999). Para este análisis se utilizó el programa Network 4.6.1.2 (<http://www.fluxus-engineering.com/>).

6.4.2.3. Dinámica poblacional a través del tiempo

Se examinó la dinámica poblacional ancestral del colibrí de Xantus, basados en el proceso coalescente, utilizando el enfoque bayesiano extendido de líneas en el cielo (“Bayesian skyline plot”, EBSP por sus siglas en inglés; Heled y Drummond, 2008), implementado en el programa BEAST. Los gráficos resultantes son modelos constantes de tamaño poblacional que se ajustan a una amplia gama de escenarios demográficos. Estos análisis han demostrado ser muy útiles como herramientas de selección del modelo demográfico más adecuado para un conjunto de datos. El modelo de EBSP utiliza procedimientos de muestreo de la cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC) para estimar la distribución a

posteriori del tamaño efectivo de la población a través del tiempo, a partir de una muestra de secuencias de genes, dado cualquier modelo de sustitución de nucleótidos. Este método incluye intervalos de confianza para las estimaciones del tamaño efectivo poblacional cada punto en el tiempo, hacia el ancestro común más reciente de las secuencias de genes analizadas (Drummond *et al.*, 2005). Los análisis se realizaron utilizando un reloj molecular estricto, un modelo de sustitución HKY + G + I, y árboles no ligados a través de todos los genes del ADNmit. El análisis se realizó tres veces, utilizando tres tasas de mutación (1.6%, 2.1% y 2.9% por sitio por m.a. para COI, Cyt-b y ND2 respectivamente, por 30 millones de iteraciones. Convergencia, estacionalidad, tamaño efectivo para cada parámetro en el análisis, así como un apropiado periodo de calentamiento, fueron evaluados utilizando el programa Tracer.

6.4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS *LOC*/MICROSATÉLITE

Para que los diferentes análisis llevados a cabo otorguen resultados robustos, es deseable que los marcadores microsatélite a utilizar cumplan con una serie de requisitos para garantizar que aportan información independiente entre sí, que sean selectivamente neutros, se hereden de manera mendeliana o exista una baja frecuencia de alelos nulos (Selkoe y Toonen, 2006). Para verificar la óptima calidad y utilidad de los marcadores se realizaron diferentes análisis descritos a continuación.

6.4.3.1. Calidad y utilidad de los *loci* microsatélite

Una vez obtenidos los *loci* polimórficos, se verificó la calidad de los microsatélites:

- a) Alelos nulos: los alelos nulos hacen referencia a aquellos que si bien están presentes, no logran amplificarse mediante PCR por problemas técnicos, ya

sea por factores intrínsecos a la reacción o bien por mutaciones sitio-específicas en la región de alineamiento de los iniciadores (Shaw *et al.*, 1999). El resultado directo de esto es que los heterocigotos que poseen dicho alelo nulo, sean genotipificados como homocigotos produciendo una consecuente subestimación de la heterocigosidad, con posibles efectos sobre los análisis genéticos (Carlsson, 2008). La presencia y frecuencia de alelos nulos fue verificada utilizando el programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2008); según estos autores, la proporción de alelos nulos se puede catalogar como bajo (<0.05), moderada ($0.05-0.20$) o alta (>0.20);

- b) Desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW): el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg establece la constancia de las frecuencias alélicas en una población, en la cual deben existir ciertas condiciones, como la diploidía, reproducción del tipo sexual y al azar, tamaño poblacional idealmente infinito, y ausencia de mutación y selección natural sobre el locus en cuestión. Bajo dichas condiciones, es posible predecir las frecuencias alélicas de las distintas generaciones a partir de la anterior, las cuales se mantendrán constantes en caso de que persistan los supuestos. Para evaluar desviaciones al equilibrio de HW, se calculó la probabilidad de que los valores de heterocigosidad observadas sean significativamente diferentes a los esperados bajo el modelo de equilibrio. Para ello se implementó una prueba exacta de Fisher en el programa GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) utilizando cadenas de Markov con parámetros por defecto y 10,000 permutaciones para calcular la significancia estadística.
- c) Desequilibrio de ligamiento: el supuesto de segregación independiente entre todos los pares de *loci* fue puesto a prueba utilizando el programa GENEPOP v4.0 (Rousset, 2008), aplicando una prueba exacta de Fisher bajo la hipótesis nula de independencia entre locus (MCMC: 10,000 dememorizaciones, 100 lotes, 10,000 iteraciones por lote).

Para analizar la potencial utilidad de los *loci* microsatélites aislados *de novo* para *H. xantusii*, se determinó la efectividad por amplificación cruzada entre las especies de colibríes relacionadas al colibrí de Xantus (Figura 8). La diversidad genética fue evaluada por locus para cada especie. Como parámetros de diversidad se estimó el número de alelos por locus (N_a), la heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e), desviaciones al equilibrio de HW, y desequilibrio de ligamiento.

6.4.4. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

6.4.4.1. Análisis de agrupación Bayesiana

De manera preliminar, se realizó un análisis de agrupación bayesiana implementado en el programa STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000, Falush *et al.*, 2003), para inferir la estructuración poblacional y el número más probable de poblaciones para el colibrí endémico de la PBC. Este método asigna los individuos (probabilísticamente) a diferentes grupos sin necesidad de conocer a priori las unidades y/o límites poblacionales, mediante un índice de membresía buscando la maximización del equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento gamético dentro de los grupos.

Para el cálculo se utilizan iteraciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), cuya longitud en el presente trabajo se fijó en 1,000,000, con un período de precalentamiento de 100,000. Se asumió un modelo de mezcla y de frecuencias alélicas correlacionadas. El método asume un modelo con K grupos, cada una de las cuales está caracterizada por unas frecuencias alélicas en cada locus. El intervalo de posibles grupos (K) analizados fue de entre uno a 17 (número de sitios de muestreo más tres, según Evanno *et al.*, 2005), y para cada K se repitió el análisis 10 veces para verificar la consistencia de los resultados. Posteriormente se evaluó la probabilidad acumulada y la probabilidad posterior

para cada valor de K, introduciendo los resultados de la simulación al servicio en línea STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012), que permite detectar el número de grupos para datos simulados, usando el estadístico ΔK de Evanno (Evanno *et al.*, 2005).

Una vez asignados los individuos al grupo para el que se tuvo un mayor índice de membresía, se realizó una alineación de los diferentes resultados obtenidos en cada una de las 10 réplicas mediante el software CLUMMP V 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007). Finalmente, se generó un gráfico que recoge la información de las 10 repeticiones para el valor de K más probable utilizando el software DISTRUCT V 1.1 (Rosenberg, 2004).

6.4.5. MODELACIÓN DE NICHO ECOLÓGICO

Para realizar las proyecciones hacia el pasado y modelar el potencial nicho ecológico, así como la distribución del colibrí de Xantus, se bajaron las capas bioclimáticas (método MIROC-ESM; Hijmans *et al.*, 2005) disponibles en la base de datos del “Worldclim” (<http://www.worldclim.org/>), del último inter-glacial (hace 140,000 a 120,000 años), del último máximo glacial (hace aproximadamente 22,000 años), del holoceno medio (últimos 6,000 años), y del presente (de 1950 al 2000). Así mismo, se incluyeron los registros de observaciones para esta especie de la base de datos del “GBIF” (<http://www.gbif.org/species>), y en conjunto con las localidades georeferenciadas de este trabajo, se realizaron las intersecciones de cada una de las capas al polígono de distribución potencial de esta especie, utilizando el programa ArcGis 10.1.

Existen distintos métodos para realizar la modelación de nicho, de los cuales el más empleado es el algoritmo de máxima entropía o MAXENT, debido a varias ventajas: 1) solo requiere datos de presencia, 2) permite el empleo de variables continuas categóricas, y 3) emplea un algoritmo que permite obtener la

distribución más probable (máxima entropía; Phillips *et al.*, 2006). Este método determina la distribución de las variables ambientales para el área de estudio, así como para los registros de presencia; el modelo resultante permite identificar distintos grados de ambientes óptimos para la presencia de la especie, y además presenta un modelo binario de presencia y ausencia para determinar el intervalo de distribución potencial de la especie (Phillips *et al.*, 2006).

6.4.6. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA

Para determinar si existen diferencias en los rasgos morfológicos entre las localidades de *H. xantusii*, se realizaron análisis exploratorios de agrupamiento para observar el nivel de similitud entre las variables morfológicas y entre las localidades; se utilizó una asociación promedio, una correlación de Pearson, y un nivel de similitud del 80%. Adicionalmente, se realizaron análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), con una correlación de Pearson y un eigenvalor >1 para los componentes significativos, con la finalidad de determinar si existe una asociación entre variables morfológicas y las localidades, observando una segregación espacial de localidades más cercanas. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico Minitab 15 (Minitab, Inc. Pennsylvania, EUA).

El error medio y la desviación estándar (SE) de los seis rasgos morfológicos, fueron calculados por localidad por sexo. Estos métodos fueron aplicados para mostrar las diferencias relacionadas al dimorfismo sexual y a las diferencias entre localidades. Tanto los valores crudos como los valores estandarizados, cumplieron los supuestos de homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene) y de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov). Las diferencias entre machos y hembras fueron determinadas utilizando una prueba t de Student, y las diferencias entre localidades utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. Una comparación post hoc de las medias fue probada

usando el LSD de Fisher cuando se encontró un efecto significativo. Correcciones de Bonferroni se aplicaron a todas las comparaciones. Estos análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistic 7 (StatSoft, Tulsa, OK).

7. RESULTADOS

Los resultados presentados a continuación, incluyen el análisis de datos obtenidos a partir de muestras de 100 individuos del colibrí de Xantus; la selección de muestras, fue realizada con base a la cantidad y concentración de ADN total disponible para los análisis genéticos.

7.1. PATRÓN FILOGEOGRÁFICO DEL COLIBRÍ DE XANTUS

7.1.1. Diversidad genética

Las secuencias mitocondriales obtenidas para los individuos del colibrí de Xantus fueron, 811 pb para Cyt-b, 804 pb para COI, y 682 pb para ND2, obteniendo un tamaño total para secuencias concatenadas de 2,297 pb. Los valores más bajos de diversidad se obtuvieron para el gen Cyt-b, con la observación de 11 haplotipos, diversidad haplotípica = 0.6851, diversidad nucleotídica = 0.0012, y número promedio de diferencias pareadas = 0.924. Los valores más altos de diversidad y número de haplotipos se observaron para el gen COI (0.8811 y 27, respectivamente), mientras que valores altos de diversidad nucleotídica y número promedio de diferencias pareadas, se presentaron en el gen ND2 (0.0097 y 4.107, respectivamente; Tabla I).

Para secuencias concatenadas, se identificaron 56 haplotipos únicos en 39 sitios polimórficos; la diversidad de haplotipos fue 0.9682, la diversidad de nucleótidos fue 0.0048, y el número promedio de diferencias pareadas fue de 6.529. La diversidad genética para cada población identificada mediante los análisis Bayesiano y de distribución espacial (ver más adelante) fueron similares, con la excepción de la población D, con valores bajos de diversidad de haplotipos (0.908), y número promedio de diferencias pareadas (6.12; Tabla I). Los niveles de

diversidad genética, fueron en general mayores en el colibrí Xantus, comparada con otras especies de aves incluyendo colibríes (Anexo 3).

Tabla I. Valores de diversidad genética y estadísticos demográficos para el colibrí endémico de la Península de Baja California, basados en el análisis de secuencias mitocondriales (Cyt-b, COI, ND2, secuencias concatenadas).

Grupos	n	S	H	<i>h</i>	π	No. de diferencias pareadas	Índice de Rugosidad	D'Tajima	Fu's <i>F_s</i>
Cyt-b (811bp)	100	8	11	0.6851	0.0012	0.924	0.1249ns	-1.0876ns	-6.197*
COI (804bp)	100	15	27	0.8811	0.0033	2.442	0.0242	-0.4396ns	-17.786**
ND2 (682 bp)	100	17	19	0.7846	0.0097	4.107	0.0439ns	0.709ns	-2.665*
Concatenated (2,297 pb)	100	39	56	0.9682	0.0048	6.529	0.0084ns	-0.2698ns	-45.004**
A	35	29	27	0.9802	0.0063	8.498	0.0109ns	0.3094ns	-7.417**
B	16	35	12	0.975	0.0093	12.542	0.0421ns	0.7884ns	-3.050*
C	13	25	12	0.9872	0.0033	7.051	0.0379ns	-0.5415ns	-4.928*
D	35	24	23	0.9077	0.0045	6.123	0.0366ns	-0.0964ns	-5.298*

ns = no significativo; ** P<0.001; * P<0.05; n = tamaño de muestra; S = sitios segregantes; H = número de haplotipos; *h* = diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica; A, B, C y D = poblaciones identificadas mediante el análisis de BAPS y SAMOVA.

7.1.2. Análisis filogenético

El modelo de evolución de ADN de mejor ajuste para las secuencias mitocondriales, fue el modelo de Tamura-Nei, que permite frecuencias de bases variables, tasas de transversion iguales, y tasas de transición variables (Tamura y Nei, 1993), con algunos sitios invariables y variables, con una distribución gamma con cuatro categorías (TRN + I + G).

Basado en el análisis de 56 haplotipos definidos por secuencias concatenadas, ambos métodos de análisis filogenéticos (máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana) resultaron en la misma topología, con valores similares y altos de soporte estadístico (Figura 11); un clado principal incluyó a las especies *Hylocharis xantusii*, *H. leucotis*, *Cynanthus latirostris*, y *Amazilia versicolor*, donde las especies de *Hylocharis* forman un clado monofilético, lo que confirma la monofilia recíproca entre estas dos especies. Todos los haplotipos de *H. xantusii*, se un clado independiente bien soportado (100%) por ambos métodos filogenéticos.

De los 56 haplotipos identificados para colibrí del Xantus, 13 fueron compartidas entre algunos sitios (ver localidades, Figura 11) donde nueve haplotipos (Hxan_01, 04, 05, 07, 45, 09, 16, 17, 03) son compartidos entre algunos sitios distantes con ubicaciones intermedias. Por ejemplo, el haplotipo Hxan_01 fue encontrado en San Blas y San Javier (340 km de distancia); haplotipos 04 y 05 se encontraron en Santiago y San Ignacio (a 700 km); el haplotipo 07 fue encontrado en Santa Gertrudis y La Soledad (600 km); mientras que el haplotipo 45 se encontró en Santa Gertrudis y Sierra de La Laguna (800 km); el haplotipo 09 se observó en Carambucho y San Dionisio (450 km); el haplotipo 16 en San Dionisio y San Nicolás (475 km), y además es uno de los haplotipos ancestrales; el haplotipo 17 en San Ignacio y San Isidro (220 km); y finalmente el haplotipo 03 en Santiago y San Isidro (485 km).

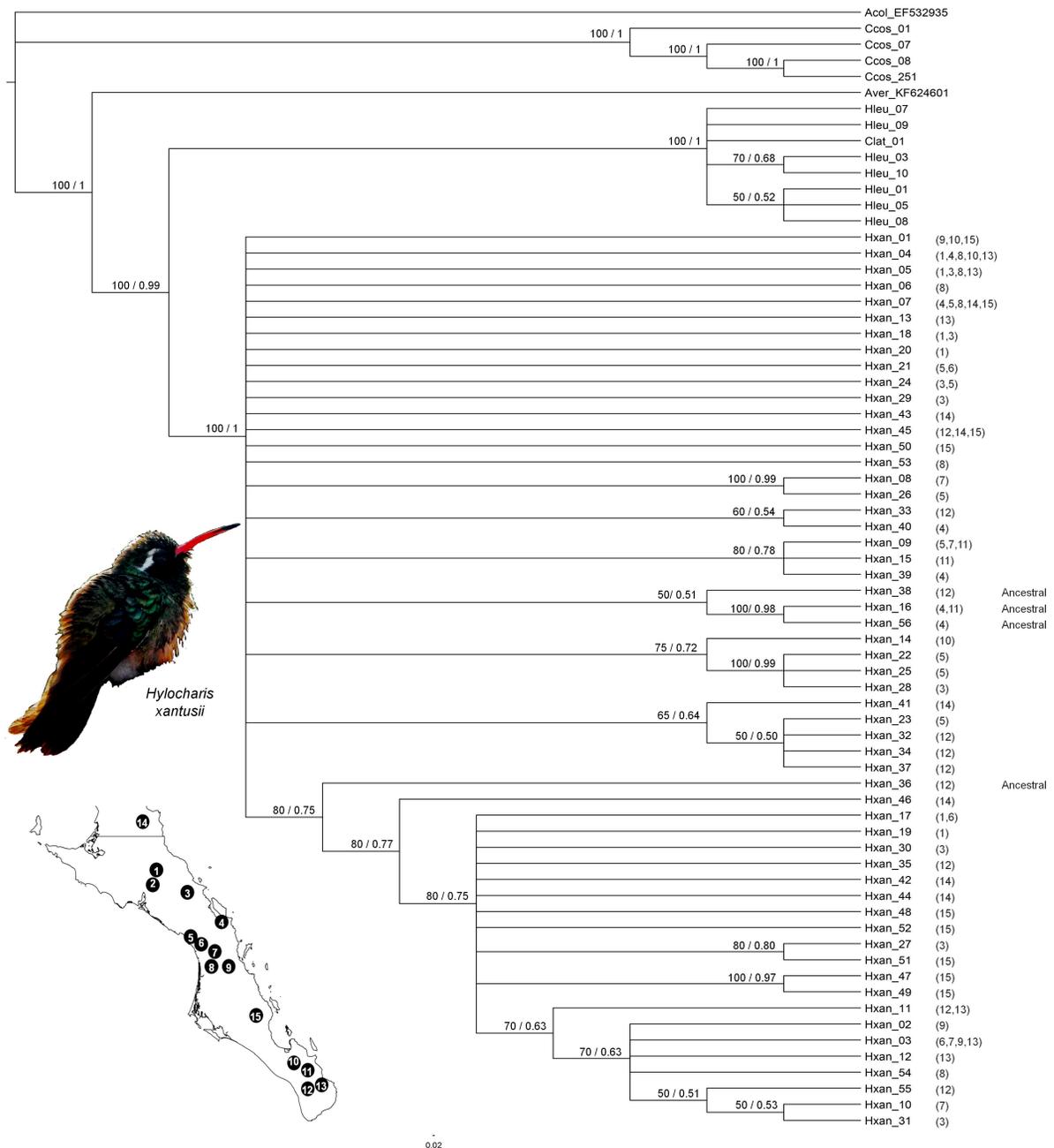


Figura 11. Reconstrucción filogenética para los 56 haplotipos del colibrí de Xantus (identificados como “Hxan”) basado en secuencias mitocondriales concatenadas (Cyt-b, COI, ND2), bajo el modelo de evolución de secuencias TrN + I + G. Número entre parentésis después de los haplotipos, indican la localidad donde los haplotipos se encuentran distribuidos (ver mapa en parte inferior izquierda). Se señalan los haplotipos ancestrales, identificados mediante las estimaciones de tiempos de divergencia. Se indican valores de soporte estadístico con base en los diferentes análisis: bootstrap de MV / probabilidad a posterior de IB.

7.1.3. Análisis espacial de la estructura genética (BAPS y SAMOVA)

La figura 12 muestra los resultados obtenidos al aplicar el modelo de análisis espacial de agrupamiento jerárquico BAPS, en las secuencias concatenadas de ADNmit del colibrí de Xantus. Cuatro agrupamientos genéticamente distintos fueron detectados, permitiendo definir cuatro poblaciones (A, B, C y D).

