

Informe final* del Proyecto HB035
Código de barras de ocho complejos de especies de aves mexicanas

Responsable: Dra. Blanca Estela Hernández Baños
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Museo de Zoología "Alfonso L Herrera"
Dirección: Av. Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F.,
04510, México
Correo electrónico: behb@hp.fciencias.unam.mx
Teléfono, fax 5622 8222 ext. 44703
Fecha de inicio: Julio 31, 2009
Fecha de término: Enero 10, 2013
Principales resultados: Base de datos, códigos de barras, fotografías, informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Hernández Baños. B. 2013. Código de barras de ocho complejos de especies de aves mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. HB035.** México D. F.

Resumen:

El propósito de este proyecto es obtener las secuencias del Citocromo c subunidad 1 oxidasa (COI) para ocho complejos de especies de aves mexicanas, incluyendo diferentes poblaciones de dichos complejos, para, de ser posible, distinguir diferentes linajes (especies) en las poblaciones. Los complejos de especies de aves de las que obtendremos las secuencias del Citocromo c subunidad 1 oxidasa (COI) son: *Cyananthus latirostrisordidus*, *Lampornis amethystinus*, *Aulacorhynchus prasinus*, *Melanerpes formicivorus*, *Campylorhynchus rufinucha*, *Chlorospingus ophthalmicus*, *Buarremon brunneinuchavirenticeps*, *Icterus pustulatus*, todos ellos tienen una distribución amplia dentro de nuestro país y en la mayoría de ellos se ha documentado que existe variación genética considerable, por lo que proponemos obtener secuencias de diferentes poblaciones. Se plantea obtener un total de 249 secuencias del Citocromo c, de los diferentes complejos de especies de aves que vamos a estudiar.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

RESUMEN

En este proyecto se obtuvieron 271 secuencias del gen mitocondrial Citocromo c subunidad 1 Oxidasa, mejor conocido como gen COI, para complejos de especies mexicanas, incluyendo diferentes poblaciones de dichos complejos, con lo cual se lograron identificar grupos diferenciados genéticamente dentro de algunos complejos (p.e. *Chlorospingus ophthalmicus*, *Amazilia rutila*, *Amazilia yucatanensis*, *Arremonops rufivirgatus-chloronotus*), mientras que en otros, como en el género *Eupherusa*, no fue posible distinguir ningún grupo diferenciado aún cuando se trataban de especies diferentes. En algunos casos más no se presentaron patrones de diferenciación para los complejos de especies como: *Melanerpes formicivorus* y *Arremon brunneinucha*. De acuerdo a nuestros resultados, en algunos casos el marcador molecular COI puede ser utilizado para diferenciar grupos a nivel interespecífico, mientras que en otros incluso puede ser empleado a nivel poblacional, con el fin de distinguir diferentes linajes evolutivos. Aunque en algunos grupos la diferenciación genética a nivel específico no fue posible, por lo que la utilidad del gen COI como un gen que determine el Código de Barras Biológico está aún por definirse.

INTRODUCCIÓN

Los problemas para distinguir e identificar especies con base en la morfología son más comunes de lo que se supone (Hillis 1987). Existen numerosos casos de especies crípticas que son morfológica y/o fisiológicamente similares, pero corresponden a especies distintas (Hebert *et al.* 2003, Hebert *et al.* 2004, Omland *et al.* 2006, Rubinoff *et al.* 2006). La incorporación de métodos de análisis moleculares en la taxonomía ha demostrado que muchos casos de supuesta variabilidad “intraespecífica” corresponden a especies crípticas que no habían sido distinguidas como tales (Rozzi *et al.* 2001, Hebert *et al.* 2004). También ocurre el caso inverso, donde individuos morfológicamente muy distintos pero pertenecientes a una misma especie son clasificados como especies diferentes (Cowell 1989).

El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la integración de datos bioquímicos al análisis filogenético (Sheldon y Bledsoe 1993, Espinosa de los Monteros y Cracraft 1997, Nei y Kumar 2000, Avise 2006). A diferencia de los primeros análisis de filogenia molecular realizados con aloenzimas (utilizando la técnica de electroforesis de proteínas) se ha encontrado poca o ninguna diferenciación genética intraespecífica (Zink *et al.* 1991, Avise 2000). El uso de secuencias de DNA mitocondrial proporcionó los primeros datos accesibles para generar las genealogías de genes a nivel intraespecífico por lo que se ha establecido un puente empírico y conceptual entre la genética de poblaciones (microevolución) y la filogenética tradicional (macroevolución, Avise 1994). El uso de secuencias de DNA mitocondrial (ácido desoxirribonucleico mitocondrial), en los últimos años muestra que este tipo de datos aportan mucha información acerca de la historia de muchos grupos de vertebrados.

La incapacidad para distinguir claramente las especies, dificulta la implementación de programas de conservación y la formulación de leyes precisas y efectivas para la protección de las mismas. Actualmente se reconocen 1.4 millones de diferentes especies, pero se supone que quedan tal vez millones por descubrir y asignárseles un nombre (Systematics Agenda 1994). Se estima que los taxónomos han descrito solo entre el 10 y el 30% de las especies existentes y considerando las tasas de extinción actuales, es probable que muchas especies se extingan antes de ser siquiera

descritas. Los vertebrados son uno de los grupos de animales mejor estudiados y es posible que la mayoría de las especies ya hayan sido identificadas. Por esta razón, existen listados que nos permiten conocer el número de especies hasta ahora descritas: 4,675 especies de mamíferos (Wilson y Reeder 1993, Hutterer 1995), 9,702 especies de aves (Sibley y Monroe 1990), 4,780 de anfibios, 8,240 de reptiles (Frost 1985, Duellman 1993, Glaw y Köhler 1998) y 23,250 de peces (Eschmeyer *et al.* 1998). Sin embargo, aún queda mucho por descubrir. Una de las cosas que se deben hacer para resolver este problema es trabajar en la sistemática de grupos taxonómicos donde existen dudas respecto al número de especies que los constituyen (Rojas-Soto 1998, Ibáñez 2000, Sanchez-González 2002, Hebert *et al.* 2004). Por lo que el generar datos sobre el código de barras (secuencias del gen mitocondrial COI) podrá proporcionar una hipótesis acerca de la identificación de los diferentes taxones que existen en nuestro país, además de que se podrían detectar problemas específicos sobre la taxonomía de algunos grupos para los cuales se tendría que hacer un trabajo más exhaustivo e intenso.

ANTECEDENTES

A partir de que Hebert y colaboradores (2003a) proponen al gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa (COI) para ser utilizado como una herramienta que sirva para la identificación de las diferentes especies que conforman nuestro planeta (Hebert *et al.* 2003a, Hebert *et al.* 2003b), se ha puesto constantemente a prueba dicha propuesta, ya que las secuencias de éste gen, cuyo número se ha incrementado considerablemente, en algunos casos ha tenido éxito en la identificación de especies crípticas, mientras que en otros casos se ha probado que el gen COI por si solo no puede identificar las diferentes especies que conforman algún complejo dado.

