

Informe final* del Proyecto R174
Sistemática molecular de Trogoniformes (Aves): Filogenia del orden y análisis de variabilidad genética de quetzales en la reserva de la Biosfera El Triunfo

Responsable: Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros Solís
Institución: Instituto de Ecología AC
División de Ecología y Comportamiento Animal
Departamento de Ecología y Comportamiento Animal
Dirección: Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec, Xalapa, Ver, 91000 , México
Correo electrónico: aespinos@sun.ieco.conacyt.mx y aespinos@ecologia.edu.mx
Teléfono/Fax: 01(28)42 1800 ext 4104, 01(28)42 1800 ext 4111 Fax: 01(28)18 7809
Fecha de inicio: Octubre 15, 1998
Fecha de término: Marzo 15, 2002
Principales resultados: Informe final, Hoja de cálculo

Forma de citar el informe final y otros resultados:** Espinosa de los Monteros Solís, A., 2001. Sistemática molecular de Trogoniformes (Aves): Filogenia del orden y análisis de variabilidad genética de quetzales en la reserva de la Biosfera El Triunfo. Instituto de Ecología AC . **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R174.** México D. F.

Forma de citar Hoja de cálculo Espinosa de los Monteros Solís, A., 2001. Sistemática molecular de Trogoniformes (Aves): Filogenia del orden y análisis de variabilidad genética de quetzales en la reserva de la Biosfera El Triunfo. Instituto de Ecología AC. **Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. R174.** México D. F.

Resumen:

El orden Trogoniformes (Trogones y Quetzales) es uno de los grupos de aves más llamativos debido a los patrones de coloración en su plumaje. Aparte de su atractivo meramente estético, los trogones son de gran importancia ya que actúan como dispersores de semillas, y al ser aves estrictas de bosque resultan ser buenos indicadores del deterioro ambiental. Para el mundo se han descrito un total de 39 especies, de las cuales nueve (24%) se distribuyen en nuestro país. Debido al hecho de ser organismos estrictos de bosque, muchas de las especies forman parte de listados de aves amenazadas. De las nueve especies distribuidas en México, cinco se encuentran contenidas en la NOM-ECOL-94. Sin embargo, desconocemos aspectos básicos de estas especies como sus interrelaciones evolutivas, variabilidad genética y estado actual de las poblaciones, los cuales deben ser criterios indispensables para poder tomar decisiones para su protección. El proyecto propuesto puede evaluar la variabilidad genética de las especies de Trogoniformes (Aves) distribuidas en México, para ello se usarán técnicas moleculares de secuenciación de ADN mitocondrial (citocromo b y 128 tRNA). Además se supone llevar al cabo un estudio más detallado con la especie *Pharomachrus mocinno* (Quetzal) en la Reserva de la Biosfera de "El Triunfo". Para determinar con una mayor precisión la variabilidad genética en los quetzales, además de secuenciar los genes del citocromo b y 12S, se empleará la técnica conocida como RAPIDs, la cuál ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad ya que teóricamente muestra un número ilimitado de loci, requiere cantidades mínimas de tejido, y es más simple metodológicamente. De los resultados obtenidos a partir de este proyecto, se pretende diseñar un plan de manejo para la población de quetzales en la Reserva de la Biosfera "El Triunfo", al igual que una serie de sugerencias para conservación de otras especies de trogones y sus áreas en que habitan.

-
- * 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.

Informe final* del Proyecto R174
Sistemática molecular de Trogoniformes (Aves): Filogenia del orden y análisis de
variabilidad genética de quetzales en la reserva de la Biosfera El Triunfo

Responsable: Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros Solís

Institución: Instituto de Ecología AC División de Ecología y Comportamiento Animal
Departamento de Ecología y Comportamiento Animal

Dirección: Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec, Xalapa, Ver, 91000 , México

Correo electrónico: aespinos@sun.ieco.conacyt.mx y aespinos@ecologia.edu.mx

Teléfono/Fax: 01(28)42 1800 ext 4104, 01(28)42 1800 ext 4111 Fax: 01(28)18 7809

Fecha de inicio: Octubre 15, 1998

Fecha de término: Marzo 15, 2002

Principales resultados: Informe final, Hoja de calculo

Forma de citar el informe final y otros resultados:** Espinosa de los Monteros Solis, A., 2001. Sistemática molecular de Trogoniformes (Aves): Filogenia del orden y análisis de variabilidad genética de quetzales en la reserva de la Biosfera El Triunfo. Instituto de Ecología AC . **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R174.** México D. F.

Forma de citar Hoja de cálculo Espinosa de los Monteros Solis, A., 2001. Sistemática molecular de Trogoniformes (Aves): Filogenia del orden y análisis de variabilidad genética de quetzales en la reserva de la Biosfera El Triunfo. Instituto de Ecología AC. **Hoja de calculo SNIB-CONABIO proyecto No. R174.** México D. F.

Resumen: El orden Trogoniformes (Trogones y Quetzales) es uno de los grupos de aves más llamativos debido a los patrones de coloración en su plumaje. Aparte de su atractivo meramente estético, los trogones son de gran importancia ya que actúan como dispersores de semillas, y al ser aves estrictas de bosque resultan ser buenos indicadores del deterioro ambiental. Para el mundo se han descrito un total de 39 especies, de las cuales nueve (24%) se distribuyen en nuestro país. Debido al hecho de ser organismos estrictos de bosque, muchas de las especies forman parte de listados de aves amenazadas. De las nueve especies distribuidas en México, cinco se encuentran contenidas en la NOM-ECOL-94. Sin embargo, desconocemos aspectos básicos de estas especies como sus interrelaciones evolutivas, variabilidad genética y estado actual de las poblaciones, los cuales deben ser criterios indispensables para poder tomar decisiones para su protección. El proyecto propuesto puede evaluar la variabilidad genética de las especies de Trogoniformes (Aves) distribuidas en México, para ello se usarán técnicas moleculares de secuenciación de ADN mitocondrial (citocromo b y 12S tRNA). Además se supone llevar al cabo un estudio más detallado con la especie *Pharomachrus mocinno* (Quetzal) en la Reserva de la Biosfera de "El Triunfo". Para determinar con una mayor precisión la variabilidad genética en los quetzales, además de secuenciar los genes del citocromo b y 12S, se empleará la técnica conocida como RAPIDs, la cuál ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad ya que teóricamente muestra un número ilimitado de loci, requiere cantidades mínimas de tejido, y es más simple metodológicamente. De los resultados obtenidos a partir de este proyecto, se pretende diseñar un plan de manejo para la población de quetzales en la Reserva de la Biosfera "El Triunfo", al igual que una serie de sugerencias para conservación de otras especies de trogones y sus áreas en que habitan.