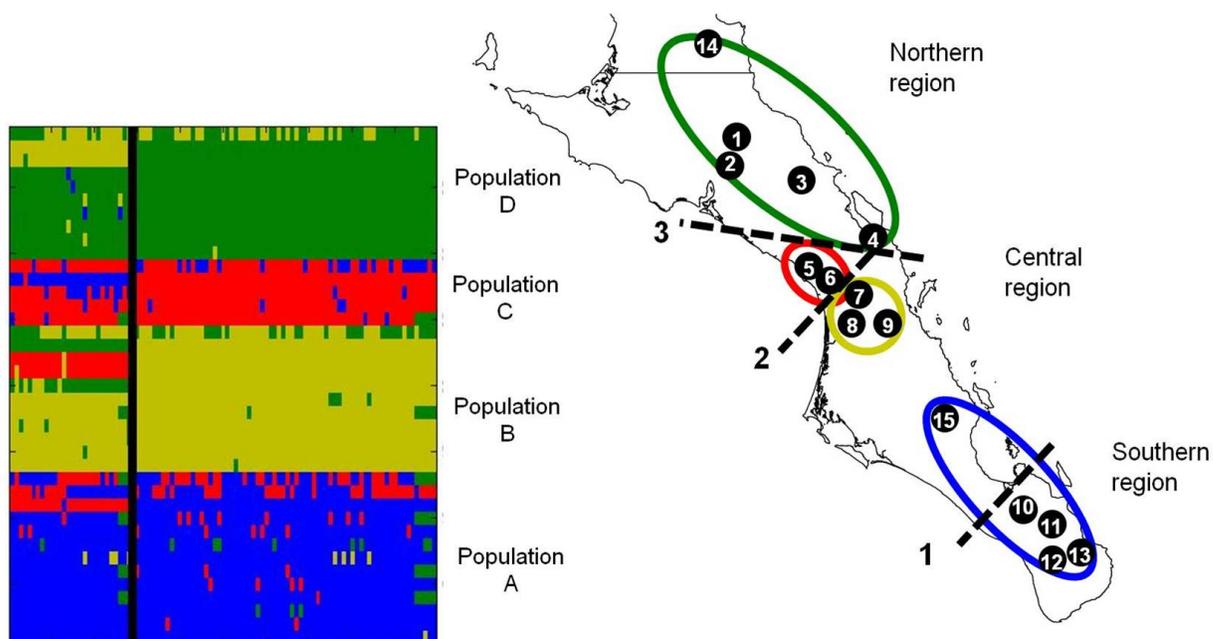


Figura 12. Agrupamientos jerárquicos identificados por BAPS (izquierda) y SAMOVA (derecha) para el colibrí de Xantus, usando secuencias concatenadas de ADNmit (Cyt-b, COI, ND2). Cuatro poblaciones son identificadas (A, B, C, D). Líneas negras punteadas en el mapa (señaladas 1 - 3), indican posibles quiebres filogeográficos entre las poblaciones identificadas.

De acuerdo con el número de poblaciones determinadas por BAPS, se incluyó en el análisis de SAMOVA $K = 4$; para los grupos K -definidos (Tabla II), el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de los sitios analizados para el colibrí Xantus; sin embargo, los índices de fijación no fueron significativos. La fuente de variación entre los grupos, revelaron diferencias significativas, con el porcentaje más alto en $K = 4$ (37%, $F_{CT} = 0.3702$, $p < 0,005$).

El SAMOVA identificar posibles barreras (discontinuidades genéticas) para establecer el patrón filogeográfico. Basado en este análisis, se establecieron tres barreras, separando en cuatro poblaciones genéticas, concordante con lo obtenido en el análisis de BAPS (Figura 12). La población A incluyó a todos los sitios (10-13) en la región del sur y la Soledad; la población B incluyó tres sitios (7-9), mientras que la población C incluyó dos sitios (5 y 6). Poblaciones B y C ocupan la región central de la distribución del colibrí de Xantus. Por otro lado, la población D incluyó a todos los sitios en la región del norte (1-4 y 14). En la región sur, se encuentra la primera barrera, y se relaciona con la separación del Cabo; los sitios en la región central están divididos por una segunda barrera que separaba la población B de la población C. Entre las regiones central y norte, una tercera barrera separa los oasis centrales que son la Purísima (incluyendo Carambucho y San Isidro; población C), y Los Comondús (San José y San Miguel) y San Javier (población B), de los oasis distribuidos en el norte (población D).

Tabla II. Resultado de los análisis de SAMOVA y porcentaje de variación dependiendo de los grupos K definidos.

Fuente de variación	K=2	K=3	K=4	K=11
	% variación (Índice fijación)	% variación (Índice fijación)	% variación (Índice fijación)	% variación (Índice fijación)
Among groups	33.96 (0.3396**)	36.47 (0.3646**)	37.02 (0.3702**)	33.25 (0.3324**)
Among populations within groups	-10.49 (-0.1691ns)	-15.34 (-0.2414ns)	-11.08 (-0.1759ns)	-26.15 (-0.3917ns)
Within populations	76.54 (0.2746ns)	78.87 (0.2113ns)	74.06 (0.2593ns)	92.90 (0.071ns)

ns = no significativo; **P<0.005

7.2. MARCO TEMPORAL DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Las estimaciones de los tiempos de divergencia, basados en secuencias concatenadas de ADNmit (2.297 pb en total), y utilizando los tres puntos de calibración (eventos geológicos y registro fósil), sugieren que *H. xantusii* se separaron de su especie hermana (*H. leucotis*) durante el Plioceno (3.6 m.a., Figura 13), después de la separación de la península del continente (alrededor de 5 m.a.). La estimación obtenida para *Calypte costae*, especie co-distribuida con *H. xantusii*, sugiere que la divergencia de la especie ocurrió hace 3.5 m.a., tiempo después de la separación de la península.

Para la diferenciación genética de haplotipos del colibrí de Xantus, el análisis de BEST sugiere que la separación entre los grupos de haplotipos ocurrió durante el Plioceno tardío y el Pleistoceno temprano (3-2 m.a., Figura 13). Sin embargo, para el 90% de los haplotipos, la divergencia comenzó en los últimos 500,000 años, y aproximadamente el 40% de los haplotipos tienen una divergencia menor a los 100,000 años.

Tres grupos principales coinciden con tres regiones geográficas para el colibrí de Xantus, con pocos haplotipos compartidos entre las poblaciones:

- a) La región del sur (población A): el tiempo al ancestro común más reciente (TMRCA) es de 2.14 m.a., la edad de uno de los haplotipos ancestrales que ocurre en la localidad de la Sierra de la Laguna. Los haplotipos más recientes, son alrededor de 16,200 años, y fueron encontrados en San Blas. Estos haplotipos recientes son compartidos con la población B. Los haplotipos de La Soledad (sitio ubicado por arriba del evento vicariante de separación de la región del Cabo), empezaron a divergir hace 402,000 años. La población del sur comenzó a divergir después de la formación del canal de agua que se formó en el Istmo de La Paz (3 m. a.).

- b) La región central: el TMRCA entre las poblaciones B y C es 922,000 años. El haplotipo más antiguo es de 780,000 años, y se encuentra en ambas poblaciones (localidades de San Miguel y San Isidro), pero además en la población D (San José de Magdalena). El segundo haplotipo más antiguo tiene 480,000 años y se encuentra en la localidad de San José (población B). El haplotipo más reciente cuenta con 85,000 años de antigüedad, y se encuentra en ambas poblaciones de la región central.
- c) La región norte (población D): contiene el haplotipo más ancestral de 2.5 m.a., que además es compartido con la localidad de la Sierra de La Laguna (región del sur). El segundo haplotipo ancestral tiene 2.06 m.a., y es encontrado en San Nicolás. Para el resto de los haplotipos en esta región, la TMRCA fue de 1.6 m.a. En esta región se encuentran haplotipos compartidos con las otras poblaciones, siendo los más recientes compartidos entre las poblaciones norte y sur (D y A respectivamente).

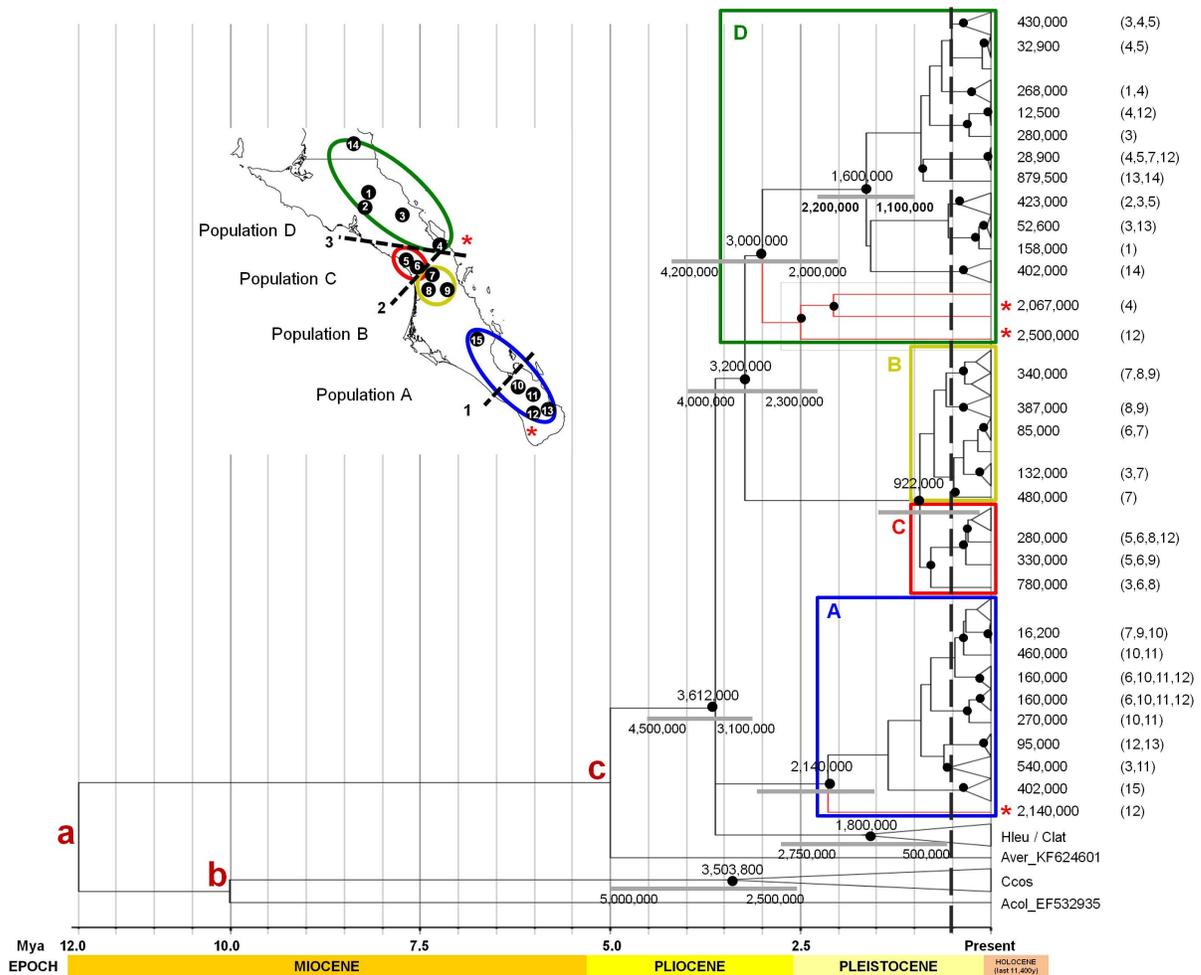


Figura 13. Estimaciones de tiempos de divergencia en años (intervalos de confianza al 95%) para las especies analizadas en este trabajo, basados en secuencias concatenadas de ADNmit (Cyt-b, COI, ND2), utilizando un reloj molecular log-normal no correlacionado relajado implementado en BEAST (Drummond *et al.* 2012). Puntos de calibración fueron: a) registro fósil (12 m.a., Bleiweiss 1998), b) formación de los arcos volcánicos (10 m.a., Ferrari *et al.* 2000), c) completa separación de la PBC (5 m.a., Riddle *et al.* 2000). El marco temporal de diferenciación genética para los haplotipos del colibrí de Xantus, se encuentran señalados en recuadros y corresponden a las poblaciones indicadas en el mapa: azul: población A, amarillo: población B, rojo: población C, y verde: población D. La línea gruesa negra punteada, indica el periodo de divergencia para la mayoría de los haplotipos (500,000 años). Haplotipos se muestran como clados terminales, y el tiempo al ancestro común más reciente se señala después de cada terminal. Entre paréntesis se señala la localidad a la que pertenecen los haplotipos. Asteriscos rojos indican los haplotipos ancestrales.

7.2.1. Historia demográfica

La distribución de Mismatch entre los haplotipos de secuencias concatenadas para cada población, comprende curvas bimodales marcadas (Figura 14), lo que contrasta con el patrón unimodal esperado en poblaciones que experimentaron expansión demográfica reciente. Los parámetros demográficos, como el índice de Rugosidad (Tabla 1) indican que la distribución observada no difiere significativamente de la distribución esperada bajo el modelo de expansión. Por otra parte, las pruebas de la neutralidad revelaron resultados diferentes: el estadístico D de Tajima no mostró desviaciones significativas de la neutralidad en todas las regiones (Tabla 1), lo que sugiere estabilidad demográfica; sin embargo, el estadístico F_S de Fu mostró diferencias significativas y negativas, lo que sugiere un exceso de haplotipos de baja frecuencia, que se esperaría si las poblaciones de *H. xantusii* experimentaran una expansión demográfica reciente.

La red de mínima separación de haplotipos mostraron patrones similares para todas las poblaciones (Figura 14), en los cuales los haplotipos se dividen en dos grupos distintos, que se diferencian por 6-9 pasos mutacionales. En estos grupos de haplotipos, se encuentran por lo general uno o dos haplotipos de mayor frecuencia, y el resto son haplotipos únicos o de baja frecuencia. Este patrón espacial de la red de haplotipos es coherente con la distribución bimodal de diferencias pareadas.

Los análisis de EBSP usando diferentes tasas de mutación, fueron similares entre sí, lo que sugiere un patrón consistente en la historia demográfica de las poblaciones del colibrí de Xantus. Las poblaciones A y D se encuentran bajo el escenario de una expansión reciente que comenzó hace 80,000 años. Por otro lado, las poblaciones B y C incrementaron en menor grado hace 1 m.a. Debido a que no es correcto interpretar de forma directa las fechas de los escenarios demográficos, solo podemos concluir que las poblaciones del colibrí de Xantus, se

encuentran en un escenario de expansión reciente, principalmente en las poblaciones extremas (población A y D), donde además, existe un mayor número de haplotipos únicos.

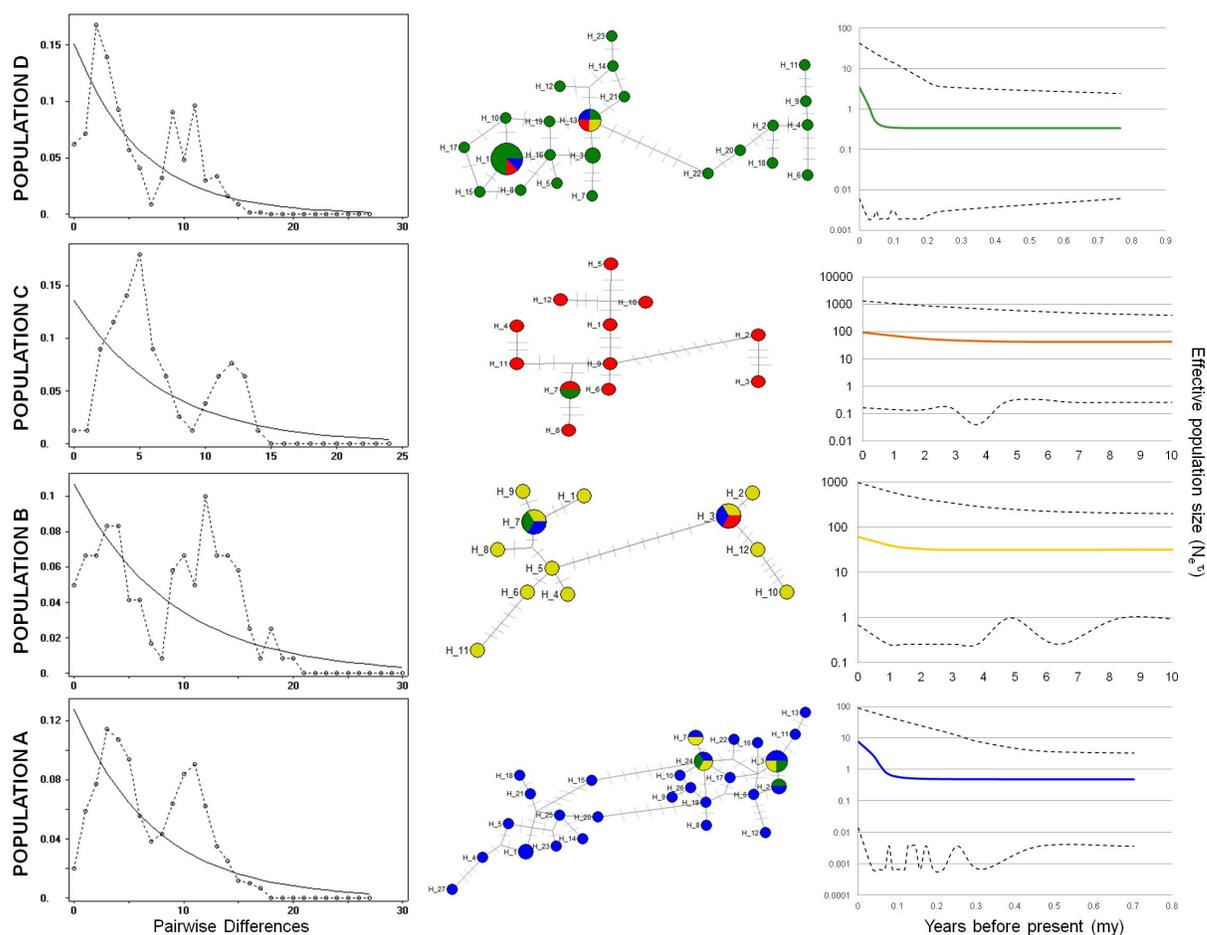


Figura 14. Distribución de diferencias pareadas (izquierda), Red de mínima separación (centro), y análisis Bayesiano de “skyline plots” (derecha; líneas punteadas indican intervalos de confianza al 95%), son generadas para cada una de las poblaciones del colibrí de Xantus, mediante el uso de secuencias concatenadas de ADNmit (Cyt-b, COI, ND2). En las redes de haplotipos, los círculos son proporcionales a la frecuencia, y la conexión entre ellos es proporcional al número de diferencias entre haplotipos. Los análisis de “skyline plots” revelaron que las poblaciones A y D, pasaron por un evento de expansión reciente que comenzó hace 80,000 años.