Hebert y colaboradores (2003a y 2003b) establecen que el gen COI puede ser empleado como un sistema de bioidentificación para los animales, también demostraron que obteniendo los perfiles del gen COI se puede discriminar entre dos entidades cercanamente emparentadas filogenéticamente, lo que reflejaría que el gen presenta altas tasas de evolución. Los autores también plantean que se obtendría información importante en el conocimiento de la diversificación de la vida y las reglas de la evolución molecular. En este trabajo (Hebert *et al.* 2003a) se encontró que para las 100 especies incluidas, se obtuvo una alta resolución filogenética para los grupos taxonómicos mayores. Ensamblajes monofiléticos fueron corroborados (Annelida, Echinodermata y Platyhelminthes), además de que los linajes de los cordados forman un grupo cohesivo, mientras que miembros de Nematoda se dividieron en tres grupos, pero cada uno correspondió a una de las tres subclases que comprende este phylum. De un total de 25 especies de artrópodos incluidos en este estudio, 23 de ellos formaron un grupo monofilético y solamente los dos representantes de los crustáceos (Cephalocarida, Maxillopoda) salieron del grupo. Uno de los resultados importantes de este estudio es que establecen que el sistema de identificación para los animales es posible hacerlo mediante secuencias de bases del gen mitocondrial COI, que la obtención de las secuencias es relativamente fácil, que el alineamiento es factible y demostraron también que las secuencias son suficientes para el asignamiento de los organismos en categorías taxonómicas mayores. Otro aspecto importante de resaltar en este estudio, es que el sistema de identificación con base en el gen COI puede brindar buenos resultados, ya que encontraron que el 98% del reconocimiento de diferentes especies con éste gen había sido corroborado por estudios previos de morfología, también encontraron que la

divergencia entre pares de especies es más grande que el 2%, aunque en algunos grupos de animales esto no se cumple (p.e. Cnidarios) ya que la tasa de evolución es muy baja.

Estudios con mariposas, arañas, hemípteros, nemátodos, peces de agua dulce y aves, en donde se utiliza el gen COI, como marcador molecular enfocado en el proyecto de código de barras para la identificación de las especies, se han llevado a cabo con mucho éxito (Vijayan y Tsou 2010). Sin embargo en algunos otros estudios se cuestiona el éxito del uso de éste gen para la identificación de especies (Dasmahapatra *et al.* 2010).

En el caso de las mariposas, los primeros estudios efectuados utilizando el gen COI reveló que para el complejo *Astrartes fulgerator* (Lepidoptera: Hesperidae) existían por lo menos 10 especies. Éste trabajo determinó que éstas 10 especies crípticas, que se encuentran distribuidas en el noroeste de Costa Rica, han estado por mucho tiempo viviendo en simpatría y que las variaciones entre éstas diez especies radica en que las orugas se alimentan de diferentes plantas, lo que ha propiciado una divergencia entre ellas, esto conlleva a que difieran en la preferencia del hábitat (Hebert *et al.* 2004). Aunado a los datos obtenidos para el código de barras, también se consideraron características morfológicas, por lo que los autores plantearon que este es un buen ejemplo del valor que puede tener la información que proporciona el gen COI. Un aspecto importante de este trabajo es que el DNA obtenido para secuenciar fue de especímenes de colecciones que tenían más de 23 años, por lo que además se confirma el valor de las colecciones científicas, siendo de gran importancia para este tipo de estudios.

Otro estudio más sobre la utilización del código de barras biológico en mariposas fue el efectuado en el Área de Conservación Guanacaste en el noroeste de Costa Rica (Hajibabaei *et al.* 2006). Determinaron que dicha herramienta molecular (gen COI), puede ser de gran utilidad para facilitar la identificación y el descubrimiento de especies en zonas tropicales con gran diversidad de especies. Encontraron que 97.9% de las 521 especies reconocidas previamente en trabajos taxonómicos, podían ser reconocidas por el gen COI y que solo algunos ejemplos de secuencias interespecíficas se sobrelapan en algunas especies similares. Un estudio adicional al Área de Conservación Guanacaste en Costa Rica, fue el efectuado con el género *Perichares*

philetetes (Lepidoptera, Hesperiiidae), en el que encontraron que aunque los estados adultos son difíciles de distinguir morfológicamente, las orugas difieren principalmente en el tipo de dieta que ellas ingieren, por lo que se dieron a la tarea de secuenciar el gen COI y encontraron que *P. philetetes* esta constituida al menos por cuatro especies, representando tres nuevas especies para la ciencia, cuyos resultados están respaldados por la biología natural de la especie, ya que como se menciona anteriormente las orugas y las pupas difieren morfológicamente.

Aunque hay evidencia del éxito del gen COI en la identificación de especies en Mariposas, hay casos en lo que esto no siempre se cumple. En un estudio del género *Mechanitis* (Lepidoptera, Nymphalidae) en el que utilizaron secuencias del gen COI, secuencias nucleares y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), con el fin de investigar los límites de especies para dicho género, encontraron que las secuencias del gen COI revelaban la existencia de ocho haplogrupos, mientras morfológicamente solo se habían descrito cuatro especies, sugiriendo la presencia de cuatro nuevas “especies crípticas” putativas, sin embargo al utilizar las secuencias de los genes nucleares solamente se pudieron detectar cuatro haplogrupos, esta discordancia en los resultados podría explicarse debido a que puede existir una divergencia reciente que no está reflejada en el DNA nuclear, debido a ésta discordancia en los resultados, los investigadores decidieron utilizar otro marcador molecular como son los AFLP y encontraron que por medio de éste marcador molecular podían distinguir los cuatro haplogrupos encontrados con las secuencias nucleares, más uno que había sido encontrado con el gen mitocondrial COI, por lo que ellos concluyen que el gen COI reconoce especies que no son reales, además de que éstos resultados los relacionaron con características morfológicas, como es el patrón de las alas, encontrando que al relacionar el gen COI con la morfología, no concordaba con los haplogrupos encontrados, mientras que si concordaba con los de los marcadores moleculares AFLP.

En el caso de las arañas, en donde se calcula que existen 40,000 especies y que son un sistema importante de modelo de estudio sobre sociabilidad, sistemas de apareamiento y dimorfismo sexual, la identificación de especies es muy importante. En un estudio en donde utilizaron el gen COI para discriminar las diferentes especies, encontraron que 168 especies de arañas y 35 de otras especies de arácnidos fueron identificados correctamente al 100%, por lo que concluyen que el gen COI es una

herramienta molecular eficaz en la identificación de especies para el grupo de los arácnidos.

El caso de las Aves

Uno de los trabajos clásicos donde se ha empleado el gen COI para la identificación de las especies es en el grupo de las aves y en particular las aves de Norte América (Hebert *et al.* 2004). En este estudio se obtuvieron secuencias del gen COI para 260 especies de aves y encontraron que la discriminación entre diferentes especies fue en su mayoría alta. Todas las especies tuvieron diferentes haplotipos (diferentes formas de un gen) y diferencias mutacionales entre especies cercanamente emparentadas, 18 veces más alta que las diferencias encontradas dentro de las especies. En sus resultados identificaron cuatro nuevas probables especies de aves en Norte América. Con este trabajo probaron la eficacia del gen COI para el grupo de las aves, por lo que sugieren que en otros grupos de animales resultados similares podrían encontrarse.

En otro trabajo más reciente con el grupo de las aves (Campagna *et al.* 2010), quienes trabajaron con el género *Sporophila*, encontraron que al secuenciar el gen COI para 11 especies de este género, varios grupos externos y habiendo obtenido los árboles de Neighbor-Joining, Máxima Parsimonia e Inferencia Bayesiana, la alta divergencia intraespecífica y baja divergencia interespecífica del sureste de éste grupo, nos habla de su más reciente radiación, por lo que las relaciones entre ellas aún no se resuelve por completo. Establecen que en este caso la eficacia del gen COI no es muy buena, proponiendo la incorporación de diferentes marcadores nucleares, con el fin de resolver las relaciones en este grupo.