-
- * 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.

Sistemática Molecular de Trogoniformes

(Aves): Filogenia del Orden, y Análisis de

variabilidad genética de quetzales en la

Reserva de la Biosfera El Triunfo"

Informe Técnico Convenio CONABIO FB612/RI74198

Alejandro Espinosa de los Monteras S.

Departamento de Ecología y Comportamiento Animal
Instituto de Ecología, A. C.
Km 2.5 Antigua carretera a Coatepec,
Xalapa, Veracruz 91000

Tel : (28) 42-1800 ext. 4104

Fax (28) 18-7809

E-mail: aespinos@ecologia.edu.mx

RESUMEN

El Orden Trogoniformes (Trogones y Quetzales) es uno de los grupos de aves más llamativos debido a los patrones de coloración en su plumaje. Aparte de su atractivo meramente estético, los trogones son de gran importancia ya que actúan como dispersores de semillas, y al ser aves estrictas de bosque resultan ser buenos indicadores del deterioro ambiental. La clasificación más reciente de las aves del mundo ha dividido a los trogones en seis géneros (i.e., *Apaloderma*, *Pharomachrus*, *Euptilotis*, *Priotelus*, *Trogon*, y *Harpactes*). En total se han descrito un total de 39 especies, de las cuales nueve (24 %) se distribuyen en nuestro país. Debido al hecho de ser organismos estrictos de bosque, muchas de las especies forman parte de listados de aves amenazadas. De las nueve especies distribuidas en México, cinco se encuentran contenidas en la NOM-059-ECOL-94. Sin embargo, desconocemos aspectos básicos de estas especies como sus interrelaciones evolutivas, variabilidad genética, y estado actual de las poblaciones, los cuales deben ser criterios indispensables para poder tomar decisiones para su protección. El presente proyecto evaluó dos aspectos básicos en este grupo. Primero, cuáles son las relaciones evolutivas de las especies de este grupo. Análisis de Parsimonia Máxima confirmaron la monofilia del grupo y de la mayoría de los géneros propuestos. Las especies del Nuevo mundo forman un grupo monofilético y son el grupo hermano de los trogones asiáticos (i.e., *Harpactes*). El linaje más basal dentro del orden lo conformaron los trogones africanos (Le., *Apaloderma*). Dentro de los trogones americanos se obtuvo que el grupo hermano del género *Trogon* es un clado formado por los quetzales, dentro de los cuales se incluye al trogon orejón (Le., *Euptilotix neoxenus*). El escenario evolutivo sugiere un origen Euro-Africano para este grupo, lo cual se ve respaldado por evidencia fósil. Por lo tanto la mayor diversidad en el continente americano se explica como un centro secundario de radiación debido a la baja competencia con especies frugívoras. Otro escenario evolutivo, esta vez sobre la aparición de coloración iridiscente sugiere un aumento en las microestructuras responsables de la iridiscencia hacia los linajes más apicales.

En segundo lugar se analizó la variabilidad genética de las especies de Trogoniformes. Para ello se usarán técnicas moleculares de secuenciación de ADN mitocondrial (citocromo b y 12S rRNA). Además, se llevó al cabo un estudio más detallado con la especie *Pharomachrus mocinno* (Quetzal) en la Reserva de la Biosfera de "El Triunfo". Para determinar con una mayor precisión la variabilidad genética en los quetzales, se secuenció un fragmento de 541 pb la región control del D-Loop, además se usó la técnica conocida como RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNAs). Los resultados tanto de las secuencias como de los RAPD's sugieren que la población se encuentra en una condición "sana" genéticamente, y que los individuos presentes en el polígono uno de "El Triunfo" representan una población con cohesión reproductiva estable. Aparentemente el problema principal que enfrentan los individuos de esta población es la escasez de sitios adecuados para anidación y la alta tasa de depredación de las nidadas por parte de la tucaneta verde (*Aulacorhynchus prasinus*) y ardillas.

PALABRAS CLAVE

Trogoniformes, Quetzal, Reserva de la Biosfera "El Triunfo", Filogenia Molecular, Citocromo b, 12S rRNA, D-Loop, RAPDs, Conservación.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Actualmente una de las disciplinas más integrativas en biología es la sistemática filogenética. Durante los últimos treinta años la sistemática ha sufrido un cambio dramático. No solo por el rápido desarrollo e incorporación de nuevas tecnologías (e.g., análisis moleculares), sino también por el surgimiento de los principios filogenéticos. El pensamiento filogenético ha transformado a la sistemática de una disciplina descriptiva a una ciencia predictiva e interpretativa. Con el auge de la biología comparada, la sistemática filogenética se ha convertido en la base de análisis de patrones biogeográficos, conductuales, y ecológicos dentro de un marco principalmente evolutivo. Con ello, nos permite proponer estrategias de manejo y conservación de la biodiversidad acordes con procesos biológicos. Para lograr realizar un análisis integral de una especie, además de comprender las relaciones históricas de un grupo es necesario estimar la variabilidad existente en las poblaciones. Una de las metas principales en los estudios genéticos enfocados a la conservación, es la determinación de el nivel y distribución de la variabilidad genética en especies amenazadas. La información genética es uno de los datos críticos para entender la estructura, demografía, y taxonomía de las poblaciones de una especies.

Los Trogoniformes (Trogones y Quetzales) son un grupo relativamente pequeño de aves con distribución pantropical. En total se reconocen 39 especies de las cuales 9 (24 %) se distribuyen en la República Mexicana (Sibley y Monroe 1990). Se conoce relativamente bien la historia natural de algunas de las especies del Nuevo Mundo (Skutch 1942, 1944, 1948). A partir de esta información se ha inferido que estas aves forman parte fundamental de las comunidades debido a su papel de dispersores de semillas (Ávila y Hernández 1990). Los trogones se consideran como buenos indicadores de deterioro ambiental debido a su aparente especificidad de hábitad. Por ende, la rápida deforestación ha hecho que muchas especies de trogones hayan sido incluidas en los listados de especies amenazadas (King 1981). Por razones similares, de las nueve especies de trogones que se distribuyen en México cinco han sido consideradas dentro de la NOM-059-ECOL-1994. No es posible establecer una política preservacionista total debido a la extrema complejidad de las causas que propician la rápida pérdida de ecosistemas en nuestro país y el mundo. Es por ello que los esfuerzos de conservación se han enfocado a tratar de proteger la mayor variabilidad genética. En este sentido el entender las relaciones filogenéticas de los grupos amenazados resulta una prioridad de vital importancia. Es así, que una vez que sabemos la filogenia de un grupo podemos hacer decisiones sobre los linajes que al protegerlos representarían la conservación de la mayoría de la biodiversidad posible (Stiassny y de Pinna 1994).