7.3. DIVERSIDAD GENÉTICA Y UTILIDAD DE LOS *LOCI* MICROSATÉLITE

La reacción de pirosecuenciación 454 resultó en 143,625 lecturas, de las cuales sólo 815 lecturas eran adecuadas para el diseño de cebadores. De los 55 *loci* diseñados, 10 *loci* mostraron patrones de amplificación inconsistentes, 14 fueron monomórficos, y 31 fueron polimórficos. Desde el 31 *loci* polimórficos, se seleccionaron solamente los *loci* tetranucleótidos para los cuales se registró una proporción mayor al 50% de éxito en la identificación de los genotipos (Tabla III), estos 16 *loci* polimórficos tetranucleótidos se utilizaron para la caracterización de los niveles de estructura genética poblacional presentes en el colibrí de Xantus, así como para probar su utilidad mediante la amplificación cruzada con otras especies de colibríes.

Los números de acceso al GenBank, las secuencias de cebadores, el motivo repetido, número de alelos, heterocigosidad observada y esperada para los 16 *loci* microsatélite desarrollados para *H. xantusii* se enlistan en la Tabla III. El número de alelos por locus varió de 3 (locus Hxan02) a 10 (locus Hxan07, 09, 16 y 17). Las estimaciones de las frecuencias de los alelos nulos variaron de insignificante, menos de 0.05 (locus 11) de pequeño, entre 0.04 a 0.17 (locus Hxan04 - 06, 11, 12), de acuerdo con los intervalos propuestos por Chapuis y Estoup (2008). La heterocigosidad observada entre los *loci*, varió de 0.29 (locus Hxan05) a 0.99 (locus Hxan16), con una media de 0.68; la heterocigosidad esperada osciló entre 0.42 (locus Hxan02) a 0.86 (locus Hxan17), con una media de 0.7. No se detectó desequilibrio de ligamiento significativo, pero cinco *loci* (Hxan05, 06, 09, 13, 14) mostraron desviaciones estadísticamente significativas al equilibrio de HW, las cuales sólo se detectaron después de la corrección de Bonferroni.

7.3.1. Amplificación cruzada

De las seis especies de colibríes filogenéticamente relacionados que se utilizaron en este trabajo para validar la eficacia de los nuevos microsatélites (Tabla IV), sólo tres mostraron altos niveles de polimorfismo (número de *loci* amplificados); *Hylocharis leucotis* (87.5%), *Calypte costae* (87.5%), y *Cyananthus latirostris* (75%). Las estimaciones de las frecuencias de alelos nulos fueron similares entre ellos, oscilando entre valores insignificantes (menos de 0.05) a valores altos (> 0.2) (de acuerdo con los intervalos propuestos por Chapuis y Estoup 2008). El número de alelos por locus varió de 2 a 8; los valores de heterocigosidad observada y esperada fueron inferiores a los obtenidos para *H. xantusii*, y aunque no se detectó desequilibrio de ligamiento significativo, algunos *loci* mostraron desviaciones significativas al equilibrio de HW, nueve *loci* para *H. leucotis*, cinco para *C. costae*, y sólo uno para *C. latirostris*.

En las otras tres especies (*Archilochus alexandri*, *Amazilia candida*, y *A. rutila*) el número de alelos por locus (dos para la mayoría de los *loci*), y los valores de polimorfismo (56, 44 y 31%, respectivamente), fueron menores comparados con la amplificación cruzadas realizada en otros grupos de aves (ver Anexo 4). Sin embargo, los bajos niveles de polimorfismo observado en estas especies, pueden ser consecuencia de tamaño de muestra pequeño utilizado para estas especies (Tabla IV).

Tabla III. *Loci* microsatélites polimórficos aislados para *Hylocharis xantusii*. Incluye el número de acceso al GenBank, la secuencia del cebador, el motivo repetido, temperatura de alineamiento (Ta), concentración de MgCl₂, intervalo de la talla alélica (bp), el número de alelos observados (Na), heterocigosidad observada y esperada (H_O y H_E respectivamente), y probabilidad de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (P_{HW}).

No. de acceso	Locus	Secuencia del cebador (5'–3')	Motivo repetido	Ta (°C)	MgCl ₂ [mM]	Tamaño (bp)	Na	H _O	H _E	P _{HW}
KU681466	Hxan01	F: TTAAGCACCCCAGTCAAAGG R: CCCAATGTCAGGGATTTTGT	(AAAT) ₆	65	2.5	220 - 226	4	0.625	0.666	
KU681467	Hxan02	F: AAATCTTCATTTTGCATGCATT R: CTTTGATGCCATCCCAATCT	(AAAC) ₇	65	2.5	120 - 156	3	0.542	0.426	
KU681468	Hxan03	F: GGCAGCCCCAAATTGCTACTA R: TGTGCTGTTCTCCATCCATC	(TGGA) ₂₂	65	2.5	117 - 167	7	0.792	0.744	
KU681469	Hxan04	F: CACATTTGTGCTCTGATGGC R: GAGACAACTCAGGCATTCCC	(ATTT) ₆	70	2.5	169 - 201	7	0.667	0.742	
KU681470	Hxan05	F: CAATGTGCAGTCTCAGGGAA R: CTCCTGTGCTCAAGGGAGAG	(TGGA) ₅	70	2.5	135 - 178	5	0.292	0.490	***
KU681471	Hxan06	F: GCCAGTGCAGAAGATGGACC R: AGCCTGGCTCCTCCGTAGTC	(CATC) ₅	60	2.5	132 - 172	5	0.417	0.661	***
KU681472	Hxan07	F: TTCTCACAATGGGAGCCCTG R: GGGAGCAAGTGCATTCAGGA	(ACAG) ₅	70	2	88 - 156	10	0.792	0.853	
KU681473	Hxan09	F: CTCTGTGATCAGGCTTTTCCA R: AGTGATAGATATAGATGATAGAGACAGA	(TCTA) ₁₇	66	2.5	141 - 193	10	0.810	0.848	**
KU681474	Hxan11	F: TGGGTTTTTCAGTCTGATGGA R: TCTGGGGATTACATAAGTA	(CATC) ₁₅	60	1.5	124 - 140	4	0.667	0.510	
KU681475	Hxan12	F: AATGGATGCATGGCTGGTG R: GCCTATGCATTCTCCCAGGC	(ATGG) ₁₁	60	1.5	110 - 134	6	0.917	0.674	
KU681476	Hxan13	F: CCACTCAGGAAGGCCAAAGA R: GGATGTACCACCAGCTTGCC	(TGGA) ₁₃	70	2	149 - 185	8	0.500	0.646	***

KU681477	Hxan14	F: CATCACCCCTAACAAACCCC R: GCACAGGGTGGGAGTAGTGC	(ATCC) ₁₄	70	2.5	99 - 176	8	0.522	0.831	***
KU681478	Hxan15	F: GATGTTTCAGGGGAAGTCCG R: TAAATGAGAGCTGCCCCGTG	(ATCC) ₁₉	66	2.5	78 - 132	9	0.739	0.820	
KU681479	Hxan16	F: GTCAGTGGCCAGCAACCACT R: TCAGGGGAGAAGCAGACCAC	(CAGA) ₁₀	68	2.5	73 - 125	10	1.000	0.810	
KU681480	Hxan17	F: TCAGGGGAGAAGCAGACCAC R: ACTGCCAGCAACCCACTC	(TCTG) ₁₀	66	2.5	94 - 154	10	0.875	0.861	
KU681481	Hxan18	F: GCTGGTACCGGAGGTTGATG R: TGGATGAATGACGGAGGAGG	(CATT) ₁₃	68	2.5	133 - 169	5	0.739	0.681	

** P<0.01, *** P <0.001 = significancia de la desviación del equilibrio e HW después de 1000 permutaciones

Tabla IV. Diversidad genética y niveles de polimorfismo obtenidos a partir de la amplificación cruzada de los *loci* microsatélites diseñados *de novo* para el colibrí de Xantus. Se incluye el número y porcentaje del polimorfismo (Polym), número de alelos observados (Na), y heterocigosidad observada y esperada (H_O y H_E respectivamente).

Locus	<i>H. leucotis</i> (n = 10)				<i>C. costae</i> (n = 9)			<i>C. latirostris</i> (n = 6)			<i>A. alexandri</i> (n = 5)			<i>A. candida</i> (n = 5)			<i>A. rutila</i> (n = 5)		
	All Na	Polym = 14 (87.5 %)			Polym = 14 (87.5 %)			Polym = 12 (75 %)			Polym = 9 (56.3 %)			Polym = 7 (43.7 %)			Polym = 5 (31.3 %)		
	Na	H_O	H_E	Na	H_O	H_E	Na	H_O	H_E	Na	H_O	H_E	Na	H_O	H_E	Na	H_O	H_E	
Hxan01	8	3	0.200	0.54 **	Monomorphic			3	0.167	0.403	2	0.250	0.469	Monomorphic			Monomorphic		
Hxan02	5	2	0.400	0.320	4	1.000	0.735	2	0.167	0.153	Monomorphic			2	1.000	0.500	Monomorphic		
Hxan03	11	2	0.400	0.320	3	0.444	0.593	5	0.667	0.611	2	0.250	0.219	2	0.500	0.375	2	1.000	0.500
Hxan04	9	2	0.300	0.255	2	0.444	0.346	Monomorphic			2	0.750	0.469	Monomorphic			Monomorphic		
Hxan05	7	2	0.300	0.495	2	0.222	0.444	Monomorphic			2	0.250	0.469	Monomorphic			Monomorphic		
Hxan06	7	2	0.000	0.48 **	3	0.556	0.66 **	2	0.500	0.375	Monomorphic			Monomorphic			Monomorphic		
Hxan07	12	5	0.500	0.715 **	4	0.667	0.66 *	3	0.667	0.486	2	1.000	0.5 *	3	1.000	0.625	2	0.500	0.375
Hxan09	11	5	0.800	0.635	2	0.667	0.444	2	0.333	0.278	Monomorphic			2	1.000	0.500	Monomorphic		
Hxan11	5	3	0.400	0.62 **	4	0.444	0.691 **	3	0.500	0.625 **	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000
Hxan12	6	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000
Hxan13	8	0	0.000	0.000	2	0.444	0.494	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000	0	0.000	0.000
Hxan14	16	6	0.400	0.73 *	6	0.556	0.778	4	0.833	0.736	3	0.500	0.625 *	2	1.000	0.500	2	1.000	0.500
Hxan15	18	6	0.333	0.833 *	4	0.444	0.568	5	0.333	0.681	2	0.500	0.375	Monomorphic			2	0.000	0.500
Hxan16	14	3	0.000	0.656 **	5	0.286	0.775 **	5	0.600	0.720	2	0.250	0.219	4	1.000	0.750	0	0.000	0.000
Hxan17	16	8	0.500	0.8 *	2	0.500	0.375	8	0.667	0.778	Monomorphic			0	0.000	0.000	2	1.000	0.500
Hxan18	9	3	0.300	0.605 **	4	0.222	0.561 **	2	0.667	0.444	3	0.500	0.531	3	0.500	0.625	Monomorphic		
Mean	10.13	3.25	0.30	0.500	3.13	0.46	0.54	3.14	0.44	0.45	1.67	0.35	0.32	1.64	0.55	0.35	1.11	0.39	0.26

P < 0.01, *P < 0.001 = significance of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium after 1000 permutation.

7.3.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

7.3.3. Análisis de agrupación bayesiana

La estimación del número de poblaciones mediante probabilidad bayesiana utilizando el programa STRUCTURE arrojó un valor más probable de dos grupos genéticos, evidenciado por el máximo valor de ΔK (Figura 15), el cual es mejor estimador para el número de clusters (Evanno *et al.* 2005). Así mismo, en la gráfica se puede observar un pico de ΔK subóptimo (con valor mucho más bajo) para un valor de $K = 4$, lo que permite inferir la existencia de una estructuración poblacional a diferentes niveles.

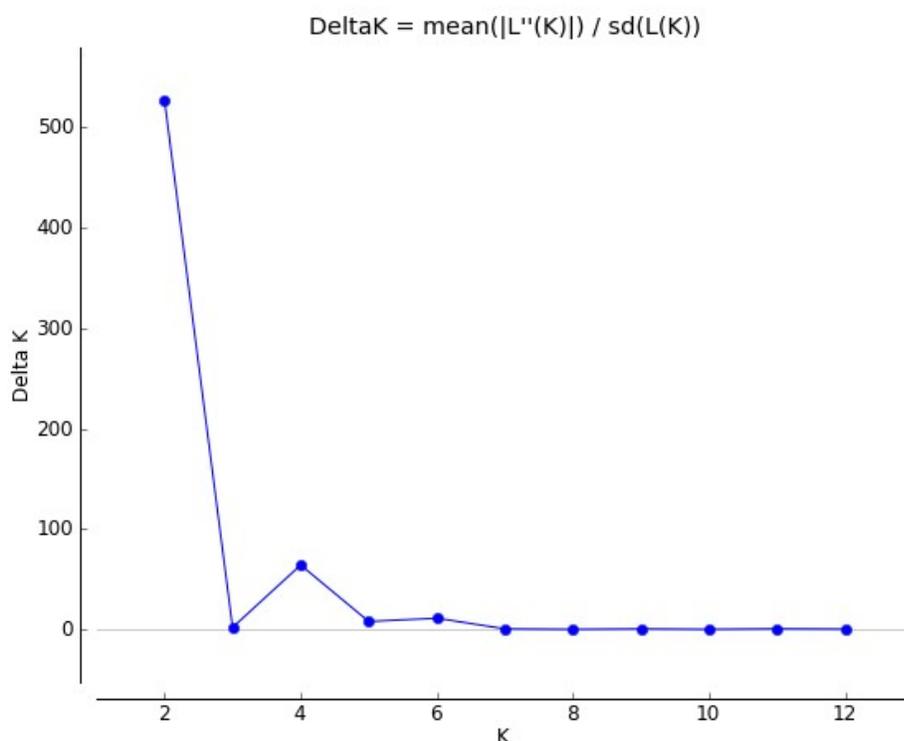


Figura 15. Número de grupos genéticamente homogéneos (K) calculado a partir de la tasa de cambio de la función de verosimilitud ΔK (Evanno *et al.* 2005).

Para el valor de K más probable de dos grupos homogéneos, los mayores coeficientes de membresía fueron para las localidades del centro y norte de la distribución del colibrí de Xantus, mostrando una mayor homogeneidad (Figura 16). Cabe destacar que la tendencia de las localidades norteñas, a mantener cierto grado de homogeneidad, comparado con el resto de las localidades, es evidente cuando se analiza el valor de K = 4. Las localidades sureñas y centrales, si bien están mayormente compuestas por un grupo genético particular, es evidente cierto grado de mezcla entre sí, cuando K = 4.

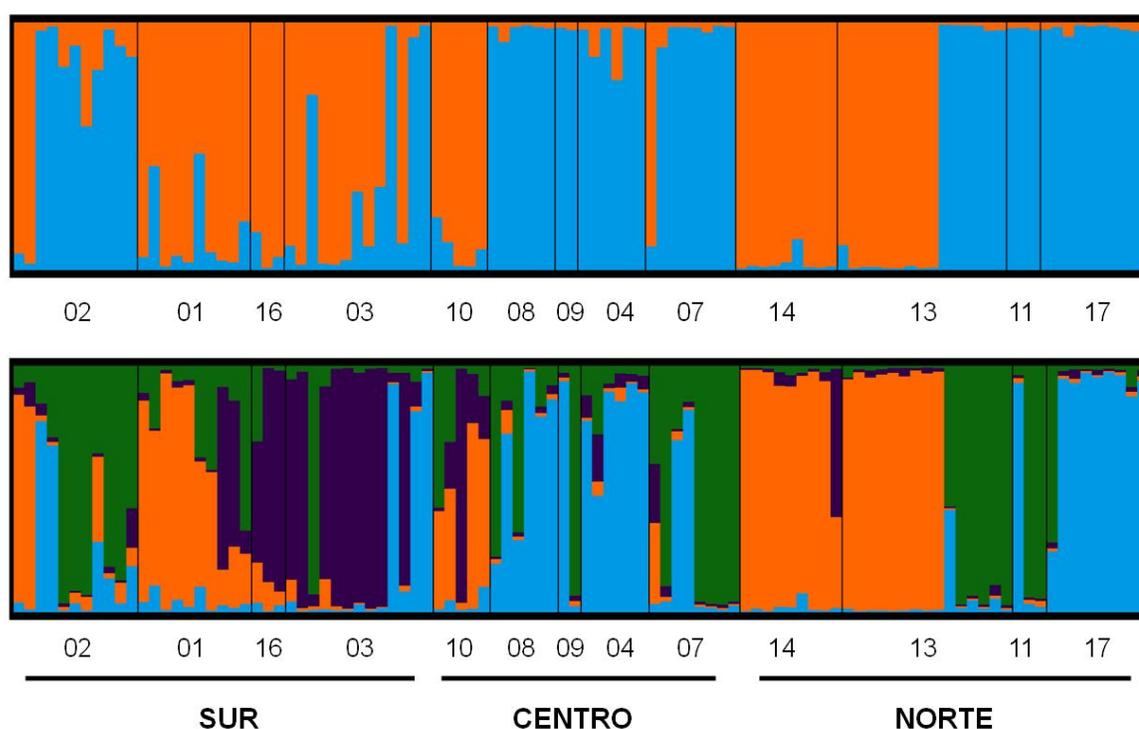


Figura 16. Coeficientes de identidad para K = 2 (arriba), y K = 4 (abajo) como número de grupos genéticos homogéneos, donde cada barra vertical corresponde a un individuo y cada color corresponde a la proporción de probabilidad de pertenecer a cada grupo. Los números de la parte inferior corresponden a las localidades de origen; para su correspondencia ver Figura 9.

7.4. MODELACIÓN DE NICHOS ECOLÓGICOS Y PROYECCIONES AL PASADO

Los resultados de las proyecciones al pasado en la modelación de nicho ecológico, permitieron observar que las regiones propuestas como de zonas refugios para el colibrí de Xantus (Sur y Norte), con base en la distribución de la diversidad genética (e.g. valores altos de diversidad y presencia de haplotipos ancestrales), concuerdan con los resultados de la MNE en las proyecciones al pasado (Figura 17). Sin embargo, estas zonas de refugio no se han mantenido a lo largo de las fluctuaciones climáticas de los periodos glaciales e interglaciales del Pleistoceno.

Por un lado, durante el LIG, se observó que las condiciones climáticas favorables para la especie, ocurrieron en la región norte, mientras que durante el LGM, las condiciones óptimas para la especie ocurrieron en la región sur (Figura 17). La condición de refugio norteño, vuelve a observarse hacia el Holoceno medio (6,000 años), actual periodo interglacial.

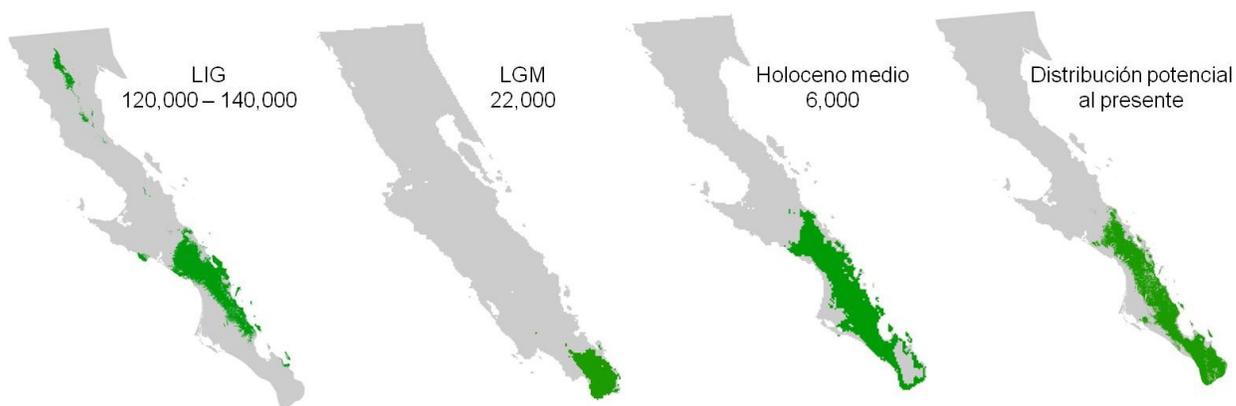


Figura 17. Modelación de nicho ecológico y distribución potencial de *Hylocharis xantusii*. Periodos: último interglacial (LIG), último máximo glacial (LGM), holoceno medio y distribución potencial al presente. Regiones en color verde representan las regiones geográficas con las condiciones favorables para que la especie ocurra.