Por lo que en el caso de las aves la eficacia del gen COI, para ser utilizado como marcador molecular para el código de barras biológico aún se tiene que probar, es por eso que en este proyecto propusimos trabajar con ocho complejos de especies de aves mexicanas y tratar de probar su eficacia para resolver los límites de especies dentro de diferentes complejos de aves mexicanos. Cabe destacar que en el caso del grupo de los colibríes es la primera vez que se utiliza este marcador para hacer un trabajo de ésta naturaleza.

OBJETIVOS

Obtener las secuencias de DNA mitocondrial del gen Citocromo *c* Oxidasa subunidad 1 (COI) para complejos de especies de aves: *Melanerpes formicivorus*, *Sittasomus griseicapillus*, *Chlorospingus ophthalmicus*, *Arremon brunneinucha*, *Amazilia beryllina*, *Amazilia rutila*, *Amazilia yucatanensis*, el Género *Eupherusa* (*E. eximia*, *E. cyanophrys*, *E. poliocerca*) y *Arremonops rufivirgatus-chloronatus*.

MÉTODOS

En este proyecto se obtuvieron secuencias del gen mitochondrial COI de 271 individuos, pertenecientes a los diferentes complejos y diferentes poblaciones propuestas. El trabajo consistió en obtener las secuencias de dicho marcador molecular, obtener las fotos de los ejemplares voucher y las coordenadas de muestreo para cada uno de los individuos, a continuación se describen las diferentes técnicas de laboratorio que se utilizaron para la obtención de las secuencias.

Trabajo de Laboratorio

Se utilizaron muestras de tejido (músculo, corazón o hígado) de aproximadamente 271 individuos provenientes de diferentes especies y complejos de especies que se distribuyen en México (ver Apéndice).

Todas las muestras de tejido que se utilizaron pertenecen a la colección de tejidos del Museo de Zoología “Alfonso L. Herrera” de la Facultad de Ciencias, UNAM de la cual soy curadora.

Una vez obtenidas las muestras de tejido, se realizó la extracción de DNA mediante la utilización del kit de extracción DNeasy (Qiagen: DNeasy Blood & Tissue Handbook: www.qiagen.com/hb/dneasybloodtissuekit_en), que a continuación se describe:

1. Tomar 25 mg de tejido en piezas pequeñas, colocarlo en un tubo de 1.5 ml y añadir 180 μ l de reactivo ATL.
2. Añadir 20 μ l de Proteinasa K, vórtex (5-10 s) e incubar a 55°C (baño maría), hasta que el tejido esté completamente degradado (1-3 hrs.). Dar vórtex durante la incubación para dispersar las muestras. La lisis será más rápida si el tejido está en pedacitos.
3. Vórtex por 15 seg. Añadir 200 μ l del reactivo buffer AL a la muestra, mezcle por vórtex e incube a 70°C por 10min.

4. Añadir 200µl de etanol (96-100%) a la muestra y mezclar vigorosamente con vórtex.
5. Colocar la mezcla del paso 4 en la columna DNeasy con el tubo de colectar de 2ml. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Tirar lo colectado y tubo.
6. Colocar columna en tubo nuevo, añadir 500µl de reactivo AW1, centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Tirar lo colectado y tubo.
7. Colocar columna DNeasy en tubo nuevo de 2 ml, añadir 500µl de reactivo AW2, centrifugar por 3 min. a 14000 rpm para secar la membrana DNeasy, tirar colectado y tubo.
8. Colocar columna en tubo de 1.5 limpio y etiquetado y añadir 200µl de reactivo AE directamente en la membrana DNeasy, incubar a temperatura ambiente durante 1 min. y centrifugar por 1 min. a 8000 rpm para eludir. Se pueden guardar lo colectado (aprox. 200µl).

La amplificación del DNA se llevó a cabo por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Los “primers” que se utilizaron en este proyecto son los BirF1 5´ TTCTCCAACCACAAAGACATTGCAC 3´y el BrdF1 5´ ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG 3. Una amplificación típica involucra un ciclo inicial (4 min. a 95°C, 1 min. a 50°C, 45 seg. a 72°C) seguida de 35 ciclos (1 min. a 95°C, 1 min. a 50°C, 45 seg. a 72°C) y una extensión final a 72°C. Las amplificaciones se visualizarán mediante el corrimiento de dichas muestras en geles de agarosa al 1%.

La purificación de los productos de PCR (eliminación del exceso de “primers”, polimerasa y dNTP's) se llevó a cabo mediante la utilización del kit de purificación Millipore, que a continuación se describe:

1. Se coloca el producto del PCR (50 µl) a la placa de 96 .
2. Se le agrega con una multipipeta 150 µl de agua inyectable (para hacer un total de 200 µl).
3. Se coloca la placa en el dispositivo de Millipore y se pone al vacío durante 15 minutos (a presión 12 min. mínimo).
4. Pasado ese tiempo, se le agrega 20 µl de agua
5. Finalmente, se puede recoger la muestra en tubos de 0.6 µl.

Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones de secuencia, mediante el protocolo de secuenciación del reactivo Big Dye V3.1, para posteriormente enviar las muestras al secuenciador ABI 3100 del Posgrado en Ciencias Biológicas, empleando el siguiente protocolo:

1. Diluir el buffer a 2.5 X, ya que el proveedor lo envía 5X, tomando 100 μ l de agua y 100 μ l de buffer.
2. Para hacer la mezcla "Master Mix" se requiere para cada muestra: 2 μ l de Big dye + 2 μ l de buffer + 0.5 μ l del oligo (10 pp μ l) y X μ l de agua haciendo un total de 7 μ l para cada muestra y le agregas 3 μ l del producto del PCR . Solamente la cantidad de big dye, el buffer y el oligo son constantes el agua va a depender de cuanto DNA se adicione para obtener un total de 10 μ l.
3. Se colocan los tubos en la termocicladora con el siguiente programa: 3 tmp 25 ciclos: 96 (0:10) 50 (0:05) 60 (4:00) y 4:00 infinito.
4. Recordar que las muestras que salgan de la máquina del PCR se deben guardar a 4 °C en una caja envuelta con papel aluminio para evitar el contacto con la luz.
5. Las columnas con la preparación del reactivo Sephadex se tienen que lavar con el jabón "alconox" (1 g "alconox" y 100 ml de agua), se ponen en un vaso de precipitado con una mosca magnética durante 30 minutos, se enjuagan con agua destilada y se ponen otra vez en el vaso de precipitado por otros 30 minutos con agua destilada para que se enjuaguen bien, se enjuagan una vez más, se secan y se ponen a esterilizar.
6. El Sephadex se prepara 2.6 g en 40 ml de agua, se deja hidratar dos horas y se guarda a 4 °C, se puede seguir utilizando.
7. A cada columna se le agregan 750 ml (columna con base), se le quita las burbujas y se espera hasta que ocurra la separación de fases, cinco minutos aproximadamente, se quita la base de la columna y se presiona la columna con el fin de filtrar una gota, posteriormente se coloca la columna en el tubo colector, se centrifuga a 2800 rpm durante dos minutos, procurando que todas las columnas estén en la misma dirección (señal de la columna). Una vez hecho esto, se pasa la columna a un tubo de 1.5 μ l previamente etiquetado (estéril).
8. Al producto de la reacción de secuencia se le adiciona 10 μ l de agua ultrapura, haciendo un total de 20 μ l, éste producto se coloca gota a gota en el centro de la columna del Sephadex, procurando no tocar el reactivo Sephadex.

9. Una vez colocado todo el producto se centrifuga a 2800 rpm durante 3.5 min con la señal de la columna hacia afuera y la tapa del tubo de 1.5 µl hacia adentro.
10. Se recolecta todo el producto (20 µl aproximadamente) y se guarda a -20°C.
11. La columna del sephadex se tira y las columnas se vuelven a lavar y esterilizar.