Para un uso mas amigable, el presente reporte ha sido dividido en tres capítulos. Dichos capítulos abarcan los distintos niveles que el proyecto pretendió enfocar. Cada capítulo consta de un prólogo introductorio al problema, una lista de objetivos particulares, la metodología usada para abordar las preguntas planteadas, una sección detallada de los resultados obtenidos, y finalmente las conclusiones a ese nivel. El primer capítulo se refiere al análisis de las interrelaciones evolutivas entre los Trogones inferidas a partir de análisis filogenéticos basados en parsimonia. El segundo capítulo siguiendo el patrón filogenético recobrado, explora un escenario evolutivo de las estructuras que producen la coloración iridiscente en estas aves. Por ultimo, el tercer capítulo representa un estudio piloto sobre la variabilidad genética de la población de quetzales en el polígono 1 de la reserva de la biosfera de "El Triunfo".

OBJETIVOS GENERALES DEL PROYECTO

El proyecto propuesto, abarca dos niveles de organización básica a nivel biológico. El primero es un estudio sobre la variabilidad genética de la población de Quetzales (*Pharomachrus mocinno*) en la Reserva de la Biosfera de El Triunfo. El segundo plantea inferir las interrelaciones evolutivas de las especies de Trogoniformes que se distribuyen en México usando técnicas moleculares (i.e., secuenciación directa de ADN mitocondrial), además de establecer su posición taxonómica dentro del orden. Por lo tanto, los objetivos particulares del presente estudio fueron:

- i) Proponer un plan de protección y manejo para el Quetzal (*Pharomachrus mocinno*) en la Reserva de la Biosfera "El Triunfo", considerando como factor fundamental la variabilidad genética de esta población.
- ii) Inferir por medio de una metodología cladística las relaciones evolutivas de las especies de trogoniformes distribuidas en la República Mexicana.
- iii) Recobrar patrones sobre aspectos evolutivos, ecológicos, y de biogeografía histórica de para las especies de trogones distribuidas en México.

RESULTADOS ESPERADOS

- i) Al final del estudio se entregará a la CONABIO un informe detallado de los resultados de ambos análisis (variabilidad genética entre las especies de tragones, y variabilidad genética en la población del quetzal en la Reserva de la Biosfera de "El Triunfo").

- ii) Matrices de comparaciones pareadas sobre la variabilidad genética interespecíficas e intraespecíficas. Se entregarán al menos tres matrices, dos interespecíficas con la variabilidad a nivel de citocromo b y 12S rRNA, y otra más detallada (i.e., intraespecífica) con la variabilidad genética de la población de el Quetzal en la Reserva de la Biosfera de "El Triunfo".

- iii) Reporte actualizado sobre la situación del Quetzal (*P. mocinno*) en el la Reserva de la Biosfera de "El Triunfo". Gracias a que existen estudios anteriores de quetzales en "El Triunfo" (e.g., Ávila y Hernández 1990, Solórzano 1995), el reporte que se presentará a la CONABIO mencionará de la manera más detallada el cambio que ha sufrido la población de esta especie a lo largo de la última década.

- iv) Formación de recursos humanos a nivel de licenciatura y posgrado (por lo menos un estudiante de cada nivel).

- Y) Publicaciones científicas en revistas internacionales. Se entregarán a CONABIO copias de cualquier derivadas de este proyecto, y por supuesto se dará crédito a CONABIO por el apoyo recibido en cualquier publicación.

RESULTADOS GENERALES

CAPITULO I

FILOGENIA DEL ORDEN TROGONIFORMES

El Orden Trogoniformes (Clase: Aves) esta formado por lo que comúnmente se denomina Quetzales y Trogones. Es indudablemente uno de los grupos de aves más coloridos. Presentan un plumaje denso, pero las plumas individuales son laxas ya que las bárbulas se encuentran especialmente reducidas. el patrón de coloración en los machos puede ir del café hasta el verde metálico, con destellos azul-violeta en la parte dorsal. La cabeza puede ser verde metálico, negra, gris, azul oscuro, violeta, rosada, o roja. En la mayoría de las especies la región superior del pecho esta dividida de la región abdominal por una banda de plumas blancas. El vientre y las cobertoras inferiores de la cola pueden ser rojas, amarillas o naranjas. Las alas son completamente negras, mientras que la cola es negra con patrones distintivos de bandas blancas. Algunas especies presentan la región periocular desnuda, pero la piel presenta coloraciones que pueden ir desde el amarillo pálido, al púrpura intenso. Los quetzales (*Pharomachrus*) se caracterizan por presentar una cresta de plumas, cobertoras de las alas elongadas, y cobertoras dorsales de la cola elongadas que en algunas especies pueden sobrepasar la longitud de esta. Es el Quetzal Centroamericano (*P. mocinno*) las cobertoras dorsales de la cola pueden sobrepasar los 100 cm de longitud. El pico es corto pero con la base ancha y el culmen decurvado. Generalmente presenta coloraciones brillantes, y en algunas especies el tomium es serrado. La cola es graduada, ancha en la base y truncada.

Los caracteres morfológicos que se consideran distintivos (Ridgway 1911, Sibley 1955, Sibley & Ahlquist 1990) de los miembros de este Orden son: paladar esquizognato, proceso basipterigoideo desarrollado, vomer elongado, 15 vértebras cervicales, dos pares de hendiduras esternales, de cuatro a cinco pares de costillas, metatarso con cuatro hendiduras, coracoides dividido, siringe traqueo-bronquial, nostrilos holorrinos, septo nasal osificado, tendones plantares de tipo VIII, convoluciones intestinales tipo VI, musculatura pélvica AX, caeca bien desarrollada, arteria carótida izquierda solamente, pterilosis espinal desde la nuca hasta la glándula pigidial, diez primarias, de once a doce secundarias, doce rectrices, y la glándula pigidial desnuda. Sin embargo muchas de estas características están presentes también en otros grupos de aves (Sibley & Ahlquist 1990). Tal vez el único carácter verdaderamente distintivo de estas aves es la presencia de un pie heterodáctilo, en el cual los dedos I y II están dirigidos hacia atrás, mientras que los dedos III y IV son frontales y unidos en su parte media basal. Por lo tanto el halux (dedo I) es el más externo, mientras que en las patas zigodáctilas son los dedos I y IV los que presentan la posición dorsal.

