



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y SU APLICACIÓN AL ESTUDIO DE
LAS RELACIONES INTRA E INTERESPECÍFICAS EN AVES**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

DIANA ARACELI GARCÍA DÁVILA

ASESOR: DRA. MA. DEL CARMEN SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

2007



DIANA ARACELI GARCÍA DÁVILA

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS Y SU
APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LAS
RELACIONES INTRA E
INTERESPECÍFICAS EN AVES**

*Con el más grande amor para mis padres
y hermanos*

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. María del Carmen Sánchez Hernández por la oportunidad de permitirme trabajar a su lado, por el apoyo, enseñanzas e interés en este trabajo. Gracias por creer en mí.

A la Dra. Iriana Zuria Jordan por su gran apoyo en campo, por los comentarios realizados y bibliografía proporcionada.

A mi comité evaluador: Dra. Irene Goyenechea Mayer-Goyenechea, Dra. Iriana Leticia Zuria Jordan, Dr. Juan Carlos Gaytán Oyarzún, Dr. Ignacio Esteban Castellanos Sturemark, Biol. Ulises Iturbe, Biol. Ricardo León Rico y Dra. María del Carmen Sánchez Hernández, gracias por sus sugerencias y comentarios, sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible.

Gracias al Dr. Rodolfo Dirzo Minjarez y al Laboratorio de Ecología de Comunidades de la UNAM por las muestras de DNA proporcionadas.

Gracias a el Dr. Miguel Ángel Martínez Morales, a la M. en C. Helga Alicia Caballero Quiroz, a la Licenciada en Biología Pilar Carbó Ramírez y a la pasante en Biología Alejandra Gómez González, por su apoyo en campo.

A mis compañeros Ernesto, Antonio (Toñito), Jacqueline y Carmen, gracias por brindarme su amistad y apoyo dentro del laboratorio, realmente aprecio su ayuda.

De manera especial quiero dar gracias a mi familia, a la cual debo mis logros:

A mis padres, gracias por la paciencia, amor, confianza, estímulo, gracias por siempre darme una oportunidad, por dejarme ser libre en muchos sentidos. Gracias a mis hermanos Daniel y Eduardo García Dávila, por estar siempre a mi lado, por su cariño y apapachos.

A José Miguel García Dávila, gracias por tu compañía, por las cosas que hemos aprendido de la vida en estos años de vivir juntos, gracias por compartir tan gratos momentos.

A Marco Antonio Mora Reyes, la persona que hace especial cada momento de mi vida, gracias por tu amor, amistad, comprensión, tolerancia, gracias por darle luz a mi vida.

Finalmente quiero dar gracias a dos admirables y maravillosas personas, el M. en C. Miguel Ángel Cabral Perdomo, por siempre brindarme su apoyo, amor y confianza, “Gracias por ser parte de mi vida”, y al Dr. Víctor Manuel Bravo Cuevas, gracias por tu amistad y cariño.

Gracias al Programa Anual de Investigación (PAI) 2006 -14B – UAEH “Análisis de polimorfismos genéticos en especies abundantes de aves en el estado de Hidalgo” y al Proyecto SEMARNAT – 2004 – CO1 – 195 “Efectos de urbanización sobre comunidades de aves y mamíferos en los municipios de Pachuca de Soto y Mineral de la Reforma, Hidalgo, México: Parque Ecológico Cubitos”, por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL.....1

- 1.1. ANTECEDENTES.....2
 - 1.1.1. Polimorfismo y marcadores genéticos.....3
 - 1.1.2. Microsatélites en el genoma aviario.....4
- 1.2. JUSTIFICACIÓN.....6
- 1.3. OBJETIVOS.....6
 - 1.3.1. Objetivo general.....6
 - 1.3.2. Objetivos particulares.....6
- 1.4. HIPÓTESIS.....7

CAPÍTULO 2

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE MICROSATÉLITES PARA 34 ESPECIES DE AVES PRESENTES EN EL ESTADO DE HIDALGO.....8

- 2.1. INTRODUCCIÓN.....8
- 2.2. OBJETIVOS.....9
- 2.3. HIPÓTESIS.....9
- 2.4. MATERIAL Y MÉTODOS.....10
 - 2.4.1. Área de estudio.....10
 - 2.4.2. Trabajo de campo.....11
 - 2.4.2. Trabajo de laboratorio.....12
- 2.5. RESULTADOS.....12
- 2.6. DISCUSIÓN.....15
- 2.7. CONCLUSIONES.....17

CAPÍTULO 3

ESTRUCTURA GENÉTICA ENTRE DOS POBLACIONES DISJUNTAS DEL COLIBRÍ *Doricha eliza*.....18

3.1.	INTRODUCCIÓN.....	18
3.1.1.	Descripción de la especie de estudio.....	19
3.2.	OBJETIVOS.....	21
3.3.	HIPÓTESIS.....	21
3.4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
3.4.1.	Muestras genéticas.....	21
3.4.2.	Selección de microsatélites y obtención de productos de PCR.....	22
3.4.3.	Análisis de diversidad genética y estructura poblacional.....	23
3.5.	RESULTADOS.....	23
3.6.	DISCUSIÓN.....	25
3.7.	CONCLUSIONES.....	28

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA PARA UN COMPLEJO HÍBRIDO ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO *Spizella* (*S. pallida* – *Spizella passerina* – *S. atrogularis*).....29

4.1.	INTRODUCCIÓN.....	29
4.1.1.	Descripción de las especies de estudio.....	30
4.2.	OBJETIVOS.....	33
4.3.	HIPÓTESIS.....	34
4.4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
4.4.1.	Área de estudio.....	34
4.4.2.	Trabajo de campo.....	34
4.4.3.	Extracción de DNA y productos de PCR.....	36
4.4.4.	Análisis de diversidad genética y estructura poblacional.....	36
4.5.	RESULTADOS.....	37
4.5.1.	Diversidad genética.....	37
4.5.2.	Estructura genética.....	39
4.5.3.	Dinámica de flujo genético.....	44
4.5.4.	Relaciones alélicas ancestrales y actuales.....	46
4.6.	DISCUSIÓN.....	50
4.6.1.	Diversidad genética.....	50
4.6.2.	Estructura genética.....	51
4.6.3.	Dinámica de flujo genético.....	53
4.6.4.	Relaciones alélicas ancestrales y actuales.....	54
4.7.	CONCLUSIONES.....	56

CAPÍTULO 5.....57

5.1. DISCUSIÓN GENERAL.....57

5.2. CONCLUSIONES GENERALES.....59

LITERATURA CITADA.....60

GLOSARIO.....65

ANEXO A.....70

ANEXO B.....72

ÍNDICE DE CUADROS

2.1.	Intervalo de amplificación en pares de bases (p.b.), detectado en 34 especies de aves presentes en el Parque Ecológico Cubitos y en la Unidad de Manejo Ambiental Rancho Santa Elena en el estado de Hidalgo. NA = No Amplificó.....	12
2.2.	Intervalo de amplificación en pares de bases (p.b.), registrado para cada oligonucleótido y intervalo de amplificación obtenido.....	14
3.1	Registros de recolecta de las muestras de las especies <i>Doricha eliza</i> y <i>Doricha enicura</i>	22
4.1.	Frecuencias alélicas por cada <i>locus</i> y entre especies. Para cada <i>locus</i> se muestran las frecuencias obtenidas por muestra, donde: Sp_1= <i>Spizella atrogularis</i> , Sp_2= <i>Spizella pallida</i> y Sp_3= <i>Spizella passerina</i> . En color gris se muestran los alelos compartidos entre especies y en color azul a los alelos exclusivos.....	37
4.2.	Diversidad genética y riqueza alélica por <i>locus</i> y especie de <i>Spizella</i>	38
4.3.	Sumario de diversidad genética por muestra para cada especie del género <i>Spizella</i> . Donde: número de alelos observados (Na), número efectivo de alelos (Ne), promedio de heterocigotos ($\hat{H}$), promedio de heterocigotos observados ($\hat{H}_o$) y heterocigosidad promedio esperada (diversidad genética de Nei) ($\hat{H}_e$).....	38
4.4.	Sumario de heterocigosidad de Nei, para cada <i>locus</i> se muestra: heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (He), heterocigosidad total (Ht) y porcentaje de polimorfismo (% P).....	39
4.5.	Análisis de grupos para la especies del género <i>Spizella</i> . Para cada comparación realizada se muestra: heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (He).....	39
4.6.	Diferencias genéticas entre especies del género <i>Spizella</i> (Fst). El valor en color gris representa el promedio de Fst para el total de las muestras analizadas.....	40
4.7.	Diferencias genéticas entre individuos de una especie (Fis= nivel de endogamia) por <i>locus</i> y por especie. El valor en color gris representa el promedio de Fis para el total de las muestras analizadas.....	40
4.8.	Diferencias entre individuos con respecto a su especie (Fit). El valor en color gris representa el promedio de Fit para el total de las muestras	

analizadas.....	41
4.9. Comparación de distancias genéticas de Nei (1972/1978) entre especies del género <i>Spizella</i> . Identidad genética sobre la diagonal y distancia genética bajo la diagonal.....	41
4.10. Matriz de flujo genético entre pares de muestras ($M=2Nm$) del género <i>Spizella</i> , en color gris se muestra a las especies con menor flujo genético.....	42
4.11. Componentes de la varianza molecular calculados a partir del método de diferencias alélicas (F_{st}) entre y dentro de las tres muestras de estudio: <i>Spizella atrogularis</i> , <i>S. pallida</i> y <i>S. passerina</i>	43
4.12. Componentes de la varianza molecular calculados a partir del método de diferencias alélicas (F_{st}) entre muestras, entre individuos dentro de cada muestra y diferencias alélicas entre el total de los individuos.....	43
4.13. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) <i>locus</i> por <i>locus</i>	44
4.14. Proporciones de alelos encontrados en cada una de las especies del género <i>Spizella</i>	45

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1.	Áreas de estudio en el estado de Hidalgo. En color azul se muestra la ubicación del Parque Ecológico Cubitos dentro de los municipios de Pachuca de Soto y Mineral de la Reforma; en color amarillo la ubicación de la Unidad de Manejo Ambiental Rancho Santa Elena en el municipio de Huasca de Ocampo; en donde se aprecia el tipo de vegetación y avifauna correspondiente a cada área de muestreo.....	10
2.2.	Proporción de especies con amplificación positiva y no amplificadas para los microsatélites HrU2, FhU2 y Mcu4.....	14
3.1.	Distribución geográfica de la especie <i>Doricha eliza</i> . Las poblaciones registradas para el estado de Veracruz se muestran en círculos color amarillo mientras que las poblaciones para el estado de Yucatán en cuadrados color verde.....	20
3.2.	Frecuencias alélicas para las poblaciones de <i>Doricha eliza</i> de Yucatán y Veracruz obtenidas con el microsatélite HrU2, en donde se observa una notable diferenciación en las frecuencias de los alelos registrados para ambas poblaciones.....	24
3.3.	Dendograma (UPGMA con 1000 repeticiones de remuestreo o <i>bootstrap</i>) de las poblaciones de <i>Doricha eliza</i> de Yucatán y Veracruz; la escala refleja el porcentaje de divergencia (72%).....	24
4.1.	Morfología de individuos adultos de <i>Spizella pallida</i> , <i>S. passerina</i> y <i>S. atrogularis</i>	32
4.2.	Distribución geográfica de las especies: a) <i>Spizella pallida</i> , b) <i>Spizella passerina</i> y c) <i>Spizella atrogularis</i> ; el color azul representa la zona de reproducción, el color naranja la zona de invernación y el color verde la zona de ocupación durante el resto del año.....	33
4.3.	Ubicación del Parque Ecológico Cubitos dentro de los municipios de Pachuca de Soto y Mineral de la Reforma, en el estado de Hidalgo, se muestra en color azul.....	35
4.4.	Estadísticos “F” para el total de las muestras analizadas.....	41
4.5.	Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre las especies analizadas. UPGMA con 1000 repeticiones de <i>bootstrap</i>	42

4.6.	Se observan las tres especies, cada una representada por un color diferente. El color rojo en el complejo uno (1), representa a los individuos de la especie <i>Spizella atrogularis</i> , el color verde en el complejo dos (2), representa a los individuos de la especie <i>S. pallida</i> , el color azul del complejo tres (3), representa a los individuos de la especie <i>S. passerina</i> . Los colores intercalados en cada complejo representan a individuos con trazas de introgresión y porcentajes de retrocruzas.....	45
4.7.	Frecuencias alélicas registradas por individuo para cada muestra analizada. Individuos 1-7, <i>Spizella atrogularis</i> ; individuos 8-18, <i>Spizella pallida</i> ; individuos 19-27, <i>Spizella passerina</i>	45
4.8.	Frecuencias alélicas encontradas en cada una de las muestras.....	46
4.9.	Se observa a <i>Spizella atrogularis</i> como la especie con mayor similitud genética, mientras que las especies <i>Spizella pallida</i> y <i>Spizella passerina</i> muestran mayor dispersión debido a la introgresión y retrocruzas registradas en cada una.....	46
4.10.	Frecuencias ancestrales y actuales para el <i>locus</i> HrU2.....	47
4.11.	Frecuencias ancestrales y actuales para el <i>locus</i> FhU2.....	47
4.12.	Frecuencias ancestrales y actuales para el <i>locus</i> Mcμ4.....	48
4.13.	Frecuencias alélicas por especie para el <i>locus</i> HrU2.....	48
4.14.	Frecuencias alélicas por especie para el <i>locus</i> FhU2.....	49
4.15.	Frecuencias alélicas por especie para el <i>locus</i> Mcμ4.....	49

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluaron un total de cinco microsatélites (HrU2, FhU2, Mcu4, Mcu8 y Ptr4) previamente registrados en diversos grupos de aves, verificándolos como sensores de polimorfismo genético. El estudio se desarrolló en cuatro capítulos; el capítulo uno comprende la introducción general, antecedentes, objetivos e hipótesis. Los restantes tres capítulos se desarrollaron de manera complementaria: el capítulo dos comprende el análisis del polimorfismo genético para tres microsatélites (HrU2, FhU2 y Mcu4) en 13 familias de aves presentes en el Parque Ecológico Cubitos y en la Unidad de Manejo Ambiental Rancho Santa Elena, en el estado de Hidalgo; aquí se registra una ampliación del intervalo de amplificación para estos marcadores y esta es una primera aproximación de un estudio a gran escala en especies mexicanas. Los tres microsatélites anteriores, junto con los microsatélites Mcu8 y Ptr4, se utilizan en los capítulos tres y cuatro como marcadores genéticos en dos modelos para poblaciones naturales en aves, con la finalidad de analizar diferencias genéticas a nivel intraespecífico e interespecífico. En el modelo intraespecífico se analiza la estructura genética y posible divergencia histórica entre dos poblaciones disjuntas del colibrí *Doricha eliza*, endémico a los estados de Yucatán y Veracruz; los resultados muestran que los individuos de *Doricha eliza* de ambas poblaciones presentan un nivel de diferenciación genética considerable, siendo necesario proponer un nuevo estatus taxonómico para ambas poblaciones. En el modelo interespecífico se analiza la estructura genética para el complejo híbrido entre especies del género *Spizella* (*S. pallida* - *S. passerina* - *S. atrogularis*), en el Parque Ecológico Cubitos, en el estado de Hidalgo. Los resultados obtenidos sugieren un proceso antiguo de hibridación e introgresión alélica entre las tres especies del género *Spizella*. El trabajo contempla el análisis de datos de microsatélites con base en la genética de poblaciones clásica y análisis de resultados haciendo uso de software específico para genética evolutiva.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las aves representan uno de los grupos biológicos de mayor biodiversidad y amplia distribución a nivel mundial. México cuenta con aproximadamente 1,200 especies y, de acuerdo con datos recientes sobre sus relaciones taxonómicas, cerca de 250 son endémicas (Torres-Chávez y Navarro-Sigüenza, 2000). Además, más de la mitad de las aves migratorias de Norteamérica pasan entre seis y ocho meses del año en el país.

Tal riqueza biológica es un reflejo que conjunta varios factores, como la posición geográfica, la historia geológica, una heterogeneidad topográfica y climática, además de la diversidad de ambientes (Ceballos y colaboradores, 2000), lo que hace que esta región sea reconocida como un importante centro de evolución de diferentes grupos taxonómicos (Torres-Chávez y Navarro-Sigüenza, 2000).

En México, la mayoría de las investigaciones sobre aves se han enfocado a las áreas taxonómica, ecológica y biogeográfica. En particular, diversos estudios taxonómicos han enriquecido el conocimiento de la diversidad de especies, sin embargo, hay pocos estudios que contemplan la diversidad genética.

En la última década, los enfoques genéticos que responden a cuestiones ecológicas han resultado ser una herramienta eficiente, poderosa, flexible y muy difundida. Los marcadores genéticos como aloenzimas, microsatélites y secuencias de DNA mitocondrial y nuclear, han permitido evaluar parámetros de interés para los ecólogos, como la determinación del tamaño poblacional, la evaluación de tasas de migración y eventos de cuellos de botella, que permiten evaluar modelos de zonas híbridas, variación y estructura genética, flujo genético inter e intrapoblacional e hipótesis sobre la genética histórica de las especies, parentesco y otros más (Sunnucks, 2000; Selkoe y Toonen, 2006).

En el presente trabajo se evaluaron tres microsatélites (HrU2, FhU2 y Mcu4) verificándolos como sensores de polimorfismo genético en 13 familias de aves presentes en el Parque Ecológico Cubitos y en la Unidad de Manejo Ambiental Rancho Santa Elena, en el estado de Hidalgo. Se utilizaron herramientas de genética molecular y poblacional para evaluar diferencias a nivel intra e interespecífico en dos modelos de poblaciones naturales: *i)* el análisis de la estructura genética y posible divergencia histórica entre dos poblaciones

disjuntas del colibrí *Doricha eliza*, endémico de los estados de Yucatán (Reserva de la Biosfera Celestún y Reserva de la Biosfera Río Lagartos) y Veracruz; y ii) el análisis de la estructura genética para un complejo híbrido entre especies del género *Spizella* (*S. pallida* - *S. passerina* - *S. atrogularis*), en el Parque Ecológico Cubitos, en el estado de Hidalgo.

Hoy en día no se cuenta con información sobre marcadores moleculares que describan procesos microevolutivos en la avifauna de las zonas de estudio. En respuesta a esto, se trabajó en la búsqueda de *loci* especie-específicos que permitieran determinar niveles de diversidad, estructura y flujo genéticos dentro de modelos de poblaciones naturales, para sustentar con ello la hipótesis de que la sensibilidad de los microsatélites (como marcadores moleculares) es suficiente para evaluar diferencias genéticas a nivel intra e interespecífico en grupos biológicos diversos, como las aves. Así, el objetivo general planteado en este trabajo fue evaluar los niveles de polimorfismo genético para cinco microsatélites en 34 especies de aves y probar la sensibilidad de éstos a nivel intra e interespecífico en dos modelos de poblaciones naturales.

1.1 ANTECEDENTES

Ante la necesidad, en Biología de Conservación, de responder a preguntas de importancia ecológica y evolutiva, y debido a que la mayoría de las veces se cuenta con recursos limitados para resolverlas, se hizo necesaria la búsqueda de nuevos métodos y herramientas que permitieran establecer estudios más completos y mejores en dicha área. Fue entonces cuando una nueva disciplina surgió, la Ecología y la Genética de Poblaciones se fusionaron para dar origen a la Ecología Molecular (Sunnucks, 2000).

Dentro de esta nueva disciplina los datos genéticos han brindado una herramienta poderosa para aquellos interesados en la Ecología, al combinarlos con la información conductual, demográfica o espacial. Con el tiempo, los adelantos tecnológicos ampliaron la lista de preguntas que podían contestarse empleando la información genética de los organismos, obteniendo respuestas a diversos niveles (interindividual o interespecífico) y a distintas escalas temporales y espaciales, siempre dentro de un contexto evolutivo; permitiendo además usar estos datos para evaluar sistemas de hibridación, flujo de genes, tamaño efectivo y viabilidad de poblaciones (DeYoung y Honeycutt, 2005).

En años recientes, los avances en el área de Genética Molecular incrementaron el impacto de la genética de poblaciones en la biología. Entre los eventos de mayor relevancia se encuentran: (1) la amplificación de DNA *in vitro*, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, conocida en inglés por las siglas PCR; (2) el desarrollo de marcadores genéticos; (3) las mejoras en el área tecnológica computacional que han inspirado el uso intensivo de aproximaciones estadísticas de máxima verosimilitud, así como (4) la creación de software específico para genética evolutiva (Sunnucks, 2000; Selkoe y Toonen, 2006). Estos nuevos enfoques permiten emplear más información en grupos de datos que resumen las aproximaciones estadísticas tradicionales y describen la demografía e historia de las poblaciones así como las relaciones genéticas entre los individuos de una manera detallada y exacta (Sunnucks, 2000; Selkoe y Toonen, 2006).

1.1.1 Polimorfismo y marcadores genéticos

El polimorfismo genético hace referencia a la existencia, dentro de una población, de múltiples alelos para un gene específico. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de una región determinada dentro del DNA entre los individuos de una población. Aquellos polimorfismos que afectan a secuencias codificantes o reguladoras y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos (variación fenotípica; Puertas, 1992; Cummings y Klug, 1999).

Así, un polimorfismo puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada; por ejemplo, la sustitución de una A (adenina) por una C (citosa) o puede ser más complicado; por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de DNA, donde un porcentaje de individuos tenga un determinado número de copias de una secuencia en particular (Puertas, 1992; Cummings y Klug, 1999).

Los marcadores genéticos son biomoléculas (proteínas: antígenos e isoenzimas; DNA: genes conocidos o fragmentos de secuencia) que pueden relacionarse con un rasgo hereditario (Koreth y colaboradores, 1996). Ejemplos de marcadores genéticos son los RFLP's (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*; Fragmentos Polimórficos de Longitud por Restricción), SSR's (*Simple Sequence Repeats* o *Short Tandem Repeats*; Secuencias Simples Repetidas), SNP's (*Single Nucleotide Polymorphisms*; Polimorfismos de un Solo Nucleótido),

mtDNA (Mitochondrial DNA Markers; Marcadores de DNA Mitocondrial), AFLP's (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*; Fragmentos Polimórficos de Longitud por Amplificación). Los marcadores genéticos más utilizados son los basados en clonación y secuenciación de fragmentos de DNA específicos, mientras que otros, más aleatorios, se basan en la detección de polimorfismos al azar (Dodgson y colaboradores, 1997).

Un marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad: poseer una buena distribución a lo largo del genoma, presentar un alto grado de polimorfismo (variación dentro de una especie o grupo de individuos), la técnica para analizar el marcador debe ser rápida y práctica, además debe poder repetirse con fiabilidad en otros laboratorios (Cheng y Crittenden, 1994). Las aplicaciones de los marcadores genéticos son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos.

Actualmente, los marcadores genéticos se emplean en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad genética intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades y análisis de dispersión de especies (Koreth y colaboradores, 1996).

1.1.2 Microsatélites en el genoma aviario

Los microsatélites (Koreth y colaboradores, 1996), consisten en pequeñas secuencias con dos a seis nucleótidos repetidos en tándems, altamente variables en tamaño, en un intervalo entre 100-200 pares de bases (p.b.). En genomas eucariontes las secuencias de los microsatélites son muy frecuentes, bien distribuidas y mucho más polimórficas que los *loci* hipervariables formados por minisatélites, constituyendo la clase de marcadores moleculares más polimórficos que se conocen, es decir, son altamente sensibles para detectar variabilidad genética (Gibbs y colaboradores, 1997).

Los microsatélites han demostrado ser de los marcadores genéticos más informativos; la mayoría de los estudios realizados hasta el momento con este tipo de secuencias genéticas se basa en el análisis de frecuencias alélicas, con la finalidad de crear mapas genéticos y posteriormente para la determinación de QTL's (*Quantitative Trait Loci*; Características cuantitativas asociadas a *loci* específicos), para la identificación individual y relaciones de

parentesco, evaluación de polimorfismos, además de estudios poblacionales y evolutivos (Georges y colaboradores, 1995; Velmala y colaboradores 1999).