Finalmente, una vez obtenidas las secuencias se visualizaron mediante el programa Sequencher 4.8 (Gene codes corporation 2007) para su edición y posteriormente se alinearon con ayuda del programa computacional Clustal X. Una vez editadas las secuencias, alineadas manualmente y con el programa antes mencionado, se procedió a enviarlas al BoldSystem.

ANÁLISIS

Las secuencias obtenidas del gen COI para los diferentes complejos de especies de aves fueron editadas y corregidas con el programa Sequencher 4.8 y alineadas con el programa Clustal X y con éstos archivos se obtuvo la matriz de distancia con el método de sustitución de 2 parámetros de Kimura y se identificaron los diferentes haplotipos.

Con el programa Mega 5 (Tamura *et al.* 2011) se construyó el árbol de distancia del Neighbor-Joining (NJ), utilizando el algoritmo de sustitución de nucleótido de Kimura 2-parametros, para los complejos aquí estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron un total de 271 secuencias del gen COI para 15 especies reconocidas (AOU 1998). A continuación se presenta un análisis de cada uno de los complejos que se trabajaron en este proyecto, así como también el análisis y una interpretación de las mismas.

Amazilia beryllina

El número total de secuencias obtenidas fue de 38 (570 pb). El análisis para *A.beryllina* identificó 9 haplotipos, que caen dentro de dos grupos y no muestran clara correspondencia geográfica, ya que los dos grupos incluyen individuos del norte, centro y sur de México. Para la matriz de datos con longitud de 570 pares de bases, el número de sitios conservados fue de 562, 8 sitios variables y 4 sitios filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue: T=26.5%, C=31.4%, A=26.0%, G=16.1%. La distancia total media entre todos los haplotipos fue de 0.5%. La mayor distancia entre todos los haplotipos fue de 1.16% (entre un individuo del sureste de Chiapas, perteneciente a la subespecie *A. b. sumichrasti* (JK07-033) y el grupo B (Figura 1). La distancia genética entre los grupos A y B fue entre 0.8-1.4%. La distancias genéticas dentro de cada grupo fueron casi nulas (0-0.16% para el grupo A y 0-0.3% para el grupo B). El árbol de NJ identificó 2 grupos (A y B), únicamente el grupo B presentó un soporte de apoyo bootstrap alto del 88%. Al interior de cada grupo el arreglo se basa en politomias, con valores bootstrap relativamente bajos (65% clado A, 66% clado B).

Amazilia rutila

Para el complejo *Amazilia rutila* se obtuvieron un número total de 52 secuencias. En el análisis se identificaron 11 haplotipos, los cuales se agrupan en tres grupos claramente diferenciados. Se obtuvo una matriz de datos con 570 pares de bases, de los cuales 482 son sitios conservados, 88 son sitios variables y 39 son sitios filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue la siguiente:

T=25.9%, C=15.8%, A=26.5% y G=31.8%. De los grupos formados a partir de la topología de NJ, se pueden diferenciar los haplotipos que se distribuyen en la Península de Yucatán junto con los haplotipos de El Salvador, conformando un grupo (C) que esta fuertemente apoyada por los valores de bootstrap (100), mientras que otro grupo es el que reúne a los individuos del estado de Chiapas (B), el cual está de igual forma apoyado por las pruebas de bootstrap (98) y por último se encuentran las muestras de la ladera Este de México, incluyendo las muestras de las Islas Marías, con un valor de soporte de bootstrap de 99 (grupo A, ver Fig. 2). Creemos que la población de las Islas Marías podría constituir un linaje evolutivo independiente debido a que las poblaciones han estado aisladas tiempo suficiente para favorecer la diferenciación genética, además de que el grupo con el que se encuentran relacionadas genéticamente son las muestras del continente de los estados de Sinaloa, Jalisco y Colima, poblaciones de las cuales probablemente se originaron las poblaciones de la Islas Marías, sin embargo esto tendría que ser corroborado al incorporar un marcador molecular con elevadas tasas de evolución que nos pudiera proporcionar información genética más reciente.

Amazilia yucatanensis

Para el complejo *Amazilia yucatanensis* se obtuvieron un total de 12 secuencias con 570 pares de bases, de los cuales 549 son sitios conservados, 21 sitios son variables y 20 son sitios filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue la siguiente: T=26.5%, C=15.8%, A=25.7% y G=32%. En la topología se observan claramente dos grupos diferenciados (Figura 3), uno que corresponde a las poblaciones que se distribuyen a lo largo del Golfo de México, desde Tamaulipas hasta Campeche (A) y por otro lado la población que se encuentra en el estado de Oaxaca (B). Aunque el número de muestras es reducido (12) se puede observar que existe una correspondencia geográfica para determinar que se trata de dos grupos que posiblemente han tenido una diferenciación genética debido a la separación geográfica que presentan, ya que la población de Oaxaca esta restringida a un área muy pequeña, mientras que las poblaciones del Este están distribuidas de una manera continua. Sobre la población de Oaxaca, también se observa que ésta se encuentra fuertemente apoyada por los valores de bootstrap (100), mientras que para las poblaciones del Este el valor de apoyo no es tan elevado. En las poblaciones del Este se observa que las poblaciones distribuidas

geográficamente hacia el sureste, es decir las del estado de Campeche, tal vez se encuentren diferenciadas de las de resto (bootstrap=65), sin embargo para corroborar esto se necesitaría aumentar el número de muestras.

Género *Arremonops*

El complejo *Arremonops* cuenta con un número de 22 secuencias de 603 pb. De ésta matriz de datos se identificaron 549 sitios conservados, 54 sitios variables y 26 sitios filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue de: T=23.9%, C=34.3%, A=26.7%, G=5.1%. Se identificaron 21 haplotipos, los cuales se concentraron en tres diferentes grupos. Los individuos pertenecientes a la especie *A. chloronotus* se agruparon dentro del clado A (Figura 4), los individuos pertenecientes a la especie *A. rufivirgatus* quedaron por fuera de este grupo (A), sin embargo se logró diferenciar el grupo correspondiente a los individuos de las poblaciones del este de México (grupo C: Tamaulipas y Querétaro), por otro lado quedaron entre estos dos grupos, los individuos pertenecientes a las poblaciones de Guerrero y Oaxaca (B). Los valores obtenidos para los dos principales grupos, referentes a la prueba de bootstrap, fueron elevados en ambos casos (A=97, C=100). Para este complejo se lograron diferenciar genéticamente las dos especies incluidas: *A. chloronotus* y *A. rufivirgatus*.

Arremon brunneinucha

Para la especie *Arremon brunneinucha* se obtuvieron 11 secuencias en total. En el análisis se identificaron 10 haplotipos, los cuales se agrupan en tres grupo claramente diferenciados. Se obtuvo una matriz de datos con 678 pares de bases, de los cuales 608 sitios son conservados, 70 sitios son variables y 58 sitios son filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue la siguiente: T=23.8%, C= 34.0%, A= 25.3% y G=16.9%. De los grupos formados como resultado del análisis de NJ (Figura 5), se puede identificar un primer grupo con los individuos que se distribuyen geográficamente en el norte de la Sierra Madre Oriental (grupo C). El segundo grupo correspondiente a los individuos de la Sierra Madre del Sur (A) y por otro lado el grupo con los individuos que se distribuyen al sur de la Sierra Madre Oriental y montañas de

Chiapas (B). Otra interpretación de la topología encontrada es diferenciar cinco grupos, uno que corresponde al norte de la Sierra Madre Oriental, el cuál está fuertemente apoyado por los valores de bootstrap (100), otro formado por las poblaciones de El Carrizal, el cuál está fuertemente apoyado por los valores de bootstrap (100) y que junto con el grupo de los individuos de la Sierra Madre del Sur en Oaxaca (bootstrap=99), forman un clado que no está muy bien sustentado (bootstrap=57). Por otro lado encontramos al grupo conformado por los individuos del sur de la Sierra Madre Oriental en Oaxaca (bootstrap=100) y el grupo con los individuos de las montañas de Chiapas (bootstrap=99).