7.5. ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA

En total se utilizaron medidas morfológicas pertenecientes a 102 individuos, para los que se identificaron 65 machos y 37 hembras (Figura 18). De las variables morfológicas analizadas, el análisis mutivariado de cluster permitió observar dos agrupaciones de los rasgos morfológicos, pero con valores de similitud bajos, menores al 50% (Figura 19a). Por otro lado, el análisis de cluster de la variación individual (Figura 19b), permitió observar cuatro agrupaciones de las localidades de *H. xantusii* (A, B, C, y D; Figura 20).



Figura 18. Variables morfológicas analizadas en este trabajo (derecha). Se indican las localidades estudiadas y el número de individuos machos y hembras identificados (M y F respectivamente).

En la figura 19a, si bien se observan valores de similitud bajos, la primera agrupación de variables que incluye el largo total, cuerda alar, ancho de pico y largo de cola, representan el conjunto de variables implicadas en la diferenciación de sexos (Figura 21), con diferencias significativas entre machos y hembras. Por otro lado, los valores de similitud observados dentro de las agrupaciones de los individuos (A, B, C y D; Figura 19b), son altos (90%), por lo que se esperaría observar diferencias entre las agrupaciones respecto a algunas variables morfológicas (ver Figura 22, Tabla V).

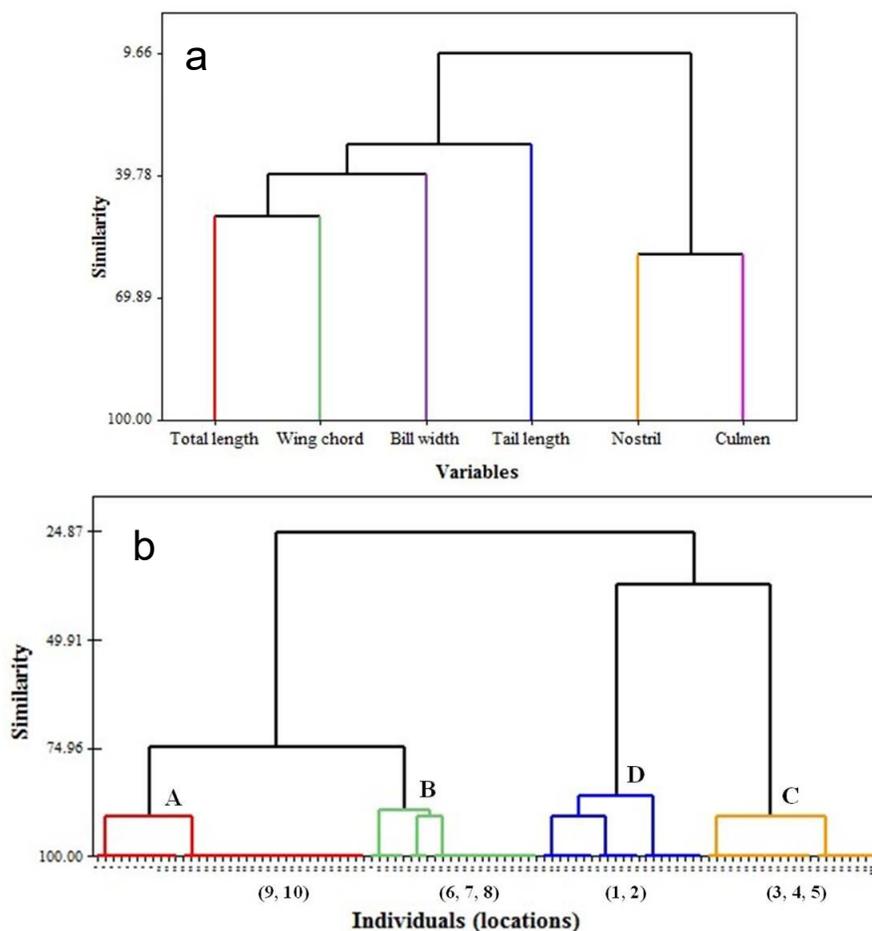


Figura 19. Análisis de cluster entre las variables morfológicas (a), y entre los individuos analizados (b) para el colibrí de Xantus.

En el análisis de componentes principales, solo los primeros dos componentes fueron significativos con eigenvalores >1 , explicando el 90% de la variación observada. La agrupación de variables en los componentes, fueron las mismas que se observaron en el análisis de cluster (Figura 19a). Al analizar la segregación de las variables morfológicas asociadas a las diferentes localidades (Figura 20), no fue posible observar alguna agrupación. Sin embargo, si se observaron diferencias en la segregación de individuos de ciertas localidades (Figura 20); por ejemplo, en el cuadrante I, se observaron mayor número de

individuos de la localidad de Santiago; para el cuadrante II, mayor número de individuos de la Soledad; en el III, mayor número de la localidad Carambucho; en tanto que para el cuadrante IV, se observaron más individuos de Santa Gertrudis.

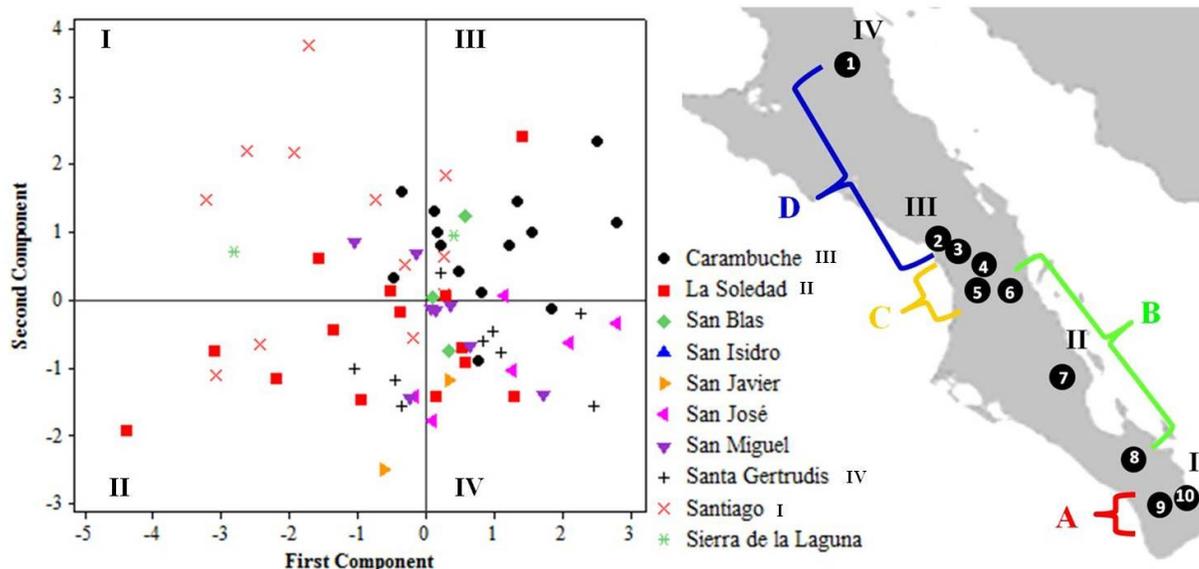


Figura 20. Análisis de componentes principales de las variables morfológicas asociadas a las diferentes localidades de muestreo para el colibrí de Xantus. Los números romanos (I, II, III, IV), indican mayor presencia de individuos de esas localidades (se señalan en el mapa). Las letras en el mapa (A, B, C y D) hacen referencia a las agrupaciones identificadas en el análisis de cluster.

En la figura 21, se observan las comparaciones de las variables morfológicas entre sexos. De las seis variables analizadas, solo cuatro de ellas mostraron marcadas diferencias significativas entre sexos: largo total, cuerda alar, largo de cola, y ancho de pico. Una vez identificadas las variables morfológicas significativamente diferentes entre hembras y machos, se analizaron de manera independiente entre las localidades. No se observaron diferencias significativas al analizar la variación morfológica de las hembras entre las localidades; sin embargo, al analizar los rasgos morfológicos de los machos entre las localidades (Figura 22), si se observaron diferencias significativas.

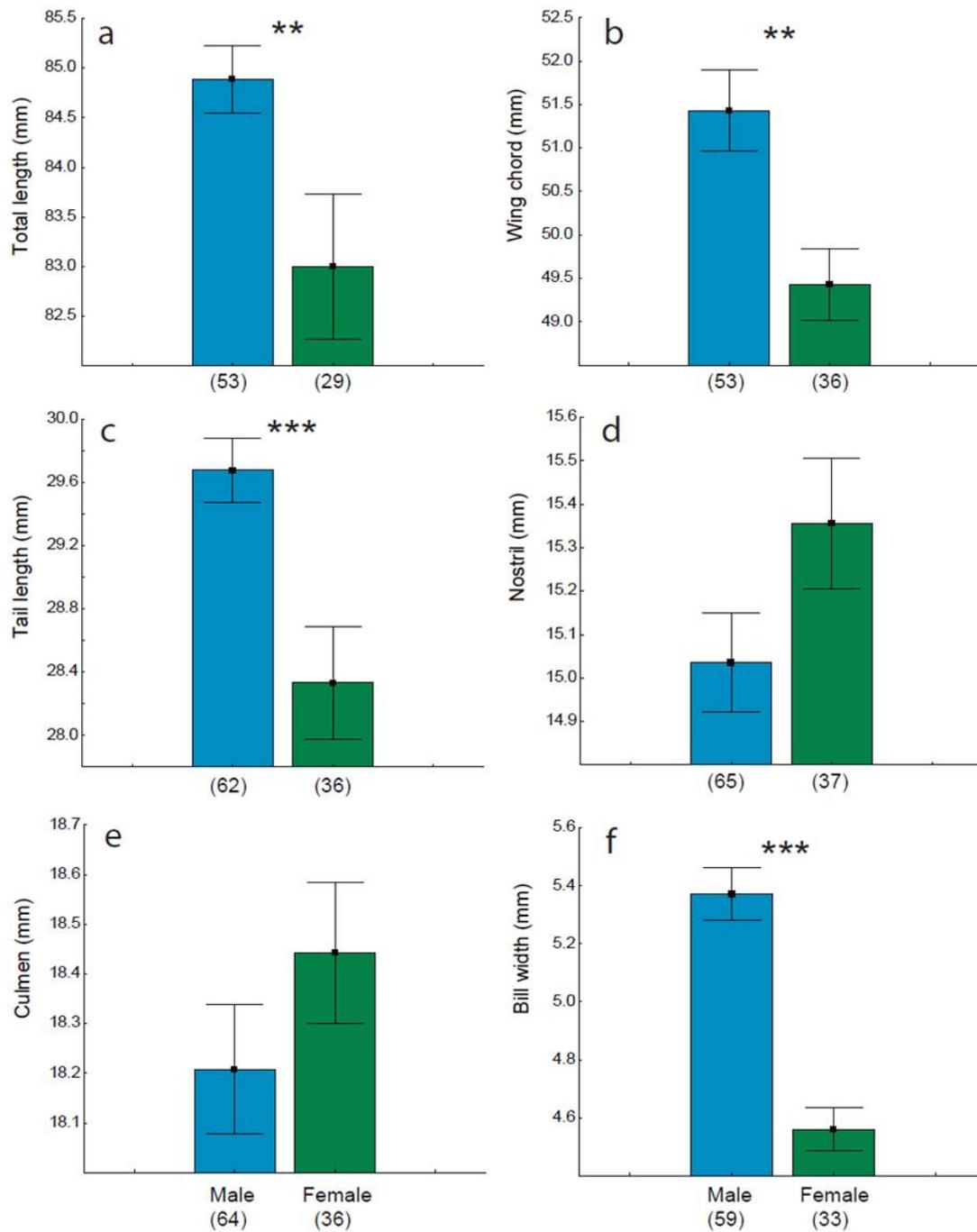


Figura 21. Diferencias en los rasgos morfológicos (promedio \pm error estándar) entre machos (azul) y hembras (verde) del colibrí de Xantus. Se indican los tamaños de muestra para machos y hembras utilizado en cada comparación. Diferencias significativas de la prueba “t”, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, en a) largo total, b) cuerda alar, c) largo de cola, y f) ancho de pico.

Al analizar las diferencias significativas de los rasgos morfológicos de los individuos machos entre las agrupaciones identificadas en el análisis de cluster (Figura 22), se observaron diferencias significativas para alguna agrupación en todas las variables estudiadas, excepto en el largo de la cola. Para la agrupación A (localidades 9 y 10; Figura 20), se observaron diferencias en el largo total y cuerda alar (Figura 22a y b respectivamente), siendo los individuos machos mucho más pequeños, comparados con el resto de las agrupaciones.

Por otro lado, la agrupación D (localidades 1 y 2), comprende individuos macho con tamaño del nostril significativamente más grande; mientras que los individuos de la agrupación B (localidades 6, 7 y 8), tuvieron un tamaño de culmen mayor. Por último, el ancho de pico con tamaño más grande, lo tuvieron los individuos de la agrupación C (localidades 3, 4 y 5). Estos resultados fueron concordantes al examinar el efecto de las diferencias entre machos y hembras, y las localidades en los rasgos morfológicos del colibrí de Xantus (ANOVA de dos vías (Tabla V).

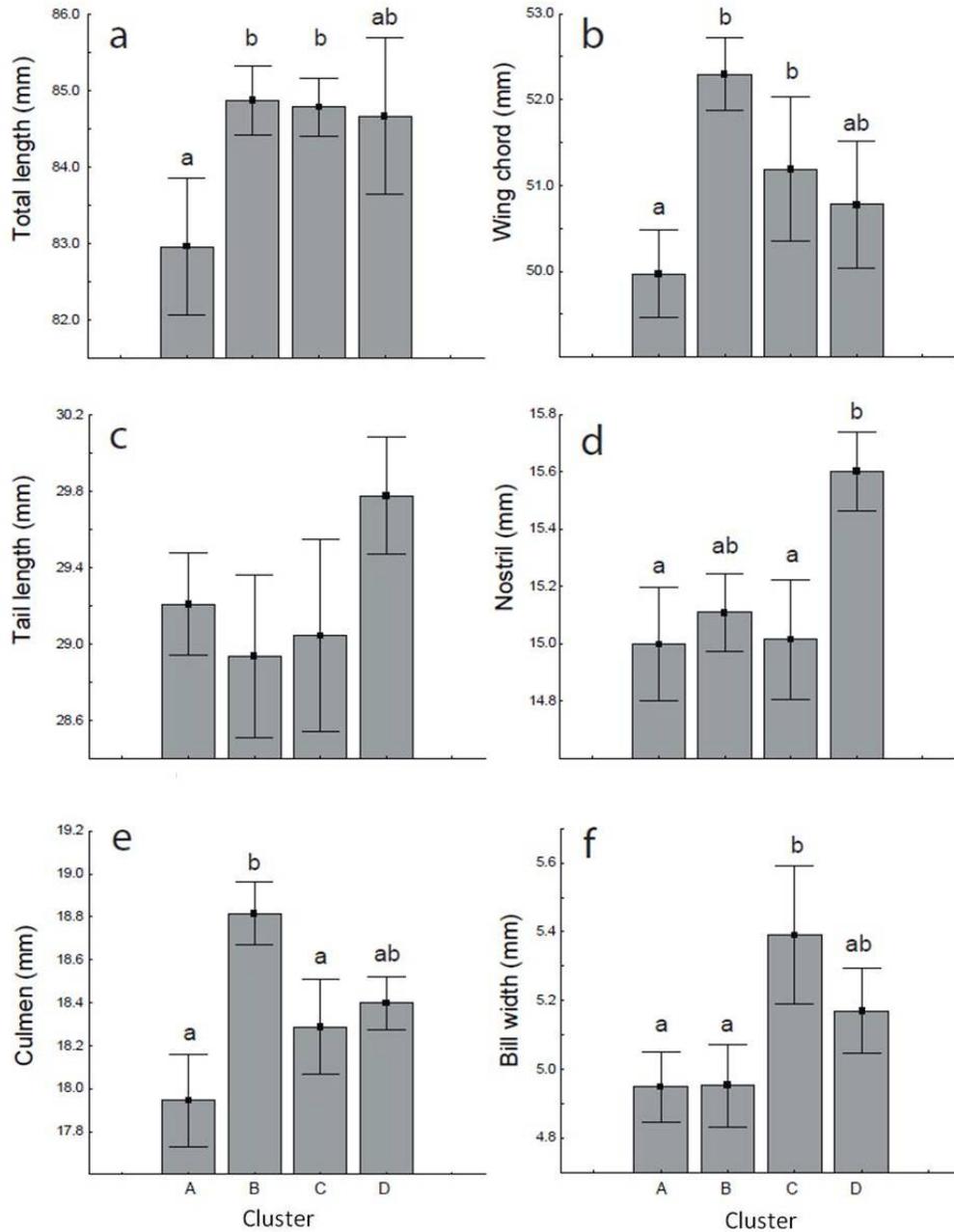


Figura 22. Diferencias en los rasgos morfológicos (promedio \pm error estándar) de los individuos machos entre las agrupaciones identificadas por el análisis de cluster. Agrupaciones con diferencias significativas se muestran con diferentes letras en: a) largo total, b) cuerda alar, d) nostril, e) culmen, y f) ancho de pico.

Tabla V. Resultados del ANOVA de dos vías examinando el efecto de las diferencias en sexo (machos vs hembras), y de las 10 localidades del colibrí de Xantus en los rasgos morfológicos analizados. df: grados de libertad, MS: valor promedio cuadrado, NS: no significativo.

Rasgo morfológico	Fuente de variación	df	MS	F-value	p-value
Largo total	Localidad	9	18.67	2.56	0.018
	Sexo	1	97.08	13.27	0.001
	Error	61	7.3		
Cuerda alar	Localidad	9	21.75	3.05	0.006
	Sexo	1	112.54	15.42	0.000
	Error	61	7.12		
Largo de cola	Localidad	9	5.6	1.51	NS
	Sexo	1	36.91	10.69	0.002
	Error	61	3.72		
Nostril	Localidad	9	2.01	6.29	0.000
	Sexo	1	0.2	0.39	NS
	Error	61	0.32		
Culmen	Localidad	9	2.7	5.68	0.000
	Sexo	1	0.92	1.27	NS
	Error	61	0.47		
Ancho de pico	Localidad	9	1.91	6.86	0.000
	Sexo	1	11.18	35.99	0.000
	Error	61	0.27		

8. DISCUSIÓN

8.1. HISTORIA EVOLUTIVA DEL COLIBRÍ DE XANTUS

Este trabajo es el primer ejemplo que revela un patrón filogeográfico en una especie de ave endémica de la Península de Baja California; para el colibrí de Xantus, se describe un patrón filogeográfico, explicado por eventos vicariantes, históricos, seguido por las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno (mayormente por periodos interglaciales), en conjunto con características a nivel local propias de la heterogeneidad ambiental de la PBC, influyendo sobre caracteres morfológicos.