El genoma de las aves es muy pequeño, en comparación con el de los mamíferos (1.2×10^9 p.b. en el genoma aviario *versus* 3×10^9 p.b. en mamíferos, de acuerdo a Gibbs y colaboradores, 1997). Sus intrones son más cortos y presentan menos elementos repetitivos (Primmer y colaboradores, 1997). Puesto que el número de microsatélites suele tener una correlación positiva con el tamaño del genoma, existen una gran cantidad de trabajos que constatan la escasez de microsatélites en el genoma de las aves en comparación con el de los mamíferos (Primmer y colaboradores, 1997; Gibbs y colaboradores, 1997; Ponsuksili y colaboradores, 1999). Se estima que en las aves se encontraría, como media, un microsatélite pequeño (tomando como modelo $(CA)_{10}$) cada 20-39 Kilobases (Kb) y hasta uno cada 136-150 Kb para microsatélites mayores (Primmer y colaboradores, 1997). Ello supone, por ejemplo, entre 10 y 20 veces menos que en humanos.

Además, para este grupo biológico, los microsatélites se han empleado en estudios ecológicos, de comportamiento sexual y en biología evolutiva. Ellegren (1992) los utilizó para detectar fertilizaciones foráneas en aves silvestres. En otro trabajo, se estudió la fidelidad al nido, año tras año, del *Falco peregrinus*, mediante el análisis de los polluelos de las distintas temporadas (Nesje y colaboradores, 2000). La utilidad y fiabilidad de los microsatélites se ha utilizado en casos en los que no se tienen datos previos de ninguno de los progenitores y en especies de aves de incubación parásita (por ejemplo: el estudio realizado en *Molothrus ater* por Alderson y colaboradores, 1999). Primmer y colaboradores (1996), sugirieron la posibilidad de utilizar los microsatélites como marcadores genéticos para la identificación de híbridos y sus especies de origen. Borge y colaboradores (2001) analizaron eventos de hibridación introgresiva entre las especies *Ficedula albicollis* y *Ficedula hypoleuca* haciendo uso de datos generados por microsatélites.

En evolución de polimorfismos y análisis poblacionales, el estudio de estos marcadores permite la identificación de cada alelo por *locus* y obtener datos poblacionales tales como las frecuencias alélicas, que a su vez permiten estimar distancias genéticas entre poblaciones (Ponsuksili, 1999). Para este tipo de aproximaciones se han desarrollado nuevos métodos estadísticos, que se ajustan a los datos generados por estos marcadores (England, 1999). En aves hay pocos estudios poblacionales realizados mediante microsatélites, tanto en especies

silvestres (Dawson y colaboradores, 1997) como domésticas, por ejemplo, con pollos (Takahashi y colaboradores, 1998; Ponsuksili y colaboradores, 1999).

1.2 JUSTIFICACIÓN

La combinación de herramientas de análisis matemático y datos moleculares (marcadores genéticos) ha demostrado ser una técnica poderosa para determinar el estatus evolutivo de las especies, lo que permite proponer estrategias adecuadas de conservación, restauración y manejo de especies vulnerables, tomando en cuenta no solamente al hábitat y a los individuos dentro de las especies, sino considerando también el acervo genético de las mismas y las diferentes interacciones que se establecen entre los individuos, el hábitat y el genoma. Actualmente no se cuenta con información sobre marcadores moleculares que describan procesos microevolutivos en la avifauna de regiones prioritarias como las áreas naturales protegidas, el caso de los modelos en este estudio.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general:

- Evaluar los niveles de polimorfismo genético en tres microsatélites de aves y probar la sensibilidad de éstos a nivel intraespecífico e interespecífico dentro de dos modelos de poblaciones naturales.

1.3.2 Objetivos particulares:

- Seleccionar microsatélites altamente polimórficos para diferentes especies de aves con abundancia elevada en el Parque Ecológico Cubitos y en la Unidad de Manejo Ambiental rancho Santa Elena, en el estado de Hidalgo (Capítulo 2).
- Determinar por medio de un muestreo piloto, la estructura genética de las poblaciones de *Doricha eliza* a lo largo del intervalo de distribución de la especie empleando marcadores genéticos como microsatélites (Capítulo 3).
- Analizar la estructura genética del complejo híbrido para poblaciones del género *Spizella* (*S. pallida* - *S. passerina* - *S. atrogularis*), en el Parque Ecológico Cubitos (Capítulo 4).

1.4 HIPÓTESIS

- Es posible emplear marcadores genéticos, particularmente microsatélites, como sensores de polimorfismo genético en diversos *taxa* de aves dentro de algunas áreas naturales protegidas, para evaluar la variabilidad genética de especies vulnerables.
- La sensibilidad de dichos marcadores es suficiente para evaluar diferencias a nivel intraespecífico e interespecífico en dos modelos de poblaciones naturales: el colibrí *Doricha eliza* y un posible complejo híbrido entre las poblaciones migratorias del género *Spizella*, perteneciente a la familia Emberizidae.

CAPÍTULO 2

POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE MICROSATÉLITES PARA 34 ESPECIES DE AVES EN EL ESTADO DE HIDALGO

2.1 INTRODUCCIÓN

El polimorfismo genético (la ocurrencia de alelos múltiples en un locus, donde al menos dos alelos aparecen con una frecuencia $>1\%$ en la población general; Cummings y Klug, 1999) ha sido ampliamente estudiado en poblaciones naturales, pues permite analizar fenómenos como la variabilidad y estructura genéticas dentro y entre poblaciones, resolviendo preguntas en un contexto ecológico y evolutivo, como: la determinación de rutas de colonización postglaciales, análisis de influencia de la variación genética en procesos de selección sexual y evolución de historias de vida, patrones de hibridación y flujo genético en especies cercanas y la elucidación de conceptos controversiales como la especiación, entre otros (DeYoung y Honeycutt, 2005; Borge y colaboradores, 2005; Selkoe y Toonen, 2006).

Sin embargo, para que un marcador genético sea útil identificando estos eventos, es necesario que posea un nivel de polimorfismo adecuado; es decir, que rastree el suficiente número de alelos para determinar las relaciones genéticas existentes entre los individuos y dentro y entre poblaciones. Para el caso particular de marcadores nucleares, es deseable que se identifiquen, al menos, entre cinco y doce alelos distintos dentro de una población. Dichos marcadores deberán ser, además, codominantes con herencia mendeliana y, de preferencia, con una utilidad de amplio espectro (que se puedan detectar en diversas especies).

Actualmente, el uso de marcadores moleculares como los microsatélites presentan grandes ventajas para este tipo de aplicaciones, como herramienta importante para el análisis de la variación genética y para el estudio de relaciones evolutivas en las poblaciones (Bruford y Wayne, 1993), por el hecho de constituir la clase de marcadores moleculares más polimórficos que se conocen (Gibbs y colaboradores, 1997). Sin embargo, la principal desventaja de éstos radica en que, para estudios ecológicos, usualmente se requiere desarrollar *loci* especie-específicos. Esto porque los oligonucleótidos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa precisan de un alto grado de similitud para amplificar los genes analizados (Jarne y Lagoda, 1996).

Una solución a este problema consiste en emplear microsatélites desarrollados en especies con relaciones evolutivas cercanas. En algunos casos, las regiones que flanquean a los microsatélites se encuentran altamente conservadas y amplifican productos homólogos en algunas especies relacionadas. En varios estudios se ha aprovechado esta capacidad para análisis genéticos (Ellegren, 1992; Primmer, 1996; Loyau, 2005), pero pocos se han realizado a gran escala (por ejemplo: los trabajos de Primmer y colaboradores, 1996; Dallimer, 1999), éstos últimos destinados a encontrar secuencias flanqueantes que pudieran ser utilizadas en la amplificación de *loci* específicos de microsatélites de amplio espectro, así como ayudar a la determinación de los tipos de familias en las cuales se agrupan estas secuencias repetidas (Jarne y Lagoda, 1996).

En respuesta a la problemática anteriormente expuesta, en este proyecto se evaluó el nivel de polimorfismo genético de tres microsatélites nucleares (HrU2, McμU4 y FhU2) en 34 especies de aves distribuidas en 13 familias presentes en el Parque Ecológico Cubitos y en la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) rancho Santa Elena, en el estado de Hidalgo.

2.2 OBJETIVOS

- Evaluar la sensibilidad, medida como la capacidad de amplificación, de tres microsatélites (registrados previamente), en 34 especies de aves presentes en el estado de Hidalgo.
- Determinar los intervalos de amplificación para 13 familias de aves presentes en el estado de Hidalgo.
- Evaluar los niveles de polimorfismo genético para cada uno de los microsatélites analizados.

2.3 HIPÓTESIS

Es posible utilizar microsatélites previamente registrados como marcadores de amplio espectro (es decir, que se encuentran presentes en especies diversas), como marcadores polimórficos para diferentes *taxa* de aves dentro de regiones prioritarias en el estado de Hidalgo, definidas como reservas ecológicas.

2.4 MATERIAL Y MÉTODOS

2.4.1 Área de estudio

El área de estudio comprende dos zonas de importancia para aves residentes y migratorias en el estado de Hidalgo:

1) *Parque Ecológico Cubitos*. Se localiza en la porción sur del estado de Hidalgo, dentro de la región sureste de la ciudad de Pachuca, en la zona conurbada de los municipios de Pachuca de Soto y Mineral de la Reforma, entre las coordenadas 20° 06' 33" y 20° 07' 39" de longitud norte y 98° 45' 00" y 98° 44' 60" de latitud oeste (Figura 2.1). Su altitud oscila entre los 2,245 y 2,495 metros. El parque cuenta con una extensión aproximada de 90 hectáreas, la mayoría de las cuales mantienen la vegetación original, que incluye la presencia de tres subtipos del matorral xerófito (micrófilo, rosetófilo y crasicaule) todos con distribución relictual, siendo las especies predominantes *Opuntia robusta*, *Agave lechuguilla*, *A. salmiana*, *Mamilaria magnanima* y *Mimosa biuncifera*, (Periódico Oficial del estado de Hidalgo, 2002).

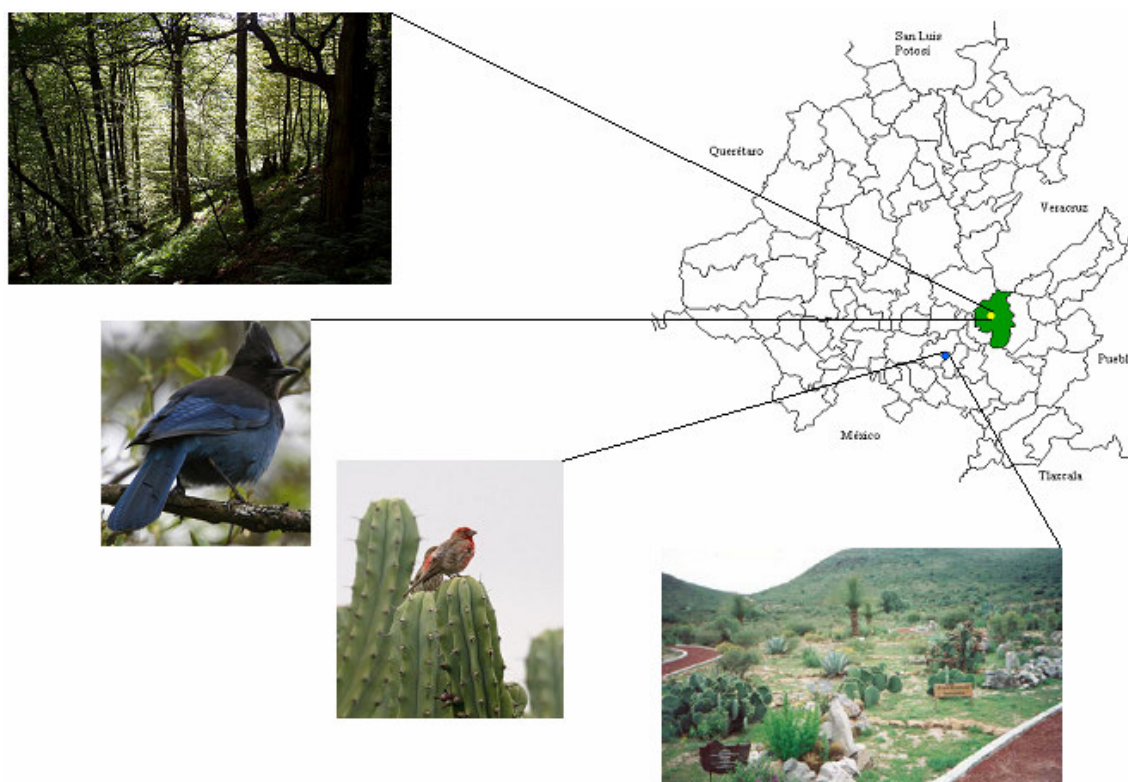


Figura 2.1. Áreas de estudio en el estado de Hidalgo. En color azul se muestra la ubicación del Parque Ecológico Cubitos dentro de los municipios de Pachuca de Soto y Mineral de la Reforma; en color amarillo la ubicación de la Unidad de Manejo Ambiental Rancho Santa Elena en el municipio de Huasca de Ocampo; en donde se aprecia el tipo de vegetación y avifauna correspondiente a cada área de muestreo.

2) *Unidad de Manejo Ambiental, Rancho Santa Elena*. Se localiza en la sierra de la Navajas, en el extremo sureste del municipio de Huasca de Ocampo, en el estado de Hidalgo, entre las coordenadas 20° 06' 07" y 20° 09' 50" de latitud norte; 98° 30' 04" y 98° 32' 06" de longitud oeste (Figura 2.1), con altitudes que van de 2,300 a 2,900 metros. Los tipos de vegetación predominantes son: bosque de pino, bosque de encino, bosque de pino-encino y pastizal, siendo las especies más abundantes *Pinus teocote*, *P. moctezumae*, *P. patula*, *Quercus laurina*, *Q. crassifolia* y *Q. rugosa* (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1991). Para este estudio se eligieron dos sitios en una zona de pino-encino; el primero se encuentra a una altitud de 2,505 metros, entre las coordenadas 20° 07' 19" de latitud norte y 98° 31' 22" de longitud oeste; el segundo sitio se encuentra a una altitud de 2,535 metros, en las coordenadas 20° 07' 48" de latitud norte y 98° 31' 16" de longitud oeste (Figura 2.1).

2.4.2 Trabajo de campo

Se realizaron recolectas en las dos áreas de estudio, entre los meses de marzo y octubre de 2006 y marzo de 2007, cada área fue seleccionada en función del tipo de vegetación predominante (matorral y arbustivo para el Parque Ecológico Cubitos y bosque de pino-encino para la Unidad de Manejo Ambiental, Rancho Santa Elena) y abundancia de aves.

La captura de los ejemplares se realizó con la ayuda de redes de niebla (de dos a tres redes por tipo de vegetación), los tamaños de muestra se definieron en función de la densidad de individuos presentes en los sitios de recolecta. Aunque se pretendió trabajar con, al menos, 10 individuos por especie, en algunos casos resultó imposible completar el número de muestra, debido a la baja densidad de individuos.

Una vez capturados, los individuos fueron identificados con la ayuda de guías de campo (Howell y Webb, 1995; Peterson y Chalif, 2000), se midieron y pesaron y posteriormente fueron marcados con anillos de aluminio numerado para evitar la duplicación de muestras. Enseguida se procedió a la toma no invasiva de una muestra de sangre por individuo para el análisis genético. Esta muestra se obtuvo mediante un corte de la uña en una pata, lo suficientemente grande para obtener una gota de sangre de 1-4 µl, de tal manera que no se sacrificara ni dañara permanentemente a ningún individuo. La colección de sangre se llevó a cabo empleando tarjetas para muestras forenses FTA de la marca Whatman.

2.4.3 Trabajo de laboratorio

La extracción de DNA total se llevó a cabo mediante técnicas forenses (Protocolo FTA Cards de la marca Whatman. Ver Anexo A) para cada muestra de sangre obtenida; se seleccionaron tres secuencias de microsatélites previamente registrados en aves (HrU2 y FhU2: Primmer y colaboradores, 1996; Mcμ4: Beck y colaboradores, 2003. Ver Anexo A), para verificar la amplificación de, al menos, 30 *loci* polimórficos para todas las especies mediante la técnica modificada de William y colaboradores (1990).

Los productos de la PCR fueron separados con cámara de electroforesis vertical (10 volts/cm) en geles de poliacrilamida y revelados mediante tinción estándar con bromuro de etidio. Se evaluaron el tamaño y número de alelos amplificados obtenidos para cada microsatélite y se verificó el intervalo de amplificación obtenido, con respecto a lo registrado en la literatura.

2.5 RESULTADOS

Se analizaron los *loci* amplificados para 129 individuos, de 34 especies, distribuidos en 13 familias presentes en el Parque Ecológico Cubitos y en la UMA Rancho Santa Elena, en el estado de Hidalgo (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Intervalo de amplificación en pares de bases (p.b.), detectado en 34 especies de aves presentes en el Parque Ecológico Cubitos y la Unidad de Manejo Ambiental Rancho Santa Elena en el estado de Hidalgo.

			Intervalo de amplificación en p.b.		
Especie	Sitio de recolecta	Individuos	HrU2	FhU2	Mcμ4
NO PASERIFORMES					
Familia Columbidae					
<i>Columbina inca</i>	PEC	12	115	85	102
<i>Columbina passerina</i>	PEC	2	110-120	85	102-140
Familia Trochilidae					
<i>Cyananthus latirostris</i>	PEC	5	95	85-100	NA
<i>Hylocharis leucotis</i>	RSE	1	200-220	NA	NA
<i>Lampornis clemenciae</i>	RSE	1	NA	95-100	NA
<i>Eugenes fulgens</i>	RSE y PEC	3	105	85-90	102
<i>Calothorax lucifer</i>	PEC	1	120	NA	NA
<i>Archilochus colubris</i>	PEC	1	NA	NA	NA

NA = No Amplificó; PEC = Parque Ecológico Cubitos; RSE = UMA Rancho Santa Elena

Continuación Cuadro 2.1.

Especie	Sitio de recolecta	Individuos	Intervalo de amplificación en p.b.		
			HrU2	FhU2	Mcp4
PASERIFORMES					
Familia Tyrannidae					
<i>Contopus sordidulus</i>	PEC	2	95-150	105	NA
<i>Empidonax flaviventris</i>	PEC	1	200-220	120-150	110-188
<i>Empidonax occidentalis</i>	RSE y PEC	3	200-220	NA	NA
<i>Pyrocephalus rubinus</i>	PEC	4	125	95	102-140
Familia Corvidae					
<i>Cyanocitta stelleri</i>	RSE	1	155	80-90	108-150
Familia Troglodytidae					
<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>	PEC	2	NA	110	NA
<i>Trychomanes bewickii</i>	PEC	7	95-160	85-135	102-150
Familia Regulidae					
<i>Regulus calendula</i>	PEC	1	NA	NA	NA
Familia Turdidae					
<i>Myadestes occidentalis</i>	RSE	1	NA	NA	NA
<i>Catharus occidentalis</i>	RSE	2	95-150	80-90	100-150
<i>Catharus guttatus</i>	PEC	1	NA	NA	NA
<i>Turdus migratorius</i>	RSE	2	155-160	90	108
Familia Mimidae					
<i>Toxostoma curvirostre</i>	PEC	11	120-125	95-135	NA
Familia Bombycillidae					
<i>Bombycilla cedrorum</i>	PEC	6	NA	NA	NA
Familia Parulidae					
<i>Dendroica nigrescens</i>	PEC	1	NA	NA	NA
<i>Mniotilta varia</i>	PEC	1	NA	105	NA
<i>Wilsonia pusilla</i>	PEC	2	NA	80-100	NA
Familia Emberizidae					
<i>Pipilo fuscus</i>	PEC	2	155-160	NA	100
<i>Spizella passerina</i>	PEC	9	40-65	90	90-160
<i>Spizella pallida</i>	PEC	13	120-130	90	100-110
<i>Spizella atrogularis</i>	PEC	6	135	90	126-168
<i>Melospiza lincolnii</i>	PEC	1	NA	95-100	NA
Familia Icteridae					
<i>Molothrus aeneus</i>	PEC	1	125-155	85	NA
<i>Icterus parisorum</i>	PEC	4	120-130	90	138
Familia Fringillidae					
<i>Carpodacus mexicanus</i>	PEC	18	150-155	NA	108-188
<i>Carduelis psaltria</i>	PEC	1	NA	NA	NA

NA = No Amplificó; PEC = Parque Ecológico Cubitos; RSE = UMA Rancho Santa Elena

Las especies en las que no se registró amplificación alguna para los tres microsatélites fueron: *Archilochus colubris*, *Myadestes occidentales*, *Dendroica nigrescens*, *Catharus guttatus*, *Carduelis psaltria*, *Regulus calendula* y *Bombycilla cedrorum* (Cuadro 2.1).

De los tres *loci* analizados, FhU2 y HrU2 amplificaron en un total de 10 familias y 22 especies por cada microsatélite, seguidos de Mcμ4, con un total de nueve familias con amplificación positiva en 15 especies (Figura 2.2).

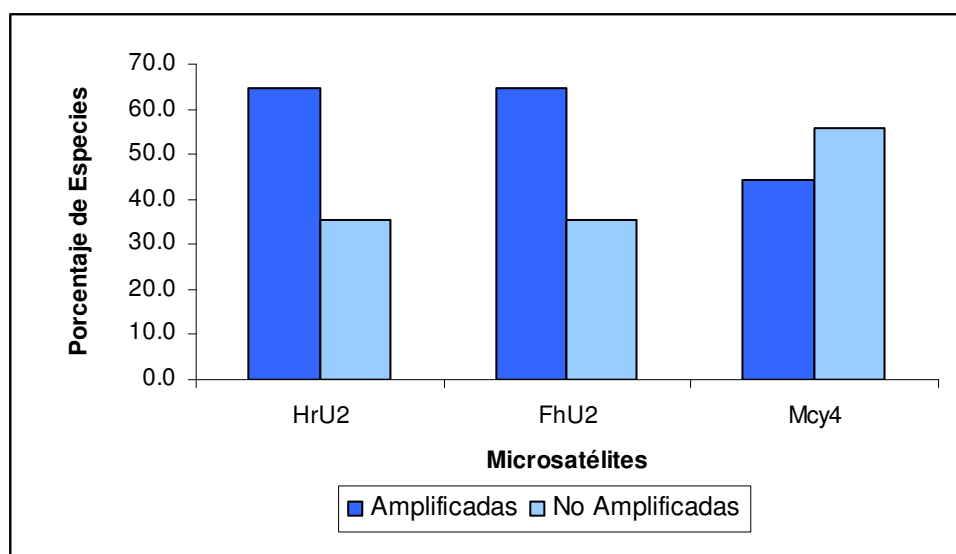


Figura 2.2. Proporción de especies con amplificación positiva y no amplificadas para los microsatélites HrU2, FhU2 y Mcμ4.

Los resultados para los tres *loci* analizados (HrU2, Mcμ4 y FhU2), mostraron diferencias con respecto al intervalo de amplificación registrado originalmente (Primmer y colaboradores, 1996; Double y colaboradores; 1997; Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Intervalo de amplificación en pares de bases (p.b.), registrado para cada oligonucleótido y intervalo de amplificación de microsatélites obtenido en este estudio.

Oligonucleótido	Referencia	Intervalo registrado	Intervalo obtenido
HrU2	Primmer y colaboradores (1996)	115-145 (p. b.)	40-220 (p. b.)
FhU2	Primmer y colaboradores (1996)	122-142 (p. b.)	80-150 (p. b.)
Mcμ4	Beck y colaboradores (2003)	140-188 (p. b.)	90-188 (p. b.)