Los tragones presentan una distribución pantropical. La clasificación más reciente para las aves del mundo reconoce un total de 39 especies divididas en seis géneros (Sibley & Monroe 1990). Los tragones africanos (género *Apaloderma*) son endémicos de los bosques montañosos de Liberia, Nigeria, Camerún, Angola, Zaire, Uganda, Kenya, Tanzania, Mozambique y Malawi. El segundo género más diverso es *Harpactes* con 11 especies. Estas se distribuyen en el Asia desde la India y Sri Lanka hasta el sureste de China, y a lo largo de la península Malaya pasando por Sumatra, Borneo, Java, y las Filipinas. El género monoespecífico *Euptilotis* es endémico de los bosques montañosos del oeste de México y sur de Arizona. Las cinco especies del género *Pharomachrus* se distribuyen desde el sur de México hasta Sudamérica en Perú, Bolivia, Colombia, Venezuela, Ecuador, y la Amazonia Brasileña. *Priotelus* incluye dos especies endémicas del Caribe en Cuba y en República Dominicana. Finalmente el género *Trogon* con 17 especies, se distribuye desde el suroeste de Nuevo México y sureste de Arizona hacia el sur cubriendo todo México, Centro y Sudamérica hasta el norte de Argentina.

Aun cuando la historia natural de algunas especies es bien conocida (e.g. Skutch 1942, 1944, 1948), las relaciones filogenéticas de las especies de tragones está pobremente estudiada. Los estudios sistemáticos se habían enfocado simplemente a la descripción de especies y subespecies (e.g. Clark 1918, Zimmer 1948, Clancey 1959, Parkes 1970). Las descripciones técnicas para los distintos géneros se basan en caracteres pobremente definidos que frecuentemente conflictúan entre los grupos y por lo tanto no discretizan grupos naturales. Caracteres tales como la cantidad de plumas en el tarso, serración del tomium, presencia de regiones desnudas de piel, patrones de coloración, y algunas características esqueléticas fueron usadas para inferir vagamente las relaciones entre las especies de este grupo (Dgilvie-Grant 1892, Ridgway 1911, Clark 1918, Parkes 1970). Sin embargo muchos de estos caracteres presentan más variación dentro de una misma especie que entre especies por lo tanto haciéndolos inútiles para el análisis filogenético. Swainson (1837), por ejemplo, reconoció solamente los géneros *Trogon*, *Harpactes*, *Apaloderma*, *Temnurus*, y *Calurus*. Ogilvie-Grant (1892) dividió a los tragones asiáticos en dos géneros (*Harpactes* y *Hapalarpactes*). Sharpe (1900) dividió a los tragones africanos en *Hapaloderma* y *Heterotrogon*. Ridgway (1911) dividió el género *Trogon* en cuatro géneros distintos (*Trogon*, *Curucujus*, *Trogonurus*, y *Chrysotrogon*). Peters (1945) dividió a *Priotelus* en dos géneros (*Priotelus* y *Temnotrogon*), y a los tragones africanos en dos géneros (*Apaloderma* y *Heterotrogon*). Más recientemente Espinosa de los Monteros (1998) realizó un análisis filogenético basado en secuencias de ADN mitocondrial para los trogoniformes. Sin embargo en este estudio las especies mexicanas de trogoniformes están pobremente representadas.

Por lo anterior los objetivos particulares de este primer capítulo pretenden: a) corroborar la monofilia de los distintos géneros de trogoniformes; b) inferir las interrelaciones evolutivas de las nueve especies de trogoniformes distribuidos en México con el resto de las especies de trogones; y c) determinar la variabilidad genética interespecífica entre las especies mexicanas de trogones y el resto de las especies de la familia.

METODOLOGÍA

Grupos Taxonómicos

El análisis filogenético global incluyó un total de 24 especies de Trogoniformes, tanto del Nuevo Mundo I *Pharomachrus* (4 spp), *Euptilotis neoxenus*, *Priotelus temnurus*, y *Trogon* (13 spp.)], como de África [*Apaloderma* (2 spp.)], y Asia [*Harpactes* (3 spp)]. Para este análisis, nos aseguramos de obtener tejidos (i.e., hígado, corazón, o sangre) de las nueve especies de trogones que se distribuyen en México (*P. mocinno*, *E. neoxenus*, *T. violaceus*, *T. elegans*, *T. collaris*, *T. mexicanus*, *T. massena*, *T. elanocephalus*, y *T. citreolus*). Como ya ha sido mencionado, de las especies que se incluirán en este estudio, cinco se encuentran consideradas dentro de NOM-059-ECOL-1994. Estas especies son: *Trogon violaceus* (NOM-059-ECOL-94: Rara), *Trogon collaris* (NOM-059-ECOL-94: Rara), *Trogon massena* (NOM-059-ECOL-94: Rara), *Euptilotis neoxenus* (NOM-059-ECOL-94: Amenazada), y *Pharomachrus mocinno* (NOM-059-ECOL-94: En peligro).

Para enraizar la filogenia y polarizar los caracteres se emplearon seis especies de grupos que se consideran cercanamente relacionados con los Trogoniformes (Espinosa de los Monteros 2000). Estas incluyeron tres especies de Coliiformes (*Colius colius*, *C. striatus*, y *C. leucocephalus*), y tres especies de Cuculiformes (*Centropus sinensis*, *Cuculux fugax*, y *Geococcyx velox*). Debido a que las relaciones existentes entre las especies del grupo externo son irrelevantes para los objetivos de proyecto planteado, en las figuras este ciado se identifica solamente como "Grupo Externo".

Colecta de tejidos

Los tejidos (músculo, sangre, plumas, etc.) utilizados en el presente estudio se obtuvieron colectando especímenes en el campo, o a través de intercambio con museos (American Museum of Natural History, Field Museum Chicago, Luisiana State University, Museo de Zoología Facultad de Ciencias UNAM, etc.). Los permisos de colecta correspondientes para México fueron

tramitados ante las autoridades del INE, y las colectas se llevaron al cabo de acuerdo con los lineamientos establecidos en los mismos. Los especímenes colectados (o tejidos) fueron almacenados en buffer fisiológico (Longmire et al. 1997) para su traslado y posterior incorporación en la colección de Tejidos Congelados del Laboratorio de Biología Evolutiva del Instituto de Ecología, A. C.