La flora y fauna de los desiertos de Norteamérica han sido ampliamente explorados para explicar patrones en filogeografía (Zink *et al.*, 2013; 2002; 2001; Devitt, 2006; Garrick *et al.*, 2013; 2009); los desiertos en la península actúan como áreas de endemismo, lo que resulta en algunos patrones claros de la diversificación que se han explicado principalmente por eventos vicariantes (Riddle *et al.*, 2000a; 2000b; Zink, 2002). En especies de aves en la península, aunque la diferenciación regional ha sido explicado por vicarianza, no se ha observado una división filogeográfica clara, como se esperaría para las aves altamente vágiles (Zink *et al.*, 2013, 2000); sin embargo, solo se han descrito valores altos de diversidad genética y haplotipos ancestrales en la región sur de la distribución de las aves (Zink *et al.*, 2013; 2002; 2001).

Los análisis de tiempo de divergencia, permitieron obtener resultados más robustos para contrastar hipótesis relacionadas con los eventos vicariantes. Por un lado, el tiempo de separación de *H. xantusii* de su especie hermana continental (*H. leucotis*), fue hace 3.6 millones de años, periodo que también fue observado para los linajes de la especie co-distribuida con *H. xantusii*, *Calypte costae* (3.5 ma). Estas observaciones implican que *H. xantusii* comenzó a divergir posteriormente a la formación del Golfo de California y de la Península de Baja California (hace

aproximadamente 5 ma; Riddle *et al.*, 2000a; 2000b). Primer evento vicariante soportado en este trabajo.

Por otro lado, los tiempos al ancestro común más reciente (TMRCA), permitieron observar una señal filogeográfica relacionada con un segundo evento vicariante: separación de la región del Cabo con la formación del canal marino del Istmo de La Paz (3 ma; Riddle *et al.*, 2000b). Los linajes del colibrí del Xantus distribuidos en la región sur tienen un tiempo de divergencia de 2.1 ma, lo que confirma que este evento vicariante aisló esta región promoviendo diferencias genéticas con las regiones centro y norte de la PBC. Segundo evento vicariante soportado en este trabajo.

El patrón filogeográfico del colibrí del Xantus, revela una historia evolutiva compleja de describir, ya que no solo es influenciado por eventos vicariantes históricos (en escala de millones de años), sino que además las evidencias genéticas apuntan a que los cambios climáticos del Pleistoceno (en escala de miles de años), han influido en la distribución geográfica de la especie. Las estimaciones de tiempos de divergencia, evidenciaron que el 90% de los haplotipos, divergieron durante los últimos 500,000 años; además, los análisis de la dinámica poblacional histórica, permitieron observar un evento de expansión reciente en los últimos 100,000 años. Estos resultados indican cambios en la distribución de *H. xantusii*, en respuesta a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno tardío. Estudios filogeográficos en especies de ambientes áridos, proporcionan evidencia de que el intervalo de expansión durante el Pleistoceno tardío y Holoceno juegan un papel importante moldeando la distribución espacial de la diversidad a nivel intraespecífico, tanto en especies de vertebrados y plantas en la península (Crews y Hedin, 2006; Garrick *et al.*, 2013, 2009; Zink *et al.*, 2013).

El patrón filogeográfico de especies de regiones áridas, son una consecuencia de la aridificación durante periodos interglaciales del Pleistoceno,

después del cual las especies se expandieron desde regiones aisladas llamadas refugios (Hull y Girman 2004, Mapelli *et al.* 2010, Reding *et al.*, 2012, Zink *et al.*, 2013; 2000). Las zonas de refugio en la península, han sido propuestas para otras aves. Particularmente, para la perlita californiana (*Polioptila californica*, Zink *et al.*, 2013; 2002, 2001) y la codorniz californiana (*Callipepla californica*; Zink, 2002), se ha propuesto la del región Sur, como una zona refugio ante las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, con base en base valores altos de diversidad genética, y presencia de haplotipos ancestrales. Para el colibrí de Xantus, se identificaron dos regiones con valores altos de diversidad genética y presencia de haplotipos ancestrales, región sur (Sierra de Laguna), y región norte (San Nicolás). En este trabajo se proponen dos zonas de refugio en la península para el colibrí de Xantus.

Análisis independientes de la variación genética, como la modelación de nicho ecológico, representan una herramienta útil ya que genera información sobre las preferencias y tolerancias bióticas de las especies, y se pueden realizar estimaciones de la distribución potencial en diferentes periodos de tiempo (Peterson *et al.*, 2011). Las proyecciones al pasado en la modelación de nicho ecológico para el colibrí de Xantus, permitieron observar que las regiones propuestas como zonas de refugios (con base en la información genética), concuerdan con los resultados de la MNE. Sin embargo, estas zonas de refugio no se han mantenido a lo largo de los cambios climáticos del Pleistoceno. Por un lado, durante el último interglacial (120,000 años), se observó que las condiciones climáticas favorables para la especie, ocurrieron en la región norte, mientras que durante el último máximo glacial (22,000 años), las condiciones óptimas para que la especie ocurriera fue en la región sur. La condición de refugio norteño, vuelve a observarse hacia el Holoceno medio (6,000 años), actual periodo interglacial. La información conjunta de la diversidad genética, y de la MNE, permiten sugerir la presencia de dos zonas de refugios para el colibrí de Xantus, Sur y Norte.

Es importante señalar que los resultados de la modelación de nicho, no implican necesariamente que las especies se encuentren distribuidas en la región geográfica determinada. El nicho fundamental de la especie es el rango de condiciones medioambientales en los cuales la especie puede existir (Hutchinson, 1957); por su parte, el nicho realizado es el área que la especie ocupa actualmente. Dado que MAXENT emplea datos de presencia, la modelación de nicho resultante es una aproximación del nicho realizado debido a que, de manera natural, distintos factores impiden la distribución de las especies en toda el área que potencialmente puede ocupar, como interacciones entre especies (e.g. competencia intra e interespecífica, depredación), barreras geográficas, influencia humana, factores históricos de colonización, y capacidad de dispersión de los individuos (Peterson *et al.*, 1999; Anderson y Martínez-Meyer, 2004). El resultado de la distribución geográfica potencial al presente para el colibrí de Xantus, sugiere que la especie puede distribuirse a lo largo y ancho de su intervalo de distribución. Sin embargo, se sabe que la especie no se distribuye de manera continua, sino que se encuentra restringida principalmente a las zonas de oasis.

Para muchas aves endémicas, los patrones filogeográficos sugieren que al menos algunos factores comunes fueron extremadamente influyentes a nivel regional. En particular, los colibríes tienen una alta diversidad y un alto nivel de especialización (McGuire *et al.*, 2007; 2014); por lo tanto, los patrones filogeográficos dependen más de los cambios climáticos que de eventos históricos, ya que vinculan aspectos biológicos como el comportamiento, hábitat, nicho de forrajeo, y la selección sexual, factores importantes para especies con un alto nivel de especialización y de origen reciente (Qu y Lei, 2009, González *et al.*, 2011, Lara *et al.*, 2012; Arbeláez-Cortés *et al.*; 2014, Licona-Vera y Ornelas, 2014). El colibrí de Xantus muestra señales de variación intraespecífica con una alta diversidad genética a nivel regional, lo que sugiere que los patrones de distribución y evolución de esta especie están influenciados principalmente por los procesos ambientales recientes.

Los oasis y la Sierra de la Laguna comparten características ecológicas de hábitats más estables comparados con el resto de la árida península; además, la especie es más abundante en las Sierra de la Laguna y oasis en la Sierra de la Giganta que en otras zonas, principalmente sitios donde los cuerpos de agua están presentes (Rodríguez-Estrella, 1997; Arriaga *et al.*, 1990). Estas diferencias ecológicas propias del hábitat de la especie, permite sugerir que existen diferencias genéticas que se relacionen a factores ecológicos.

El estudio de marcadores moleculares como los microsatélites, con resolución espacial y temporal fina, permite resolver preguntas relacionadas con procesos que influyan sobre la divergencia poblacional y especiación, así como con aspectos de la biología evolutiva (ver anexo 4 para referencias). Los microsatélites generados en este trabajo, son los primeros en ser caracterizados para el colibrí de Xantus, y mostraron tener suficiente resolución y polimorfismo (González-Rubio *et al.*, 2016), para evaluar la existencia de diferenciación genética a escalas regionales. Además, al evaluar su utilidad mediante la amplificación cruzada en otras especies, se observó que las especies filogenéticamente más relacionadas, o genéticamente menos distantes, mostraron un mayor rendimiento en la amplificación, lo que significa una mayor proporción de *loci* amplificados (Mukesh *et al.*, 2011; González-Rubio *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que los microsatélites caracterizados para el colibrí de Xantus, pueden ser utilizados para estudios comparativos entre especies. En este trabajo, de forma preliminar se describen resultados sobre la estructura poblacional del colibrí de Xantus. De manera general, las poblaciones del norte, se han mantenido como grupos más homogéneos, comparados con las localidades del sur, donde se observaron mayores niveles de mezcla, al aumentar el valor de K.

Diferencias a nivel regional, también fueron observadas mediante el análisis de la variación morfológica. El colibrí de Xantus, tiene un marcado dimorfismo

sexual, y los resultados revelaron que los machos son significativamente más grandes en tamaño, tanto en el largo total, cuerda alar y largo de cola, así como de pico más ancho del pico. Se ha observado que un mayor tamaño de los machos favorece que evolutivamente se desarrolle el dimorfismo sexual (regla de Rensch; Abouheif y Fairbairn, 1997); además de que puede ser un indicativo de mayor territorialidad y defensa por hembras (Ornelas, 1996), favoreciendo el éxito reproductivo de los machos más grandes. Por otro lado, se ha observado que la diversificación floral es un factor importante en la evolución del dimorfismo del pico (Temeles *et al.*, 2000; 2003). Para el colibrí de Xantus, las observaciones en campo han evidenciado que es una especie territorial, donde los machos defienden un área determinada; además se ha observado que no existe competencia por recursos entre especies (al menos entre especies de colibríes), particularmente con *Calypte costae* (especie co-distribuida), por lo que al no tener competidores, pudiera estar desarrollando diferentes habilidades en el uso de flores y recursos disponibles, generando diferencias entre sexos para el forrajeo, y al mismo tiempo diferencias entre localidades o poblaciones.

En colibríes, se ha observado que especies que habitan en ambientes extremos (e.g. condiciones áridas de la península), puede incrementarse la competencia intraespecífica, y en ausencia de competencia interespecífica, puede permitir a ambos sexos utilizar distintos nichos que otro modo serían ocupados por los congéneres, promoviendo diferencias entre grupos de individuos a condiciones ambientales locales (Berns y Adams, 2010; 2013). Otros autores también han sugerido que la dominación de las hembras sobre los machos alrededor de los nidos y la defensa de territorios por los machos, como es el caso del colibrí de Xantus, puede alterar el tamaño corporal y caracteres del pico en ambos sexos, generando una amplia gama de dimorfismos dentro de varios grupos de individuos dispersos o segregados (Temeles *et al.*, 2010).

9. CONCLUSIONES

Este estudio presenta la primera investigación sobre filogeografía y estructura genética poblacional del colibrí de Xantus, una especie endémica de la Península de Baja California. En general los análisis realizados hasta el momento han generado información novedosa respecto al patrón filogeográfico de la especie, que no había sido observado para otras especies en la península. Las principales conclusiones del trabajo se resumen a continuación:

- 1) El análisis de tres genes mitocondriales en el colibrí de Xantus, revelaron un patrón filogeográfico con cuatro poblaciones aisladas, separando la región sur, centro y norte de la distribución de la especie;
- 2) Todas las poblaciones tienen valores de diversidad altos, y distribución de haplotipos similar con muchos haplotipos únicos o de baja frecuencia; características que algunos autores sugieren, corresponden a especies de origen reciente, o que se encuentran en un proceso de diversificación o expansión reciente;
- 3) Las estimaciones de tiempos de divergencia, evidenciaron que el patrón filogeográfico del colibrí de Xantus, se relaciona con dos eventos vicariantes: a) formación del Golfo de California con la separación de la península del continente, y b) aislamiento temporal de la región del Cabo;
- 4) Así mismo el patrón filogeográfico de la especie, está influenciado por los cambios climáticos del Pleistoceno: el 90% de los linajes mitocondriales, divergieron en los últimos 500,000 años; además los análisis de la dinámica poblacional histórica evidenciaron que el colibrí de Xantus se encuentra en un proceso de expansión reciente de los últimos 100,000 años;

- 5) La presencia de haplotipos ancestrales y valores altos de diversidad genética, en conjunto con los resultados de la MNE, permiten sugerir la presencia de dos zonas de refugio, en distintos periodos de tiempo: periodos interglaciales y glaciales del Pleistoceno;
- 6) El polimorfismo de los *loci* microsatélite reportados en este trabajo, vario de moderado a alto, comparado con otras especies de colibríes; estos niveles son suficientes para indagar sobre procesos recientes en la historia del colibrí de Xantus; además, la ampificación cruzada de los *loci* microsatélite, revelo un desempeño alto para las especies filogenéticamente cercanas o genéticamente menos distantes;
- 7) La distribución geográfica de la variación genética del colibrí de Xantus, está relacionada con la distribución de los ambientes de oasis; así mismo, se observaron diferencias morfológicas entre localidades, sugiriendo que las diferencias regionales ambientales, influyen sobre los niveles de diferenciación de la especie;
- 8) Por último, existen diferencias significativas muy marcadas en las variables morfológicas entre machos y hembras: los machos son generalmente más grandes (largo total, cuerda alar, largo de cola), y con picos más anchos; según algunos autores, en ausencia de competidores interespecíficos, los individuos de diferentes sexos pueden usar diferentes recursos, favoreciendo la evolución del dimorfismo sexual.

10. LITERATURA CITADA

- Abdelkrim J, BC Robertson, JL Stanton y NJ Gemmell. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques*. 46:185-192. <http://dx.doi.org/10.2144/000113084>
- Abouheif E y DJ Fairbairn. 1997. A Comparative Analysis of Allometry for Sexual Size Dimorphism: Assessing Rensch's Rule. *The American Naturalist*. 149:540-562
- Aljanabi SM y I Martínez. 1997. Universal and rapid Salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res*. 25:4692–4693.
- Alvarado-Serrano DF y LL Knowles. 2013. Ecological niche models in phylogeographic studies: applications, advances and precautions. *Mol Ecol Resour*. 14(2):233-248.
- Ando H, S Kaneko, H Suzuki, K Horikoshi, H Takano, H Ogawa y Y Isagi. 2011. Genetic Diversity of the Japanese Wood Pigeon, *Columba janthina*, Endemic to Islands of East Asia, Estimated by Newly Developed Microsatellite Markers. *Zoo Science*. 28(12):891-896
- Arbeláez-Cortés, E., Milá, B., Navarro-Siguenza, A.G., 2014. Multilocus analysis of intraspecific differentiation in three endemic bird species from northern Neotropical dry forest. *Mol. Phylogenet. Evol.* 70, 362-377.
- Arriaga L, R Rodríguez-Estrella y A Ortega-Rubio. 1990. Endemic Hummingbirds and Madrones of Baja: are they Mutually Dependent? *Southwest. Nat.* 35:76-79.
- Arriaga, L. y Rodríguez-Estrella, R. (Eds). 1997. *Los Oasis de la Península de Baja California, Mexico*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) - Sistema de Investigadores del Mar de Cortés (SIMAC). México.
- Arriaga, L., Díaz, S., Domínguez, R. y León, J.L. 1997. Composición florística y vegetación. In Arriaga, L., Rodríguez-Estrella, R. (Eds.). *Los Oasis de la Península de Baja California, Mexico*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) - Sistema de Investigadores del Mar de Cortés (SIMAC). México. pp. 69-106.
- Awise JC, AG Jones, DeEttWalker y JA DeWoody. 2002. Genetic Mating System and Reproduction Natural Histories of Fishes: Lessons for Ecology and Evolution. *Annu Rev Genet*. 36:19–45.
- Awise JC. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge MA. pp. 447.

- Avise JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* 36: 3-15. doi:10.1111/j.1365-2699.2008.02032.x
- Avise, J.C., Walker, E. 1998. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 265(1395): 457-463.
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16(1): 37-48.
- Barve N, V Barve, A Jiménez-Valverde, A Lira-Noriega, SP Maher, AT Peterson, J Soberón y F Villalobos. 2011. The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. *Ecological Modelling.* 222:1810-1819.
- Beebee, T.J.C., Rowe, G. 2008. An introduction to molecular ecology, 2 Edn. Oxford University Press, New York. pp.416.
- Berns, C.M. y Adams, D.C. 2010. Bill shape and sexual shape dimorphism between two species of temperate hummingbirds: black-chinned hummingbird (*Archilochus alexandri*) and ruby-throated hummingbird (*A. colubris*). *The Auk.* 127(3):626-635.
- Berns, C.M. y Adams, D.C. 2013. Becoming different but staying alike: patterns of sexual size and shape dimorphism in hummingbirds. *Evolutionary Biology.* 40: 246-260.
- Berns, C.M. 2013. The evolution of sexual dimorphism: Understanding mechanisms of sexual shape differences, in: Moriyama, H. (Ed.), *Sexual Dimorphism*. ISBN: 978-953-51-1075-0, InTech, doi:10.5772/55154.
- Bleiweiss, R. 1998. Tempo a mode of hummingbird evolution. Origin of hummingbird faunas. *Biological Journal of the Linnean Society.* 65, 63-97.
- Bleiweiss, R. 1999. Joint effects of feeding and breeding behaviour on trophic dimorphism in hummingbirds. *Proceeding of the Royal Society of London B.* 266, 2491–2497. doi:10.1098/rspb.1999.0951
- Brown, J.H. y Bowers, M.A. 1985. Community organization in hummingbirds: Relationships between morphology and ecology. *The Auk.* 102, 251-269.
- Buermann W, JA Chaves, R Dudley, JA McGuire, TB Smith y DL Altshuler. 2011. Projected changes in elevational distribution and flight performance of montane Neotropical hummingbirds in response to climate change. *Global Change Biol.* doi: 10.1111/j.1365-2486.2010.02330.x
- Chapuis MP y A Estoup. 2008. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol.* 24:621–31. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msl191>
- Cheng, L., Connor, T.R., Sirén, J., Aanensen, D.M., Corander, J. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS

- software. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/mst028.
- Cortez-Rodríguez N, BE Hernández-Baños, AG Navarro-Siguenza, AT Peterson y J García-Moreno. 2008. Phylogeography and population genetics of the amethyst-throated hummingbird (*Lampornis amethystinus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 48:1-11.
- Crews, S.C., Hedin, M. 2006. Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Araneae: *Homalonychus*) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 470-487.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods.* 9, 772.
- De Filippis, V.R., Moore, W.S. 2000. Resolution of phylogenetics relationships a recently evolved species as a function of amount DNA sequence: An empirical study based of woodpeckers (Aves: Picidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 143-160.
- Devitt, T.J. 2006. Phylogeography of the Western Lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic–Neotropical transition. *Mol. Evol.* 15, 4387-4407. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03015.x
- Domínguez-Domínguez O y E Vázquez-Domínguez. 2009. Filogeografía: Aplicaciones en taxonomía y conservación. *Anim Biodivers Conserv.* 32:59-70.
- Drummond, A.J., Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* doi: 10.1093/molbev/msi103.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Suchard, M. 2012. BEAST v1.7.4. Bayesian evolutionary analysis sampling trees. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571-81.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792-1797.
- Edwards SV, SB Kingan, JD Calkins, CN Balakrishnan, WB Jennings, WJ Swanson y MD Sorenson. 2005. Speciation in birds: Genes geography and sexual selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:6550-6557.
- Eltanany M, U Philipp, S Weigend y O Distl. 2011. Genetic diversity of ten Egyptian chicken strains using 29 microsatellite markers. *Animal Genetics.* 42: 666–669