Chlorospingus ophthalmicus

Para el Complejo *Chlorospingus ophthalmicus* se obtuvieron un total de 77 secuencias. En el análisis se identificaron 24 haplotipos, los cuales se agrupan en cinco grupos claramente diferenciados (Figura 6). Se obtuvo una matriz de datos con 661 pares de bases, de los cuales 601 fueron sitios conservados, mientras que 60 fueron sitios variables y 54 fueron sitios filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue la siguiente: T=24.7%, C=33.1%, A=26.2% y G=16%. De los cinco grupos encontrados, uno de ellos corresponde a los individuos distribuidos geográficamente en la parte más sureña de México (grupo E: Volcán Tacaná, Chiapas), quien se une al grupo de Los Tuxtlas (grupo D: Veracruz), ésta unión tal vez es artificial, ya que cuando incorporamos muestras de Centroamérica, la población del Volcán Tacaná se une a ésta y entonces se forma un grupo que fácilmente podemos distinguir y corroborar por la distribución geográfica. La población de los Tuxtlas (Veracruz) queda como un grupo basal a todas las demás poblaciones. Otro de los grupos que se forma es el de la Sierra Madre del Sur (grupo C), en el que se incluyen las poblaciones de la Sierra de Miahuatlán y Guerrero. Un grupo más que se forma es el de las poblaciones correspondientes a Los Chimalapas y el Norte de Chiapas (grupo B), el cuál concuerda con una distribución geográfica bien definida y por último el grupo que incluye a las poblaciones de Puebla, Hidalgo, Veracruz (a excepción de Los Tuxtlas) y Oaxaca, es el grupo correspondiente a las poblaciones de la Sierra Madre Oriental (grupo A). Los cinco grupos identificados presentan altos valores de soporte (bootstrap=98-99). Estos resultados muestran que el gen mitocondrial COI resuelve de

manera precisa los diferentes grupos que se habían planteado en estudios previos, con otros genes mitocondriales (ATPasa 8, ATPasa 6, Citocromo b). Como se muestra en la Figura 6, éstos grupos corresponden a poblaciones que han estado por mucho tiempo aisladas y que con este estudio se logra aportar más información sobre los diferentes grupos que deberán ser reconocidos como especies diferentes.

Género *Eupherusa*

Para el caso del género *Eupherusa* se obtuvieron un total de 12 secuencias. Se identificaron 11 haplotipos, de los cuales no se observó ninguna separación para las especies que conforman el género (*E. poliocerca*, *E. eximia* y *E. cyanophrys*). Se obtuvo una matriz de datos con 629 pares de bases, de los cuales 624 fueron sitios conservados, 4 sitios variables y ningún sitio es filogenéticamente informativo. La composición nucleotídica fue la siguiente: T=26.2%, C=32.0%, A=26.3% y G=15.6%. El hecho de que no se encontrara ningún tipo de diferenciación genética entre especies diferentes se debe tomar con reserva, ya que podrían existir diversos factores, como una tasa de evolución baja del gen COI para este género en específico, para lo cual se repetirá el análisis con datos moleculares, ya que hemos encontrado que con otros genes mitocondriales la separación de las especies se observa con claridad y las ramas presentan valores altos de apoyo, a diferencia de la topología obtenida con este marcador molecular, con el cual se obtuvo una politomía sin valores de soporte.

Melanerpes formicivorus

En el caso del carpintero arlequín (*M. formicivorus*) se obtuvieron un total de 10 secuencias y una matriz de datos con 680 pares de bases, de los cuales 674 fueron sitios conservados, 6 sitios variables y 2 sitios filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue la siguiente: T=24.6%, C=35.1%, A=24.8%, G=15.5%. Se identificaron 6 haplotipos, los cuales se agrupan en dos clados principales (Figura 8), uno correspondiente a las diferentes poblaciones del continente (grupo A) y el otro correspondiente a la población que se distribuye en la Península de Baja California (grupo B), aunque no se obtuvieron valores de bootstrap muy elevados (grupo A=12,

grupo B=86), con este marcador se puede evidenciar la separación de las poblaciones de la península, las cuales están aisladas del resto de las poblaciones de México y podría interpretarse como la presencia de dos linajes evolutivos independientes. Sin embargo la evidencia no es suficiente, por lo cual se tendrían que secuenciar un número mayor de individuos para cada grupo, además de incluir otras especies del género *Melanerpes*.

Sittasomus griseicapillus

Para el complejo *S. griseicapillus* se obtuvieron un total de 30 secuencias. Se identificaron 4 haplotipos, los cuales se agrupan en cuatro grupos claramente diferenciados. Se obtuvo una matriz de datos con 693 pares de bases, de los cuales 686 son sitios conservados, 7 son sitios variables y 7 son sitios filogenéticamente informativos. La composición nucleotídica fue la siguiente: T=28%, C=29.3%, A=26.6% y G=16%. De los cuatro grupos formados, el que presenta los mayores valores de apoyo bootstrap es el correspondiente a los individuos del Estado de Veracruz (grupo D, bootstrap=94, Figura 9), todos ellos se distribuyen alrededor de la Estación Biológica de los Tuxtlas o en las faldas del Volcán San Martín. En otro gran grupo se encuentran los otros tres subgrupos que se diferencian, uno que lo conforman los individuos del oriente de México sin el Estado de Veracruz (grupo C, bootstrap=62), como son los individuos del estado de Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí, mientras que otro grupo lo conforman los individuos que se distribuyen en la ladera occidental de México (grupo B, bootstrap=88), específicamente los que se distribuyen en el estado de Guerrero y Oaxaca y por último el grupo conformado por los individuos de los estados del sur-suroeste de México (grupo A, bootstrap=61), que incluye a los individuos que se distribuyen en Chiapas, Campeche y el sur de Oaxaca.

Nota: Se tienen siete secuencias más correspondientes a las especies: *Lampornis amethystinus* (3), *Cyananthus latirostris* (3) y *Cyananthus sordidus* (1), para las cuales no se realizó ningún tipo de análisis debido al número reducido de muestras que presentan.

RESULTADOS GENERALES

Tabla 1. Complejos (resultados generales)

Complejo	No. Secuencias	No. Haplotipos	No. Grupos	Topología (dendrograma) Ver Apéndice
<i>Amazilia beryllina</i>	38	9	2	Figura 1
<i>Amazilia rutila</i>	52	11	3	Figura 2
<i>Amazilia yucatanensis</i>	12	6	2	Figura 3
Género <i>Arremonops</i>	22	21	3	Figura 4
<i>Arremon brunneinucha</i>	11	10	3	Figura 5
<i>Chlorospingus ophthalmicus</i>	77	24	5	Figura 6
Género <i>Eupherusa</i>	12	11	1	Figura 7
<i>Melanerpes formicivorus</i>	10	6	2	Figura 8
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	30	4	4	Figura 9

CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos se puede concluir que en algunos casos el gen mitocondrial COI, empleado para el proyecto de Código de Barras Biológico, puede ser de gran utilidad al distinguir los diferentes linajes evolutivos dentro de un complejo (p.e. *A. rutila*, *C. ophthalmicus*) y en algunos otros casos no lo es (p.e. Género *Eupherusa*). Los resultados aquí presentados evidencian que éste marcador molecular no siempre da la misma resolución a nivel poblacional.