2.6 DISCUSIÓN

Ante el dilema de contar con un número reducido de microsatélites en el genoma de las aves (Primmer y colaboradores, 1997; Gibbs y colaboradores, 1997; Ponsuksili y colaboradores, 1999), resulta necesaria la búsqueda de marcadores de amplio espectro. Una solución a esta problemática ha sido el desarrollar microsatélites en especies con relaciones evolutivas cercanas. Con base en lo anterior, en este estudio se trabajó en la búsqueda de *loci* especie-específicos y se logró incrementar el intervalo de amplificación de los microsatélites utilizados en 34 especies, todas localizadas en el estado de Hidalgo. Este registro demuestra la amplia distribución de microsatélites homólogos en una diversidad de familias y especies de aves, lo que permitirá a futuro, contar con marcadores polimórficos ya evaluados, con posibles aplicaciones a análisis genéticos y evolutivos intra e interespecíficos.

Como se observa en la Figura 2.2, los microsatélites HrU2 y FhU2, mostraron proporciones significativas de amplificación, resultado que Primmer y colaboradores (1996) obtuvieron al probar dichos microsatélites en 19 especies de aves no Paseriformes y 40 especies Paseriformes. En los resultados obtenidos, la diferencia en la proporción del número de especies en las que se amplificó el microsatélite Mcμ4, en comparación con los microsatélites HrU2 y FhU2 es considerable, sin embargo, los resultados para el microsatélite Mcμ4, son altamente significativos, pues el número de especies empleado aquí es mucho mayor.

En el 2003, Beck y colaboradores desarrollaron el microsatélite Mcμ4 para un estudio llevado a cabo en 392 individuos de la especie *Malurus cyaneus*, con la finalidad de observar la evolución e hipervariabilidad de dicho microsatélite. El intervalo de amplificación registrado hasta entonces era el que se observa en la Cuadro 2.2, con el presente estudio el intervalo se incrementó considerablemente tras analizar a ocho especies de aves no Paseriformes y 26 especies Paseriformes.

Las diferencias entre los intervalos de amplificación registrados y los obtenidos en este estudio se deben a que las especies aquí analizadas no se habían analizado antes con marcadores genéticos. Esto se considera una ampliación dentro del espectro de amplificación para estos marcadores e implica la inclusión de nuevas especies en el mismo. Además, no se había registrado un mapeo a gran escala para polimorfismo genético en aves mexicanas y este trabajo es una primera aproximación.

La relevancia de los polimorfismos genéticos para grupos biológicos como las aves implica determinar, de una manera confiable, niveles de riqueza genética, diversidad, estructura y flujo genéticos; parámetros que al combinarse con variables ecológicas y morfológicas, son de gran importancia en el área de conservación y protección de recursos genéticos en especies vulnerables.

Además, la amplificación positiva de genes polimórficos dentro de especies sin relaciones filogenéticas cercanas, como en este caso, permite corroborar datos previamente registrados, donde no se registra una relación directa entre la especie de donde se obtiene un microsatélite polimórfico de amplio espectro y las posibles especies donde puede amplificar positivamente (Primmer y colaboradores, 2005). Esto implica que, dentro del genoma aviar se encuentran secuencias consenso asociadas a los microsatélites, las cuales están altamente conservadas en el mismo, lo que permite que se localicen en especies sin relaciones cercanas aparentes y dichos marcadores son útiles para determinar procesos microevolutivos dentro de grupos diversos de especies, aunque no son recomendables para establecer relaciones evolutivas, puesto que su detección en el genoma no sigue un patrón filogenético.

2.7 CONCLUSIONES

- Los tres microsatélites empleados como marcadores presentan un alto grado de polimorfismo genético, reflejado en el número alelos amplificados por familia y especie.
- Se ha ampliado el intervalo de amplificación para los microsatélites HrU2, Mcμ4 y FhU2, para un total de 34 especies, localizadas dentro del estado de Hidalgo.
- Los intervalos de amplificación registrados son una primera aproximación para análisis de genética poblacional en diferentes *taxa* de aves.
- La contribución realizada al intervalo de amplificación resulta ser altamente significativa, tomando en cuenta la escasez de *loci* especie-específicos en aves.

CAPÍTULO 3

ESTRUCTURA GENÉTICA ENTRE DOS POBLACIONES DISJUNTAS DEL COLIBRÍ *Doricha eliza*

3.1 INTRODUCCIÓN

Cuando diferentes poblaciones dentro de una especie son sometidas a distintas condiciones ambientales sostenidas por varias generaciones, ocurren diversos cambios de tipo variado y, si su magnitud es suficiente, una especie puede dividirse en dos o más especies contemporáneas (Mettler y Gregg, 1982). La formación de especies requiere del aislamiento reproductivo de las poblaciones; pero antes de que este aislamiento se establezca es necesario que haya cierta separación física (Cummings y Klug, 1999).

Quizá el tipo más común de separación sea el geográfico; esto con frecuencia produce una especie en la que los fenotipos de una región difieren, gradual e imperceptiblemente, con respecto a los que son típicos de otras regiones, permitiendo la formación de una clina de selección. Así, el aislamiento geográfico puede conducir a la diferenciación local aunque no haya líneas claras de demarcación entre las poblaciones. En todos los casos, los tipos de aislamiento (geográfico y ecológico) pueden ser suficientes para interrumpir el flujo de genes e iniciar una diferenciación genética importante entre poblaciones de la misma especie (Mettler y Gregg, 1982).

Para establecer si las poblaciones de una especie pertenecen a *taxa* genéticamente diferentes, se recurre a la aplicación de herramientas como los marcadores moleculares, software específico para genética evolutiva y análisis intra-específicos, los cuales pueden ayudar en la evaluación de las relaciones espaciales entre las poblaciones para reconocer su estructura y distinguir flujo de genes, aislamiento histórico o actual, efecto de deriva genética, entre otros (DeYoung y Honeycutt, 2005).

En el presente estudio se realizó un muestreo piloto para analizar la estructura genética de las dos poblaciones disjuntas del colibrí *Doricha eliza*, endémico de los estados de Yucatán y Veracruz, suponiendo que tal vez dichas poblaciones podrían ser, en realidad, *taxa* distintos. Bajo la hipótesis de la existencia de suficiente aislamiento ecológico y geográfico en ambas poblaciones de *Doricha eliza*, se llevaron a cabo análisis con microsatélites como marcadores

genéticos, con la finalidad de determinar si los individuos de Yucatán y Veracruz pertenecen a *taxa* genéticamente diferentes.

3.1.1 Descripción de la especie de estudio

Doricha eliza es una especie de colibrí endémica de México, cuya distribución comprende dos regiones geográficas separadas entre sí por más de 650 Km. (Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002), una en el centro del estado de Veracruz y otra en el norte de la Península de Yucatán (Figura 3.1). La biología y la ecología de la especie son en su mayoría desconocidas. Se tienen datos dispersos sobre su anidación, conducta de apareamiento, alimentación (Ortiz-Pulido y Díaz, 2001) y requerimientos ecológicos (Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002).

Morfología: *Doricha eliza* es un colibrí pequeño de color verde-bronce; el macho posee una gargantilla iridiscente rojo-rosado y el pico largo y curvado, la cola es larga y bifurcada con las plumas externas negras, las márgenes internas entretejidas de color claro canela. La hembra no posee la gargantilla, es de color bronce intenso en la parte superior, la cola relativamente pequeña, la base de las plumas externas leonadas, con las puntas blancas y una banda subterminal negra (Howell y Webb, 1995; Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002). Aparentemente, los machos adultos de la población de Veracruz, comparados con los de la población de Yucatán, poseen el babero menos prolongado; en el caso de los individuos juveniles de la población de Veracruz, se registra que pueden alcanzar el plumaje adulto más rápidamente que los de Yucatán (Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002).

Evidencia conductual y ecológica sugiere que en realidad se trata de, al menos, dos especies diferentes (Torres-Chávez y Navarro-Sigüenza, 2000; Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002), sin embargo, la evidencia morfológica no es concluyente (Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002).

En una búsqueda sistemática realizada en Veracruz (Ortiz-Pulido y Díaz, 2001; Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002), se encontró que la población de ese lugar se distribuye en un área elipsoidal de 800 Km², localizada entre los 110 y los 1390 metros de altitud, ocupando en su mayoría matorral xerófito poco perturbado y el resto en paisajes dominados por bosque de pino-encino, bosque mesófilo, bosque de pino, potreros, acahuales de selva baja y campos de cultivo tales como mango, caña, maíz y café (Ortiz-Pulido y Díaz, 2001). Se estima que en

Veracruz existen entre 1,000-2,000 individuos, con una proporción sexual 1:1 (Ortiz-Pulido y Díaz, 2001; Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002).

En estudios llevados a cabo en Yucatán se encontró que la población se distribuye en un área rectangular muy alargada de aproximadamente 2,100 Km², en áreas localizadas a menos de 50 metros de altitud; en esta zona la especie usa un área menor a 1 Km. de ancho a lo largo de la costa, ocupando bordes de manglar, zonas de matorral xerófito y parques (Howell y Webb 1995; Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002). A la fecha se desconoce el número de individuos que componen las poblaciones de Yucatán, pero se considera que debe ser mayor que la de Veracruz; la proporción sexual tentativamente registrada para Yucatán es de 1:10, con predominancia de hembras (Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002).

Dada esta separación geográfica y las diferencias en el hábitat que usan (Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002) se ha planteado que ambas regiones podrían agrupar a *taxa* distintos. Actualmente la especie se encuentra protegida por la legislación mexicana (Norma Oficial Mexicana, 2000) como una especie en peligro de extinción.

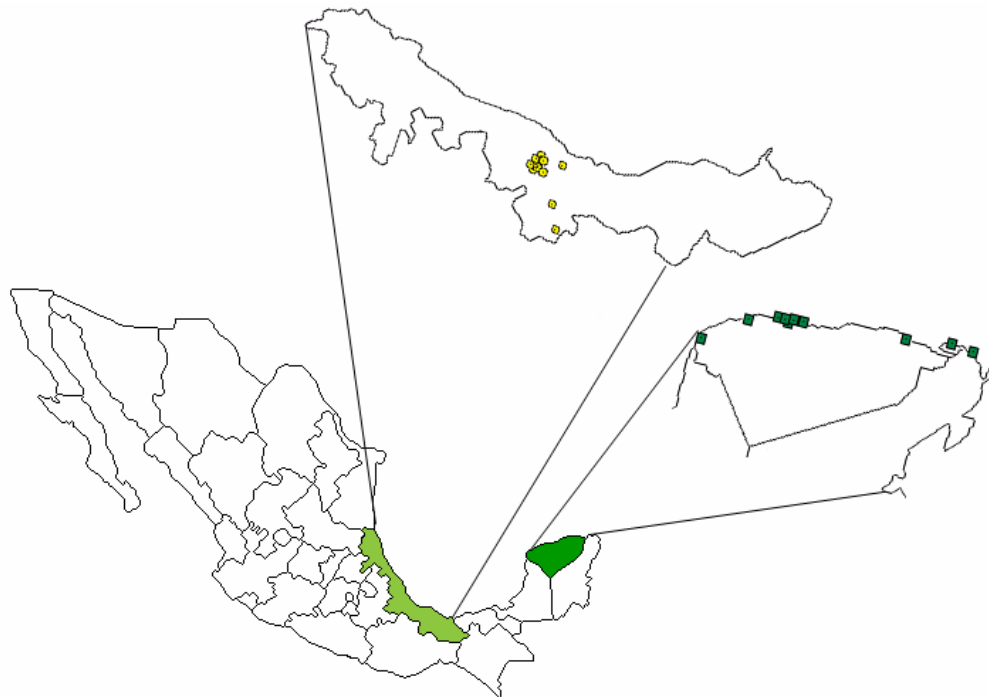


Figura 3.1. Distribución geográfica de la especie *Doricha eliza*. Las poblaciones registradas para el estado de Veracruz se muestran en círculos color amarillo mientras que las poblaciones para el estado de Yucatán en cuadrados color verde.

3.2 OBJETIVOS

- Identificar microsatélites que sirvan como marcadores genéticos con *loci* especie-específicos para el género *Doricha*.
- Evaluar la sensibilidad de los microsatélites seleccionados en dos especies hermanas (*Doricha eliza* y *Doricha enicura*), verificando la existencia de polimorfismo y alelos exclusivos en cada una de ellas.
- Analizar la posible divergencia genética e histórica entre dos regiones disjuntas (Veracruz y Yucatán) para una muestra piloto de individuos de *Doricha eliza*.

3.3 HIPÓTESIS

Para México, es posible encontrar poblaciones de *Doricha enicura* y *Doricha eliza* en rangos de distribución distintos. Mientras *D. enicura* es una especie de amplia distribución, con preferencia por los bosques mixtos en zonas montañosas y localizada desde el centro de México hasta Honduras, *Doricha eliza* es una especie con una distribución restringida al centro de Veracruz y costa de Yucatán. Se observan además diferencias morfológicas y ecológicas entre los individuos de *Doricha eliza* de ambas regiones, lo que permite suponer que existe una diferenciación genética suficiente para considerarlos *taxa* distintos, tal vez como un modelo de especiación alopátrica incipiente.

3.4 MATERIAL Y MÉTODOS

3.4.1 Muestras genéticas

Las muestras de DNA fueron tomadas de ejemplares depositados en la colección ornitológica del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a través de una donación proporcionada por el Dr. Rodolfo Dirzo Minjarez del Laboratorio de Ecología de Comunidades de la UNAM.

Para este estudio se consideró un total de 10 y 14 individuos pertenecientes a las especies *Doricha eliza* y *Doricha enicura* respectivamente, ésta última incluida en el estudio por ser la especie hermana de *Doricha eliza*; para ambas especies se eligió al menos una especie asociada a cada sitio de recolecta (Cuadro 3.1). Las muestras analizadas de *Doricha eliza* y *Doricha enicura* corresponden a recolectas realizadas del 2001 al 2003 en los estados

de Veracruz, Yucatán, Distrito Federal, Chiapas y Tlaxcala por parte del Laboratorio de Ecología de Comunidades de la UNAM (Cuadro 3.1).

Cuadro 3.1. Registros de recolecta de las muestras de las especies *Doricha eliza* y *Doricha enicura*.

Especie	Sitio de recolecta	Fecha de recolecta	No. de ejemplares	No. de muestra¹
<i>Doricha eliza</i>	Naolinco, Veracruz	Agosto 2001	3	718-99M (1,2,3)
<i>Doricha eliza</i>	Xico, Veracruz	Julio 2002	3	718-101M (1,2,3)
<i>Doricha eliza</i>	Reserva de la Biosfera Celestún, Yucatán	Agosto 2003	4	718-112M (1,2,3,4)
<i>Doricha enicura</i>	Reserva de la Biosfera Montes Azules, Chiapas	Abril 2001	5	719-77M (1,2,3,4,5)
<i>Doricha enicura</i>	Reserva Desierto de los Leones, D.F.	Mayo 2002	4	719-83M (1,2,3) 719-83F (1)
<i>Doricha enicura</i>	Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala	Abril 2003	5	755-97M (1,2,3,4,5)
<i>Abeillia abeillei</i>	Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala	Abril 2003	4	756-98M (1,2,3,4,5)
<i>Amazilia beryllina</i>	Xico, Veracruz	Julio 2002	4	720-103M (1,2,3,4)
<i>Amazilia rutila</i>	Reserva de la Biosfera Celestún, Yucatán	Agosto 2003	7	720-120M (1,2,3) 720-20F (1,2,3,4)
<i>Anthracothonax prevostii</i>	Naolinco, Veracruz	Agosto 2001	4	717-90M (1,2,3,4)

¹Registros realizados por el Laboratorio de Ecología de Comunidades de la UNAM

3.4.2 Selección de microsatélites y obtención de productos de PCR

La selección de alelos especie-específicos para los microsatélites se llevó a cabo evaluando un grupo de cinco secuencias para microsatélites (HrU2, FhU2, Mcμ4, Mcμ8 y Phtr4) registrados anteriormente en otros grupos de aves (HrU2 y FhU2: Primmer y colaboradores, 1996; Phtr4: Fridolfsson y colaboradores, 1997; Mcμ4 y Mcμ8: Beck y colaboradores, 2003. Ver Anexo A). La amplificación de los mismos se llevó a cabo en especímenes de *Doricha eliza*, provenientes de Yucatán y Veracruz y en especímenes de la especie *Doricha enicura* provenientes de los estados de Distrito Federal, Chiapas y Tlaxcala.

Los productos de la PCR fueron separados con una cámara de electroforesis vertical (10 volts/centímetro) en geles de poliacrilamida al 6% (Urea 7M) y revelados mediante tinción con nitrato de plata.

3.4.3 Análisis de diversidad genética y estructura poblacional

Se realizó el análisis de diversidad genética utilizando DNA de especímenes de la especie *Doricha eliza*, pertenecientes a las regiones de Veracruz y Yucatán. Todas las estimaciones se obtuvieron con base en las frecuencias alélicas de cinco microsatélites altamente polimórficos, identificados previamente; los resultados fueron analizados con el programa Fstat (Versión 2.9.3.2, 2002).

Se llevaron a cabo análisis de diversidad genética dentro de los individuos para ambas regiones (Yucatán y Veracruz) y se obtuvieron valores para la estructura genética y la estimación de flujo génico de la especie en los dos sitios (R_{ST} : índice de fijación y N_m : índice de migración). Se realizó además un dendrograma con la ayuda del método de agrupamiento llamado UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Average*), este método se basa en la hipótesis del reloj molecular, es decir, que la tasa de mutación (para los caracteres cualitativos) o la velocidad de cambio (para los rasgos cuantitativos) son idénticos para todas las ramificaciones del árbol (Hartl, 1999).

3.5 RESULTADOS

Los cinco microsatélites seleccionados (HrU2, Mcμ4, Mcμ8, FhU2 y Phtr4) fueron probados en 10 individuos de *Doricha eliza*, 14 de *Doricha enicura* y las cuatro especies asociadas a cada sitio de recolecta (ver Cuadro 3.1). Para todas las especies, se encontró que los microsatélites HrU2, FhU2 y Phtr4 amplificaron positivamente. Se encontraron tres *loci* (HrU2, FhU2 y Phtr4) que presentan alelos específicos para cada *taxón* de *Doricha eliza* en ambas regiones geográficas (Yucatán y Veracruz). En amplificaciones realizadas con el microsatélite HrU2 se encontró que para ambas especies (*Doricha eliza* y *Doricha enicura*) es especie-específico.

Los resultados obtenidos para el *locus* HrU2 en *Doricha eliza*, muestran que los alelos más frecuentes para la región de Veracruz son el 172 y 175, mientras que para los ejemplares de Yucatán, los alelos de mayor frecuencia fueron el 178 y 190 (Figura 3.2).

Se calcularon las diferencias genéticas entre las muestras analizadas (estadístico R_{ST} ; mide las diferencias entre poblaciones; medida de diferenciación genética; intervalo de valores de 0 a 1). La diferenciación genética se interpreta de la siguiente manera: de 0 a 0.5 pequeña,

de 0.05 a 0.15 moderada, de 0.15 a 0.25 grande y >0.25 diferenciación genética muy grande (Slatkin, 1995).

En el análisis realizado para las muestras de Veracruz y Yucatán, se observó un alto grado de diferenciación genética entre ambos *taxa*; los valores de índice de diferenciación genética y flujo genético entre poblaciones son de $R_{ST}=0.457$ y $N_m=0.08$, respectivamente.

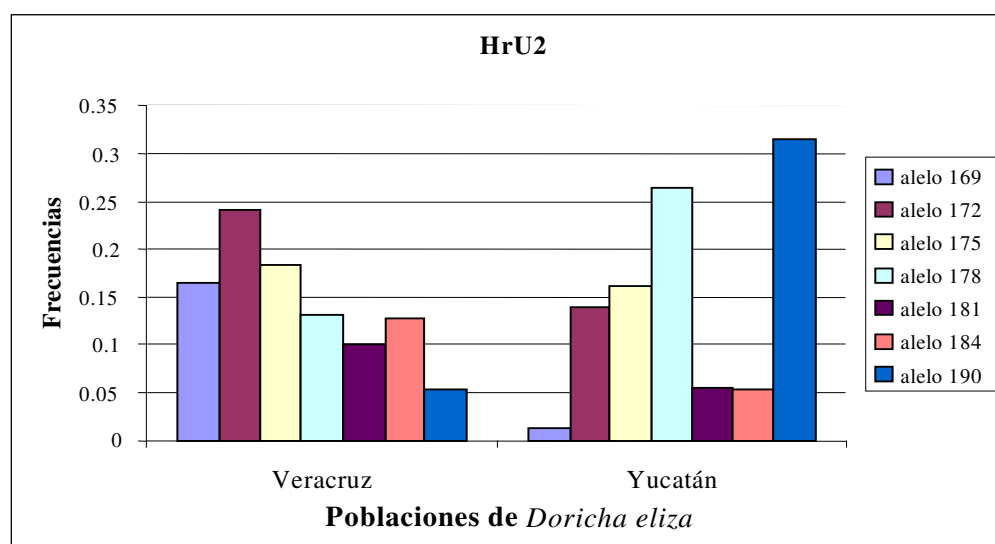


Figura 3.2. Frecuencias alélicas para las poblaciones de *Doricha eliza* de Yucatán y Veracruz obtenidas con el microsatélite HrU2, en donde se observa una notable diferenciación en las frecuencias de los alelos comunes a ambas poblaciones.

Con la ayuda del programa TFPGA (Versión 1.3, 1997), se generó el dendrograma de la figura 3.3, en el cual se muestran dos grupos, el primero formado por las poblaciones de la especie *Doricha eliza* y un segundo grupo representado por la especie hermana *Doricha enicura*. Los tres grupos presentan niveles considerables de diferenciación genética.

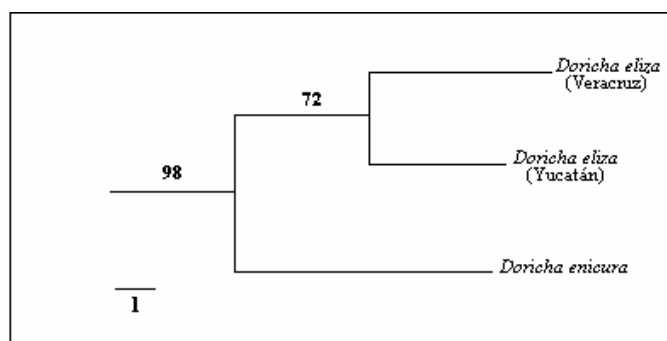


Figura 3.3. Dendrograma (UPGMA con 1000 repeticiones de remuestreo o *bootstrap*) de las poblaciones de *Doricha eliza* de Yucatán y Veracruz; la escala refleja el porcentaje de divergencia (72%) entre las dos regiones de distribución y la divergencia (98%) con respecto a la especie hermana, *Doricha enicura*.

3.6 DISCUSIÓN

Mettler y Gregg (1982) expresan que la importancia de estudiar grupos genéticamente aislados (poblaciones de una misma especie separadas por barreras geográficas), radica en que el flujo de genes entre ellos es menor y que la selección los puede conducir a la adaptación local, como ocurre con la especie de este estudio. Los alelos se fijan en proporciones desiguales o tienen frecuencias muy distintas en ambas zonas de distribución (Veracruz y Yucatán), lo que implica que los eventos evolutivos que modifican la estructura genética en ambas regiones, son diferentes.

El flujo de genes es, por definición, un acontecimiento raro entre los grupos aislados, pero cuando se intercambian genes, el suceso tiene gran importancia porque los complejos genéticos de adaptación se rompen, las frecuencias alélicas se alteran y, en general, todas las diferencias genéticas entre las poblaciones se reducen. Sin embargo, en los datos obtenidos la cantidad de flujo genético por generación es de 0.08 individuos, lo que implica que se estaría intercambiando un individuo cada 10 generaciones, aproximadamente; es decir, el contacto entre ambas regiones es demasiado limitado para mantener afinidades genéticas. Si se suma esto a las diferencias ecológicas y morfológicas, se infiere que posiblemente esta diferenciación ha originado *taxa* distintos en ambas regiones, lo que sugiere que tal vez sean poblaciones con un proceso activo de especiación.