- Excoffier, L., Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 564-567.
- Faircloth BC. 2008. Msatcommander: Detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Mol Ecol Resour.* 8:92–4. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01884.x>
- Ferrari, L., Conticelli, S., Vaggelli, C., Petrone, C., Manetti, P. 2000. Late Miocene mafic volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics.* 318, 161-185.
- Fisher-Reid, M.C. y Wiens, J.J. 2015. Is geographic variation within species related to macroevolutionary patterns between species? *Journal of Evolutionary Biology.* doi: 10.1111/jeb.12670
- Frankham R, JD Ballou y DA Briscoe. 2009. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. Reino Unido. 704pp.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against populations growth, hitchhiking and background selection. *Genetics.* 147, 915-925.
- García-Deras GM, N Cortez-Rodríguez, M Honey, AG Navarro-Siguenza, J García-Moreno y BE Hernández-Baños. 2008. Phylogenetic relationships within the genus *Cyanthus* (Aves: Trochilidae) with emphasis on *C. doubledayi*. *Zootaxa.* 1742: 61–68.
- García-Moreno J, N Cortés, GM García-Deras y BE Hernández-Baños. 2006. Local origin and diversification among Lampornis hummingbirds: a Mesoamerican taxon. *Mol. Phylogenet. Evol.* 38:488–498. doi:10.1016/j.ympev.2005.08.015
- Garrick, R.C., Nason, J.D., Fernández-Manjarrés, Dyer, R.J. 2013. Ecological coassociations influence species' responses to past climatic change: an example from a Sonoran Desert bark beetle. *Mol. Ecol.* 22, 3345-3361.
- Garrick, R.C., Nason, J.D., Meadows, A., Dyer, R.J. 2009. Not just vicariance: phylogeography of a Sonoran Desert euphorb indicates a major role of range expansion along the Baja peninsula. *Mol. Ecol.* 18, 1916-1931.
- Gehring, P.S., Pabijan, M., Randrianirina, J.E., Glaw, F., Vences, M., 2012. The influence of riverine barriers on phylogeographic patterns of Malagasy reed frogs (*Heterixalus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 64, 618-632.
- Gibbard, P., Van Kolfschoten, T. 2004. Chapter 22: The Pleistocene and Holocene Epochs. In: Gradstein, F. M., Ogg, J.G., Smith, A.G.A. (Eds.). *Geologic Time Scale.* Cambridge University Press. 441-452 p.
- Glenn TC y NA Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA *loci*. *Methods Enzymol.* 395:202-222.
- González, C. y Ornelas, J.F. 2014. Acoustic Divergence with Gene Flow in a

- Lekking Hummingbird with Complex Songs. *PLoS ONE*, **9**, e109241. <http://dx.doi:10.1371/journal.pone.0109241>
- González, C., Ornelas, J.F. & Gutiérrez-Rodríguez, C. 2011. Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology*. 11, 38.
- Graham CH, JL Parra, C Rahbek y JA McGuire. 2009. Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 106:19673-19678.
- Graham, C.H.C., Parra, J.J.L., Tinoco, B.A.B. Stiles, F.G. y McGuire, J.A. 2012. Untangling the influence of ecological and evolutionary factors on trait variation across hummingbird assemblages. *Ecology*. 93:99–111.
- Grismer, L.L. 2000. Evolutionary biogeography on Mexico's Baja California peninsula: A synthesis of molecules and historical geology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, doi: 10.1073ypnas.260509697
- Guillot G, A Estoup, F Mortier y JF Cosson. 2005. A Spatial Statistical Model for Landscape Genetics. *Genetics*. 170:1261-1280.
- Gutiérrez-Elorza, M. 1998. Geomorfología y cambio climático en zonas Áridas. Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y Naturales de Zaragoza, España. pp. 87.
- Gutiérrez-Flores C. 2015. Filogeografía y estructura genética poblacional del cardón *Pachycereus pringlei* en el Noroeste de México. CIBNOR. 174pp.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Hum. Biol.* 66, 591-600.
- Hedrick P y L Waits. 2005. Conservation Genetics: What ancient DNA tells us. *Heredity*. 94:463-464.
- Hedrick P. 2004. Recent development in conservation genetics. *Forest Ecol Manag.* 197:3–19.
- Heled, J., Drummond, A.J. 2008. Bayesian inference of population size history from multiple *loci*. *BMC Evol. Biol.* 8, 289.
- Hernández-Baños, B.E., Zamudio-Beltrán, L.E., Eguiarte-Frums, L.E., Klicka, J., García-Moreno, J. 2014. The *Basilinna* genus (Aves: Trochilidae): an evaluation based on molecular evidence and implications for the genus *Hylocharis*. *Rev. Mex. Biodivers.* 85, 797-807.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role, in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247-276.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405, 907-913.
- Hickerson MJ, BC Carstens, J Cavender-Bares, KA Crandall, CH Graham, JB Johnson, L Rissler, PF Victoriano y AD Yoder. 2010. Phylogeography's

- past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol. Phylogenet. Evol.* 54: 291–301.
- Howell CA y SN Howell. 2000. Xantus's Hummingbird (*Hylocharis xantusii*), The Birds of North America Online. A. Poole Ed. Cornell Lab of Ornithology USA. doi:10.2173/bna.554
- Hull, J.N., Girman, D.J., 2004. Effects of Holocene climate change on the historical demography of migrating sharp-shinned hawks (*Accipiter striatus velox*) in North America. *Mol. Ecol.* doi: 10.1111/j.1365-294X.2004.02366.x
- Jiang HX, SL Ren, YQ Hou, M Yang y XB Wu. 2011. Isolation and characterization of tetranucleotide repeat polymorphic microsatellite *loci* in *Larus saundersi* (Aves, Laridae). *Genet. Mol. Res.* 10(3): 2034-2037
- Johnsgard PA. 1983. The Hummingbirds of North America. Smithsonian Institution Press. Washington, D.C. 303pp.
- Kerr KCR, DA Lijtmaer, AS Barreira, PDN Hebert y PL Tubaro. 2009. Probing Evolutionary Patterns in Neotropical Birds through DNA barcodes. *PLoS One.* doi:10.1371/journal.pone.0004379
- Knowles LL y WP Maddison. 2002. Statistical Phylogeography. *Mol. Ecol.* 11:2623-2635.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Paabo, S., Villablanca, F.X., Wilson, A.C., 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6196-6200.
- Lara, C., Feria- Arroyo, T.P., Dale, J., Muñoz, J., del Coro-Arizmendi, M., Ornelas, J.F., Ortiz-Pulido, R., Rodríguez-Flores, C.I., Díaz-Valenzuela, R., Martínez-García, V., Díaz-Palacios, A., Partida, R., Enríquez, P.L., Rangel-Salazar, J.L., Schondube, J., 2012. Potential effects of the climate change in the distribution of hummingbirds: a study case with hummingbirds from the genus *Amazilia* and *Cyananthus*. *Ornitol. Neotrop.* 23, 57-70.
- Leaché, A.D., Koo, M.S., Spencer, C.L., Papenfuss, T.J., Fisher, R.N., McGuire, J.A. 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 12418-12423.
- Leaché, A.D., Mulcahy, D.G. 2007. Phylogeny, divergence times and species limits of spiny lizards (*Sceloporus magister* species group) in western North American deserts and Baja California. *Mol. Ecol.* 16, 5216-5233.
- Librado, P., Rozas, J. 2009. DnaSP v5: A software of comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451-1452.
- Licona-Vera, Y., Ornelas, J.F. 2014. Genetic, ecological and morphological divergence between populations of the endangered Mexican sheartail

- hummingbird (*Doricha eliza*). PLOS ONE. 9, e101870. doi: 10.1371/journal.pone.0101870
- Lindell, J., Ngo, A., Murphy, R. 2006. Deep genealogies and the mid peninsular seaway of Baja California. *J. Biogeogr.* 33, 1327-1331.
- Lovette IJ. 2005. Glacial cycles and the tempo of avian speciation. *Trends Ecol Evol.* 20:57–59.
- Lozano Garza, O.A., León de la Luz, J.L., Lara, S.F. and García-De-León, F.J. (2015) New Interpretations about Clonal Architecture for the Sour Pitaya (*Stenocereus gummosus*, Cactaceae), Arising from Microsatellite Markers of *de novo* Isolation and Characterization. *Open Journal of Genetics*, **5**, 1-11. <http://dx.doi.org/10.4236/ojgen.2015.51001>
- Manel S, MK Schwartz, G Luikart y P Taberlet. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol.* 18:189-197.
- Mapelli, F.J., Mora, M.S., Mirol, P.M., Kittlein, M.J. 2010. Effects of Quaternary climatic changes on the phylogeography and historical demography of the subterranean rodent *Ctenomys porteousi*. *J. Zoology*. doi:10.1111/j.1469-7998.2011.00849.x
- Mardis ER. 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics.* 24:133-141.
- Maya, Y., Coria, R., Domínguez, R. 1997. Caracterización de los Oasis. In: Arriaga, L., Rodríguez-Estrella, R. (Eds.). *Los Oasis de la Península de Baja California*. Mexico. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., Mexico. pp. 5-26.
- McGuire, J.A., Witt, C.C., Altshuler, D.L., Remsen Jr., J.V. 2007. Phylogenetic systematics and biogeography of hummingbirds: Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. *Syst. Biol.* 56, 837–856.
- McGuire, J.A., Witt, C.C., Remsen Jr, J.V., Corl, A., Rabosky, D.L., Altshuler, D.L., Dudley, 2014. Molecular phylogenetics and the diversification of hummingbirds. *Curr. Biol.* doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.016
- Megléczy E, C Costedoat, V Dubut, A Gilles, T Malausa, N Pach y JF Martin. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinforma.* 26:403–404. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp670>
- Meyers LA y JJ Bull. 2002. Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends Ecol Evol.* 17: 551 – 557.
- Milá B, BH Warren, P Heeb y C Thébaud. 2010. The geographic scale of diversification on islands: genetic and morphological divergence at a very

- small spatial scale in the Mascarene grey white-eye (Aves: *Zosterops borbonicus*). *BMC Evol Biol.* 10:158
- Milá B, DJ Girman, M Kimura y TB Smith. 2000. Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267:1033-1040.
- Moritz, C. 1994. Defining evolutionarily significant units for conservation. *Trends Ecol. Evol.* 9, 373-375.
- Mukesh y S Sathyakumar. 2011. Eighteen polymorphic microsatellites for domestic pigeon *Columba livia var. domestica* developed by cross species amplification of chicken markers. *J. Genet.* 90:86–89.
- Mukesh, Javed, R., Gaur, U., Jianlin, H. and Sathyakumar, S. 2011. Cross-species applicability of chicken microsatellite markers for investigation of genetic diversity in Indian duck (*Anas platyrhynchos*) populations. *African Journal of Biotechnology*, **10**, 17623-17631.
- Munguia-Vega, A. 2011. Habitat fragmentation in small vertebrates from the Sonoran Desert in Baja California. Doctoral Thesis. University of Arizona, Tucson, AZ.
- Neto JM, JL Arroyo, B Bargain, JS Monrós, N Mátral, P Procházka y P Zehtindjiev. 2012. Phylogeography of Habitat Specialist with High Dispersal Capability: The Savi's Warbler *Locustella luscinioides*. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0038497
- Nosil P, SP Egan y DJ Funk. 2008. Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: “isolation by adaptation” and multiple roles for divergent selection. *Evolution.* 62:316-336.
- Orndorff, R.C., Stamm, N., Craigg, S., D'Erchia, T., Edwards, L., Fullerton, D., Murchey, B., Ruppert, L., Soller, D., Tew, B.N. 2007. Divisions of Geologic Time. Major Chronostratigraphic and Geochronologic Units. US Geological Survey Geologic Committee, Washington, D.C.
- Ornelas JF. 1996. Origen y Evolución de los colibríes. *Ciencias.* 42. Abril-Junio. Facultad de Ciencias, UNAM. ISSN:0187
- Parada R, J Ksiazkiewicz, M Kawka y K Jaszczak. 2012. Studies on resources of genetic diversity in conservative flocks of geese using microsatellite DNA polymorphic markers. *Mol Biol Rep.* 39:5291–5297
- Peakall, R. and Smouse, P.E. (2012) GenAIEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research—An Update. *Bioinformatics*, **28**, 2537-2539. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Peterson AT y J Soberón. 2012. Species distribution modeling and Ecological niche modeling: getting the concepts right. *Natureza & Conservação*

- 10(2):102-107.
- Peterson AT, J Soberón, RG Pearson, RP Anderson, E. Martínez-Meyer, M Nakamura y M Bastos-Araújo. 2011. Ecological Niches and Geographic Distributions. Princeton University Press. 316pp.
- Polly, D., Speer, B., Patel, S., Chang, R., Jackson, A., Sorenson, P., Wu, Y.Y., Rieboldt, S., Smith, D. 2009. The Pliocene Epoch. International Commission on Stratigraphy's International Stratigraphic Chart.
- Posada D y KA Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14:817-818.
- Posada, D., Crandall, K.A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst. Biol.* 50, 580-601.
- Primmer CR, T Raudsepp, BP Chowdhary, AP Moller y H Ellegren. 1997. Low Frequency of Microsatellites in the Avian Genome. *Genome Res.* 7: 471-482
- Pritchard JK, M Stevens y P Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945-959.
- Qu Y, X Luo, R Zhang, G Song, F Zou y F Lei. 2011. Lineage diversification and historical demography of a montane bird *Garrulax elliotii* – implications for the Pleistocene evolutionary history of the Eastern Himalayas. *BMC Evol Biol.* 11:174
- Qu, Y., Lei, F. 2009. Comparative phylogeography of two endemic birds of the Tibetan plateau, the white-rumped snow finch (*Onychostruthus taczanowskii*) and the Hume's ground tit (*Pseudopodoces humilis*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 51, 312-326.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2009. Tracer v1.6. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2012. TreeAnnotator v1.7.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Department of Computer Science, University of Auckland Available as part of the BEAST package. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>.
- Reding, D.M., Bronikowski, A.M., Johnson, W.E., Clark, W.R. 2012. Pleistocene and ecological effect on continental-scale genetic differentiation in the bobcat (*Lynx rufus*). *Mol. Ecol.* 21, 3078-3093.
- Ribeiro, A.M., Lloyd, P., Dean, W.R.J., Brown, M. & Bowie, R.C.K. 2014. The ecological and geographic context of morphological and genetic divergence in an understorey-dwelling bird. *PLoS ONE* 9(2): e85903. doi:10.1371/journal.pone.0085903
- Riddle BR y DJ Hafner. 2006. Biogeografía Histórica de los Desiertos cálidos de Norteamérica. 57-65 p. En E Vázquez-Domínguez y DJ Hafner (eds). *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin No. 32.

- Riddle BR, DJ Hafner, LF Alexander y JR Jaeger. 2000a. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert Biota. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97:14438-14443.
- Riddle, B.R., Dawson, M.N., Hadly, E.A. 2008. The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Prog. Phys. Geogr.* 32, 173-202.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J. 2006a. A step-wise approach to integrating phylogeographic and phylogenetic biogeographic perspectives on the history of the core North American warm deserts biota. *J. Arid. Environ.* 66, 435-461.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J. 2006b. Biogeografía Histórica de Los Desiertos Cálidos de Norteamérica. In: Vázquez-Domínguez, E., Hafner, D.J. (Eds.). *Genética y Mamíferos Mexicanos: presente y futuro*. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin No. 32. pp. 57-65.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J., Alexander, L.F. 2000b. Phylogeography and systematics of the *Peromyscus eremicus* species group and the historical biogeography of North American warm regional deserts. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17, 145-160.
- Rodríguez-Estrella, R. 1997. Factores que condicionan la distribución y abundancia de las aves terrestres en el desierto xerófilo de Baja California Sur, México: El efecto de los cambios en el hábitat por la actividad humana. Doctoral thesis. Universidad Autónoma de Madrid-Estación Biológica de Doñana, Spain.
- Rodríguez-Estrella, R., Blázquez, M.C. y Lobato, J.M. 2005. Avian Communities of Arroyos and Desert Oases in Baja California Sur: Implications for conservation. In: Cartron, J.L.E., Ceballos, G., Felger, R.S. (Eds). *Biodiversity and conservation in Northern Mexico*, Oxford University Press, UK. pp. 334-353.
- Rodríguez-Estrella, R., Rubio, L. y Pineda, E. 1997. Los oasis como parches atractivos para las aves terrestres residentes e invernantes. In: Arriaga, L., Rodríguez-Estrella, R. (Eds.). *Los Oasis de la Península de Baja California, Mexico*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, BCS, Mexico. pp. 157-196.
- Rodríguez-Estrella, R., Rubio, L., Pineda, E., Blanco, G. 1999. The Belding's Yellowthroat: Current status, habitat preferences, and threats in oases of Baja California, México. *Anim. Conserv.* 2, 77-84.
- Rogers, A.R., Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.
- Rojas-Soto, O.R., Alcántara-Ayala, O., Navarro, A.G. 2003. Regionalization of the

- avifauna of the Baja California Peninsula, Mexico: a parsimony analysis of endemism and distributional modelling approach. *J. Biogeogr.* 30, 449-461.
- Rollins LA, LE Browning, CE Holleley, JL Sabage, AF Russell y SC Griffith. 2012. Building genetic networks using relatedness information: a novel approach for the estimation of dispersal and characterization of group structure in social animals. *Mol Ecol.* 21:1727–1740
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P. 2012. Mrbayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539-542.
- Rousset, F. (2008) GENEPOP'007: A Complete Re-Implementation of the Genepop Software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103-106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Roy, M.S., Torres-Mura, J.C. y Hertel, F., 1998. Evolution and history of hummingbird (Aves: Trochilidae) from the Juan Fernandez Islands, Chile. *IBIS International Journal of Avian Science.* 140, 265-273.
- Rull V. 2007. On the origin of present Neotropical biodiversity: a preliminary meta-analysis about speciation timing using molecular phylogenies. *Orsis.* 22:105-119.
- Santos DO, LR Moreira, H Tonhati y R Caparroz. 2012. Isolation and characterization of ten novel microsatellite *loci* in the red-winged tinamou (*Rhynchotus rufescens*, Tinamiformes, Aves) and cross-amplification in other tinamous. *Mol Biol Rep.* 39:4837–4840
- Sauquet, H., Ho, S.Y.W., Gandolfo, M.A., Jordan, G.J., Wilf, P., Cantrill, D.J., Bayly, M.J., Bromham, L., Brown, G.K., Carpenter, R.J., Lee, D.M., Murphy, D.J., Sniderman, J.M.K., Udovicic, F. 2012. Testing the impact of Calibration on molecular divergence times using a fossil-rich group: The case of *Nothofagus* (Fagales). *Syst. Biol.* 61, 289-313.
- Scoble J y AJ Lowe. 2010. A case for incorporating phylogeography and landscape genetics into species distribution modeling approaches to improve climate adaptation and conservation planning. *Diversity Distrib.* 16:343.353.
- Sly, N.D., Townsend, A.K., Rimmer, C.C., Townsend, J.M., Latta, S.C., Lovette, I.J. 2011. Ancient islands and modern invasions: disparate phylogeographic histories among Hispaniola's endemic birds. *Mol. Ecol.* 20, 5012-5024.
- Smith, B.T., Escalante, P., Hernández-Baños, B.E., Navarro-Sigüenza, A.G., Rohwer, S., Klicka, J. 2011. The role of historical and contemporary processes on phylogeographic structure and genetic diversity in the northern cardinal, *Cardinalis cardinalis*. *BMC Evol. Biol.* 11, 136.
- Sorenson, M.D., Ast, J.C., Dimcheff, D.E., Yuri, T., Mindell, D.P. 1999. Primers for