Como se observa en los resultados y discusión, los mejores datos se obtuvieron cuando el número de muestras fue alta, por lo que se recomienda el uso de este marcador con muestreos para la mayoría de las poblaciones de los complejos o de las especies que se pretendan estudiar, cuando se cuente con número de individuos suficiente para lograr hacer comparaciones a nivel poblacional o a nivel interespecífico.

La poca o mucha variación y diferenciación genética que se presentó en los diferentes complejos de este estudio se puede deber a las características propias del gen mitocondrial COI, a pesar de que se sabe es un gen con altas tasas de evolución, para algunos grupos puede no presentar la suficiente información filogenética que defina grupos o pueda diferenciar incluso entre especies. Esta es una característica que se debe tomar en cuenta como limitante en algunos casos, ya que hay evidencia que prueba que el gen COI no podría ser empleado por sí solo como delimitador de linajes evolutivos independientes, sino que tendría que ser empleado en conjunto con otros genes que presenten mayor variación genética.

REFERENCIAS

- Avise, J. C., 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall. USA.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, M. A. Harvard University Press.
- Avise, J.C. 2006. *Evolutionary Pathways in Nature. A Phylogenetic Approach*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, Inglaterra.
- Campagna, L., Lijtmaer, D. A., Kerr, K. C. R., Barreira, A. S., Hebert, P. D. N., Loughheed, S. C., Tubaro, P. L. 2010. DNA barcodes provide new evidence of a recent radiation in the genus *Sporophila* (Aves: Passeriformes). *Molecular Ecology Resources*, 10: 449-458.
- Dasmahapatra, K. K., Elias, M., Hill, R. I., Hoffman, J. I., Mallet, J. 2010. Mitochondrial DNA barcoding detects some species that are real, and some that are not. *Molecular Ecology Resources*, 10: 264-273.
- Duellman, W. E. 1993. *Amphibian Species of the World: Additions and Corrections*. Lawrence: University of Kansas Museum of Natural History. Special Publication 21.
- Eschmeyer, W. N., C. J. J. Ferraris, M. Dang Hoang, and D. J. Long. 1998. Species of fishes, p. 25-1821. *In: Catalog of fishes*. Vols. 1-2. W. N. Eschmeyer (ed.). California Academy of Sciences, San Francisco.
- Espinosa de los Monteros, A y J. Cracraft. 1997. Intergeneric relationship of the New World Jays inferred from cytochrome b gene sequences. *Condor* 99:490-502.

- Frost, D. R. (editor). 1985. Amphibian species of the world. A taxonomic and geographical reference. Lawrence, KS: Association of Systematics Collections and Allen Press.
- Gene codes corporation. 2007. Sequencer 4.8. Tutorial for Windows and Macintosh.
- Glaw, F., Köhler, J. 1998. Amphibian Species diversity exceeds that of mammals. Herpetological Review 29: 11-12.
- Hajibabaei M, Janzen DH, Burns JM, Hallwachs W, Hebert PDN (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 968–971.
- Hebert, P.D.N., S. Rtnasinham and J.R. Woard. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit divergence among closely related species. Proc. R. Soc. Lond. Biology letters: S1-S4.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003b. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B 270: 313–321.
- Hebert P.D., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S., Francis C.M. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biol, 2(10):e312.
- Hillis, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18: 23-42.
- Hutterer, R., Verhaagh, M., Diller, J., Podloucky, R., 1995. An inventory of mammals observed at Panguana Biological Station, Amazonian Peru. Ecotropica 1, 3–20.

- Ibáñez-Hernández, P.G. 2000. Variación geográfica de las poblaciones del turco real (*Momotus momota*), Momotidae, Aves. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Nei, M., Kumar, S. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford: Oxford University Press. 333 p.
- Omland, K. E., Baker, J. M., Peters, J. L. 2006. Genetic signatures of intermediate divergence: population history of Old and New World Holarctic ravens (*Corvus corax*). *Molecular Ecology*, 15: 795-808.
- Rojas-Soto, O. R. 1998. Variación geográfica de las poblaciones de *Toxostoma curvirostre* (Mimidae) de las zonas áridas de Norteamérica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Rozzi, R., P. Feinsinger, F. Massardo y R. Primack. 2001. ¿Qué es la diversidad biológica? En: R. Primack, R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo. Fundamentos de Conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas. Fondo de Cultura Económica. México. Pp: 59-76.
- Rubinoff D: Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conserv Biol* 2006, 20(4):1026-1033.
- Sánchez-González, L. A. 2002. Variación geográfica y límites de especies en las poblaciones de *Chlorospingus opthalmicus* (Aves: Thraupidae) de Mesoamérica. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Sheldon, F. H. y Bledsoe, A. H. 1993. Avian molecular systematics, 1970s to 1990s. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24: 243-278.
- Sibley, C. G. y Monroe, B. L. 1990. Distribution and Taxonomy of Birds of the World. Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut.

- Systematics Agenda 2000. 1994. Systematics Agenda 2000: Charting the Biosphere. Technical Report. Systematics Agenda 2000, a Consortium of the American Society of Plant Taxonomists, the Society of Systematic Biologists, and the Willi Henning Society, in cooperation with the Association of Systematics Collections, N. Y. 34 pp.
- Tamura K, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar. 2011. Mega 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Likelihood, Distance, and Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*.
- Vijayan, K. y Tsou, C. H. 2010. DNA barcoding in plants: taxonomy in a new perspective. *Current Science* 99: 1530-1541.
- Wilson, D. E. y Reeder, D. M. (eds.). 1993. Mammals species of the World, a taxonomic and geographic reference. Second edition. Smithsonian Institution Press, Washington D.C.
- Zink, R. M., S. Rootes y D. L. Dittmann. 1991. Mitochondrial DNA variation, population structure, and evolution of the Common grackle (*Quiscalus quiscula*). *Condor* 93:318-329.

APÉNDICE

Figura 1: *Amazilia beryllina*

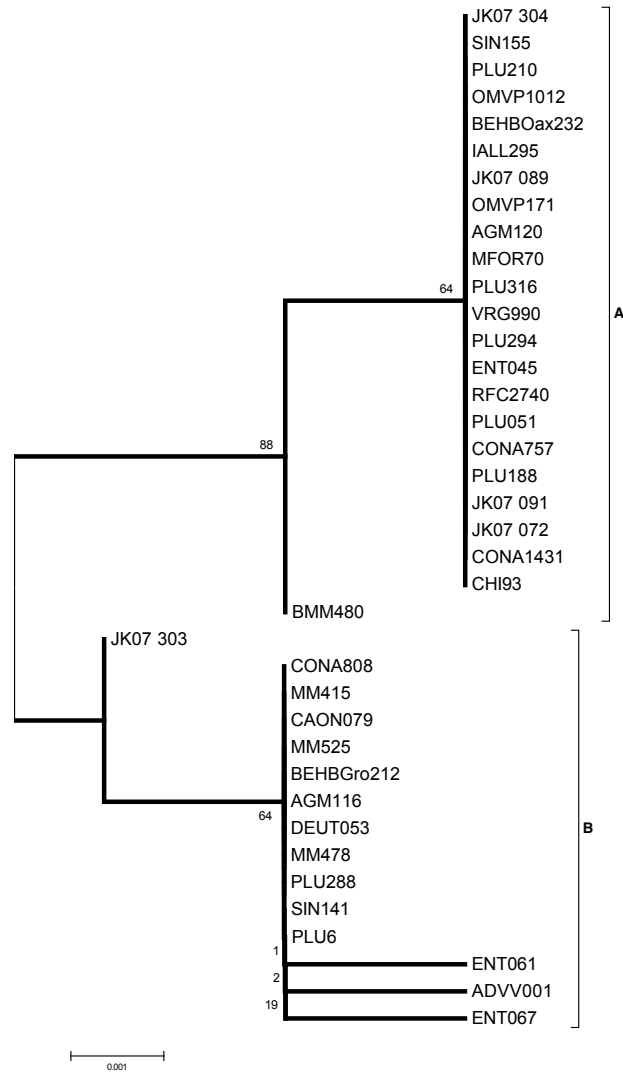


Figura 1. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *A. beryllina*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).