Existe un debate general entre los evolucionistas acerca de la naturaleza de las diferencias genéticas que resultan en aislamiento reproductivo y los roles relativos del aislamiento, deriva genética y selección divergente como mecanismos de especiación. El aislamiento alopátrico, combinado con selección divergente en caracteres ecológica o sexualmente dimórficos, pueden dar como resultado especies distintas (Phillips y colaboradores, 2004). Este mecanismo se ha propuesto en muchas ocasiones como precursor de divergencia genética importante que, en alopatría, puede resultar en un aislamiento postzigótico sustancial (Phillips y colaboradores, 2004). Para el caso de *Doricha eliza*, es probable que, dada la separación geográfica entre ambas poblaciones y diferencias en los requerimientos de hábitat ecológico y patrones de comportamiento reproductivo, las diferencias genéticas y morfológicas observadas sean parte un proceso gradual de especiación alopátrica.

Como se puede observar en los resultados, a pesar de que se mantienen los mismos alelos en ambas poblaciones (lo que indica un origen genético común), las diferencias en sus frecuencias alélicas son notables, al igual que los alelos fijados para las muestras de cada región (Cuadro 3.1 y Figura 3.2). Aunado a este hecho se encuentra flujo genético casi nulo entre ambas poblaciones (número de migrantes: $N_m = 0.08$), lo que permite un alto grado de diferenciación genética ($R_{ST} = 0.457$). Estos datos se traducen en una adaptación local específica para cada región y una diferenciación progresiva debido a eventos de fragmentación y la aparición de barreras al flujo genético, diferencias en los requerimientos de hábitat ecológico (condiciones climáticas, vegetación, altitud) y patrones de comportamiento reproductivo específico entre ambas regiones (anidación, periodos reproductivos, conducta de apareamiento).

La eficacia del intercambio de genes depende de la estructura que tienen las poblaciones y, más específicamente, de la cantidad de migración y de la divergencia genética de los grupos participantes. Es importante comprender que factores históricos como los eventos de fragmentación en el pasado, cambios en la demografía y la aparición y desaparición de barreras al flujo genético pueden tener una gran influencia en los modelos actuales de diversidad y similitud genética (DeYoung y Honeycutt, 2005).

Cuando se considera lo anterior en las muestras analizadas resulta comprensible el hecho de que, debido a la aparición de barreras de flujo genético y geográficas, la cantidad de migración disminuya y la divergencia entre ambas poblaciones sea mayor; un fenómeno que posiblemente haya acelerado o potenciado el proceso es la actividad antropogénica, considerando que entre ambas regiones se ha desarrollado un importante complejo de explotación petrolera particularmente en Campeche, lo que ha modificado drásticamente el panorama a lo largo de la costa del Golfo de México, limitando el intercambio de especies entre la zona noreste y sureste de esa zona.

Al realizar análisis genéticos de las poblaciones, los procesos históricos deben ser considerados como una primera aproximación para entender los efectos de los eventos recientes de variación genética dentro y entre ellas (Bossart y Powell, 1998). En el caso de los individuos de Yucatán y Veracruz, podría asumirse que, dada la gran distancia de separación (más de 600 Km.), la genética histórica de la especie esté tomando un nuevo rumbo, condicionada básicamente por diferencias biológicas, ecológicas y de aislamiento geográfico.

Esto implica, a futuro, la formación de dos especies nuevas, pues aunque las poblaciones de Veracruz y Yucatán presentan similitudes alélicas y morfológicas, el nivel de diferenciación genética, así como las discrepancias registradas para la temporada de apareamiento/anidación, se intuye un proceso incipiente de especiación entre ambos sitios, con una diferenciación lo suficientemente relevante como para considerarse a los individuos de Yucatán un *taxón* recientemente diferenciado, con respecto a los existentes en Veracruz, que se consideraría como la población ancestral, puesto que es la que presenta un hábitat altamente restringido (Ortiz-Pulido y colaboradores, 2002) y una mayor fijación alélica.

3.7 CONCLUSIONES

- La sensibilidad de los tres microsatélites seleccionados fue suficiente para evaluar las diferencias existentes a nivel intraespecífico en *Doricha eliza* e identificar alelos especie-específicos que permiten discriminar entre ambas poblaciones y entre especies hermanas (como *Doricha enicura*). Además, de diferenciar al género *Doricha* de otras especies localizadas en la misma región geográfica.
- Datos registrados previamente sugieren que factores como la selección diferencial de hábitat, abundancia relativa y proporciones sexuales, variación morfológica, conductal y genética, han influido en la dinámica histórica de divergencia observada entre las poblaciones de Yucatán y Veracruz, para el colibrí *Doricha eliza*.
- Los individuos de *Doricha eliza* de Yucatán y Veracruz presentan un nivel de diferenciación genética considerable y un flujo genético muy escaso (casi nulo), resultado que se complementa con la evidencia previamente registrada de diferenciación morfológica y ecológica, sustentando así la probabilidad de encontrarse en un proceso incipiente de especiación.
- Se considera conveniente revisar el actual estatus taxonómico para ambas poblaciones, puesto que la evidencia genética sugiere que se trate, probablemente, de dos especies distintas, con base en los datos obtenidos en este estudio y la evidencia ecológica y morfológica publicada anteriormente, con el fin de formular estrategias integrales de conservación y manejo, de acuerdo a requerimientos específicos para cada región.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA PARA UN COMPLEJO HÍBRIDO ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO *Spizella* (*S. pallida* - *S. passerina* - *S. atrogularis*)

4.1 INTRODUCCIÓN

La palabra “hibridación” dentro de la evolución biológica, generalmente se refiere a cruzamientos entre diferentes poblaciones, razas o especies (Mettler y Gregg, 1982). Los híbridos naturales se encuentran en muchos grupos de plantas y animales, constituyendo excelentes modelos de referencia para estudios que implican intercambio horizontal de genes (Mettler y Gregg, 1982).

Las zonas híbridas se caracterizan generalmente por ser regiones estrechas, en donde poblaciones genéticamente diferenciadas se encuentran, se reproducen y forman híbridos (Mettler y Gregg, 1982). La importancia de estos últimos radica en que si son parcialmente fértiles, pueden actuar como puentes para el intercambio genético entre genomas diferenciados, proceso conocido como “introgresión” (Borge y colaboradores, 2005).

La dinámica de estas zonas es un área fecunda para el estudio de aquellos caracteres y procesos genéticos que pueden estar involucrados en la divergencia evolutiva y en la especiación de organismos (Kohlman, 1993). Hasta cierto punto, la dinámica en las zonas híbridas puede describirse como una batalla entre la fusión y la fisión de genomas parcialmente incompatibles (Borge y colaboradores, 2005).

Existen individuos híbridos altamente exitosos que llegan a formar poblaciones que eventualmente conviven en simpatría o parapatría con las poblaciones paternas. En este caso, es posible que los híbridos exploten recursos distintos o se especialicen gradualmente, formando un sistema clinal donde se incluyen las especies paternas (Borge y colaboradores, 2005). También puede ocurrir que esta fusión de genes (reflejada en los híbridos), sea incluso más exitosa que las especies puras; entonces los híbridos compiten por los mismos recursos que las especies paternas, llegando inclusive a desplazarlas y formar una nueva especie (Borge y colaboradores, 2005).

Los procesos de hibridación introgresiva son muy comunes entre plantas y algunos grupos de animales. La dinámica de la introgresión puede ser muy variable, ya que depende en gran medida del ambiente y de la arquitectura genética de las especies. La hibridación

introgresiva puede ser asimétrica (unidireccional de una especie a otras especies) o simétrica (ambas direcciones entre especies) y resultar o concluir en procesos de especiación que dan origen a nuevas especies, a la extinción de alguna de las especies paternas o a la extinción de los híbridos (Delgado, 2002).

Predecir el resultado de la dinámica en las zonas híbridas es difícil, pues las fuerzas evolutivas operan de manera opuesta simultáneamente. Por consiguiente, se ha sugerido que la hibridación introgresiva podría ser una fuente importante de variación genética (Barton, 2001); es decir, este mecanismo puede ser, en algunos casos, una manera de enriquecer genéticamente a las especies paternas a través de los híbridos, actuando también como “puentes” para el intercambio de características específicas (Barton, 2001).

Dentro de este complejo de estudio, se han verificado varios casos de hibridación en aves norteamericanas (Grant y Grant, 1992). Helbig y colaboradores (2001), analizaron el flujo de genes en zonas de contacto entre las especies *Phylloscopus collybita* y *Phylloscopus brehmii*. Primmer y colaboradores (1996), sugirieron la posibilidad de utilizar los microsatélites como marcadores genéticos para la identificación de híbridos y sus especies de origen. Borge y colaboradores (2005), analizaron un caso de hibridación introgresiva entre las poblaciones de *Ficedula albicollis* y *Ficedula hypoleuca*, también con la ayuda de microsatélites.

En el presente estudio se analizó un posible complejo híbrido entre especies del género *Spizella*, (*S. pallida* – *S. passerina* – *S. atrogularis*). El trabajo contempla el análisis de datos de microsatélites con base en la genética de poblaciones clásica y el análisis molecular de la varianza (AMOVA) de los grupos alélicos encontrados. Los resultados obtenidos a través de estos datos permitieron detectar eventos de hibridación entre las especies *Spizella pallida* y *Spizella atrogularis*, convirtiéndolas así en posibles especies paternas.

4.1.1 Descripción de las especies de estudio

Spizella pallida, *S. passerina* y *S. atrogularis*, son tres especies pertenecientes a la familia Emberizidae que, junto con *S. breweri*, *S. pusilla* y *S. worthenii* constituyen el género *Spizella*.

Spizella pallida es una especie de ave invernante en México que habita en zonas áridas con matorrales, campos de cultivo y otras áreas abiertas; se distribuye de manera general desde Canadá hasta Guatemala. En México pasa el invierno y se le encuentra desde el norte, en estados como Coahuila, Sonora y Baja California sur; hacia el sur del país, en Oaxaca y Chiapas (Figura 4.2; Knapton, 1994).

Morfología: *Spizella pallida* un gorrión de color café claro y de gris a blanco en el vientre, la garganta y mejillas son ligeramente rojizas, más notorias en aves adultas; el tamaño varía entre los 125-140 mm., la especie presenta un ligero dimorfismo sexual en color y tamaño (Figura 4.1; Knapton, 1994).

Puede encontrárseles reunidos con una variedad de especies, particularmente con *Spizella breweri* y *Spizella passerina* (Knapton, 1994). No se reconocen subespecies, pero mantiene estrecha relación con *Spizella breweri* y *Spizella passerina*, coincidiendo libremente con ambas especies también durante la migración (Knapton, 1994). Estudios de mtDNA llevados a cabo por Zink y Dittmann (1993) hacen pensar que *Spizella pallida* es la especie más estrechamente relacionada a *Spizella passerina*.

Spizella passerina es una de las aves migratorias más comunes y extensamente distribuidas en América del Norte. Se encuentra desde Alaska y Estados Unidos, hasta Nicaragua. En México es residente y con amplia distribución. Las aves del norte del país migran hacia el centro-sur del país (Middleton, 1998), se reproducen en los bosques de pino, en las montañas del norte de Baja California y en los estados del noroeste hacia el sur a través de las montañas de la planicie central hasta Chiapas (Figura 4.2.; Middleton, 1998; Peterson y Chalif, 2000). Ocupa hábitats variados, que van desde bosques de pino-encino, selvas bajas, campos de cultivo, granjas y hasta ciudades (Middleton, 1998).

Morfología: es un gorrión pequeño y esbelto, con la corona rojiza, línea superciliar blanca y línea ocular negra. La nuca y pecho son gris claro, el dorso y alas de color café bordeadas en negro y blanco, cola grisáceo oscuro. Este plumaje lo presenta en temporada reproductiva. En invierno son café grisáceo con la corona rojiza, muy poco aparente. Los juveniles son rayados en la cabeza y pecho (Figura 4.1; Middleton, 1998).

La similitud morfológica entre *Spizella breweri*, *S. pallida* y *S. passerina* sugiere una relación muy estrecha (Mayr y Short, 1970); sin embargo, la similitud no se ve apoyada por el

análisis de mtDNA (Zink y Dittmann, 1993). El parecido entre estas tres especies puede ser el resultado de rasgos hereditarios ancestrales compartidos, lo que no necesariamente es un indicador de afinidad filogenética reciente (Zink y Dittmann, 1993). Aunque se han llevado a cabo análisis de mtDNA en las poblaciones norteamericanas, no hay datos equivalentes para las localidades restantes, incluidas las de México (Middleton, 1998).

Spizella atrogularis se localiza a lo largo del suroeste de los Estados Unidos, sur y centro de México; habita en lugares con laderas rocosas de chaparral mixto en alturas de entre 1200-2500 metros, en verano. Es un migrante parcial, pasa generalmente el invierno en el sur y centro de México, en laderas o matorral xerófito (Tenney, 1997). En México, se reproduce al sur de Baja California y desde el este de Sonora y Coahuila hacia el sur, a través de las tierras altas semiáridas hasta Oaxaca (Figura 4.2; Tenney, 1997; Peterson y Chalif, 2000). La especie presenta mayor abundancia relativa en EE.UU., para México no se tienen datos; sin embargo, el cambio climático y variables de tiempo parecen jugar un papel importante en las fluctuaciones de la población (Tenney, 1997).

Morfología: Es la especie con mayor dimorfismo sexual dentro del género *Spizella*, la espalda y la garganta resaltan en un tono gris, el pecho y alas son castaño rojizo. En el macho, el pico es color carne resaltado por la barbilla negra que lo rodea. Las hembras carecen de la coloración de la barbilla, pero se diferencian por la cabeza y pecho grisáceos y sin marcas; la espalda es café (Figura 4.1.; Tenney, 1997; Howell y Webb, 1995). Poco se conoce de su conducta, alimentación, depredadores y características de su biología reproductiva. Dentro de la especie se reconocen cuatro subespecies (Zink y Dittman, 1993).

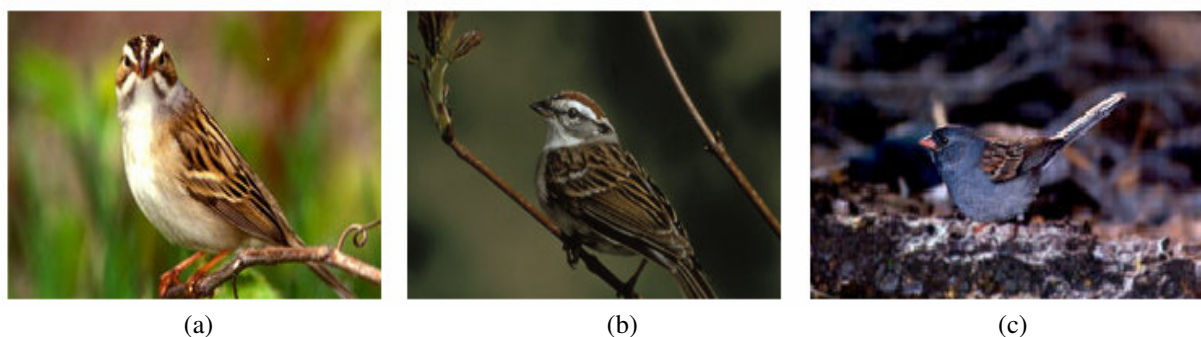


Figura 4.1. Morfología de individuos adultos de (a) *Spizella pallida* (original de Arthur Morris), (b) *S. passerina* (original de Michael J. Hopiak) y (c) *S. atrogularis* (original de Brian E. Small).

De acuerdo a los trabajos realizados por Knapton (1994), Tenney (1997), Middleton (1998) y Peterson y Chalif (2000) las tres especies se distribuyen en áreas diferentes y sólo *Spizella pallida* y *Spizella passerina* cohabitan en simpatria durante la migración y muestran correspondencia en algunos sitios de reproducción.

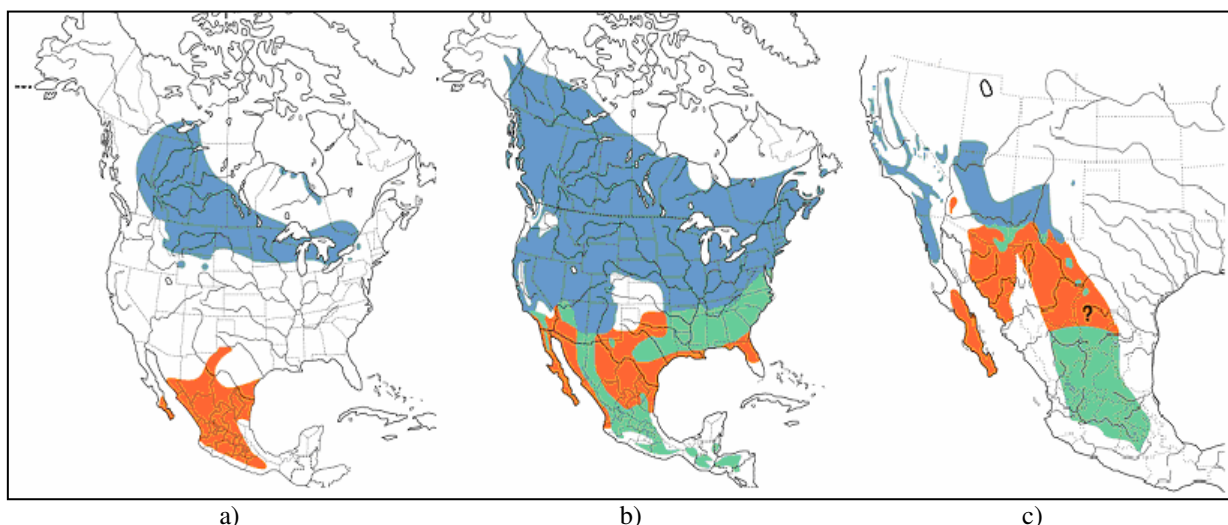


Figura 4.2. Distribución geográfica de las especies: a) *Spizella pallida* (tomado de Knapton, 1994), b) *Spizella passerina* (tomado de Middleton, 1998) y c) *Spizella atrogularis* (tomado de Tenney, 1997); el color azul representa la zona de reproducción, el color naranja la zona de invernación y el color verde la zona de ocupación durante todo el año.

4.2 OBJETIVOS

- Analizar los niveles de diversidad genética y riqueza alélica para cada una de las especies de estudio (*S. pallida*, *S. passerina* y *S. atrogularis*), utilizando microsatélites altamente polimórficos, evaluados previamente.
- Determinar la estructura y la direccionalidad del flujo genético entre especies para todo el complejo, evaluando patrones de hibridación, retrocruzas y niveles de introgresión entre todas ellas.
- Analizar las relaciones alélicas ancestrales y actuales entre las tres especies, para discriminar aquellas que tienen un origen monofilético de las que tiene un origen por hibridación.

4.3 HIPÓTESIS

La evidencia morfológica y ecológica sugiere un nexo genético importante entre las especies *S. pallida* y *S. passerina*, tal vez por la existencia de flujo genético horizontal entre ellas. Del mismo modo, se supone que las tres especies en estudio (*S. pallida*, *S. passerina* y *S. atrogularis*) forman un complejo híbrido y al menos una de ellas es una especie originada por hibridación ancestral entre las dos restantes.

4.4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.1 Área de estudio

El trabajo se desarrolló en el Parque Ecológico Cubitos, dentro de la región sureste de la ciudad de Pachuca, en la zona conurbada de los municipios de Pachuca de Soto y Mineral de la Reforma, entre las coordenadas 20° 06' 33" y 20° 07' 39" de longitud norte y 98° 45' 00" y 98° 44' 60" de latitud oeste (Figura 4.3), su altitud oscila entre los 2,245 y 2,495 metros. El parque cuenta con una extensión aproximada de 90 hectáreas, de las cuales la mayoría mantiene la vegetación original, que incluye la presencia de tres subtipos del matorral xerófito (micrófilo, rosetófilo y crasicaule) todos con distribución relictual (Periódico Oficial del Estado de Hidalgo, 2002).

La importancia del área de estudio seleccionada para el desarrollo de este trabajo, radica en que, está calificada como Área Natural Protegida en el estado de Hidalgo, además de considerar al Parque Ecológico Cubitos como reservorio de diversos grupos de aves migratorias, debido a los rasgos físicos y de vegetación que presenta.

4.4.2 Trabajo de campo

Se realizaron recolectas a lo largo del área de estudio, entre los meses de marzo y octubre de 2006 y marzo de 2007, dentro del Parque Ecológico Cubitos; cada zona fue seleccionada en función del tipo de vegetación: matorral y arbustivo.

La captura de los ejemplares se realizó con la ayuda de redes de niebla (de dos a tres redes por tipo de vegetación), los tamaños de muestra se definieron en función de la densidad de individuos presentes en cada zona, aunque se pretendió trabajar con al menos 10 individuos por especie. En algunos casos resultó imposible completar el número de muestra, debido a la

baja densidad encontrada para las especies *Spizella atrogularis* y *Spizella passerina*, para las cuales se obtuvieron sólo seis y nueve individuos, respectivamente.

Una vez capturados los individuos, éstos fueron identificados con la ayuda de guías de campo (Peterson y Chalif, 2000; Howell y Webb, 1995), medidos y pesados; posteriormente fueron marcados con anillos de aluminio numerados para evitar la duplicación de muestras. Enseguida se procedió a la toma no invasiva de una muestra de sangre por individuo, para el análisis genético. Para la obtención de sangre se realizó un corte en la uña de una de las patas, lo suficientemente profundo para obtener una gota con un volumen aproximado de 1-4 μ l, de manera tal que no se sacrificara ni dañara permanentemente a los individuos. La recolección de la sangre se llevó a cabo empleando tarjetas de análisis forense, FTA de la marca Whatman.



Figura 4.3. Ubicación del Parque Ecológico Cubitos dentro de los municipios de Pachuca de Soto y Mineral de la Reforma, en el estado de Hidalgo, se muestra en color azul.

4.4.3 Extracción de DNA y productos de PCR

La extracción de DNA total se llevó a cabo mediante técnicas forenses (Protocolo FTA Cards de la marca Whatman. Ver Anexo A) para cada muestra de sangre obtenida; se seleccionaron tres secuencias de microsatélites altamente polimórficas, registrados con anterioridad para otros grupos de aves (HrU2 y FhU2: Primmer y colaboradores, 1996; Mcμ4: Beck y colaboradores, 2003. Ver Anexo A), para verificar la amplificación de, al menos, 30 *loci* polimórficos para todas las especies mediante la técnica modificada de William y colaboradores (1990).

Los productos de la PCR fueron separados con una cámara de electroforesis vertical (10 volts/centímetro) en geles de poliacrilamida al 6% y teñidos con bromuro de etidio.

4.4.4 Análisis de diversidad genética y estructura poblacional

Todas las estimaciones de variación genética se obtuvieron con base en las frecuencias alélicas, porcentaje de *loci* polimórficos y los estadísticos descriptivos de los heterocigotos (esperados y observados), los cuales fueron calculados utilizando los programas TFPGA (Versión 1.3, 1997) y POPGENE (Versión 1.31, 1999), generando árboles de similitud entre las especies, basados en las distancias genéticas.

La estructura genética de las tres poblaciones y la estimación de los estadísticos F de Wright, 1951 (F_{IS} = nivel de endogamia o apareamiento entre individuos con relaciones cercanas; intervalo de valores de 0 a 1. F_{IT} = balance entre deriva y flujo genético de los individuos dentro y entre poblaciones; intervalo de valores de -1 a 1. F_{ST} = nivel de diferenciación entre poblaciones; intervalo de valores de 0 a 1), se obtuvieron mediante un análisis molecular de la varianza (AMOVA), con la ayuda del programa ARLEQUÍN (Versión 3.01, 2006), para verificar diferencias dentro y entre grupos e individuos.