Extracción y secuenciación de ADN

El DNA genómico fue extraído directamente de muestras de tejidos de acuerdo al protocolo descrito en Espinosa de los Monteros y Cracraft (1997). Para la extracción de ADN, los tejidos fueron sometidos a desnaturalización por ebullición en una solución al 5% de Chelex, siguiendo el protocolo propuesto por Singer-Sam et al. (1989). Posteriormente los genes seleccionados fueron aislados y amplificados por medio de técnicas *in vitro* de PCR, usando oligonucleótidos diseñados específicamente para aves (Espinosa de los Monteros 1998, 2000). Esto con el objeto de minimizar el riesgo de contaminación. El PCR se llevó al cabo en termocicladores de efecto Peltier (Perkin-Elmer), siguiendo los siguientes parámetros: 94 °c por 1 min, 50 °c por 1.5 min. y 72 °c por 2.5 min.; por 35 ciclos. Los productos fueron separados por medio de electroforesis submarina de geles de agarosa al 2% (FMC Bioproducts). Los productos fueron teñidos en una solución de bromuro de etilo, a una concentración de 2pg/ml, y fueron visualizados usando una lámpara de luz ultravioleta. Las reacciones exitosas fueron recobradas directamente de los geles resuspendiendo la muestra en 1.50 MI de agua ultrapura libre de ARNasa y sometiéndolos a fusión por calor a una temperatura de 73 °c por 15 min. Usando esta muestras como base, los genes fueron reamplificados en volúmenes de 40 *pl* para obtener la cantidad adecuada de template para secuenciación directa. Los parámetros a seguir durante esta segunda amplificación fueron: 94 °c por 45 s, 55 °c por 1 min., y 72 °c por 2 min.; por 25 a 30 ciclos. Todos los experimentos de PCR se realizaron paralelamente con reacciones control negativas y positivas, con el objeto de asegurar que los productos representan verdaderamente los genes deseados y no posible contaminación externa. Alicuotas de 3 *yl* de las reamplificaciones fueron aisladas y visualizadas como ya fue descrito. El volumen restante fue purificado usando el kit GeneClean III (BIO 101 inc), con el fin de eliminar el exceso de oligonucleotidos, enzimas y buffers que pueden inhibir las reacciones de secuenciación directa. Las reacciones purificadas fueron sometidas a secuenciación cíclica usando el kit ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit con AmpliTaq DNA Polymerase FS, en un ciclador GeneAmp 480 PCR System (Perkin Elmer). Las reacciones se llevaron al cabo en volúmenes de 15 *ytl* (5.7 *ycl* del kit, 1 pino; oligonucleótido de secuenciación, 5 ng/gl de DNA, y 8 *pl* de agua ultrapura libre de ARNasa). Las condiciones que se usaron durante la secuenciación cíclica fueron: 96 °c por 30 s, 53 °c por 20 s, 60 °c por 4 min., durante 27 ciclos.

El exceso de terminadores Taq dideoxy-nucleótidos fue removido por medio de columnas de Sephadex (CentriSep Princeton Separations) en una microcentrífuga durante 2 min. a una velocidad de 2500 rpm. El volumen recuperado fue secado en una centrifuga de vacío, y posteriormente fue resuspendido en 2.5 jl de buffer de secuenciación (6x formalina desionizada, 1 x EDTA 50 mM pH 8.0). Las reacciones fueron observadas por medio de electroforesis de geles desnaturalizadores de poliacrilamida al 4%, en una estación secuenciadora automática de DNA ABI Prisma 373 (Perkin Elmer). Los archivos conteniendo las secuencias fueron analizados con el programa Sequencher 3.0 (Gene Codes Corp, Ann Arbor, MI, <http://www.genecodes.com>). Para asegurar la mayor exactitud posible de las secuencias, los genes fueron secuenciados en ambas direcciones. Los alineamientos de las secuencias se hicieron a ojo, o en los casos que esto no fue posible con la ayuda del programa Malign (Wheeler y Gladstein 1992).

Genes Secuenciados

El problema básico de cualquier análisis molecular es encontrar la partición adecuada que contenga la variabilidad necesaria para abordar la pregunta planteada. Si el análisis involucra especies que han divergido hace mucho tiempo es necesario encontrar una molécula que presente una tasa evolutiva lo suficientemente lenta como para que los cambios acumulados no alcancen el nivel de saturación. Por otro lado cuando se trabaja con divergencias recientes es indispensable encontrar un gen que cambie lo suficientemente rápido para que existan diferencias entre las secuencias a comparar. La complejidad se incrementa ya que las tasas evolutivas de los genes pueden variar no solo dependiendo del gen que se trate, sino también del grupo con el que se trabaje. Aunado a esto no existe la información suficiente que permita saber que gen es adecuado para un grupo determinado de organismo. Por estas razones, para el presente estudio se usó la estrategia de secuenciar dos genes distintos con tasas evolutivas diferentes. Los dos genes usados pertenecen al genoma mitocondrial. El gen del citocromo-b (cit-b) se eligió por presentar en promedio una tasa relativamente rápida pero que es adecuada para análisis a nivel genérico y específico (Edwards et al. 1991). El gen del 12S rRNA (12S) presenta una tasa evolutiva más lenta que la del citocromo b, lo que lo hace un buen candidato para resolver los nodos profundos dentro de este grupo. Además el uso de más de un gen permite evitar que la filogenia reconstruida represente la historia evolutiva del gen en vez de la del grupo taxonómico (Nei & Kumar 2000). Las secuencias completas para todas las especies de Trogoniformes incluidas en el presente estudio se incluyen en el apéndice II, al final del presente reporte.

Análisis Filogenético

El análisis filogenético de las secuencias de ADN se hizo con la ayuda del programa PAUP

(Swofford 2000). Debido al número de tazas que se incluyeron en el estudio, la estrategia de búsqueda fue del tipo heurístico con 1000 réplicas por búsqueda. La transformación de los nucleótidos se consideró no ordenada en todas las búsquedas. Además, para cada búsqueda se considerarán los siguientes parámetros: (a) para la interpretación de los resultados solo se consideraron los árboles más parsimoniosos, (b) cuando el resultado convergió en múltiples árboles igualmente parsimoniosos la señal se condensó usando una solución de consenso estricto, (c) la longitud de las ramas se optimizó utilizando la opción *ACCTRAN* la cual favorece las reversiones y pérdidas sobre los paralelismos y convergencias, esto con el fin de reducir en efecto de atracción por ramas largas, y (d) la robustez de la señal para cada uno de los clados se evaluó utilizando pruebas de bootstrap (500 replicas) e índices de tolerancia de las ramas (Bremcr 1994).