Figura 2: *Amazilia rutila*

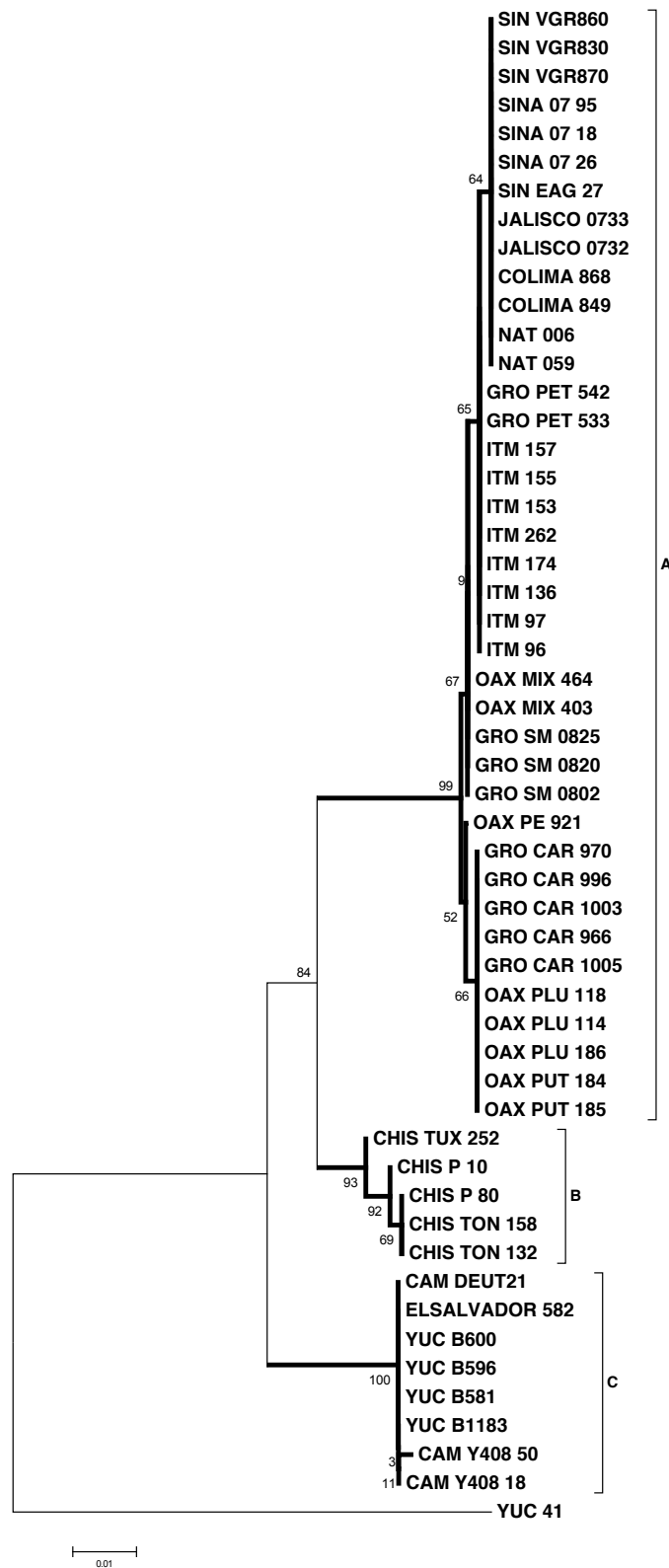


Figura 2. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *A. rutila*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).

Figura 3: *Amazilia yucatanensis*

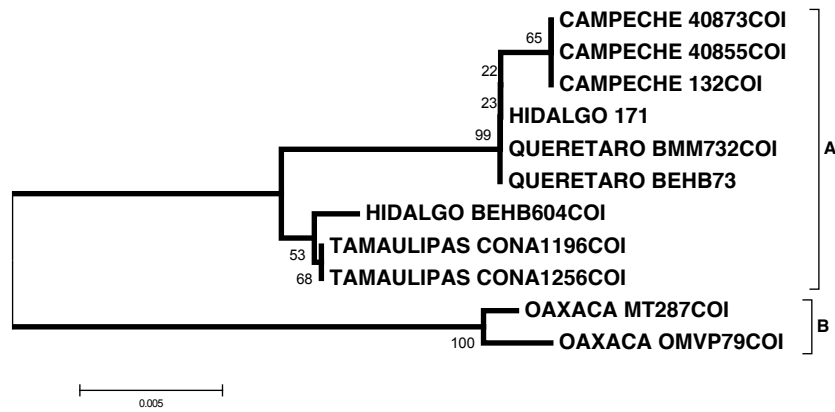


Figura 3. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *A. yucatanensis*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).

Figura 4: Género *Arremonops*

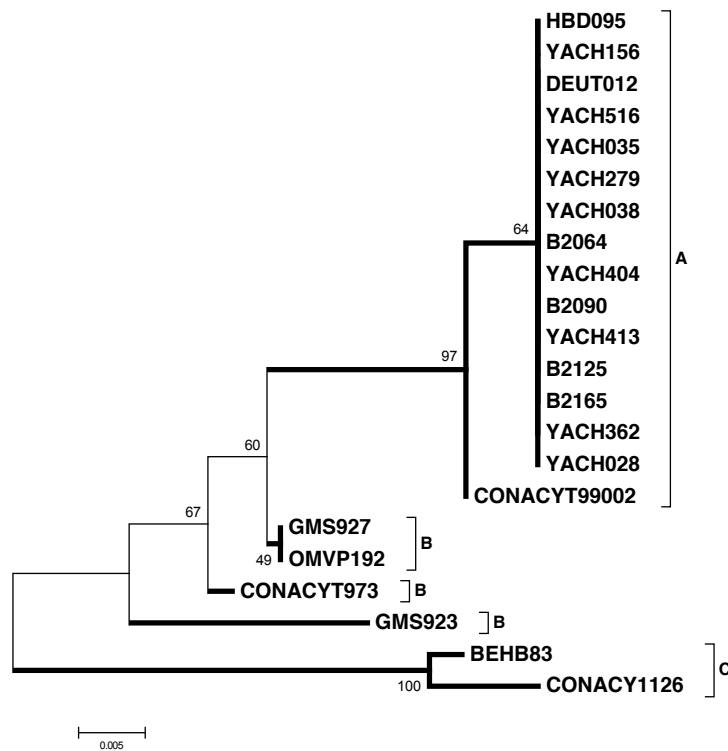


Figura 4. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *Arremonops*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).