Finalmente, con la ayuda del programa Structure (Versión 2.2, 2007), se realizó un estudio de afinidad genética, mediante un análisis estadístico de asociación por máxima verosimilitud, que permitió un agrupamiento por semejanza de los alelos para cada una de las especies que se suponen paternas (*Spizella pallida* y *S. atrogularis*) y los posibles híbridos, con el objetivo de determinar si estas tres especies constituyen o no un complejo híbrido, además de determinar la estructura genética en dicho complejo y si existe evidencia de introgresión en las especies supuestamente paternas (Manel y colaboradores, 2005).

4.5 RESULTADOS

4.5.1 Diversidad genética

Los tres microsatélites polimórficos seleccionados amplificaron para todas las muestras obtenidas y se detectaron un total de 49 alelos. Se presentaron cuatro alelos exclusivos (especie-específicos) en la muestra de *S. pallida* para el locus HrU2 y dos alelos compartidos entre las muestras de *S. atrogularis* y *S. pallida* para el mismo locus (Cuadro 4.1, ver Anexo B). Para el locus FhU2, se obtuvieron tres alelos exclusivos para la muestra *S. pallida* y un alelo compartido entre esta muestra y la de *S. passerina* (Cuadro 4.1, ver Anexo B). Finalmente, para el locus Mcμ4, se presentó un alelo exclusivo para la muestra de *S. pallida* (Cuadro 4.1, ver Anexo B). Sólo se encontraron alelos exclusivos para la población de *Spizella pallida* en los tres loci analizados.

Cuadro 4.1. Frecuencias alélicas por cada locus y entre especies. Para cada locus se muestran las frecuencias obtenidas por muestra, donde: Sp_1= *Spizella atrogularis*, Sp_2= *Spizella pallida* y Sp_3= *Spizella passerina*. En color gris se muestran los alelos compartidos entre especies y en color azul a los alelos exclusivos.

Alelo	Locus HrU2			Locus FhU2			Locus Mcμ4		
	Sp_1	Sp_2	Sp_3	Sp_1	Sp_2	Sp_3	Sp_1	Sp_2	Sp_3
1	0.071	0.045	0.111	0.071	0.136	0.111	0.071	0.091	0.056
2	0.071	0.091	0.111	0.071	0.045	0.389	0.214	0.182	0.056
3	0.143	0.136	0.167	0.357	0.091	0.056	0.071	0.091	0.222
4	0.286	0.045	0.111	0.071	0.182	0.167	0.143	0.227	0.222
5	0.143	0.091	0.222	0.214	0.091	0.056	0.286	0.136	0.167
6	0.143	0.045	0.278	0.214	0.091	0.111	0.143	0.091	0.111
7	0.071	0.045	****	****	0.091	0.111	0.071	0.045	0.167
8	0.071	0.045	****	****	0.136	****	****	0.136	****
9	****	0.091	****	****	0.091	****	****	****	****
10	****	0.091	****	****	0.045	****	****	****	****
11	****	0.182	****	****	****	****	****	****	****
12	****	0.091	****	****	****	****	****	****	****

Los niveles de diversidad genética fueron diferentes entre las muestras y dentro de cada uno de los loci analizados. La muestra con mayor diversidad genética fue *Spizella pallida* con un valor de 0.959, mientras que los valores más bajos se presentaron en la especie *S. atrogularis* con un valor de 0.833. El loci Mcμ4 presentó mayor información respecto a la diversidad genética, con un promedio general de 0.919 (Cuadro 4.2).

La mayor riqueza alélica se encuentra concentrada en la especie *S. atrogularis* con un valor promedio de 8.434. *S. pallida* fue la especie con menor riqueza alélica al registrar un valor promedio de 6.272. El *locus* HrU2 fue el que proporcionó mayor información respecto a la riqueza alélica con un valor promedio de 7.856 (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Diversidad genética y riqueza alélica por *locus* y especies de *Spizella*.

Diversidad genética				
Especie/Locus	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>	Promedio
HrU2	0.94	0.959	0.861	0.92
FhU2	0.833	0.932	0.847	0.871
Mcy4	0.929	0.918	0.91	0.919
Promedio	0.901	0.936	0.873	
Riqueza alélica				
HrU2	9.53	5.877	8.162	7.856
FhU2	8.584	6.433	7.425	7.481
Mcy4	7.188	6.506	6.717	6.804
Promedio	8.434	6.272	7.435	

Los valores de heterocigosidad observada fueron menores a los esperados, la diferencia final entre uno y otro fue de 0.3436, siendo *S. pallida* la especie con mayor heterocigosidad observada (0.5758; Cuadro 4.3).

Los tres *loci* fueron 100% polimórficos. Los valores de heterocigosidad observada por *locus* fueron menores a los esperados, la diferencia final entre un valor y otro fue de 0.38, siendo FhU2 el *locus* con mayor heterocigosidad observada (0.659) y con menor diferencia entre ésta y la esperada (Cuadro 4.4).

Cuadro 4.3. Sumario de diversidad genética por muestra para cada especie del género *Spizella*. Donde: Número de alelos observados (Na), Número efectivo de alelos (Ne), Promedio de heterocigotos ($\hat{H}$), Promedio de heterocigotos observados ($\hat{H}_o$), Heterocigosidad promedio esperada (diversidad genética de Nei) ($\hat{H}_e$).

Especie	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>	Media
Na	7	10	6.6667	10.0000
Ne	5.2768	8.3484	5.1705	8.0709
$\hat{H}$	0.8294	0.8294	0.8294	0.8294
$\hat{H}_o$	0.4762	0.5758	0.5185	0.5309
$\hat{H}_e$	0.8061	0.8774	0.8045	0.8745

Cuadro 4.4. Sumario de heterocigosidad de Nei, para cada *locus* se muestra: Heterocigotos observados (Ho), Heterocigotos esperados (He), Heterocigosidad total (Ht), Porcentaje de polimorfismo (% P).

<i>Locus</i>	Ho	He	Ht	% P
HrU2	0.584	0.919	0.909	100
FhU2	0.659	0.871	0.892	100
Mcy4	0.328	0.918	0.883	100
Media	0.523	0.903	0.895	100

En un análisis comparativo entre especies, se estimó la riqueza alélica, la heterocigosidad observada y esperada. Al evaluar las muestras de *S. atrogularis* versus *S. pallida* se obtuvo una riqueza alélica de 7.717, siendo éste el mayor valor obtenido de todas las comparaciones entre muestras. Al igual que en el análisis individual por cada muestra, los valores de heterocigosidad observada fueron menores a los esperados (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5. Análisis de grupos para las especies del género *Spizella*. Para cada comparación realizada se muestra: Heterocigotos observados (Ho), Heterocigotos esperados (He).

Parámetros/ Especies	<i>S. atrogularis</i> vs. <i>S. pallida</i>	<i>S. atrogularis</i> vs. <i>S. passerina</i>	<i>S. pallida</i> vs. <i>S. atrogularis</i>	<i>S. atrogularis</i> vs. <i>S. pallida</i> vs. <i>S. passerina</i>
Riqueza Alélica	7.717	6.636	7.353	7.235
Ho	0.537	0.5	0.55	0.531
He	0.922	0.885	0.908	0.906

4.5.1 Estructura genética

Estadísticos “F” de Wright

El valor promedio de F_{ST} para las tres muestras analizadas fue de 0.06523; en el análisis por muestra, *Spizella passerina* registró la mayor diferenciación con un valor total de 0.06726, seguido de las muestras para *S. atrogularis* y *S. pallida* con un valor de 0.06711 y 0.06237, respectivamente (Cuadro 4.6). En el análisis *locus* por *locus*, el microsatélite Mcu4 presentó mayor información respecto a la diferenciación entre individuos con respecto a su muestra, con un valor de 0.63673, seguido de los *locus* HrU2 y FhU2 con valores de 0.35349 y 0.23857, respectivamente.

Cuadro 4.6. Diferencias genéticas entre especies del género *Spizella* (F_{ST}). El valor en color gris representa el promedio de F_{ST} para el total de las muestras analizadas.

Especie	F_{ST}
<i>S. pallida</i>	0.06237
<i>S. passerina</i>	0.06726
<i>S. atrogularis</i>	0.06711
Promedio	0.06523

En el análisis de diferenciación genética entre individuos de una especie (F_{IS} : niveles de endogamia), el valor promedio de las tres poblaciones analizadas fue de 0.41227, *Spizella atrogularis* fue la especie con menor diferencia genética entre sus individuos, con un valor promedio de 0.471, *S. pallida* mostró la mayor diferenciación genética entre sus individuos con un valor promedio de 0.385 (Cuadro 4.7). El *locus* que detectó menor diferenciación genética entre individuos de una especie fue el Mcμ4 con un valor de 0.692, registrado en la muestra de *S. atrogularis*, el valor promedio de este *locus* fue de 0.643; el *locus* que detectó la mayor diferenciación genética entre individuos de una muestra fue el FhU2, con un valor promedio de 0.247 (Cuadro 4.7).

Cuadro 4.7. Diferencias genéticas entre individuos del género *Spizella* (F_{IS} = nivel de endogamia) por *locus* y por especie. El valor en color gris representa el promedio de F_{IS} para el total de las muestras analizadas.

Locus/Especie	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>	Promedio
HrU2	0.544	0.431	0.097	0.357
FhU2	0.143	0.122	0.475	0.247
Mcμ4	0.692	0.604	0.634	0.643
Promedio	0.471	0.385	0.406	0.41227

Para F_{IT} , el valor promedio de las tres especies analizadas fue de 0.43674. El *locus* con la mayor frecuencia fue el Mcμ4, con un valor promedio de 0.65472, seguido del *locus* HrU2 con un valor de 0.38379, el valor más pequeño se registró para el *locus* FhU2, con una frecuencia de 0.25957 (Cuadro 4.8). Se realizó una gráfica final para el total de las poblaciones, en donde es posible observar los valores promedio para los estadísticos “F”, descritos anteriormente (Figura 4.4).

Cuadro 4.8. Diferencias entre individuos con respecto a su especie (F_{IT}). El valor en color gris representa el promedio de F_{IT} para el total de las muestras analizadas.

Locus	F_{IT}
HrU2	0.38379
FhU2	0.25957
Mcp4	0.65472
Promedio	0.43674

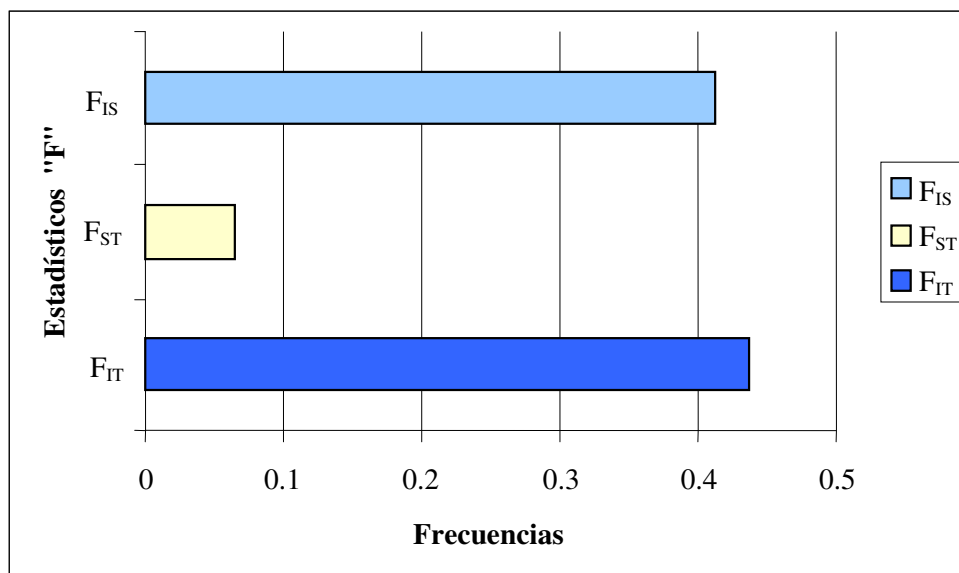


Figura 4.4. Estadísticos "F" para el total de las muestras analizadas.

Distancias y flujo genético entre especies

La matriz de distancias de Nei muestra las diferencias genéticas entre pares de grupos, en donde las especies con el valor más alto de identidad genética son *Spizella atrogularis* y *S. passerina* (Cuadro 4.9), mientras que las especies de *Spizella passerina* y *S. pallida* presentan menor distancia genética.

Cuadro 4.9. Comparación de distancias genéticas de Nei (1972/1978) entre especies del género *Spizella*. Identidad Genética sobre la diagonal y Distancia Genética bajo la diagonal.

	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>
<i>S. atrogularis</i>	****	0.6599	0.6591
<i>S. pallida</i>	0.4157	****	0.6362
<i>S. passerina</i>	0.4169	0.4522	****

Utilizando los datos de la matriz de distancia genética para las tres especies, se realizó un dendograma con la ayuda del programa TFPGA (Versión 1.3, 1997) que muestra dos grupos, el primero formado por las especies *Spizella atrogularis* y *S. pallida* y un segundo grupo representado por *S. passerina* (Figura 4.5).

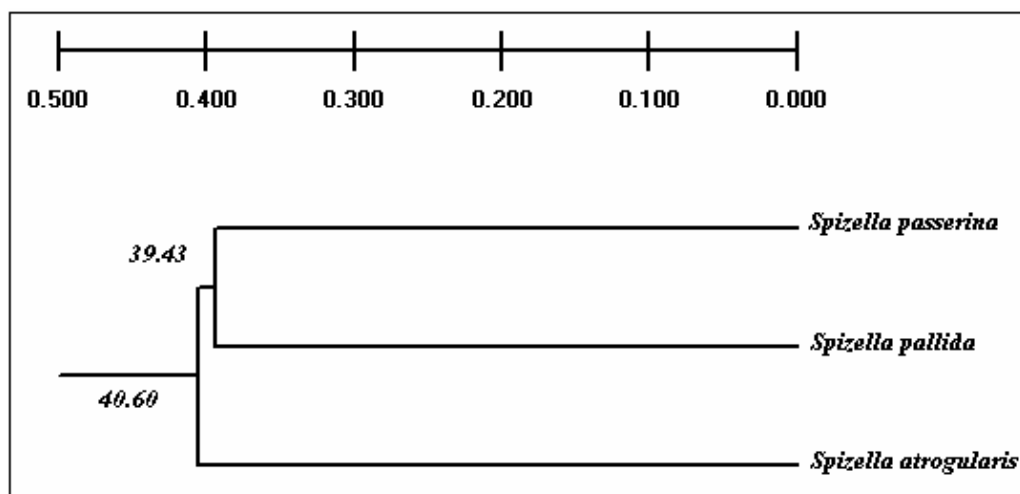


Figura 4.5. Dendograma que muestra las relaciones genéticas entre las especies analizadas. UPGMA con 1000 repeticiones de *bootstrap*.

Los resultados de flujo genético estimados con el parámetro M (índice de migración para pares de muestras), indican que las especies con menor intercambio de migrantes son *Spizella atrogularis* y *S. passerina* (Cuadro 4.10).

Cuadro 4.10. Matriz de flujo genético entre pares de muestras para las especies del género *Spizella* ($M=2Nm$), en color gris se muestra a las especies con menor flujo genético.

	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>
<i>S. atrogularis</i>	*****	*****	*****
<i>S. pallida</i>	7.3748	*****	*****
<i>S. passerina</i>	6.0988	7.8477	*****

Análisis de varianza molecular

Se llevaron a cabo tres análisis de varianza molecular (AMOVA); el primero analizó la varianza molecular calculada a partir del método de diferencias alélicas (F_{ST}) entre y dentro de las tres especies de estudio (*S. atrogularis*, *S. pallida* y *S. passerina*), el segundo examinó la varianza molecular calculada entre muestras de cada especie, entre individuos dentro de cada

muestra y diferencias alélicas entre el total de los individuos; finalmente se realizó un AMOVA *locus* por *locus*, en donde se estimó la variación para cada *loci* entre muestras y entre individuos.

El primer análisis de varianza molecular realizado refleja que el 93.48 % de la variación total se encuentra dentro de las muestras y sólo un 6.52 % entre ellas (Cuadro 4.11). El índice de fijación F_{ST} obtenido fue de 0.065, el cual es significativamente diferente de cero ($P < 0.05$) después de 1023 permutaciones, valor que refleja escasa diferenciación genética (Cuadro 4.11).

Cuadro 4.11. Componentes de la varianza molecular calculados a partir del método de diferencias alélicas (F_{ST}) entre y dentro de las tres muestras de estudio: *Spizella atrogularis*, *S. pallida* y *S. passerina*.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre muestras	2	5.911	0.09225 Va	6.52
Dentro de las muestras	51	67.423	1.32202 Vb	93.48
Total	27	73.333	1.41427	
Índice de fijación F_{ST} : 0.06523				

El segundo AMOVA muestra que el 56.33 % de la variación total se encuentra entre el total de los individuos, el 39.51 % de la variación total se encuentra repartida entre los individuos al interior de las muestras y solo un 4.16 % entre ellas (Cuadro 4.12).

Cuadro 4.12. Componentes de la varianza molecular calculados a partir del método de diferencias alélicas (F_{ST}) entre muestras, entre individuos dentro de cada muestra y diferencias alélicas entre el total de los individuos.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre muestras	2	5.911	0.05885 Va	4.16
Entre individuos/ dentro de las muestras	24	45.923	0.55858 Vb	39.51
Entre individuos	27	21.500	0.79630 Vc	56.33
Total	53	73.333	1.41427	

En el último análisis de varianza molecular *locus* por *locus*, se observó que el 4.95078 % y el 60.52097 % de la variación total entre muestras y entre individuos pertenece al *locus*

Mcμ4. El *locus* FhU2 fue el que menor porcentaje de variación presentó entre muestras y entre individuos (Cuadro 4.13).

Cuadro 4.13. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) *locus* por *locus*.

Variación entre muestras				
<i>Locus</i>	Suma de cuadrados	g.l.	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
HrU2	2.03848	2	0.02253	4.68635
FhU2	1.52405	2	0.01242	2.75807
Mcμ4	2.348	2	0.0239	4.95078
Variación entre individuos				
<i>Locus</i>	Suma de cuadrados	g.l.	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
HrU2	14.88745	24	0.16201	33.6927
FhU2	13.01299	24	0.10444	23.19863
Mcμ4	18.02237	24	0.29213	60.52097

4.5.3 Dinámica de flujo genético

Frecuencias de alelos compartidos

Las frecuencias alélicas obtenidas para cada muestra se agruparon bajo los siguientes criterios de discriminación, asignados mediante la estrategia de máxima verosimilitud:

1. Puros = > 95% de alelos paternos
2. Introgresión = 95-80% de alelos paternos
3. Retrocruzas = 60-80% de alelos paternos
4. Híbridos = 60-45% de cada grupo alélico

Los individuos de cada una de las especies se identificaron y agruparon siguiendo el criterio anterior, del total de individuos analizados (N= 27) se encontraron cuatro individuos puros, 14 con introgresiones, nueve retrocruzas y un individuo híbrido (Anexo B).

Para cada una de las muestras analizadas se aplicó el mismo criterio, obteniendo de un total de siete individuos para la muestra de *S. atrogularis*: cuatro individuos puros y tres introgresiones; para la muestra de *S. pallida*, con un total de 11 individuos, se registraron 10 introgresiones y una retrocruza; finalmente para *S. passerina* con un total de nueve individuos, se obtuvieron ocho retrocruzas y un individuo híbrido (Cuadro 4.14 y Figuras 4.6- 4.9).

Cuadro 4.14. Proporciones de alelos encontrados en cada una de las especies del género *Spizella*.

Proporción	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>
Puros	0.571	0	0.000
Introgresiones	0.429	0.909	0.222
Híbridos	0	0	0.111
Retrocruzas	0	0.091	0.667
Total	1	1	1

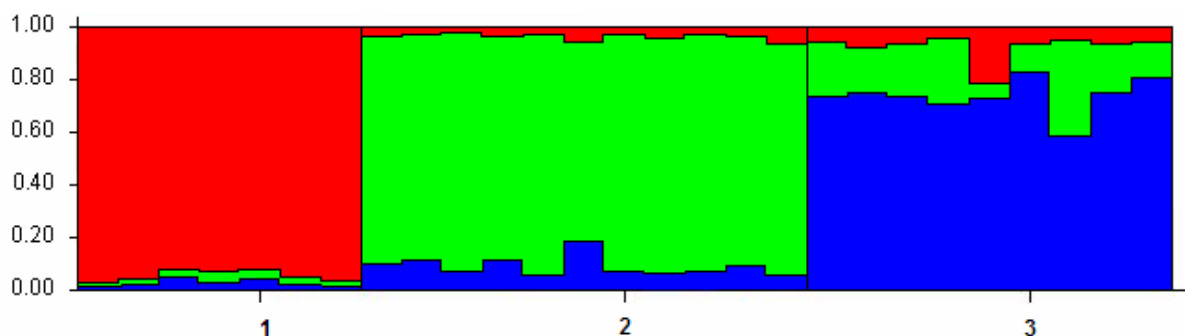


Figura 4.6. Se observa las tres especies, representadas cada una por un color diferente. El color rojo en el complejo uno (1), representa a los individuos de la especie *Spizella atrogularis*, el color verde en el complejo dos (2), representa a los individuos de la especie *S. pallida*, el color azul del complejo tres (3), representa a los individuos de la especie *S. passerina*. Los colores intercalados en cada complejo representan a individuos con trazas de introgresión y porcentajes de retrocruzas.

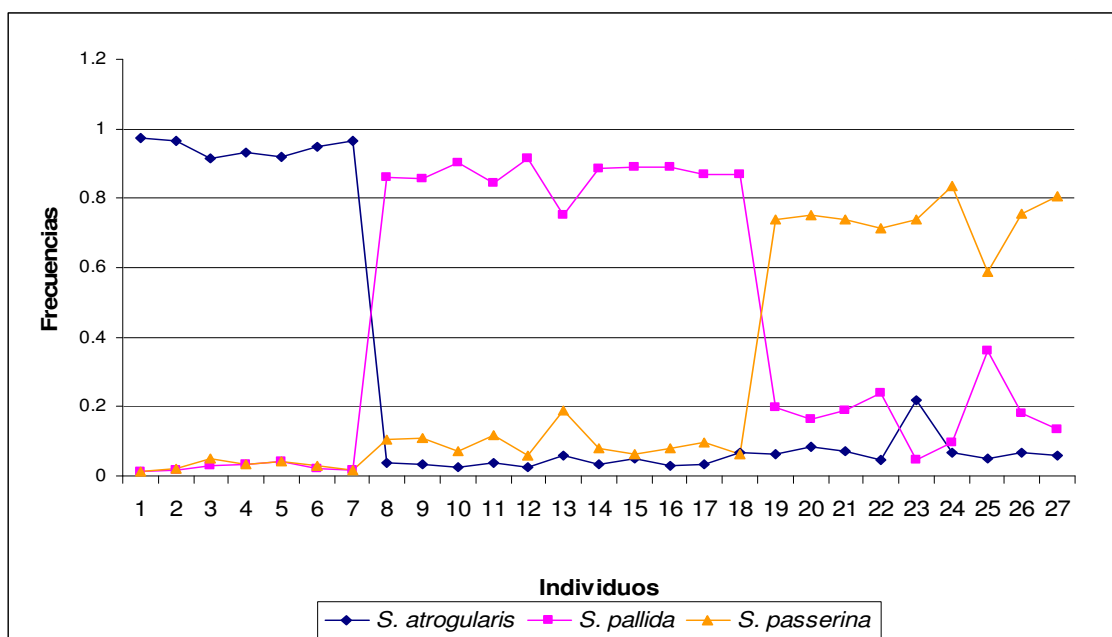


Figura 4.7. Frecuencias alélicas registradas por individuo para cada muestra analizada. Individuos 1-7, *Spizella atrogularis*; individuos 8-18, *Spizella pallida*; individuos 19-27, *S. passerina*.