- a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.* 12, 105-114.
- Storfer A, MA Murphy, JS Evans, CS Goldberg, S Robinson, SF Spear, R Dezzani, E. Delmelle, L Vierling y LP Waits. 2007. Putting the landscape in landscape genetics. *Heredity*. 98:128–142.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 123, 585-595.
- Tamura, K., Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Temeles EJ y WJ Kress. 2003. Adaptation in a Plant-Hummingbird Association. *Science*. 25:630-633
- Temeles EJ, IL Pan, JL Brennan y JN Horwitt. 2000. Evidence for Ecological Causation of Sexual Dimorphism in a Hummingbird. *Science*. 21:441-443
- Temeles, E.J. & Roberts, W.M. 1993. Effect of sexual dimorphism in bill length on foraging behavior: an experimental analysis of hummingbirds. *Oecologia*. 94, 87-94.
- Temeles, E.J., Miller, J.S. & Rifkin, J.L. 2010. Evolution of sexual dimorphism in bill size and shape of hermit hummingbirds (Phaethornithinae): a role for ecological causation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 365, 1053-1063.
- Templeton AR y CF Sing. 1993. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations with Haplotypes Inferred from Restriction Endonuclease Mapping. IV. Nested Analyses with cladogram Uncertainty and Recombination. *Genetics*. 134:659-669.
- Templeton AR, E Routman y CA Phillips CA. 1995. Separating Population Structure from Population History: A Cladistic Analysis of the Geographical Distribution of Mitochondrial DNA Haplotypes in the Tiger Salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*. 140:767-782.
- Templeton AR, KA Crandall y CF Sing CF. 1992. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. III. Cladogram Estimation. *Genetics*. 132:619-633.
- Thomassen HA, W Buermann, B Milá, CH Graham, SE Cameron, CJ Schneider, JP Pollinger, S. Saatchi, RK Wayne y TB Smith. 2009. Modeling environmentally associated morphological and genetic variation in a

- rainforest bird, and its application to conservation prioritization. *Evol Appl.* doi:10.1111/j.1752-4571.2009.00093.x
- Upton, D.E., Murphy, R.W. 1997. Phylogeny of the side-blotched lizards (Phrynosomatidae: *Uta*) based on mtDNA sequences: support for a mid-peninsular seaway in Baja California. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8, 104-113.
- Valdivia-Carrillo T. 2014. Filogeografía y modelación de nicho ecológico en la iguana del desierto *Dipsosaurus dorsalis* (Baird y Girard, 1825) en la Península de Baja California. Tesis de Maestría. CIBNOR. 165pp.
- Valero, A., Schipper, J., Allnutt, T. 2014. Southern North America: Baja California Peninsula in western Mexico. <http://www.worldwildlife.org/ecoregions/na1306>
- Van Tienderen PH, AA de Haan, CG van der Linden y B Vosean. 2002. Biodiversity assessment using markers for ecologically important traits. *Trends Ecol Evol.* 17(12): 577–582.
- Wainstein, B.G., Tinoco, B., Parra, J.L., Brown, L.M, McGuire, J.A., Stiles, F.G. & Graham, C.H. 2014. Taxonomic, Phylogenetic, and Trait Beta Diversity in South American Hummingbirds. *The American Naturalist.* 184, 211-224.
- Wang H, X Lou, Q Zhu, Y Huang, L Zhou y B Zhang. 2011. Isolation and Characterization of Microsatellite DNA Markers for the Oriental White Stork, *Ciconia boyciana*. *Zoo Science.* 28(8):606-608
- Weir, J.T., Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Mol. Ecol.* 17, 2321-2328.
- Wernersson R y AG Pedersen. 2003. RevTrans: multiple alignment of coding DNA from aligned aminoacid sequences. *Nucleic Acids Research.* 31:537–3539.
- Wiens, J.J. 2015. Explaining large-scale patterns of vertebrate diversity. *Biol. Lett.* 11, 20150506. <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2015.0506>
- Willems, R.J.L., Top, J., Schaik, W.V., Leavis, H., Bonten, M., Sirén, J., Hanage, W.P., Corander, J. 2012. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. *mBio.* doi:10.1128/mBio.00151-12
- Wright S. 1945. Tempo and Mode in Evolution: A Critical Review. *Ecology.* 26:415-419.
- Zamudio-Beltrán, L.E. 2011. Filogenia y variación dentro del complejo *Hylocharis leucotis* Vieillot, 1818 (Aves: Trochilidae) utilizando secuencias de DNA. Master's Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City.
- Zink RM. 2002. Methods in Comparative Phylogeography, and Their Application to Studying Evolution in the North American Aridlands. *Integr. Comp. Biol.* 42:953-959.
- Zink, R.M., Blackwell-Rago, R.C., Ronquist, F. 2000. The shifting roles of dispersal

- and vicariance in biogeography. Proc. R. Soc. Lond. B 267, 497-503.
- Zink, R.M., Groth, J.G., Vázquez-Miranda, H., Barrowclough, G.F. 2013. Phylogeography of the California gnatcatcher (*Polioptila californica*) using multilocus DNA sequences and ecological niche modeling: Implications for conservations. Auk. 130, 449-458.
- Zink, R.M., Kessen, A.E., Line, T.V., Blackwell-Rago, R.C. 2001. Comparative phylogeography of some aridland bird species. Condor. 103, 1-10.
- Zwickl, D.J. 2011. GARLI 2.0. https://www.nescent.org/wg_garli/main_page

11. ANEXOS

11. ANEXOS

Anexo 1. Información obtenida en campo de los individuos del colibrí de Xantus (*Hylocharis xantusii*) endémico de la Península de Baja California. Se indican el ID del ADN total, la localidad y sus coordenadas geográficas, ID de la fotografía, sexo, peso y las variables morfológicas analizadas en este trabajo.

Ind	ID_ADN	Localidad	Latitud	Longitud	ID_Foto	Sexo	Peso	Largo total (mm)	Cuerda alar	Cola	Pico		
											Nostril	Culmen	Ancho
1	Hxan_001	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hxan_002	Sierra de La Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	M	3.4	87.1	51	30	14.8	17.6	-
3	Hxan_003	Sierra de la Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	H	3.2	85	48.2	33	16.8	18.6	-
4	Hxan_004	Sierra de la Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	M	3.6	84	32.5	28	15.6	17.1	-
5	Hxan_005	Sierra de la Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	M	3.1	90	54	31	15.9	18.5	-
6	Hxan_006	Sierra de la Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	H	3.1	84	51.5	30	16.2	18.1	-
7	Hxan_007	Sierra de la Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	M	3.2	82	52	30	14.6	17.2	-
8	Hxan_008	Sierra de la Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	H	3.6	90	52	31	15.3	18.6	-
9	Hxan_009	Sierra de la Laguna	26°04'38"	110°00'68"	-	M	3.7	92	56	32	13.7	16.8	-
10	-	Presa Buena Mujer	24°05'17"	110°11'31.3"	-	H	4	95	-	30	17.9	-	-
11	-	Presa Buena Mujer	24°05'17"	110°11'31.3"	ID_11	M	-	88	-	-	16.5	-	-
12	Hxan_012	Rancho San Isidro	28°97'58"	112°03'33"	ID_12	M	4	-	45.7	30	18	21	3.2
15	Hxan_015	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_15	M	3.6	-	51	28	17	21	5
16	Hxan_016	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_16	M	3.9	-	56	32	16	19	6
18	Hxan_018	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_18	H	3.3	-	48	28	17	19	5
19	Hxan_019	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_19	M	3.5	-	52	28	16	19	6
20	Hxan_020	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_20	M	3.3	-	52	29	15	19	5
21	Hxan_021	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_21	M	4	-	55	31	18	21	7
22	Hxan_022	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_22	H	2.7	-	48	28	16	20	4
23	Hxan_023	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_23	M	3.9	-	54	29	16	21	6
24	Hxan_024	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_24	M	4	-	51	29	14	18	5
25	Hxan_025	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_25	M	3.5	-	53	28	16	18	4
26	Hxan_026	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_26	H	3.4	-	51	28	16	18	4

27	Hxan_027	Santiago	23°29'10.1"	109°42'52.8"	ID_27	H	3.3	-	48	26	16	18	4
28	Hxan_028	Rancho San Isidro	28°97'58"	112°03'33"	ID_28	M	4	-	49.2	28	14.3	17.2	4.7
29	Hxan_029	Rancho San Isidro	28°97'58"	112°03'33"	ID_29	H	4	-	48.5	30	15.6	19.1	4.5
30	Hxan_030	Rancho San Isidro	28°97'58"	112°03'33"	ID_30	H	4.5	-	52.7	22	17	20.8	4.2
31	Hxan_031	Rancho San Isidro	28°97'58"	112°03'33"	ID_31	H	4	-	48.6	28	15.7	18.3	4.3
32	Hxan_032	Rancho San Isidro	28°97'58"	112°03'33"	ID_32	M	4	-	50.7	29	14.7	17.8	5.3
33	Hxan_033	Rancho San Isidro	28°97'58"	112°03'33"	ID_33	M	4	-	40.6	29	15.6	18.9	4.3
34	Hxan_034	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_34	H	3	85	48.3	28	13	16.9	4.4
35	Hxan_035	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_35	H	3	80	47.5	27	14.5	18.2	4.1
36	Hxan_036	Santiago	23°48'64"	109°72'64"	ID_36	M	2.5	84	51.1	30	14.1	18.3	4.6
37	Hxan_037	Santiago	23°48'64"	109°72'64"	ID_37	H	3.5	83	50.2	30	14.6	19	4.7
38	Hxan_038	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_38	M	2.5	85	50	31	14.8	18.2	4.8
39	Hxan_039	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_39	M	3.5	80	47.6	28	13.1	16.6	5
40	Hxan_040	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_40	H	3.5	76	47.1	27	15.2	17.7	4.1
41	Hxan_041	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_41	H	3	81	46.8	28	13.6	16.5	3.7
42	Hxan_042	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_42	M	4	86	49.5	30	14.5	17.9	5.3
43	Hxan_043	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_43	M	4	88	49.5	32	14.7	16.3	4.7
44	Hxan_044	Santiago	23°48'24"	109°72'30"	ID_44	M	4	88	44.6	32	14.3	16.7	4.4
45	Hxan_045	San Bartolo	23°70'51"	109°84'04"	-	M	3.75	84	54	27	12.7	15.6	4.6
46	Hxan_046	San Blas	23°51'51"	110°10'54"	ID_46	M	4	84	50	32	14.3	17.7	5.8
47	Hxan_047	San Blas	23°51'51"	110°10'54"	ID_47	M	4	81	49	30	15.3	17.7	6.2
48	Hxan_048	San Blas	23°51'51"	110°10'54"	ID_48	H	3.5	84	51	31	14.9	19.1	4.5
49	-	San Blas	23°51'51"	110°10'54"	ID_49	Pollo	-	53	-	-	7	9.5	4.5
50	Hxan_050	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_50	M	4	85	54	30	14.2	17.88	6.3
51	Hxan_051	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_51	H	3.5	86	53	30	15.28	17.23	5.74
52	Hxan_052	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_52	M	3.5	87	51	30	15.08	18.77	6.4
53	Hxan_053	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_53	M	3.5	84	48	30	14.85	17.88	6.39
54	Hxan_054	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_54	M	3.5	85	58	33	14.58	17.05	6.3
55	Hxan_055	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_55	M	4	85	55	29	13.96	18.75	6.47
56	Hxan_056	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_56	M	4.5	87	58	30	15.18	17.68	6.49
57	Hxan_057	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_57	M	3.5	84	54	30	14.82	18.41	5.13
58	Hxan_058	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_58	M	3.5	85	52	30	15.18	19.07	4.81
59	Hxan_059	Carambucho	26°12'53.50"	112°01'35.40"	ID_59	M	3.5	86	54	23	13.95	17.94	6.54

60	Hxan_060	Carambucho	26°12'53.50"	112°1'35.40"	ID_60	M	3.5	82	53	30	13.94	17.31	5.13
61	Hxan_061	Carambucho	26°12'53.50"	112°1'35.40"	ID_61	M	3.0	83	52	29	14.09	17.62	5.97
62	Hxan_062	Carambucho	26°12'53.50"	112°1'35.40"	ID_62	M	3.5	83	49	31	14.47	17.83	5.93
63	Hxan_063	Carambucho	26°12'53.50"	112°1'35.40"	ID_63	M	3.0	85	48	29	14.84	17.5	5.1
64	Hxan_064	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_64	H	3.5	87	52	29	14.5	19.49	4.56
65	Hxan_065	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_65	M	4.0	84	52	30	15.42	17.73	4.89
66	Hxan_066	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_66	M	3.0	85	49	29	14.52	18.7	5.5
67	Hxan_067	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_67	M	3.5	84	53	29	15.08	18.02	4.55
68	Hxan_068	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_68	M	3.5	87	52	30	15.67	19.42	5.29
69	Hxan_069	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_69	M	3.5	81	53	28	14.02	17.71	4.74
70	Hxan_070	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_70	H	3.0	83	54	29	14.34	17.9	4.74
71	Hxan_071	San Miguel de Comondú	26°00'18.5"	111°51'59.42"	ID_71	H	3.5	85	49	28	14.94	19.45	4.6
72	Hxan_072	San José de Comondú	26°03'33.86"	111°49'22.86"	ID_72	M	4.0	88	54	31	15.47	18.99	6.18
73	Hxan_073	San José de Comondú	26°03'33.86"	111°49'22.86"	ID_73	M	3.5	86	54	29	14.33	19.12	5.39
74	Hxan_074	San José de Comondú	26°03'33.86"	111°49'22.86"	ID_74	M	4.0	87	54	30	15.26	19.24	5.71
75	Hxan_075	San José de Comondú	26°03'33.86"	111°49'22.86"	ID_75	H	3.5	82	51	29	14.99	19.5	4.67
76	Hxan_076	San José de Comondú	26°03'33.86"	111°49'22.86"	ID_76	H	3.0	84	50	29	15.52	19.34	4.54
77	Hxan_077	San José de Comondú	26°03'33.86"	111°49'22.86"	ID_77	M	3.5	84	54	31	15.43	19.21	4.8
78	Hxan_078	San Ignacio	27°18'0.63"	112°53'59.32"	ID_78	M	-	-	-	-	-	-	-
79	Hxan_079	San Ignacio	27°18'0.63"	112°53'59.32"	ID_79	H	-	-	-	-	-	-	-
80	Hxan_080	San Ignacio	27°18'0.63"	112°53'59.32"	ID_80	M	-	-	-	-	-	-	-
81	Hxan_081	San Ignacio	27°18'0.63"	112°53'59.32"	ID_81	-	-	-	-	-	-	-	-
82	Hxan_082	San Ignacio	27°18'0.63"	112°53'59.32"	ID_82	M	-	-	-	-	-	-	-
83	Hxan_083	Rancho San Zacarias	27°08'13.89"	112°54'20.5"	ID_83	H	-	-	-	-	-	-	-
84	Hxan_084	Rancho San Zacarias	27°08'13.89"	112°54'20.5"	ID_84	M	-	-	-	-	-	-	-
85	Hxan_085	Rancho San Zacarias	27°08'13.89"	112°54'20.5"	ID_85	M	-	-	-	-	-	-	-
86	Hxan_086	Rancho San Zacarias	27°08'13.89"	112°54'20.5"	ID_86	M	-	-	-	-	-	-	-
87	Hxan_087	Rancho San Zacarias	27°08'13.89"	112°54'20.5"	ID_87	M	-	-	-	-	-	-	-
88	Hxan_088	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_88	M	-	-	-	-	-	-	-
89	Hxan_089	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_89	H	-	-	-	-	-	-	-
90	Hxan_090	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_90	M	-	-	-	-	-	-	-
91	Hxan_091	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_91	M	-	-	-	-	-	-	-
92	Hxan_092	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_92	M	-	-	-	-	-	-	-

93	Hxan_093	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_93	H	-	-	-	-	-	-
94	Hxan_094	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_94	M	-	-	-	-	-	-
95	Hxan_095	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_95	M	-	-	-	-	-	-
96	Hxan_096	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_96	M	-	-	-	-	-	-
97	Hxan_097	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_97	M	-	-	-	-	-	-
98	Hxan_098	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_98	M	-	-	-	-	-	-
99	Hxan_099	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_99	M	-	-	-	-	-	-
100	Hxan_100	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_100	H	-	-	-	-	-	-
101	Hxan_101	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_101	H	-	-	-	-	-	-
102	Hxan_102	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_102	M	-	-	-	-	-	-
103	Hxan_103	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_103	M	-	-	-	-	-	-
104	Hxan_104	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_104	H	-	-	-	-	-	-
105	Hxan_105	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_105	M	-	-	-	-	-	-
106	Hxan_106	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_106	M	-	-	-	-	-	-
107	Hxan_107	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_107	H	-	-	-	-	-	-
108	Hxan_108	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_108	M	-	-	-	-	-	-
109	Hxan_109	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_109	M	-	-	-	-	-	-
110	Hxan_110	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_110	M	-	-	-	-	-	-
111	Hxan_111	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_111	M	-	-	-	-	-	-
112	Hxan_112	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_112	M	-	-	-	-	-	-
113	Hxan_113	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_113	M	-	-	-	-	-	-
114	Hxan_114	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_114	M	-	-	-	-	-	-
115	Hxan_115	San José de Magdalena	27°03'47.73"	112°14'37.66"	ID_115	H	-	-	-	-	-	-
116	Hxan_116	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_116	M	-	-	-	-	-	-
117	Hxan_117	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_117	H	-	-	-	-	-	-
118	Hxan_118	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_118	M	-	-	-	-	-	-
119	Hxan_119	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_119	M	-	-	-	-	-	-
120	Hxan_120	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_120	M	-	-	-	-	-	-
121	Hxan_121	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_121	M	-	-	-	-	-	-
122	Hxan_122	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_122	M	-	-	-	-	-	-
123	Hxan_123	Estero San Nicolás	26°13'1.29"	111°23'3.76"	ID_123	M	-	-	-	-	-	-
124	Hxan_124	Rancho Monte Alto	25°85'97"	111°62'08"	-	M	-	-	-	-	-	-
125	Hxan_125	Rancho Monte Alto	25°85'97"	111°62'08"	-	M	-	-	-	-	-	-