Figura 6: *Chlorospingus ophthalmicus*

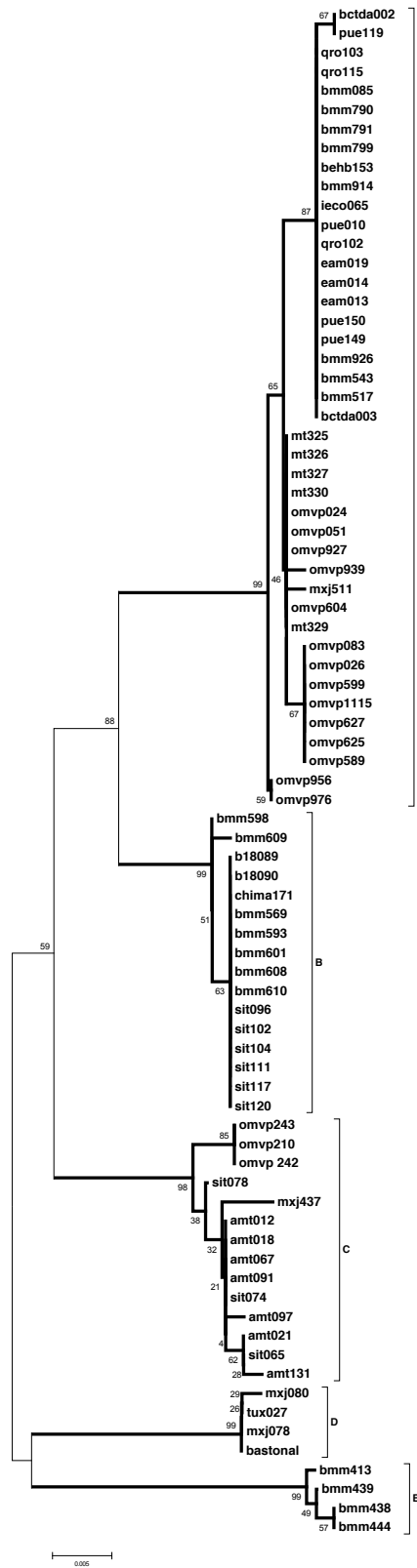


Figura 6. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *C. ophthalmicus*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).

Figura 5: *Arremon brunneinucha*

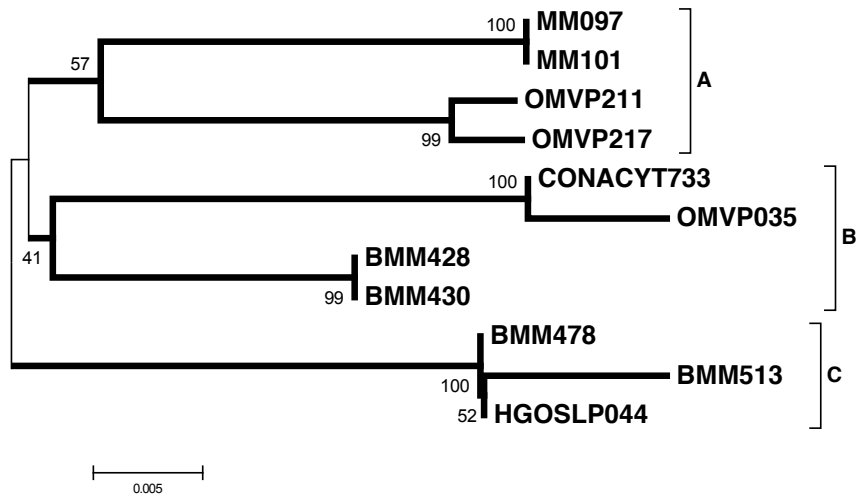


Figura 5. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *A. brunneinucha*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).

Figura 7: Género *Eupherusa*

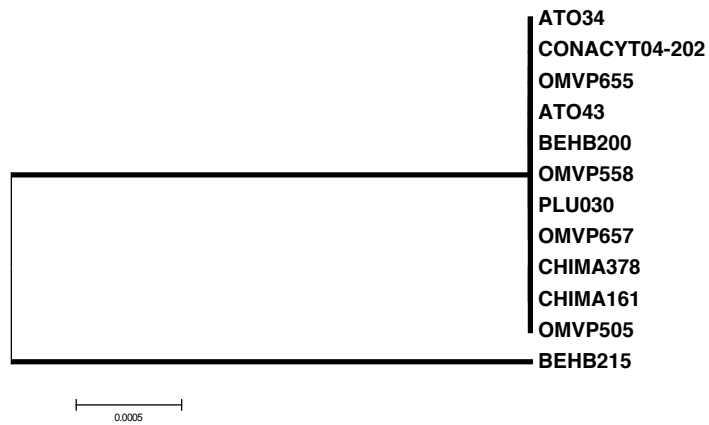


Figura 7. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *Eupherusa*

Figura 8: *Melanerpes formicivorus*

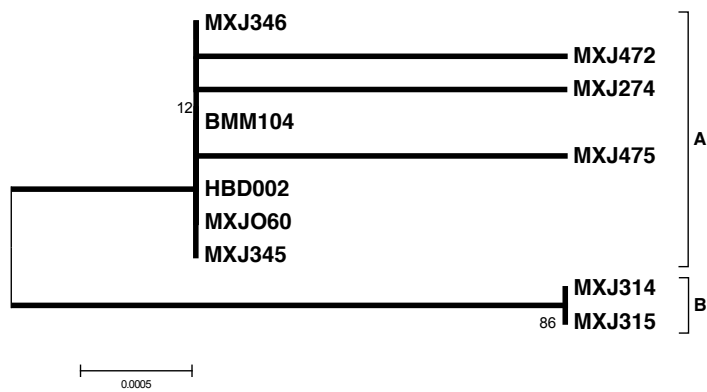


Figura 8. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *M. formicivorus*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).

Figura 9: *Sittasomus griseicapillus*

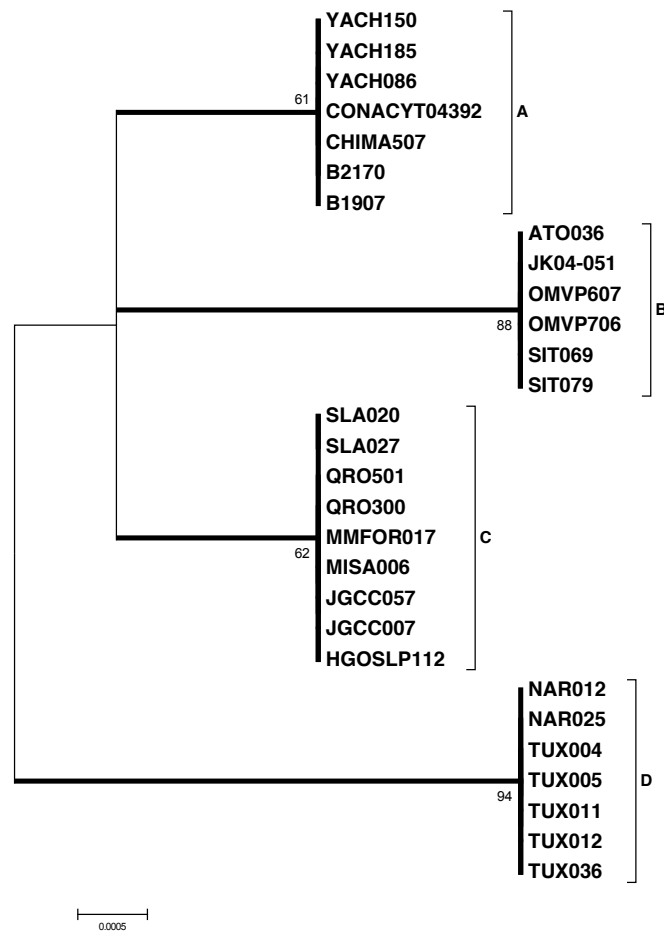


Figura 9. Topología resultado del análisis de NJ para el complejo *S. griseicapillus*. Se indican los valores de apoyo para las ramas (bootstrap).