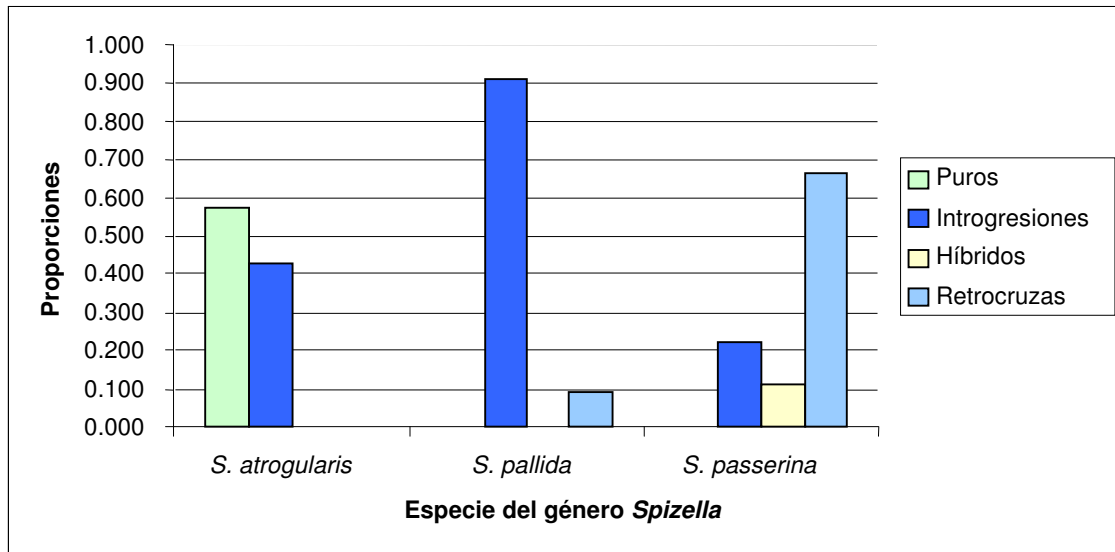


Figura 4.8. Frecuencias alélicas encontradas en cada una de las muestras.

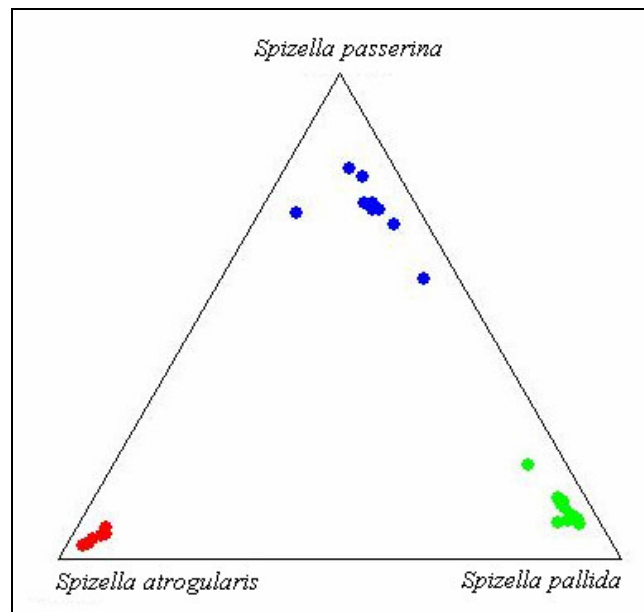


Figura 4.9. Se observa a *Spizella atrogularis* como la especie con mayor similitud genética entre sus individuos, mientras que las especies *Spizella pallida* y *Spizella passerina* muestran mayor dispersión debido a la introgresión y retrocruzas registradas en cada una.

4.5.4 Relaciones alélicas ancestrales y actuales

Frecuencias ancestrales y actuales por locus

Se estimaron las frecuencias ancestrales y actuales para cada uno de los *loci* analizados y sus alelos. Para el *locus* HrU2, los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 90, 115 y 120, con valores de 0.109, 0.192 y 0.11, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a

los alelos 115, 120 y 135, con valores de 0.12, 0.227 y 0.14, respectivamente. La mayor frecuencia ancestral y actual corresponde a los alelos 115 y 120 (Fig. 4.10, ver Anexo B).

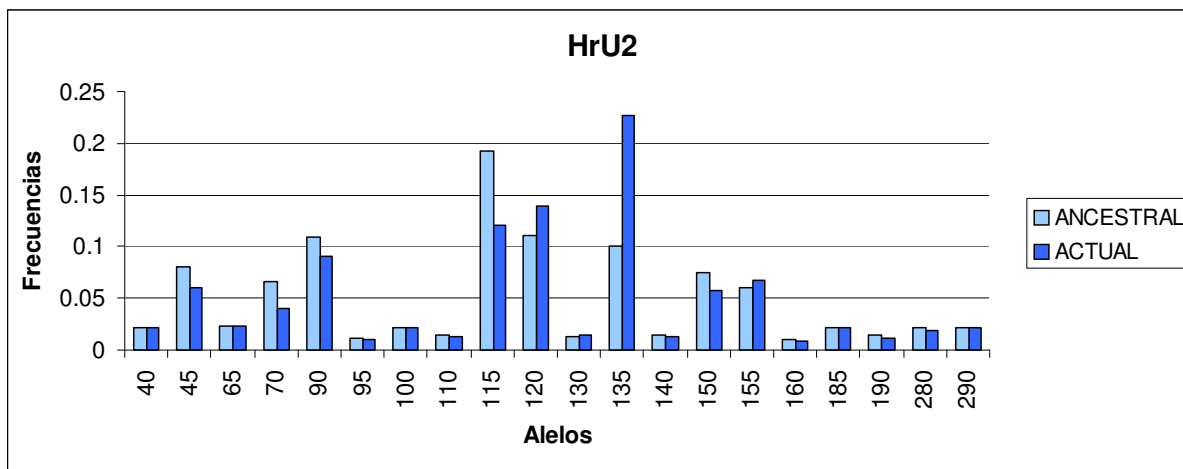


Figura 4.10. Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* HrU2.

Los resultados obtenidos para el *locus* FhU2, muestran que los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 88, 100 y 110, con valores de 0.271, 0.224 y 0.122, respectivamente. La mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 76, 88 y 100, con valores de 0.141, 0.202 y 0.236, respectivamente. La mayor frecuencia ancestral y actual corresponde a los alelos 88 y 100 (Figura 4.11, ver Anexo B).

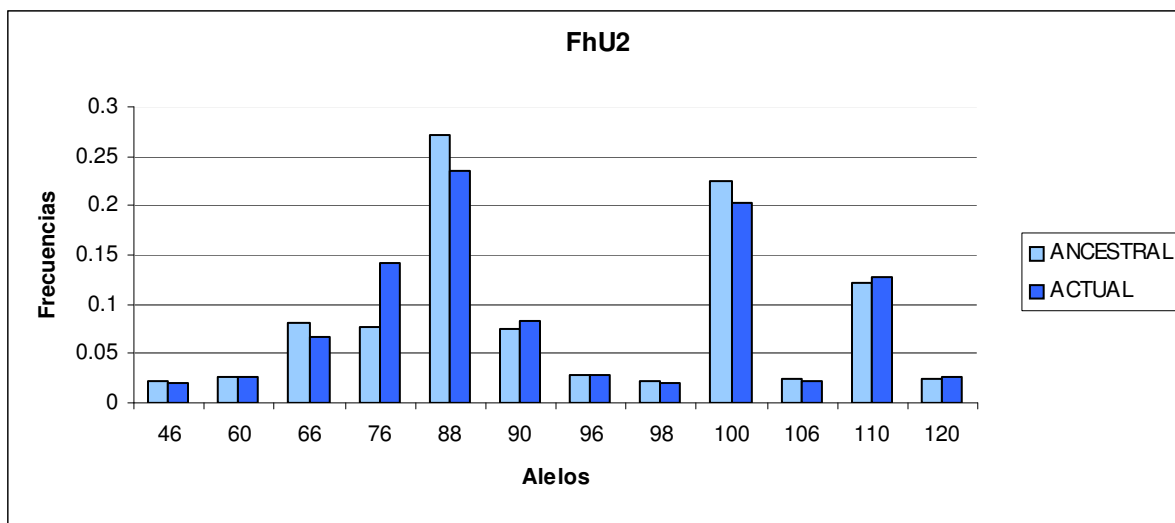


Figura 4.11. Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* FhU2.

Finalmente para el *locus* Mcu4, los alelos con mayor frecuencia ancestral fueron 166, 190 y 200, con valores de 0.167, 0.233 y 0.105, respectivamente; la mayor frecuencia actual corresponde a los alelos 166, 188 y 190 con valores de 0.181, 0.216 y 0.154, respectivamente. La mayor frecuencia tanto ancestral como actual corresponde a los alelos 166 y 190 (Figura 4.12, ver Anexo B).

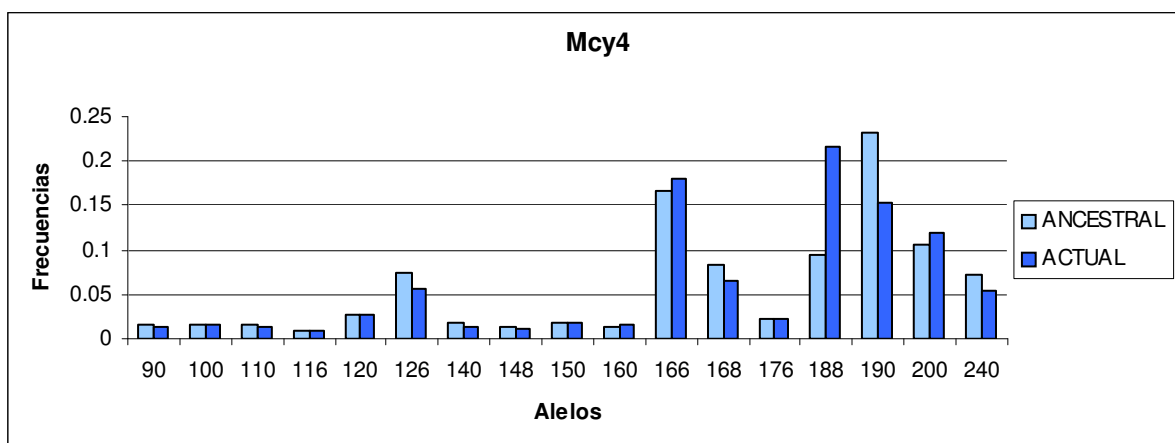


Figura 4.12. Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* Mcu4.

Alelos con mayor frecuencia por *locus* y por especie

Se obtuvieron las frecuencias alélicas por *locus*, para cada uno se eligieron aquellos alelos con mayor frecuencia por cada muestra. Para el *locus* HrU2 se seleccionaron seis alelos (65, 70, 90, 115, 135 y 155). El alelo con la mayor frecuencia para *Spizella atrogularis* fue el 115, con un valor de 0.143; para *S. pallida* y *S. passerina*, el alelo con mayor frecuencia fue el 65, con un valor de 0.113 para ambas especies (Figura 4.13, ver Anexo B).

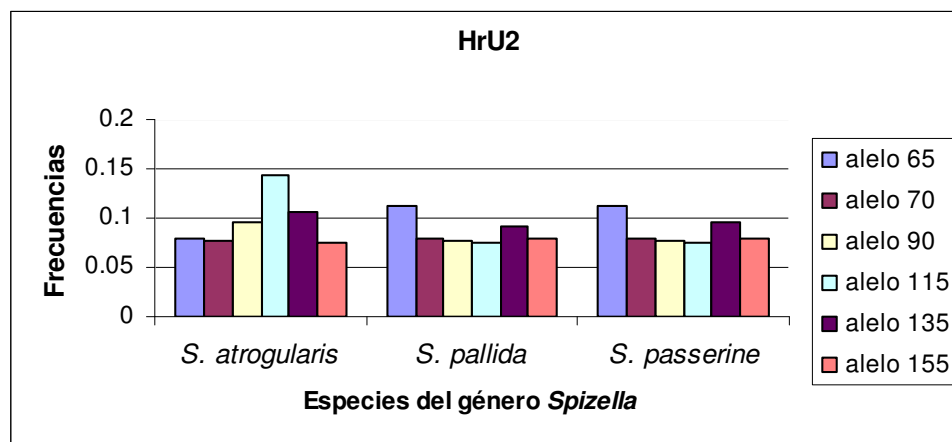


Figura 4.13. Frecuencias alélicas por especie para el *locus* HrU2.

Para el *locus* FhU2 se seleccionaron 3 alelos (88, 100 y 110). Los alelos con mayor frecuencia para la población *S. atrogularis* fueron el 88 y 100, con un valor de 0.232 para ambos alelos; para *S. pallida* y *S. passerina*, el alelo con mayor frecuencia fue el 100, con un valor de 0.207 y 0.206, respectivamente (Figura 4.14, ver Anexo B).

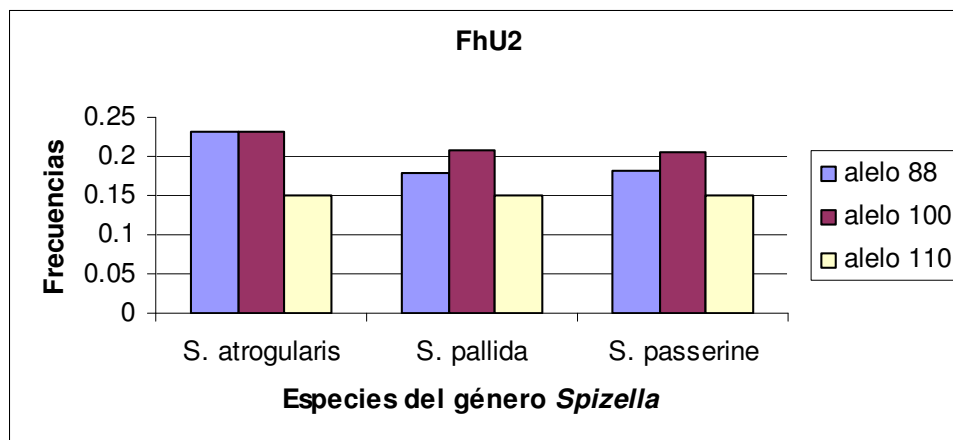


Figura 4.14. Frecuencias alélicas por especie para el *locus* FhU2.

Finalmente para el *locus* Mcμ4 se seleccionaron cinco alelos (166, 176, 190, 200 y 240). El alelo con mayor frecuencia para las tres poblaciones analizadas fue el 166, con un valor de 0.166 para *S. atrogularis*, 0.143 para *S. pallida* y 0.144 para *S. passerina* (Figura 4.15, ver Anexo B).

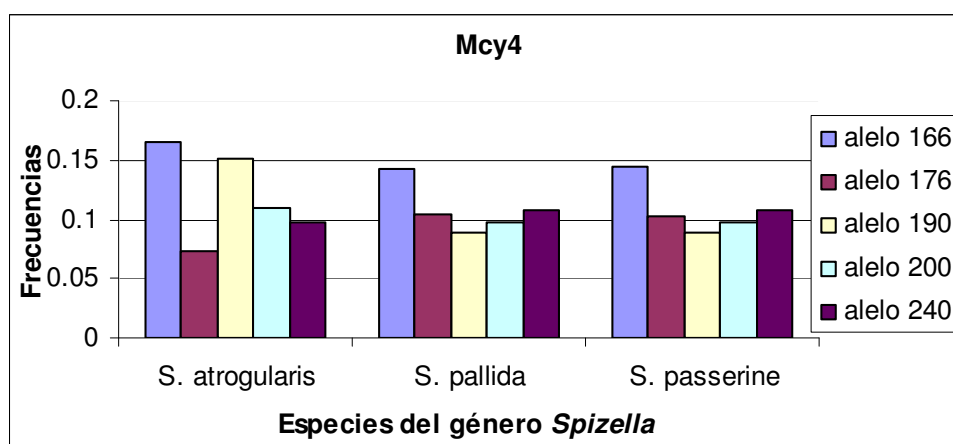


Figura 4.15. Frecuencias alélicas por especie para el *locus* Mcμ4.

4.6 DISCUSIÓN

4.6.1 Diversidad genética

Las tres especies estudiadas presentaron niveles elevados de diversidad genética, lo que coincide con especies con amplia distribución, como es el caso de *Spizella pallida*, *Spizella atrogularis* y *Spizella passerina*. Dentro de los estimadores relevantes se encuentran los niveles de heterocigosidad, que son una medida directa de diversidad genética, pues cuenta directamente a los heterocigotos observados (como individuos representantes de la combinación genética con mayor diversidad, dentro de una muestra determinada); así, la especie con mayor diversidad genética es *Spizella pallida*, quien presenta también la distribución más amplia.

Se ha registrado que para especies con amplia distribución, existen determinantes locales de selección de genes específicos para las distintas poblaciones en todo el intervalo. Esto implica que el aporte a la poza genética total, por parte de cada una de las poblaciones sea muy variado, lo que implica una mayor diversidad genética (Kohlman, 1993). Esta especie (*Spizella pallida*), también presenta alelos exclusivos, es decir, alelos que sólo se encuentran en este grupo taxonómico. Esto se relaciona también a su amplia distribución y a la posible existencia de poblaciones alopátricas que tengan una diferenciación genética mayor, con respecto al resto y esto implica, a su vez, alelos que se diferencian exclusivamente para esas poblaciones.

También *Spizella pallida* presenta mayor similitud genética con *Spizella passerina* (como se observa en el dendrograma de la Figura 4.5), lo que se puede relacionar también con los intervalos de distribución de ambas especies, los cuales coinciden en aproximadamente el 80% de la distribución geográfica. Esta coincidencia en la distribución propicia una interacción muy cercana entre ambas especies, tanto para las zonas de reproducción e invernación, como para la zona de ocupación común el resto de año, es decir, son especies simpátricas.

Esta simpatría promueve, muy probablemente, la posibilidad de formar híbridos entre ambas especies. La formación de híbridos en la naturaleza responde generalmente a una estrategia de colonización de nuevos ambientes y/o de enriquecimiento genético y posible diferenciación hacia especies nuevas (Mettler y Gregg, 1982; Borge y colaboradores, 2005). En este contexto, *Spizella atrogularis* presenta una diversidad genética moderada, pero una

mayor riqueza alélica; es decir, existe un mayor número de alelos y también más combinaciones de éstos como genotipos. Esto implica que, en el caso que existan híbridos entre *S. pallida* y *S. atrogularis*, estos híbridos actuarían como “puentes genéticos” para incrementar la diversidad y riqueza genéticas entre ambas especies, considerando que la primera es más diversa en heterocigotos, pero la segunda presenta un mayor número de alelos en su poza genética y, potencialmente, puede formar más genotipos.

En el caso de *Spizella passerina*, se presentan niveles moderadamente elevados de diversidad genética, en un intervalo intermedio entre *Spizella pallida* y *Spizella atrogularis*. Presenta además mayor afinidad genética con *Spizella pallida* y, como se discutirá más adelante, evidencia de ser un grupo derivado de la hibridación entre *Spizella pallida* y *Spizella atrogularis*, a las que se les considera entonces, con base en la evidencia genética obtenida, como especies paternas de *Spizella passerina*. Estos datos evidencian además el papel de *Spizella passerina* como puente entre ambas, sugiriendo que el flujo de genes se prioriza hacia *Spizella pallida*.

Sin embargo, tomando en cuenta los resultados para la diversidad y riqueza genética, además de la evidencia morfológica, *Spizella passerina* puede ser un *taxón* con un proceso de especiación incipiente, pues aunque se están registrando niveles elevados de introgresión genética y la morfología es muy similar a *Spizella pallida*, los niveles de diferenciación genética y riqueza alélica son distintos, presentando una riqueza moderada (intermedia con respecto a la registrada para las especies paternas), pero una diversidad genética ligeramente menor (Como se observa en la Cuadro 4.2) a la registrada para *Spizella pallida*.

4.6.2 Estructura genética

La estructura genética dentro de una especie, dentro de una población o entre poblaciones, es definida a partir de la variación que existe dentro y entre los niveles de estudio (especie, inter o intrapoblacional). Esta estructura genética está determinada en parte por las condiciones ambientales, el tamaño efectivo de las poblaciones, adecuación y ciclo de vida, por lo que la estructura genética de las poblaciones refleja su evolución. Comúnmente la estructura genética se mide utilizando estimadores de la heterocigosidad, a través de la cual pueden ser calculados estadísticos como los estadísticos “F” propuestos por Wright (1951).

Para este estudio, las tres especies analizadas (*Spizella pallida*, *Spizella passerina* y *Spizella atrogularis*) presentaron una similitud genética elevada, considerando el valor obtenido para F_{ST} (Ver Cuadro 4.6). Esto implica que existen relaciones filogenéticas cercanas entre las especies paternas (*Spizella pallida* y *Spizella atrogularis*), probablemente como especies monofiléticas (hermanas) y niveles de flujo genético horizontal (a través de los híbridos) considerables. Esto se comprueba con los resultados obtenidos para el flujo genético entre los tres *taxa*, que presenta un intercambio aproximado de seis a siete individuos por cada generación, lo que se considera abundante, con respecto a lo registrado en otros modelos híbridos en aves (Borge y colaboradores, 2005).

Los *taxa* con menor número de migrantes fueron *Spizella atrogularis* y *Spizella passerina*, probablemente porque estas especies no presentan coincidencia en el intervalo de reproducción. Es más probable que cualquier intercambio genético entre ambas ocurra a través de la otra especie (*Spizella pallida*). En este caso, es viable que la dirección del flujo genético se establezca de *Spizella atrogularis* a *Spizella pallida* y de esta última hacia *Spizella passerina*. Este modelo de direccionalidad explicaría también las jerarquías de riqueza y diversidad genéticas, además de ser congruente a las relaciones dentro del intervalo de distribución para las tres especies.

Además, la formación de híbridos está determinando también la estructura genética de las tres especies, pues mientras que existe gran similitud entre las tres, las diferencias encontradas dentro de los grupos son significativas para los individuos y dentro de cada *taxón*; es decir, las diferencias observadas entre individuos y dentro de cada especie, están condicionadas por el origen híbrido de *Spizella passerina*.

Lo anterior se corrobora cuando se analizan los resultados para el parámetro F_{IS} (niveles de endogamia), donde *Spizella atrogularis* es la que presenta el valor más alto, esto tal vez porque no tiene un contacto significativo con las otras dos especies, como se discutió con anterioridad. Sin embargo, *Spizella pallida* es la especie con un menor índice de endogamia, esto seguramente porque es la especie con el intervalo más amplio de distribución y la que mayor contacto tiene con el *taxón* híbrido (*Spizella passerina*), lo que impide que la endogamia sea un factor significativo en la estructura genética de dicha especie.

Con respecto al parámetro F_{IT} , éste registra un equilibrio entre la deriva genética (factores aleatorios que modifican la estructura) y el flujo genético (movimiento direccional de

genes que homóloga las pozas genéticas entre especies/poblaciones), en un intervalo de -1 a 1, respectivamente (Wright, 1951) Para el caso de las tres especies de este estudio, el valor es <0.4 , lo que implica que la fuerza evolutiva que está condicionando de manera significativa la estructura genética de las tres especies es el flujo genético, tanto dentro de cada una de ellas (a nivel de poblaciones), como el establecido a través de los híbridos (entre especies).

Esto se corrobora también en los Análisis Moleculares de la Varianza, en los tres modelos analizados: a) por diferencias alélicas (grupos/muestras), b) diferencias alélicas (individuos) y c) *locus* por *locus*. Para las dos primeras se agrupa la mayor variación dentro de las muestras, es decir, entre individuos. Esto implica que los individuos presentan una variación genética muy grande al interior de las tres especies y que esta variación es mayor que la que presentan los diferentes grupos entre sí, aunque sigue existiendo diferenciación suficiente para considerarlos *taxa* distintos. Para el caso de los diferentes *loci* utilizados en el análisis, el que resulta ser más informativo es el Mcu4 (Ver Cuadro 4.13), aunque los otros dos presentan contribuciones significativas a la variación total de la especie; es decir, al ser marcadores altamente polimórficos, son capaces de detectar diferencias genéticas entre individuos, dentro de cada grupo y entre todos los *taxa* analizados.