Distancias Genéticas y Análisis de Homogeneidad de Particiones

Se calculó las distancias genéticas corregidas para cada par de *especies* incluidas con el fin de determinar si existen efectos de saturación que pudieran afectar los análisis filogenéticos (Arctander 1991). Las distancias fueron computadas con el programa PAUP* (Swofford 2000) usando el modelo de Kimura de dos parámetros (Kimura 1980). La tasa de cambio entre transversiones y transiciones fue computada de forma empírica a partir de los datos.

Basados en análisis de simulación evolutiva de nucleótidos Bull y colaboradores (1993) determinaron que la reconstrucción filogenética puede ser menos precisa cuando se combinan particiones genéticas que presentan tasas evolutivas significativamente distintas. Para explorar esta posibilidad se usó una prueba de homogeneidad de particiones. Dicha prueba se implementó usando el programa PAUP (Swofford 2000). Para realizar dicha prueba, se generaron mil matrices permutando los caracteres de manera aleatoria. La longitud de los árboles obtenidos a partir de las matrices permutadas se determinó usando búsquedas heurísticas

RESULTADOS

Secuencias de ADN Mitocondrial

La estrategia de secuenciación para los genes empleados se muestra en el Cuadro 1, mientras que en el apéndice II se reportan las secuencias completas para los genes del 12S y cit-b para las especies de Trogoniformes que se distribuyen en México. Las secuencias se presentan en formato GenBank, además, se presenta la secuencia de aminoácidos que son codificados para el caso del gen del cit-b. Las secuencias combinadas para los genes del cit-b y 12S resultaron en un

alineamiento de 2159 pares de bases (bp) [1143 bp para el cit-b y 1016 bp para el 12S]. Las secuencias del cit-b contienen 590 posiciones invariantes (52%), 85 cambios exclusivos de taxones terminales (7% de autapomorfias), y 468 caracteres filogenéticamente informativos (41%). La variabilidad a nivel de las posiciones dentro de un codón presenta un patrón similar al reportarlo para otras moléculas de cit-b (Edwards et al. 1991, Irwin et al. 1991, Graybeal 1993). Las segundas posiciones fueron las menos variables mostrando tan solo 57 substituciones. Las primeras posiciones presentaron un total de 137 cambios, mientras que las más variables fueron las terceras posiciones con un total de 362 cambios. Aun cuando la mayor variación se presenta en terceras posiciones, tan solo algunos de estos cambios son responsables de substitución de aminoácidos. Si traducimos las secuencias, un total de 118 (31 % de los 380 residuos de aminoácidos) son variables para los trogoniformes. Basado en el modelo de la estructura secundaria de la molécula del cit-b (Hotivell 1989), la mayor incidencia de residuos variables se encuentra localizarla en la región transmembranal de la molécula, especialmente en el cuarto, quinto y octavo segmento. Este patrón de reemplazo es similar a lo que se ha observado en la misma molécula para otros organismos (Degli-Esposti et al. 1993).

Las diferencias empíricas observadas entre pares de especies de tragones fluctuaron desde un mínimo de 14 (1.2%) entre *Trogon citreolus* y *T.melanocephalus*, hasta un máximo de 239 (18.21) entre *Pharomachrus mocinno* y *T. personatus* (ver información electrónica anexa DivNucCb.xls). La distancia menor entre especies pertenecientes a géneros distintos fue de 144 pb (12.6%) entre *Euptilotis neoxenus* and *P. pavoninus*.

Mutaciones del tipo de inserciones y deleciones son características de las regiones hipervariables del gen del 12S. Aun cuando la alineación de las secuencias para los trogoniformes tuvo una longitud de 1016 pb, el número de nucleótidos para cada especie varió de 935 pb en *Euptilotis neoxenus* hasta 975 en *Apaloderma narina*. Regiones funcionales (i.e., tallos y asas) en la secuencia: fueron fácilmente identificados siguiendo los modelos para la estructura secundaria de la molécula (Springer & Douzery 1996, Houde et al. 1997, Mindell et al. 1997). La matriz alineada contiene 590 posiciones invariantes (58%), 72 autapomorfias (7%), y 354 sitios filogenéticamente informativos (35%). Los tallos de la molécula son más conservados que las asas. Dentro de los tallos se identificaron 315 (53%) de los caracteres invariantes, 20 de las autapomorfias (28%), y 134 de los caracteres filogenéticamente informativos (30%). Las principales regiones hipervariables encontradas en las secuencias de los Trogoniformes se concentraron principalmente en sitios donde se hipotetiza se encuentran las asas.

La variación entre las secuencias del gen del 12S para los Trogoniformes varió desde las 16 pb (1.6%) cambios entre *Pharomachrus mocinno* y *P. pavoninrrs*, hasta 150 cambios (14.8(7c) entre *Apaloderma vitraturn* y *Trogon melanocephalus* (ver información electrónica anexa DivNuc12.xls). La distancia promedio entre géneros es de 130 pb lo que equivale al 12.8% de la secuencia total del gen del 12S.

La variación entre la proporción de transiciones y transversiones debido a las presiones de selección en el genoma mitocondrial produce un desvío en el porcentaje de nucleótidos, esto es especialmente en posiciones silenciosas dentro del cit-b (Brown 1985, Sueoka 1988). La desviación en la composición de nucleótidos (C) en el cit-b reportada para otras aves (Nunn & Cracraft 1996, Nunn et al. 1996) y mamíferos (Irwin et al. 1991) es casi idéntica a la registrada en el presente análisis (ver información electrónica anexa NucComCb.xls). Debido a que las sustituciones en las terceras posiciones del colón tienden a ser silenciosas, y por lo tanto más variables, el desvío en esta posición fue mayor ($C=0.414$). Las terceras posiciones son ricas en citosina (42.4%), seguida por adenina (38.6%), mucho menos timina (15.4%), y muy pobres en guanina (3.5%). Las segundas posiciones presentan una desviación media ($C=0.22$), siendo ricas en timina (39.7%) y pobres en guanina (12.8%), con porcentajes intermedios de la timina (26.7%) y adenina (20.8%). Las primeras posiciones son las menos desviadas del equilibrio ($C=0.073$), siendo ligeramente ricas en citosina (28.5%) y bajas en guanina (20.8%), y por lo tanto intermedias en adenina y en timina (27% y 23.7% respectivamente).