126	Hxan_126	San Dionisio	23°55'86"	109°86'55"	-	M	-	-	-	-	-	-	-
127	Hxan_127	San Dionisio	23°55'86"	109°86'55"	-	H	-	-	-	-	-	-	-
128	Hxan_128	San Dionisio	23°55'86"	109°86'55"	-	M	-	-	-	-	-	-	-
129	Hxan_129	San Javier	25°51'35.6"	111°32'38.8"	ID_129	H	3	85	52	29	15.59	18.67	4.36
130	Hxan_130	San Javier	25°51'35.6"	111°32'38.8"	ID_130	H	3	-	55	-	15.67	18.41	5.35
131	Hxan_131	San Javier	25°51'35.6"	111°32'38.8"	ID_131	H	4	86	51	23	16.09	18.96	4.32
132	Hxan_132	Sierra de la Laguna	23°55'11"	110°00'68"	ID_132	H (juv)	-	81	46	28	14.3	16.71	4.03
133	Hxan_133	Sierra de la Laguna	23°55'11"	110°00'68"	ID_133	M	-	87	49	30	14.85	17.16	5.5
134	Hxan_134	Sierra de la Laguna	23°55'11"	110°00'68"	ID_134	M	-	85	55	-	14.26	17.14	5.34
135	Hxan_135	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_135	H	-	83	49	29	15.72	18.76	5.31
136	Hxan_136	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_136	M	-	85	57	32	14.19	16.89	5.44
137	Hxan_137	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_137	H	-	81	49	29	14.23	17.52	4.6
138	Hxan_138	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	-	H	-	75	43	23	14.84	18.36	4.61
139	Hxan_139	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_139	M	-	82	51	30	15.41	18.82	5.57
140	Hxan_140	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_140	M	-	79	50	25	15.32	18.81	5.97
141	Hxan_141	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_141	H	-	76	48	25	14.33	18.26	4.74
142	Hxan_142	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_142	M	-	83	51	29	15.11	17.9	5.75
143	Hxan_143	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_143	H	-	80	44	29	15.14	18.15	4.36
144	Hxan_144	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_144	H	-	79	50	29	15.41	17.46	4.55
145	Hxan_145	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_145	M	-	82	53	27	14.67	17.95	5.12
146	Hxan_146	La Soledad	24°48'48"	110°48'22.2"	ID_146	M	-	85	50	32	15.77	19.25	5.08
147	Hxan_147	La Soledad	24°48'41.5"	110°50'32.3"	ID_147	M	-	82	50	30	14.95	18.08	4.92
148	Hxan_148	La Soledad	24°48'41.5"	110°50'32.3"	ID_148	M	-	83	51	30	15.5	18.43	5.36
149	Hxan_149	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_149	M	-	88	54	30	16.64	18.81	5.36
150	Hxan_150	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_150	H	-	87	51	30	15.52	18.22	5
151	Hxan_151	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_151	H	-	82	49	29	15.52	18.97	4.81
152	Hxan_152	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_152	M	-	82	51	31	15.07	17.62	5.42
153	Hxan_153	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_153	H	-	80	47	30	15.25	18.43	4.88
154	Hxan_154	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_154	M	-	85	50	30	15.66	18.22	5.52
155	Hxan_155	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_155	M	-	87	54	29	15.58	18.54	4.55
156	Hxan_156	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_156	M	-	89	52	31	15.48	18.53	5.79
157	Hxan_157	Santa Gertrudis	28°05'01"	113°08'65"	ID_157	H	-	82	49	28	15.7	18.25	5.2

Anexo 2. Cebadores microsatélites obtenidos por pirosecuenciación, sintetizados para pruebas de polimorfismo en el colibrí de Xantus (*Hylocharis xantusii*), endémico de la Península de Baja California.

Locus	Clave	Secuencia del cebador (5'–3')	Motivo repetido	Tamaño (pb)	Ta (°C)
Hxan01	HxaG34O	F: TTAAGCACCCCAGTCAAAGG R: CCCAATGTCAGGGATTTTGT	(AAAT) ₆	227	65
Hxan02	Hxa6UMK	F: AAATCTTCATTTTGCATGCATTT R: CTTTGATGCCATCCCAATCT	(AAAC) ₇	189	65
Hxan03	HxaQVCC	F: GGCAGCCCAAATTGCTACTA R: TGTGCTGTTCTCCATCCATC	(ACCT) ₂₃	177	65
Hxan04	HxaYAHA	F: CACATTTGTGCTCTGATGGC R: GAGACAACTCAGGCATTCCC	(AAAT) ₆	169	70
Hxan05	HxaYV5T	F: CAATGTGCAGTCTCAGGGAA R: CTCCTGTGCTCAAGGGAGAG	(ACCT) ₆	160	70
Hxan06	Hxa6YFC	F: GACAGGTATTTGCTCACTTCCA R: TTTGAGAATAGAGACGTGTTCAAGA	(AGAT) ₁₇	150	70
Hxan07	HxaVHRL	F: GGGAGCAAGAAGAGGAGGAT R: GTGTCAGATGCAATGGATGG	(AGGT) ₁₃	148	65
Hxan08	Hxa1ZR1	F: GCCTTGCTTGCAAATGAAGT R: ATGCTCCATCACAGGGAAAC	(AC) ₁₆	254	60
Hxan09	HxaNQQI	F: AGTACTTGCCTCTCCTGGGG R: CGAAGCACAAGCGTGAATAA	(AG) ₁₀	229	70
Hxan10	HxaGVI3	F: TCCAGGAAAACCTTGAGGAA R: ATCCACTGTGACCATCACCA	(AC) ₁₁	192	60
Hxan11	Hxa7BHU	F: GAGACAGGTTTCTTGTGAGTGA R: TCTTTGGTCTTTCCATTGCC	(AC) ₁₁	130	65
Hxan12	HxaQX99	F: CACACCCACTCACTCACACC R: CAGGGTCCTTTCTTTACCCA	(AC) ₁₁	90	67
Hxan13	HxaNE4U	F: TTGTCTTGGAGAACAGCAGC R: TAAAGGAGCATCATTCCCCA	(AC) ₁₂	130	65
Hxan14	HxaWX5Q	F: CATGTAAAGAGAAAATACAGCTCCC R: GCTTTGAATGACAGGCCATA	(AG) ₁₀	112	65
Hxan15	HxaZONY	F: ATTCCAGCATCAGTTTTGGC R: ACATGTACCTGGCTTCTGGG	(AC) ₁₁	108	70
Hxan16	HxaA84W	F: ATCATTGCTGGATCCCAAAG R: TGTTACCCTCATGTGCTGAGA	(AG) ₁₀	107	65
Hxan17	Hxa0VGX	F: CCAGGCAGCATTTGATGTTA R: GACAGTCAGTGCATTTGTCTGAG	(AT) ₁₀	103	60
Hxan18	Hxa4TGV	F: CGAGCTGTGATGGAGTGAAA R: GAGCTGTACTGCCTGGGAAC	(AC) ₁₁	95	60 - 75

Hxan19	HxaAOIA	F: GCCAGTGCAGAAGATGGACC R: AGCCTGGCTCCTCCGTAGTC	(CATC) ₅	124	60
Hxan20	Hxa47YI	F: TCTTATCACAGTCTGCCTGAGCC R: GTTTTGAGGCAGCAACACCC	(GT) ₁₀	113	68
Hxan21	HxaO825	F: CAGGCTGACAGGTTGCTGG R: TAACAACGGGTGGTCCCTGA	(GT) ₇	125	70
Hxan22	HxaZYIS	F: AATCTGCTGCAGGTCCAAGTG R: ACAAACGATGCTCCCTGCTC	(GT) ₁₃	117	60 - 75
Hxan23	HxaS0MO	F: TTCTCACAATGGGAGCCCTG R: GGGAGCAAGTGCATTGAGGA	(ACAG) ₅	133	70
Hxan24	Hxa8S00	F: TGGTTGGTTTTGCTTGTGG R: TGCTGCCCTGTCTGTGTAA	(GTTT) ₇	90	70
Hxan25	HxaO5LW	F: TCAGGGAGAAGCTGAGCTGG R: CTCTGGGCTCTGTGGGATG	(CCAT) ₁₆	126	60 - 75
Hxan26	HxaLA71	F: TGCTCACCAGATTCCCCACT R: GAGGGCAAGGAGAGGGAGAG	(GAAG) ₅	132	68
Hxan27	HxaH4ZP	F: TCAGGGAGAAGCTGAGCTGG R: TCCTTTCTCCTCTGGGCTCC	(CCAT) ₆	91	70
Hxan28	HxaVZ8N	F: GCCCTTCACTGATCTCCCCT R: GTTCTTCTTGCCCAGCCCT	(TG) ₇	119	70
Hxan29	HxaYE4C	F: TGTTGCAGAATGCTTGTGGG R: GTGGTCTCATCTGGGCTTGC	(TC) ₈	149	66
Hxan30	HxaU1D0	F: TTCCCAGGAGGAAGGTAGCTG R: CTACACGTGAGGGGTGTGGG	(CA) ₈	91	68
Hxan31	HxaW9TM	F: CTCTGTGATCAGGCTTTTCCA R: AGTGTAGATATAGATGATAGAGACAGA	(TCTA) ₁₇	129	65
Hxan32	HxaME1K	F: ATTGTTGTGGGGATGTGGAT R: ACATACTGTGCATAAAGA ACT	(AT) ₁₃	95	65
Hxan33	HxaPVUQ	F: GGAATTTGCATTGTAAGTCTG R: ACAGGTTCTGGTCTGTGTAT	COMP ₁₃	140	65
Hxan34	HxaWFZG	F: AAATCACAGATTGCGGAAA R: TGTGTAAGTGGTGGAACTGAGG	COMP ₇	91	70
Hxan35	HxaRL8C	F: TGGTTTTTCAGTCTGATGGA R: TCTGGGGATTACATAAGTA	(CATC) ₁₅	127	70
Hxan36	HxaV28U	F: TCAGAGCTGTACATCTGATGGG R: AGGTAGATAGGTAGATAGGTAGGT	(CTAT) ₁₆	163	70
Hxan37	HxaD76B	F: GTCTCACTGACACTATTTTCTT R: CATGGAAATCCCATTTGGTC	COMP ₁₁	107	65
Hxan38	Hxa1VTE	F: AATGGATGCATGGCTGGTG R: GCCTATGCATTCTCCAGGC	(ATGG) ₁₁	92	60
Hxan39	Hxa4YXS	F: CCACTCAGGAAGGCCAAAGA	(TGGA) ₁₃	145	70

Hxan40	HxaA6YM	R: GGATGTACCACCAGCTTGCC F: CATCACCCCTAACAAACCCC R: GCACAGGGTGGGAGTAGTGC	(ATCC) ₁₄	129	60
Hxan41	Hxa3E6I	F: GATGTTTCAGGGGAAGTCCG R: TAAATGAGAGCTGCCCCGTG	(ATCC) ₁₉	150	65
Hxan42	Hxa84GF	F: GTCACTGCCCAGCAACCACT R: TCAGGGGAGAAGCAGACCAC	(CAGA) ₁₀	170	67
Hxan43	Hxa8RXU	F: TCAGGGGAGAAGCAGACCAC R: ACTGCCCAGCAACCCACTC	(TCTG) ₁₀	168	65
Hxan44	HxaTRN7	F: GATGGAGGGATGGAGGGATG R: CACCAGGGACGGCAAAGTAG	(TGGA) ₁₀	135	65
Hxan45	HxaYSHD	F: GCTGGTACCGGAGGTTGATG R: TGGATGAATGACGGAGGAGG	(CATT) ₁₃	163	70
Hxan46	Hxa3SGN	F: AGGAGATGCCCTGGGATTGT R: ACAAACGATGCTCCCTGCTC	(GT) ₁₃	209	65
Hxan47	HxaE4ZB	F: CCAAGCTGGTGTGAGGAGGTC R: TGTTGTGCAGCCCTTTGTGT	(TG) ₁₃	169	60
Hxan48	HxaM0GM	F: CTTCTGGCTGGGAGGTTTT R: GCACCCTTTCATTGGAGCTG	(GT) ₁₀	150	60 - 75
Hxan49	Hxa011O	F: TCGCTGACAATATTTACCCACAA R: GAAGCATCAGGCAGGTTTGC	(AC) ₁₁	183	60
Hxan50	HxaLJN5	F: GGTTCTGTGGAGCCACTCA R: CTCTGCAGCCATGCAGCTC	(GT) ₁₁	92	68
Hxan51	HxaNDOQ	F: TCCGACTCAGAGACGCACTC R: AAAATGTGGAGAAGATGCTGAAGTG	(GT) ₁₀	90	70
Hxan52	HxaQZGD	F: TCAGCCAGGTGGTGGACTCT R: GGGTAGTTCTTCCCAAATACCTG	(GT) ₁₃	186	60 - 75
Hxan53	HxaVKA8	F: TTGTGATCCTCCAGGGATGC R: GCTACTGGGAATGGGCAGTG	(CA) ₁₀	91	70
Hxan54	HxaNTUG	F: CTGCTGGTGTGCTCCCTT R: TTTGTGTCCTGGTGTCCGTG	(GT) ₁₅	134	70
Hxan55	HxaR9K7	F: GTGAATTGAACGTGCCTGC R: AGACAGTCTGCCAGCATGGA	(TG) ₁₁	93	60 - 75

Anexo 3. Valores de diversidad genética de secuencias de ADN mitocondrial comparada entre distintas especies de aves.

Especies	Set de datos					
		Cyt-b	COI	ND2	Concatenated*	
Birds						
H U M M I N G B I R D S	<i>Hylocharis xantusii</i>	bp	778	761	585	2,124
	Este trabajo	n	81	81	81	81
		H	11	27	20	50
		<i>h</i>	0.6956	0.8759	0.7747	0.9682
		π	0.0012	0.0033	0.0097	0.0048
	<i>Sephanoides sp.</i>	bp	-	-	552	-
	Roy et al. 1998	n	-	-	31	-
		H	-	-	7	-
		<i>h</i>	-	-	0.76	-
		π	-	-	0.4285	-
	<i>Lampornis amethystinus</i>	bp	-	-	-	844
	Cortés-Rodríguez et al. 2004	n	-	-	-	69
		H	-	-	-	32
		<i>h</i>	-	-	-	0.91
		π	-	-	-	0.0082
	<i>Campylopterus curvipennis</i>	bp	-	-	-	1,407 ^a
	González et al. 2011	n	-	-	-	160
		H	-	-	-	63
		<i>h</i>	-	-	-	0.5 - 1
		π	-	-	-	0.0003 - 0.0035
<i>Campylopterus curvipennis</i>	bp	-	-	-	1,077 ^b	
González et al. 2011	n	-	-	-	25	
	H	-	-	-	10	
	<i>h</i>	-	-	-	0.796	
	π	-	-	-	0.002	
<i>Pseudopodoces humilis</i>	bp	-	-	-	1,510	
Qu y Lei 2009	n	-	-	-	87	
	H	-	-	-	42	
	<i>h</i>	-	-	-	0.943	
	π	-	-	-	0.00346	
<i>Onychostruthus taczanowskii</i>	bp	-	-	-	1,409	
Qu y Lei 2009	n	-	-	-	78	
	H	-	-	-	54	
	<i>h</i>	-	-	-	0.963	
	π	-	-	-	0.00273	
<i>Garrulax elliotii</i>	bp	880	707	1,003	-	
Qu et al. 2011	n	80	80	80	-	
	H	32	13	34	-	
	<i>h</i>	0.951	0.681	0.945	-	

	π	0.0046	0.0014	0.0034	-
<i>Cardinalis igneus</i>	bp	-	-	1,041	-
Smith <i>et al.</i> 2011	n	-	-	47	-
	H	-	-	21	-
	<i>h</i>	-	-	0.8608	-
	π	-	-	0.00173	-
<i>Locustella luscinioides</i>	bp	-	-	1,041	-
Neto <i>et al.</i> 2012	n	-	-	330	-
	H	-	-	57	-
	<i>h</i>	-	-	0.868	-
	π	-	-	0.00784	-
<i>Passerina leclancherii</i>	bp	737	-	660	1,395
Arbeláez-Cortés <i>et al.</i> 2014	n	59	-	59	51
	H	28	-	19	34
	<i>h</i>	-	-	-	-
	π	0.006	-	0.006	0.005
<i>Melanerpes chrysogenys</i>	bp	-	582	463	1,046
Arbeláez-Cortés <i>et al.</i> 2014	n	-	45	46	42
	H	-	16	11	20
	<i>h</i>	-	-	-	-
	π	-	0.005	0.005	0.005
<i>Momotus mexicanus</i>	bp	-	568	579	1,185
Arbeláez-Cortés <i>et al.</i> 2014	n	-	23	28	21
	H	-	11	16	7
	<i>h</i>	-	-	-	-
	π	-	0.023	0.017	0.02

bp = pares de bases; n = tamaño de muestra; H = número de haplotipos; *h* = diversidad haplotípica;
a = ATPasa + CR; b = ATPasa + ND2.

Anexo 4. Comparación del uso de *loci* microsatélite entre distintas especies de aves. Se indica el tamaño de muestra (n), el número de *loci* polimórficos, el número de alelos por locus, heterocigosidad observada y esperada.

Espece	Distribución	n	<i>loci</i> polimórficos	alelos / locus	Ho	He	Referencia
<i>Hylocharis xantusii</i> Colibrí de Xantus	Endémico de la PBC	100	16	3 - 12	0.29 - 0.9	0.42 - 0.86	Este trabajo
<i>Campylopterus curvipennis</i> Colibrí ruiseñor	México, Guatemala, Belice, Honduras	160	10	4 - 20	0.18 - 0.65	0.30 - 0.64	González <i>et al.</i> 2011
<i>Garrulax elliotii</i> Charlatán o Tordo jocosó	Endémico del este del Himalaya	80	10	2 - 9	0.0 - 0.86	0.07 - 1	Qu <i>et al.</i> 2011
<i>Pomatostomus ruficeps</i> Charlatán de coronilla castaña	Endémica de Australia y Nueva Guinea	1197	9	11 - 21	-	0.74 - 0.91	Rollins <i>et al.</i> 2012
<i>Columba livia</i> var. <i>domestica</i> Paloma bravia	Europa, Asia, Africa principalmente en zonas urbanas	22	18	2 - 18	0.23 - 0.91	0.35 - 0.94	Mukesh y Sathyakumar 2011
<i>Columba janthina janthina</i> <i>Columba janthina nitens</i> Paloma japonesa	Endémica de las islas del Japón	15 25	7 2	1 - 7 1 - 3	0.0 - 0.67 0.0 - 0.08	0.0 - 0.64 0.0 - 0.08	Ando <i>et al.</i> 2011
<i>Larus saundersi</i> Gaviota	Global y vulnerable	30	9	4 - 15	0.58 - 0.89	0.58 - 0.9	Jiang <i>et al.</i> 2011
<i>Rhynchotus rufescens</i> Perdiz de alas rojas	Original de América del Sur	24	6	2 - 12	0.27 - 0.82	0.27 - 0.86	Santos <i>et al.</i> 2012
Variedades de Gansos	Nativos de Polonia	160	14	3 - 19	0.45 - 0.55	0.38 - 0.51	Parada <i>et al.</i> 2012
<i>Ciconia boyciana</i> Cigüeña oriental	Norte de China al Sureste de Rusia	23	11	2 - 8	0.0 - 0.86	0.22 - 0.85	Wang <i>et al.</i> 2011
Pollos Egipcios	Razas locales de Egipto	251	29	3 - 20	0.22 - 0.84	0.32 - 0.88	Eltanany <i>et al.</i> 2011