4.6.3 Dinámica de flujo genético

Para diagnosticar la existencia de un *taxón* híbrido como tal, es necesario analizar los patrones de flujo genético dentro de las especies involucradas, así como la dirección del mismo y el porcentaje de alelos compartidos en cada una de las especies o grupos involucrados en el proceso (Borge y colaboradores, 2005). Para este estudio y con base en los resultados obtenidos, se define la existencia de un complejo híbrido entre las tres especies, considerando a *Spizella pallida* y *Spizella atrogularis* como especies paternas y a *Spizella passerina* como un *taxón* híbrido, tal vez una especie incipiente con fuertes trazas de retrocruzas e introgresión.

La especie paterna con mayor evidencia de alelos introgresados (alelos de la otra especie, adquiridos a través de los híbridos) es *Spizella pallida*, probablemente porque es la que mayor interacción presenta con el grupo híbrido (*Spizella passerina*). Las introgresiones observadas en *Spizella atrogularis*, seguramente se adquieren solamente a través de híbridos de primera generación (F_1). Para el caso del *taxón* híbrido (*Spizella passerina*), sólo se

encontró un individuo híbrido de primera generación (con 45-60% de alelos de ambas especies paternas) y la mayor parte de los híbridos fueron retrocruzas (F_2 ; 60-80% de alelos de alguna de las especies paternas) y la dirección de estas retrocruzas es hacia *Spizella pallida* (Ver Cuadro 4.14 y Figura 4.8)

Los datos obtenidos concuerdan con los intervalos de distribución registrados para las tres especies, puesto que para que haya formación de híbridos es necesario que las especies paternas coincidan durante la época reproductiva, mientras que para la existencia de las retrocruzas es necesario que los híbridos formados en la primera generación permanezcan en contacto con la especie paterna hacia la cual se realiza dicha retrocruza.

Es evidente también que este proceso de hibridación e introgresión alélica es un proceso antiguo, lo que ha permitido una diferenciación progresiva (aunque incipiente para *Spizella passerina*) de los tres *taxa* analizados. Las condiciones de simpatría y los altos niveles de flujo genético, así como la existencia de híbridos fértiles y bien diferenciados, permiten semejanzas genéticas entre las tres especies, aunque los intervalos de distribución particulares para cada una y temporadas de reproducción diferentes, establecen un equilibrio para que se mantengan como taxones diferentes.

4.6.4 Relaciones alélicas ancestrales y actuales

Es importante considerar la dinámica de genes ancestrales y actuales cuando se analiza el establecimiento de hibridación/introgresión entre especies simpátricas. Se ha descrito la importancia de verificar si las frecuencias y tipos de alelos ancestrales se han mantenido o presentan cambios relevantes en las poblaciones actuales (Delgado, 2002).

Para el caso de las zonas híbridas, un patrón clásico consiste en que, para determinar el éxito y/o mantenimiento de individuos híbridos viables es importante que sus frecuencias alélicas se mantengan constantes y que presenten, en su mayoría, los mismos alelos que los encontrados en las especies paternas (Delgado, 2002). En este caso, para los tres microsatélites analizados, se conservan frecuencias muy similares para cada uno de los alelos; esto corrobora la gran sensibilidad de estos marcadores y la consistencia del complejo híbrido como tal.

Es decir, la existencia de un *taxón* híbrido que actúa como puente entre las otras dos especies, es una consecuencia de las relaciones evolutivas y ecológicas de ambas y ha

permitido, además, una selección diferencial y positiva de los individuos híbridos, los cuales presentan un proceso de especiación incipiente.

Para el caso de las proporciones alélicas para cada microsatélite utilizado se observa, en los tres casos, que las frecuencias de alelos para *Spizella pallida* y *Spizella passerina* son muy similares, lo que indica una fuerte interacción reproductiva actual, mientras que *S. atrogularis*, aunque presenta los mismos alelos, tiene frecuencias distintas como producto de una mayor diferenciación con respecto a las otras dos; posiblemente en el pasado, existía una mayor interacción entre las especies *Spizella pallida* y *Spizella atrogularis*, hecho que actualmente coloca a ambos *taxa* como filogenéticamente más cercanos.

4.7 CONCLUSIONES

- La sensibilidad de los tres microsatélites seleccionados fue suficiente para evaluar diferencias existentes a nivel inter-específico entre especies del género *Spizella* (*Spizella pallida*, *Spizella passerina* y *Spizella atrogularis*), siendo Mcμ4, el microsatélite con mayor sensibilidad.
- Los datos indican que la especie *Spizella passerina* es producto de la hibridación entre *Spizella pallida* y *Spizella atrogularis*.
- Se observó un elevado flujo genético y similitud genética entre las tres especies de estudio, lo que explicaría también los valores de riqueza y diversidad genéticas observados para cada *taxón*.
- Los resultados obtenidos sugieren un proceso antiguo de hibridación e introgresión alélica entre las tres especies del género *Spizella* (*Spizella pallida*, *Spizella passerina* y *Spizella atrogularis*).
- *Spizella atrogularis* presenta mayor similitud genética, además de mantener una estrecha relación filogenética con la especie *Spizella pallida*.
- Los datos morfológicos (publicada anteriormente) y moleculares sugieren una mayor afinidad genética entre las especies *Spizella pallida* y *Spizella passerina*, debida a factores tanto ecológicos, de selección de hábitat, abundancia, coincidencia en regiones y periodos reproductivos, lo que ha propiciado un proceso extensivo de hibridación e introgresión de genes.

CAPÍTULO 5

5.2 DISCUSIÓN GENERAL

La detección de polimorfismos en grupos como las aves es importante, porque permite determinar, de una manera confiable, niveles de riqueza genética, diversidad, estructura y flujo genéticos; parámetros que al combinarse con variables ecológicas y morfológicas, son de gran importancia en el área de conservación y protección de recursos genéticos en especies vulnerables.

Marcadores genéticos como los microsatélites, son de utilidad en análisis de diversidad y estructura genéticas intra e interespecies, porque pueden ser empleados en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad genética intra e interespecífica, mejoras genéticas y análisis de dispersión de especies (Koreth y colaboradores, 1996).

En regiones de alta riqueza biológica, como las reservas naturales, es deseable contar con información de los recursos genéticos de grupos bioindicadores, como las aves, ya que de esta manera se pueden proponer estrategias adecuadas de conservación, restauración y manejo de especies vulnerables, tomando en cuenta no solamente al hábitat y a los individuos dentro de las especies, sino considerando también el acervo genético de las mismas.

Estudios anteriores, realizados por Primmer y colaboradores (1996), utilizando los microsatélites HrU2 y FhU2, registraron un número elevado de especies con amplificación positiva, aun en especies sin relaciones filogenéticas cercanas, como en este caso. Los resultados en el presente trabajo confirman los resultados registrados por esos autores, además de incorporar un número importante de especies dentro del mismo y detectar nuevos alelos, lo que contribuye a enriquecer el número de marcadores genéticos de amplio espectro, identificados para avifauna.

En este estudio en particular, se corroboró el alto nivel de polimorfismo de los marcadores HrU2, FhU2 y Mcu4, lo que contribuye a incrementar el intervalo de amplificación de los mismos, al incluir a 34 nuevas especies, además de un registro adicional de alelos nuevos. Esta es una primera aproximación de evaluación de polimorfismos genéticos a gran escala para aves, en México y es relevante porque se contribuye al registro de cinco

marcadores polimórficos para aplicaciones en estudios genéticos y análisis de niveles de variabilidad y estructura genética dentro y entre poblaciones de aves.

La mayoría de los microsatélites amplificaron positivamente, lo que significa que las secuencias de los oligonucleótidos de las regiones flanqueantes son altamente conservadas en el grupo aviario, a pesar del origen heterogéneo de la muestras (especies distintas), lo que implica que están relacionados a regiones altamente conservadas dentro de su genoma (Primmer y colaboradores, 2005). Tomando en cuenta el reducido número de microsatélites en el genoma y dada la escasez de *loci* especie-específicos, los resultados son una contribución importante a la incremento del intervalo de amplificación para marcadores de amplio espectro dentro de las aves.

Comprobada la sensibilidad de los microsatélites HrU2, FhU2 y Mcu4 como marcadores altamente polimórficos, así como su aplicación a diversos modelos para poblaciones naturales en aves, permite su aplicación en modelos intra e interespecíficos de análisis genético, como los analizados en este trabajo.

En el modelo intraespecífico, se logró elucidar un proceso activo de especiación alopátrica entre dos poblaciones disjuntas del colibrí *Doricha eliza*, endémico de los estados de Veracruz y Yucatán, verificando un nivel considerable de diferenciación genética entre los individuos de ambas regiones, además de niveles casi nulos de flujo genético.

En el modelo interespecífico, se describe la estructura genética del complejo híbrido para poblaciones del género *Spizella* (*S. pallida* - *S. passerina* - *S. atrogularis*), en el Parque Ecológico Cubitos, elucidando un proceso antiguo de hibridación e introgresión alélica actual entre las tres especies del género *Spizella*, así como un origen híbrido para la especie *S. passerina*, probablemente por contacto ancestral entre *S. pallida* y *S. atrogularis*.

Lo expuesto en este trabajo ilustra la utilidad de los microsatélites, pues son capaces de detectar múltiples alelos y dar de manera confiable niveles de riqueza genética, diversidad y estructura genética, convirtiéndolos en una herramienta indispensable en las áreas de conservación y protección de recursos genéticos de especies vulnerables.

5.2 CONCLUSIONES GENERALES

- Los cinco marcadores empleados presentan un alto grado de polimorfismo, reflejado en el número alelos amplificados para 34 especies distintas de aves.
- El polimorfismo de los cinco microsátélites seleccionados permitió llevar a cabo amplificaciones positivas en diversas especies de aves, en modelos intra e interespecíficos.
- Se contribuyó a la ampliación del intervalo de amplificación de los microsátélites HrU2, FhU2 y Mcμ4, para 34 especies de aves presentes en el Parque Ecológico Cubitos y en la Unidad de Manejo Ambiental Rancho Santa Elena, en el estado de Hidalgo, al detectarse nuevos alelos, lo que enriquece los niveles de polimorfismo detectados con anterioridad.
- Se observó un nivel de diferenciación genética, ecológica y morfológica considerable en las poblaciones disjuntas del colibrí *Doricha eliza*, endémico de los estados de Veracruz y Yucatán; lo que sugiere que talvez sean poblaciones en un proceso activo de especiación, por lo que se sugiere una revisión a la taxonomía actual de la especie, pues probablemente haya diferenciación suficiente para considerarlos taxa distintos.
- Los resultados obtenidos indican que la especie *Spizella passerina* es producto de la hibridación entre las especies *Spizella pallida* y *Spizella atrogularis*, especies que muestran una mayor afinidad genética debida a factores tanto ecológicos, de selección de hábitat, abundancia, coincidencia en regiones y periodos reproductivos, hecho que ha propiciado un proceso extensivo de hibridación e introgresión de genes.

LITERATURA CITADA

- Alderson, G.W., H.L. Gibbs y S.G. Sealy.** (1999). Parentage and Kinship studies in an obligate brood parasitic bird, the Brown-headed cowbird (*Molothrus ater*), using microsatellites DNA markers. *The Journal of Heredity* 90: 182-190.
- Barton, N.H.** (2001). The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10: 551-568.
- Beck, N.R., M.C. Double y A. Cockburn.** (2003). Microsatellite evolution at two hypervariable *loci* revealed by extensive avian pedigrees. *Molecular Biology and Evolution* 20: 54-61.
- Borge, T., K. Lindroos, P. Na' Dvorni'K, C. Syva' Nen, y G.P. Saetre.** (2005). Amount of introgression in flycatcher hybrid zones reflects regional differences in pre and post-zygotic barriers to gene Exchange. *Journal Evolutionary Biology* 18: 1416-1424.
- Bossart, J.L. y D.P. Prowell.** (1998). Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons, and new directions. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 202-206.
- Bruford, M.W. y R.K. Wayne.** (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetic and Development* 3: 939-943.
- Ceballos, G., A.M. Coro y V.L. Márquez.** (2000). La diversidad y conservación de las aves de México. En Ceballos, G. y V.L. Márquez. (Eds.), Las aves en peligro de extinción (24-26) CONABIO, Instituto de Ecología UNAM, Fondo de Cultura Económica. 1^{er} Edición. México, D.F.
- Cheng, H.H. y L.B. Crittenden.** (1994). Microsatellite markers for genetic maing in the chicken. *Poultry Science* 73:539-546.
- Cummings, M.R. y W.S. Klug.** (1999). Conceptos de genética. 8^a Ed. *Prentice Hall Iberia*. Madrid, España. 814 pp.
- Dallimer, M.** (1999). Cross-species amplification success of avian microsatellites in the redbilled quelea *Quelea quelea*. *Molecular Ecology* 8: 685-702.
- Dawson, R.J.G, H.L. Gibbs, K.A. Hobson y S.M. Yezerinac.** (1997). Isolation of Microsatellite of Cross- Species Microsatellite DNA Markers from a Passerine Bird, *Dendrica petechia* (The yellow warbler), and Their Use in Population Studies. *Heredity* 79:508-514.
- Delgado, P.V.** (2002). Dinámica histórica de la hibridación introgresiva en poblaciones naturales de *Pinus montezumae* Lamb y *P. pseudostrobus* Lind (*Pinaceae*). Tesis para

obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. México, D. F.

- DeYoung, R.W. y R.L. Honeycutt.** (2005). The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management* 69: 1362-1384.
- Dodgson, J.B., H.H. Cheng y R. Okimoto.** (1997). DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science* 76: 1108-1114.
- Double, M.C., D. Dawson, T. Burke y A. Cockburn.** (1997). Finding the fathers in the least faithful birds: a microsatellite-based genotyping system for the superb fairy-wren *Malurus cyaneus*. *Molecular Ecology* 6: 691-693.
- Ellegren, H.** (1992). Polymerase chain reaction (PCR) of microsatellites, a new approach to studies of genetic relationships in birds. *Auk* 109: 886-895.
- England, P.R.** (1999). Statistical analysis of microsatellite DNA data. *Tree* 14: 253-256.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider.** (2006). Arlequin, versión 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis.
URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
- Fridolfsson, A.-K., U.B. Gyllenstein, y S. Jakobsson.** (1997). Microsatellite markers for paternity testing in the Willow warbler *Phylloscopus trochilus*: high frequency of extra-pair young in an island population. *Hereditas* 126: 127- 132.
- Georges, M., D. Nielsen, M. Mackinnon, A. Mishra, R. Okimoto, A.T. Pasquino, L.S. Sargeant, A. Sorensen, M.R. Steele, Y. Zhao, J.E. Womack y J. Hoeschle.** (1995). Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle exploiting progeny testing. *Genetics* 139:907-920.
- Gibbs, M., D. Dawson, C. McCamley, A.F. Wardle, J.A.L. Armour y T. Bruke.** (1997). Chicken microsatellite markers isolated from libraries enriched from simple tandem repeats. *Animal Genetics* 28: 401-417.
- Goodman, S.J.** (1997). RST Calc: a collection of computer program for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology* 6: 881-885.
- Goudet, J.** (2002) FSTAT, version 2.9.3.2: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices.
URL: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Grant, P.R., & B.R. Grant.** (1992). Hybridization of bird species. *Science* 256:193-197.

- Hanotte, O., C. Zanon, A. Pugh, C. Greig, A. Dixon y T. Bruke.** (1994). Isolation and caracterización of microsatellite *loci* in a passerine bird: the reed buting *Emberiza schoeniclus*. *Molecular Ecology* 3: 529-540.
- Hartl, D.L.** (1999). A primer of population genetics. *Sinauer Associates, Inc.* Sunderland, Massachusetts, USA. 121 pp
- Helbig, A.J., M. Salomon, S. Bensch y I. Seibold.** (2001). Male-biased gene flow across an avian hybrid zone: evidence from mitochondrial and microsatellite DNA. *Journal Evolutionary Biology* 14: 227-287.
- Howell, S.N.G. y S. Webb.** (1995). A guide to the birds of Mexico and Northern Central America. *Oxford University Press*. New York, EUA. 851 pp
- Jarne, P. y P.J.L. Lagoda.** (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecology and Evolution* 11: 424-429.
- Knapton, R.W.** (1994). Clay-colored Sparrow (*Spizella pallida*). En Poole, A. y F. Gill (Eds.), The Birds of North America, No. 120. The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA, and The American Ornithologists' Union, Washington, D.C.
- Kohlman, B.** (1993). Análisis de las zonas híbridas y la evolución. En Núñez-Farfán, J. y C. Cordero. (Eds.), Tópicos de Biología Evolutiva, Diversidad y Adaptación. Editorial Centro de Ecología UNAM. México, D.F. 105-127 pp
- Koreth, J., J.J. O'Leary, y J.O'D. McGee.** (1996). Microsatellite and genomic analysis. Review Article. *Journal of Pathology* 178:239-248.
- Loyau, A., B. Moureau, M. Richard, P. Christe, P. Heeb y G. Sorci.** (2005). Cross-amplification of polymorphic microsatellites reveals extra-pair paternity and brood parasitism in *Sturnus vulgaris*. *Molecular Ecology Notes* 5: 135–139.
- Manel, S., O.E. Gaggiotti y R.S. Waples.** (2005). Assignment methods: matching biological questions whit the aropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 136 – 142.
- Mayr, E. y L.L. Short, Jr.** (1970). Species *taxa* of North American birds, a contribution to comparative systematic. *Publications of the Nuttall Ornithological* 9:1-127.
- Mettler, L.E. y T.H. Gregg.** (1982). Genéticas de las Poblaciones y Evolución. Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana (UTEHA), S.A. de C.V. México. 245 pp
- Middleton, A.L.** (1998). Chipping Sparrow (*Spizella passerina*). En Poole, A. y F. Gill (Eds.), The Birds of North America, No. 120. The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA, and The American Ornithologists' Union, Washington, D.C.
- Miller, M.P.** (1997). TFGPA, versión 1.3: Tools for population genetic analyses. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

URL: <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>

- National Geographic. (1999).** Field guide to the birds of North America. 3er Edición. National Geographic Society. Washington D.C. 480 pp
- Nei, M. (1972).** Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292 pp
- Nei, M. (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nesje, M., K.H. Roed, J.T. Liefjeld, P. Lindberg y O.F. Steen. (2000).** Genetic relationships in the peregrine falco (*Falco peregrinus*) analyzed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 9: 53-60.
- Norma Oficial Mexicana.** Protección ambiental – Especies de flora y fauna silvestres de México. Categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). Diario Oficial 16 Octubre del 2000.
- Ortiz-Pulido R. y R. Díaz. (2001).** Distribución de los colibríes en la zona baja del centro de Veracruz, México. *Ornitología Neotropical* 12: 297-317.
- Ortiz-Pulido, R., P.A. Townsend, B.M. Robbins, R. Díaz, A.G. Navarro-Sigüenza y G. Escalona-Segura. (2002).** The Mexican Sheartail (*Doricha eliza*): Morphology, Behavior, Distribution, and Endangered Status. *Wilson Bulletin* 114: 153-282.
- Periódico Oficial del Estado de Hidalgo (2002)** Decreto gubernamental: Área Natural Protegida en la categoría de Parque Estatal (Parque Ecológico Cubitos). Gobierno del Estado de Hidalgo. 1-64 pp
- Peterson, R.T. y E.L. Chalif. (2000).** Aves de México. Ed. Diana. México, D.F. 473 pp
- Phillips, B.L., S.J.E. Baird y C. Moritz. (2004).** When vicars meet: a narrow contact zone between morphologically cryptic phylogeographic lineages of the rainforest skink, *Carlia rubrigularis*. *Evolution* 58: 1536-1548.
- Ponsuksili, S., K. Wimmers, F. Schmoll, P. Horst y K. Schellander. (1999).** Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in chicken. *The Journal Heredity* 90: 656-659.
- Primmer, C.R., A.P. Moller y H. Ellegren. (1996).** A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Primmer, C.R., T. Raudse, B.P. Chowdhary, M. Pape y H. Ellegren. (1997).** Low frequency of microsatellites in the avian genome. *Genome Research* 7: 471-482.

- Pritchard, J.K., X. Wen y D. Falush.** (2007). Structure, version 2.2: Inference of population structure using *multilocus* genotype data.
URL: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.** (1991). Estudio del manejo integral forestal para las fracciones B y C del predio denominado “Rancho Santo Domingo”, Huasca de Ocampo, Hidalgo. 39 pp
- Selkoe, K.A. y R.J. Toonen.** (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 1-14.
- Sunnucks, P.** (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199–203.
- Takahashi, H., K. Nirasawa, Y. Nagamine y Y. Yamamoto.** (1998). Genetic relationships among Japanese native breeds chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. *Journal of Heredity* 89: 543-546.
- Tenney, C.R.** (1997). Black-chinned Sparrow (*Spizella atrogularis*). En Poole, A. y F. Gill (Eds.), The Birds of North America, No. 120. The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, PA, and The American Ornithologists' Union, Washington, D.C.
- Torres-Chávez, M.G. y A.G. Navarro- Sigüenza.** (2000) Los colibríes de México, brillo de la biodiversidad. *Biodiversitas* 28: 2- 6.
- Velkala, R. J., H.J. Vilki, K.T. Elo, D.J. De Koning y A.V. Maki-Tanila.** (1999). A search for quantitative trait *loci* for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. *Animal Genetic* 30(2):136-43.
- William, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Libak, J.A. Rifalski y S.V. Tingey.** (1990). DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primer are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wright, S.** (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yeh, F., R. Yang y T. Boyle.** (1999). POPGEN, versión 1.31: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis.
URL: <http://www.ualberta.ca/~fyeh/index.htm>
- Zink, R.M. y D.L. Dittman.** (1993). population structure and gene flow in the Chiing Sparrow and a hypothesis for evolution in the genus *Spizella*. *Wilson Bulletin* 105: 399-413.

GLOSARIO

Definiciones tomadas de: **Mettler y Gregg** (1982), **Puertas** (1992) y **Cummings y Klug** (1999).

Ácido nucleico. Biomoléculas formadas por macropolímeros de nucleótidos, o polinucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base material de la herencia que se transmite de una a otra generación. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA).

Aislamiento conductual (etológico- de comportamiento). Falta de cruzamiento entre las especies de animales cuyos rituales de cortejo y apareamiento difieren sustancialmente.

Aislamiento ecológico. Falta de apareamiento entre organismos que pertenecen a poblaciones diferentes y que ocupan hábitats determinados dentro de la misma área.

Aislamiento geográfico. Separación de dos poblaciones por una barrera física.

Aislamiento reproductivo. Incapacidad de los organismos de una población para reproducirse con éxito con los miembros de otra población ya sea por mecanismos aislantes previos o posteriores al apareamiento.

Aislamiento temporal. Incapacidad de los organismos para cruzarse si tienen temporadas de celo muy diferentes.

Alelo. Cada una de las formas en que puede presentarse un gen en un determinado locus de cromosomas homólogos.

Amplificación. Aumento del número de copias de una secuencia de DNA, bien mediante un proceso biológico en la célula, o bien mediante técnicas de laboratorio.

Árbol filogenético. Diagrama ramificado que ilustra las líneas de descendencia entre un grupo de especies emparentadas.

Biodiversidad. La riqueza o variedad de formas vivientes en un área o región geográfica, generalmente definida como el número de especies presente

Carácter. Rasgo distintivo como expresión de un gen.

Depresión endogámica. La reducción del vigor observada en la progenie de cruzamiento entre pariente cercanos. La depresión endogámica es debida a la expresión de alelos recesivos perjudiciales.

Desnaturalización. De proteínas o DNA. Proceso por el cual una proteína pierde su estructura

original y en consecuencia cambian muchas de sus propiedades físicas. Una proteína se puede desnaturalizar por calor, cambios en el pH del medio, presencia de diversas sustancias químicas como detergentes, etc. La aplicación en el caso del DNA es la separación de sus dos hebras.