De las dos regiones estructurales de la molécula del 12S, son las asas las que presentan el mayor desvío en la composición de nucleótidos ($C=0.191$), este desvío es principalmente el resultado de la abundancia de adenina (39.2%), lo cual se explica por la hipótesis de que la baja polaridad en este nucleótido puede favorecer las interacciones hidrofóbicas con las proteínas (Gutell et al. 1985). Después de la adenina, la citosina es el nucleótido más abundante (25.1%), en tercer lugar está la timina (20.1%), y finalmente guanina (15.6%). La composición de nucleótidos en los tallos está casi en equilibrio ($C=0.044$), siendo ligeramente ricos en citosina (27%), y escasos en adenina (23%), las proporciones intermedias las ocupan la guanina (26.7%) y la timina (23.7%). La proporción en la composición de nucleótidos en el gen 12S de los Trogoniformes es similar a lo que ha sido reportado para otros vertebrados, en especial para los mamíferos (Springer et al. 1995, Springer & Douzery 1996).

Comúnmente se han reportado la existencia de copias translocadas de genes mitocondriales en el DNA nuclear (i.e., pseudogenes) (Quina 1992, Smith et al. 1992, Komegay et al. 1993). En los

resultados se destacan cinco hechos que me permiten asegurar que las secuencias comparadas en este estudio corresponden a genes homólogos de origen mitocondrial y no pseudogenes. (1) El marco de lectura en la secuencia del cit-b es continuo y no presenta la codones sin sentido o de terminación es sitios intermedios. (2) Los genes fueron aislados inicialmente como un fragmento único incluyendo regiones flanqueantes de los genes contiguos. (3) Los 381 residuos *de* aminoácidos del cit-b fueron fácilmente traducidos usando el código genético mitocondrial de los vertebrados. La estructura secundaria del gen del 128 es consistente con lo que se ha propuesto para otros vertebrados (Springer and Douzery 1996, Houde et al. 1997, Mindell et al. 1997). y (5) La desviación en la composición d nucleótidos para los dos genes secuenciados es muy similar para lo que ha sido reportado en otras aves (Moore & DeFilippis 1997).

Análisis Filogenético

La prueba de homogeneidad de particiones sugiere que las matrices individuales para el gen del citb y para el gen del 12S presentan una señal filogenética similar ($p = 0.034$) y por lo tanto realizar un análisis combinando dichas particiones es adecuado. Para explorar si los genes presentan saturación y por lo tanto fuera necesario hacer algún tipo de corrección se graficaron las distancias genéticas empíricas contra las distancias corregidas usando el modelo de Kimura. Este análisis mostró que la acumulación de cambios a lo largo del tiempo presenta una trayectoria lineal en el gen del 1.2S. Sin embargo para el gen del cit-b existe evidencia de que el gen o alguna de sus particiones pueden presentar saturación. En la Figura 1 se presentan las curvas acumulativas de cambios en cada una de las posiciones del codón. Las segundas posiciones presentan la tasa más baja en acumulación de cambios (pendiente= 0.77) y claramente una acumulación lineal. La tasa de reemplazo en primeras posiciones es más del doble (pendiente= 1.81) que para las segundas posiciones, sin embargo su acumulación sigue siendo lineal. La acumulación de cambios en terceras posiciones se incrementa rápidamente y al sobrepasar el 13% de diferencias la pendiente de la curva se reduce indicando un claro efecto de saturación en estas posiciones. Por este motivo es preciso realizar una ligera corrección a la señal contenida en terceras posiciones. El cambio aplicado es bajar a un medio el efecto que presentan las terceras posiciones del cit-b con respecto al resto de las posiciones informativas de las secuencias.

El análisis filogenético global, el cual combina las secuencias tanto del gen del cit-b como las del gen del 12S para los Trogoniformes, resulta en un cladograma de 3248 pasos, con Índice de Consistencia = 0.437, y un Índice de Retención = 0.567 (Fig. 2). En este árbol todas los géneros de Trogoniformes son monofiléticos. En la base del árbol se encuentran los trogones africanos. Las especies del Nuevo Mundo forman un grupo monofilético y son el grupo hermano de los

trogones asiáticos. Dentro de los trogones americanos tenemos en la base al trogon de Cuba (*Priotelus temnurus*). El trogon orejón (*Euptilotis neoxenus*) es el grupo hermano de los quetzales y junto con ellos forma un grupo monofilético que es el más cercano evolutivamente al género *Trogon*. El presente resultado sugiere que el quetzal mexicano (*P. mocinno*) es el linaje más apical dentro del clado de los quetzales. El género *Trogon* se puede dividir en dos subclados uno que por comodidad denominaré el "Subclado Elegans" que está compuesto por *T. mexicanus*, *T. collaris*, *T. personatus*, *T. rufus*, y *T. elegans*. El "Subclado Violaceus" está compuesto por *T. curucui*, *T. citreolus*, *T. viridis*, *T. comptus*, *T. melanurus*, *T. massena*, *T. melanocephalus*, y *T. violaceus*. El subclado "elegans" incluye principalmente a los trogones de pecho rojo, mientras que el subclado "violaceus" está conformado principalmente por las especies de trogones de pecho amarillo y cabeza violeta. Esta hipótesis filogenética es bastante robusta y se mantiene estable aun cuando las especies incluidas en el grupo externo sean cambiadas. Como lo presentaré más adelante, esta filogenia concuerda en gran medida con características morfológicas como lo son el patrón de coloración o las tendencias en la evolución de ornamentaciones, especialmente dentro del grupo de los quetzales. Un resultado interesante es el hecho que la elongación de las plumas cobertoras de la cola es una condición reciente en la evolución de los quetzales, muy probablemente influenciado por selección sexual. Esta filogenia molecular también es corroborada en gran medida por las evidencias fósiles encontradas (Mayr 1999), así como por datos conductuales (Brightsmith 1999), y fisiológicos (Stanley & Harrison 1999).

DISCUSIÓN

Biogeografía de Trogoniformes

La distribución pantropical de los Trogoniformes ha sido un problema de interés en ornitología. La distribución actual de estas aves coincide con la distribución de muchas otras familias de aves (e.g. Anhingidae, Capitonidae, Heliomithidae, Jacanidae, Psittacidae), y con la de algunos otros vertebrados (e.g. cocodrilos, cecílidos). Los patrones de congruencia geográfica se puede explicar por medio de dos mecanismos generales: a) especiación de taxa ampliamente distribuidos después de un evento de vicarianza, o b) por múltiples eventos de dispersión. Aún cuando la vicarianza requiere el menor número de explicaciones *ad hoc* para justificar el patrón de distribución observado, esta depende de la congruencia de múltiples filogenias derivadas de grupos independientes. Las cuales hasta el momento no están disponibles, sin embargo existen métodos alternativos que nos permiten abordar el problema.