Diversidad Biológica. Conjunto de todas las especies de plantas y animales, su material genético y los ecosistemas de los que forman parte. Es el número de especies de una región determinada; La variabilidad genética de cada especie; Y el número de ecosistemas que dichas especies conforman.

Diversidad genética. Variabilidad genética presente en una población o especie.

DNA. Deoxyribonucleic acid (en español Ácido desoxirribonucleico). Es la molécula que contiene y transmite la información genética de los organismos excepto en algunos tipos de virus (retrovirus). Está formada por dos cadenas complementarias de nucleótidos que se enrollan entre sí formando una doble hélice que se mantiene unida por enlaces de hidrógeno entre bases complementarias. Los cuatro nucleótidos que forman el DNA contienen las bases adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T).

DNA genómico. DNA cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de células o tejidos.

DNA mitocondrial. Genoma existente en el interior de las mitocondrias formado por un cromosoma circular de DNA que está en número variable de copias según los tejidos.

DNA repetitivo. Fragmentos de DNA que están repetidos a lo largo del genoma, bien en tándem o bien dispersos. El número de repeticiones (número de copia) es variable.

DNA repetitivo en tándem. Secuencia de DNA que se encuentra en dos o más copias yuxtapuestas, tanto en orientación cabeza-cola (repetición directa) como cola-cola ó cabeza-cabeza (repetición invertida).

Electroforesis. Es la técnica por la cual mezclas complejas de moléculas como proteínas, DNA o RNA se separan en un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a su carga eléctrica. La electricidad empuja las moléculas a través de los poros de un gel, que es una sustancia firme como la gelatina. El gel puede hacerse de manera que sus poros tengan distintas dimensiones para separar las moléculas según un rango específico de tamaños y formas. Las moléculas más pequeñas migran más rápido que las más grandes.

Especie. Grupo de organismos con características estructurales y funcionales similares, con afinidad reproductiva y similitud genética apreciable. Generalmente sus poblaciones se consideran monofiléticas.

Evolución biológica. Cambios primero molecular, después celular, y por último de organismos, a lo largo de la historia como resultado de mutaciones en el ADN, de su reproducción y de procesos de selección. Los caracteres adquiridos no se heredan.

Expresión genética. La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotes y eucariotes transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

F1. Símbolo utilizado para representar la primera generación filial; prole heterocigota producida por el cruzamiento de dos sujetos no relacionados o por el cruce de una cepa dominante homocigota con una recesiva.

F2. Símbolo utilizado para representar la segunda generación filial; prole producida por el cruzamiento de dos miembros de la generación F1 o de dos cepas heterocigotas cualesquiera.

Fenotipo. Rasgos o características visibles de un organismo, por ejemplo, el color del cabello, el peso o la presencia o ausencia de una enfermedad. Los rasgos fenotípicos no son necesariamente genéticos.

Gen. Unidad de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de DNA que codifica un RNA funcional.

Genoma. DNA que contiene la información genética total de un individuo, una población o una especie.

Genotipo. El genotipo se refiere a la constitución genética del individuo u organismo, en otras palabras, el genotipo está dado por los alelos localizados en un locus particular de un cromosoma de un individuo.

Herencia mendeliana. Forma en que se transmiten los genes y por ende los rasgos de padres a hijos. Entre los ejemplos de herencia mendeliana están la autosómica dominante, la autosómica recesiva y los genes ligados al sexo.

Hibridación. Unión entre dos individuos con fenotipos o genotipos distintos, o bien procedentes de dos poblaciones o especies diferentes. Alude a la capacidad de las moléculas complementarias de DNA o RNA monocatenario para formar un dúplex.

Kilobase (Kb). Unidad de tamaño de los ácidos nucleicos, correspondiente a una longitud de 1.000 nucleótidos. En DNA bicatenario se denomina kilopares de bases (Kbp).

Ley de Hardy-Weinberg. Exposición en términos matemáticos del principio de que las frecuencias genotípicas permanecen constantes en una población grande en condiciones de panmixia, siempre que no haya mutación, selección ni migración.

Loci. Plural de *locus*.

Locus. El lugar del cromosoma donde está localizado un gen específico, es la dirección física del gen.

Marcador genético. Locus genético con alelos fácilmente detectables, bien porque producen un fenotipo característico o porque pueden estudiarse por métodos moleculares. Son utilizados en estudios de ligamiento y en la creación de mapas físico.

Microsatélite. Pequeñas regiones de DNA que contienen múltiples copias de secuencias repetitivas cortas y que se emplean como marcadores genéticos para rastrear la herencia familiar o mapear enfermedades en el genoma.

Nucleótido. Unidad que conforma los ácidos nucleicos, cada nucleótido se compone de una base nitrogenada (Purina o pirimidina), un azúcar pentosa (D-ribosa o 2-deoxy-ribosa) y un ácido fósfórico.

Oligonucleótido. Secuencia corta de cadena única de DNA o RNA. Los oligos se usan a menudo como sondas para detectar DNA o RNA complementario porque se unen fácilmente a sus complementos.

Polimorfismo. Presencia conjunta en una población de dos o más genotipos alternativos, cada uno con una frecuencia mayor que la que podría mantenerse sólo por mutación recurrente. Locus genético que está presente en dos o más alelos distintos, de forma que el alelo más raro tiene una frecuencia mayor o igual a 1% (0,01) en la población general. Un polimorfismo puede ser transitorio (las frecuencias alélicas tienden a cambiar debido a una ventaja selectiva) o estable (las frecuencias alélicas permanecen constantes durante muchas generaciones).

RFLP's; Fragmentos Polimórficos de Longitud por Restricción. Son las variaciones en las bases nitrogenadas en el sitio donde una enzima de restricción corta un segmento de DNA. Estas variaciones afectan el tamaño de los fragmentos que resultan del corte. Los RFLP se pueden utilizar como marcadores en la construcción de mapas físicos y de ligamiento.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's). Son variaciones comunes de una sola base que ocurren en el DNA humano con una frecuencia aproximada de 1 en cada 1000 bases. Estas variaciones se pueden emplear para rastrear patrones de herencia familiar.

Primer; cebador. Una secuencia corta de oligonucleótidos que se une en forma complementaria específica a una cadena única de ácido nucleico e inicia la síntesis de esa cadena en presencia de DNA polimerasa y nucleótidos en una reacción de PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es la reacción en cadena de la polimerasa. Es una técnica rápida y económica para hacer copias ilimitadas de cualquier porción del DNA. Llamada también fotocopiado molecular, la PCR ha tenido un inmenso impacto en biología y medicina, especialmente en investigación genética.

Relicto. Se aplica, en el sentido de reliquia, a las plantas que fueron dominantes en otra época, pero que ahora son escasas. Por extensión, lo que queda o perdura de la vegetación primitiva de un país.

RNA. Ribonucleic acid (en español Ácido ribonucleico). Molécula formada por un poli-ribonucleótido de longitud variable que contiene Uracilo en vez de Timina. Hay tres tipos: RNA mensajero (mRNA), RNA ribosomal (rRNA) y RNA de transferencia (tRNA).

Sonda. Es un fragmento de DNA, RNA o un anticuerpo marcado. Estos se emplean en ciertas técnicas de laboratorio para detectar genes o proteínas y estudiar sus funciones.

Taxón, (Taxa; plural). Unidad taxonómica de cualquier jerarquía. Por ejemplo, una familia, un género o una especie.

ANEXO A

En el presente anexo se proporcionan: el protocolo de extracción de DNA, secuencias de oligonucleótidos para microsatélites, condiciones de amplificación y concentraciones de reactivos para PCR.

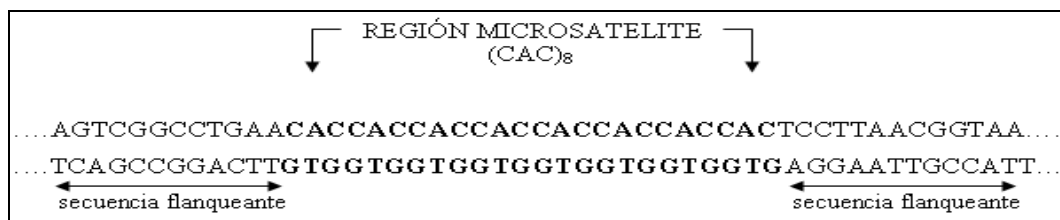
Protocolo de extracción de DNA a través de las tarjetas forenses FTA de la marca Whatman

1. Cortar los discos (1.2 mm para sangre) y transferir a tubos para amplificación por PCR.
2. Agregar a cada tubo 200 µl de FTA Purification Reagent para lavar los discos.
3. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (el contenido del tubo puede mezclarse manualmente).
4. Eliminar y desechar todo el FTA Purification Reagent, empleando una pipeta.
5. Repetir los pasos 3-5 dos veces, para un total de tres lavados con el FTA Purification Reagent.
6. Agregar a cada tubo 200 µl del Buffer TE (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)
7. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Eliminar y desechar todo el Buffer TE con una pipeta.
9. Repetir pasos 7-9 una vez más para un total de dos lavados con el Pulidor de TE.
10. Secar el disco a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora, a 56°C durante 10 minutos. El disco está ahora listo para la PCR.

Secuencias de oligonucleótidos para microsatélite

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA	REFERENCIA
Fh U2 - F Fh U2 - R	5'-gtg ttc tta aaa cat gcc tgg agg-3' 5'-gca cag gta aat att tgc tgg gcc-3'	Primmer, C. R.; Møller, A. P. y Ellegren, H. (1996)
Hr U2 - F Hr U2 - R	5'-cat caa gag agg gat gga aa-3' 5'- gaa aag att att ttt ctt tc-3'	Primmer, C. R.; Møller, A. P. y Ellegren, H. (1996)
Mcp4 - F Mcp4 - R	5'- ata aga tga cta agg tct ct-3' 5'- tag caa ttg tct atc atg gt-3'	Beck, N. R.; Double, M. C. y Cockburn, A. (2003)
Mcp8 - F Mcp8 - R	5'- ccc aat ggt gat gaa agt cc-3' 5'- aca tta gtc ttc cct ttt tt-3'	Beck, N. R.; Double, M. C. y Cockburn, A. (2003)
Ptr4 - F Ptr4 - R	5'- ggg ctt tag tcc atg cat tt-3' 5'- ccc tgg agt tta caa t-3'	Fridolfsson, A. K.; Gyllensten, U. B. y Jakobsson, S. (1997)

Esquema que ilustra la composición de una región microsatélite en una cadena de DNA



Concentraciones de reactivos para *master stock* (mezcla madre), para PCR

Reactivos	
ddH ₂ O estéril	258.5 µl
dNTPs mix 10 mM (50 µl % _w)	200 µl
MgCl ₂ 1.5mM	7.5 µl
Buffer 10X PCR	500µl

Concentraciones de reactivos para *master mix* (mezcla de trabajo), para PCR

Reactivos	1 Reacción
ddH ₂ O estéril	14 µl
Master Stock	5.1 µl
Primer F (25 µM)	2µl
Primer R (25 µM)	2µl
AmpliTaq DNA polimerasa	.16 µl

Condiciones de amplificación

Microsatélite		HrU2 ¹ , FhU2 ²		McyU4 ³ , McyU8 ⁴		Phtr4 ⁵	
Desnaturalización		94 °C 3 minutos		94 °C 3 minutos		94 °C 3 minutos	
Amplificación		55 °C 1 minuto		-		55 °C 30 segundos	
Polimerización		72 °C 1 minuto		-		72 °C 40 segundos	
No. de Ciclos	Desnaturalización	34 Ciclos	94 °C 30 segundos	35 Ciclos	94 °C 30 segundos	31 Ciclos	94 °C 30 segundos
	Amplificación		50 °C 30 segundos		55 °C 30 segundos		50 °C 30 segundos
	Polimerización		72 °C 40 segundos		72 °C 30 segundos		72 °C 40 segundos
	Extensión Final		72 °C 5 minutos		72 °C 3 minutos		72 °C 5 minutos

¹ *Hirundo rustica*, ² *Fiducela hypoleuca*, ^{3y4} *Malurus cyaneus*, ⁵ *Phylloscopus trochilus*.

ANEXO B

A continuación se proporcionan las frecuencias alélicas por locus, frecuencias alélicas compartidas entre poblaciones, ancestrales y actuales descritas en el área de resultados del capítulo 4.

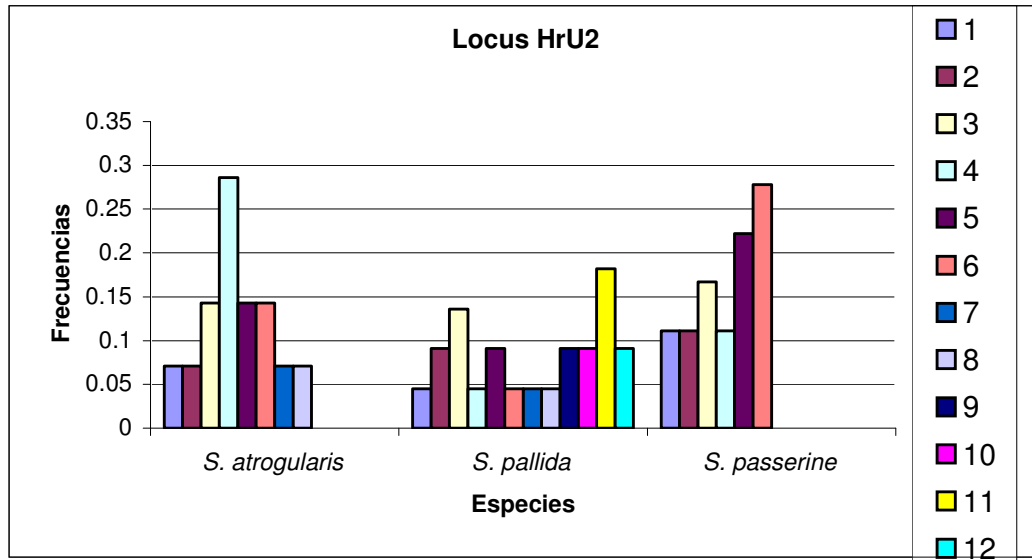


Figura 1. Frecuencias alélicas para el *locus* HrU2, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada especie.

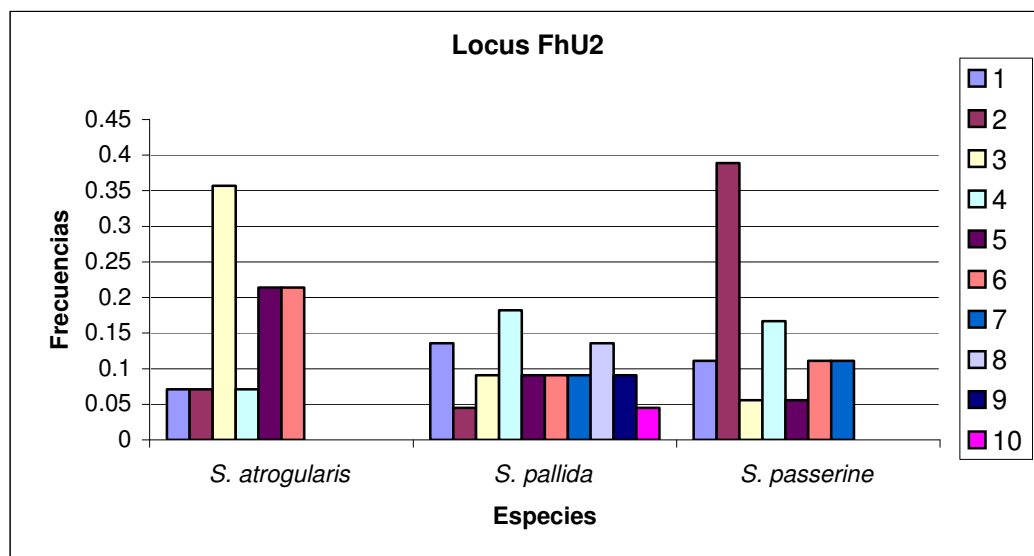


Figura 2. Frecuencias alélicas para el *locus* FhU2, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada especie.

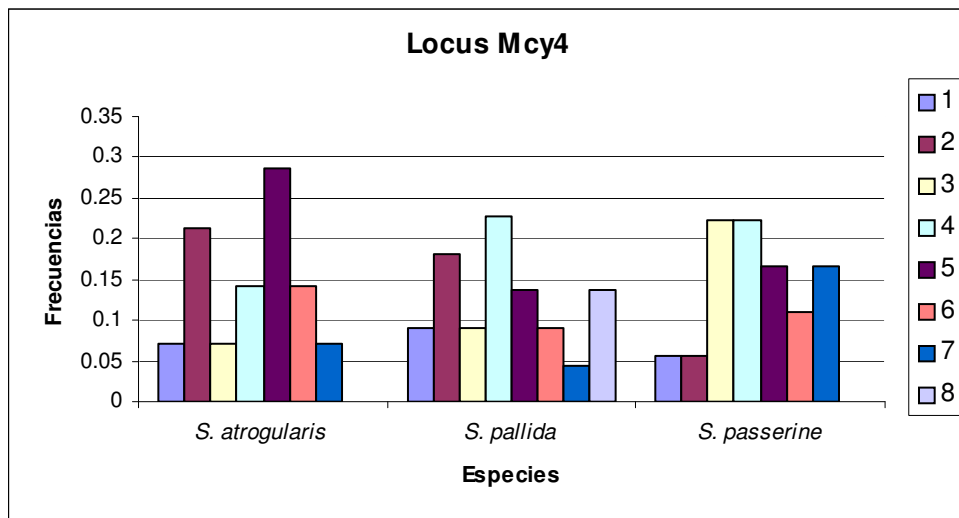


Figura 3. Frecuencias alélicas para el *locus* Mcy4, donde se muestra la frecuencia obtenida para cada especie.

Frecuencias de alelos compartidos para cada una de las especies. Criterios de discriminación: Puros = > 95% de alelos parentales, Introgresión = 95-80% de alelos parentales, Retrocruzas = 60-80% de alelos parentales y Híbridos = 60-45% de cada uno de los alelos. El color morado representa a las retrocruzas, el azul a las introgresiones y el naranja a los híbridos.

N	Especies	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>
1	1	0.9747	0.0116	0.0137
2	1	0.963	0.0171	0.0199
3	1	0.9166	0.0309	0.0524
4	1	0.932	0.0335	0.0345
5	1	0.9191	0.0404	0.0405
6	1	0.9493	0.0217	0.0289
7	1	0.9662	0.0159	0.0178
1	2	0.0377	0.8585	0.1037
2	2	0.0355	0.855	0.1095
3	2	0.0238	0.9039	0.0723
4	2	0.0391	0.8438	0.1171
5	2	0.025	0.9159	0.059
6	2	0.0568	0.7528	0.1904
7	2	0.0338	0.885	0.0812
8	2	0.0483	0.8889	0.0628
9	2	0.031	0.8912	0.0778
10	2	0.0351	0.8696	0.0953
11	2	0.067	0.8706	0.0624
1	3	0.0616	0.1985	0.7399
2	3	0.0841	0.1645	0.7515
3	3	0.0709	0.1888	0.7403
4	3	0.0478	0.2404	0.7118
5	3	0.2165	0.0464	0.7372
6	3	0.068	0.0986	0.8334
7	3	0.0514	0.3595	0.5891
8	3	0.0678	0.1785	0.7537
9	3	0.057	0.1353	0.8076

Frecuencias y proporciones de alelos encontrados para el total de las especies.

Integrantes	27	Proporciones	
Puros	4	Puros	0.148
Introgresión	15	Introgresión	0.556
Híbridos	1	Híbridos	0.037
Retrocruzas	7	Retrocruzas	0.259
		Total	1

Frecuencias y proporciones de alelos encontrados en la especie *S. atrogularis*.

Integrantes	7	Proporciones	
Puros	4	Puros	0.571
Introgresión	3	Introgresión	0.429
Híbridos	0	Híbridos	0
Retrocruzas	0	Retrocruzas	0
			1

Frecuencias y proporciones de alelos encontrados en la especie *S. pallida*.

Integrantes	11	Proporciones	
Puros	0	Puros	0
Introgresión	10	Introgresión	0.909
Híbridos	0	Híbridos	0
Retrocruzas	1	Retrocruzas	0.091
			1

Frecuencias y proporciones de alelos encontrados en la especie *S. passerina*.

Integrantes	9	Proporciones	
Puros	0	Puros	0
Introgresión	2	Introgresión	0.222
Híbridos	1	Híbridos	0.111
Retrocruzas	6	Retrocruzas	0.667
			1

Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* HrU2.

Alelo	Ancestral	Actual
40	0.022	0.021
45	0.08	0.06
65	0.023	0.023
70	0.066	0.04
90	0.109	0.091
95	0.011	0.01
100	0.021	0.021
110	0.015	0.013
115	0.192	0.12
120	0.11	0.14
130	0.013	0.014
135	0.1	0.227
140	0.014	0.013
150	0.074	0.058
155	0.061	0.068
160	0.01	0.009
185	0.021	0.022
190	0.014	0.011
280	0.022	0.019
290	0.021	0.021

Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* FhU2.

Alelo	Ancestral	Actual
46	0.022	0.021
60	0.027	0.027
66	0.081	0.066
76	0.077	0.141
88	0.271	0.236
90	0.076	0.083
96	0.028	0.028
98	0.023	0.02
100	0.224	0.202
106	0.024	0.023
110	0.122	0.128
120	0.025	0.027

Frecuencias ancestrales y actuales para el *locus* Mcu4.

Alelo	Ancestral	Actual
90	0.016	0.013
100	0.016	0.016
110	0.015	0.013
116	0.009	0.008
120	0.027	0.026
126	0.075	0.057
140	0.017	0.013
148	0.013	0.012
150	0.019	0.017
160	0.014	0.015
166	0.167	0.181
168	0.084	0.065
176	0.023	0.022
188	0.095	0.216
190	0.233	0.154
200	0.105	0.119
240	0.071	0.053

Frecuencias alélicas por especie para el *locus* HrU2.

Alelos	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>
40	0.013	0.018	0.018
45	0.065	0.063	0.062
65	0.079	0.113	0.113
70	0.078	0.08	0.08
90	0.096	0.078	0.077
95	0.024	0.034	0.034
100	0.028	0.041	0.041
110	0.04	0.057	0.056
115	0.143	0.076	0.076
120	0.089	0.065	0.065
130	0.014	0.02	0.02
135	0.106	0.092	0.096
140	0.011	0.015	0.015
150	0.06	0.056	0.057
155	0.076	0.079	0.079
160	0.033	0.048	0.047
185	0.007	0.009	0.009
190	0.013	0.02	0.019
280	0.02	0.028	0.028
290	0.005	0.007	0.007

Frecuencias alélicas por especie para el *locus* FhU2.

Alelos	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>
46	0.02	0.029	0.028
60	0.027	0.038	0.038
66	0.096	0.105	0.105
76	0.098	0.114	0.112
88	0.232	0.178	0.181
90	0.053	0.045	0.046
96	0.005	0.007	0.006
98	0.031	0.044	0.044
100	0.232	0.207	0.206
106	0.032	0.046	0.046
110	0.149	0.15	0.151
120	0.025	0.037	0.036

Frecuencias alélicas por especie para el *locus* Mcu4.

Alelos	<i>S. atrogularis</i>	<i>S. pallida</i>	<i>S. passerina</i>
90	0.01	0.014	0.014
100	0.028	0.04	0.041
110	0.041	0.059	0.058
116	0.002	0.003	0.003
120	0.032	0.046	0.046
126	0.068	0.068	0.068
140	0.013	0.019	0.019
148	0.019	0.027	0.027
150	0.015	0.022	0.021
160	0.011	0.016	0.016
166	0.166	0.143	0.144
168	0.065	0.063	0.063
176	0.073	0.104	0.103
188	0.097	0.081	0.084
190	0.152	0.088	0.089
200	0.109	0.098	0.098
240	0.098	0.108	0.108