La hipótesis más comúnmente aceptada menciona al Nuevo mundo como el centro de origen de los Trogoniformes (Swainson 1837, Ridgway 1911). Esta idea esta basada principalmente en el hecho de que la mayor diversidad del grupo se encuentra en América (64% de las especies actuales). Cain (1971), sin embargo, ha argumentado que sitios de alta riqueza específica no necesariamente deberían ser el centro de origen, sino más bien un lugar secundario de radiación filética. La biogeografía filogenética tradicional asume que el área de origen debería ser considerada como la suma de las áreas actuales de distribución. Sin embargo, esto implicaría que la distribución del ancestro siempre ha sido más amplia que la de cualquiera de sus descendiente eliminando las posibilidades de dispersión (Bremer 1992). Recientemente Bremer (1992, 1995) propuso un método para estimar la probabilidad relativa que distintas áreas de la distribución de un linaje formen parte del área ancestral del grupo.

Si aplicamos la metodología propuesta por Bremer a la filogenia obtenida en el presenta análisis resulta que África obtiene la probabilidad mayor ($aa = 1.0$) de formar parte del área ancestral para los Trogoniformes. En cuanto a Asia y el Nuevo Mundo, cada una de estas áreas solo tiene la mitad de la probabilidad ($aa = 0.5$) que con respecto a África. Por lo tanto un origen neotropical para el grupo no es apoyada por este método. Métodos alternativos como el propuesto por Ronquist (1994, 1995) y Brundin (1981, 1988) convergen también en África como el área ancestral para los Trogoniformes. Por lo tanto América representa un sitio secundario de radiación.

Una fuente alternativa de datos que señala un origen paleártico de los trogones son los datos del registro fósil. Los fósiles más antiguos para este grupo provienen de depósitos del Terciario de Europa (Olson 1985). Los primeros registros de trogones se han encontrado en Suiza y pertenecen a la especie denominada *Protornis glarniensis*. Esta especie presenta claramente la condición heterodáctila característica de los Trogoniformes (Olson 1976). Otro fósil conocido como *Paratrogon gallicus*, fue descubierto en depósitos del Mioceno inferior en Langy, Francia (Olson 1976). Recientemente Mayr (1999) ha descrito a *Primotrogon wintersteini* encontrado en depósitos del Oligoceno medio en Cereste Francia el cual tiene una edad aproximada de 33 millones de años. Por otro lado los fósiles más antiguos descubiertos en América pertenecen a especies recientes (*Priotelus roseigaster* y *Trogon surrucura*), todos provenientes de capas del Pleistoceno con una antigüedad máxima de un millón de años

Ahora bien, considerando que África es uno de los continentes más grandes y que los trogones llevan la mayor parte de su historia evolutiva en este sitio, como podemos explicar que tan solo el

7% de la especies descritas para el grupo de encuentren aquí. Aparentemente la diversidad general de África es mucho menor que la de otros sitios tropicales (Keast 1973). Determinar todos los factores que determinan la diversidad biológica es extremadamente difícil. Existen gran variedad de componentes físicos, históricos, y biológicos que han sido correlacionados con casi cualquier patrón de biodiversidad (Huston 1994). El principio de exclusión competitiva puede ser usado en este caso para explicar el patrón de diversidad observado en los Trogoniformes. Todas las especies de tragones distribuidas en África y Asia, son completamente insectívoras, mientras que las especies americanas por lo general tienen hábitos alimenticios mixtos. Probablemente los nichos frugívoros en *el Viejo* Mundo ya estaban ocupados por grupos mas agresivos como Bucerotidae, Musophagidae, Pynonotidae y/o Irenidae, los cuales no tienen representantes en el Neotrópico. Por lo tanto, la llegada a un habitat donde las presiones competitivas eran reducidas pudo haber sido un factor facilitador para permitir esta radiación explosiva de los Trogoniformes en América.

Otros factores asociados al aumento de la diversidad son la complejidad y heterogeneidad ambiental de un hábitat (Schluter 1988, Huston 1994). Durante los períodos glaciales los bosques amazónicos y del SE de Asia se vieron reducidos a refugios (Roberts 1984), posiblemente conformando sitios favorables que a través del aislamiento de las poblaciones facilitarían procesos de especiación alopátrica. Comparado con el SE asiático y con el Neotrópico, la historia tectónica de África es muy simple. Durante los últimos 40 millones de años la posición de África prácticamente no ha cambiado y no existen evidencias que sugieran la aparición de cadenas montañosas u otras alteraciones orogénicas (Potts & Behrensmeyer 1992). Por estos motivos, la mayor diversidad en Asia y la megadiversidad en América puede ser directamente la consecuencia de la sobre actividad tectónica durante el Cenozoico, consecuencia de la colisión de placas continentales.

En la actualidad desconocemos fechas absolutas sobre la diversificación de los Trogoniformes. Sin embargo, el problema de determinar el tiempo de origen de un grupo puede ser abordado por medio de las técnicas moleculares empleada-s en este estudio. Algunos autores han sugerido que tiempos aproximados pueden ser estimados basados en las diferencias encontradas al comparar los genomas de pares de especies (Brown et al. 1982, DeSalle et al. 1987, Miyamoto & Boyle 1989, Irwin et al. 1991). Para algunos grupos de aves se ha encontrado que el genoma mitocondrial presenta una tasa de cambio de 1.58% a 2.86% por cada millón de años para la distancia corregida en terceras posiciones del cit-b (Nunn et al. 1996). Basándome en esta estimación, y asumiendo que una vez corregidas las distancias en las terceras posiciones mantienen una acumulación lineal

durante el tiempo, es posible inferir rangos de divergencia para los distintos grupos de Trogoniformes. Un valor promedio de 51.5^{17} : de divergencia nos *sugiere* que la invasión del Nuevo Mundo por una especie ancestral ocurrió entre 18 y 35.6 millones de años. El origen de los quetzales y por lo tanto su separación con respecto al género Trogon se estima ocurrió hace cerca de 15 millones de años. La invasión de México por el grupo de los trogones ha sido un evento reciente, y ha ocurrido múltiples veces. Al menos podemos inferir que los trogones han entrado independientemente seis veces a nuestro país (Fig. 3). Des veces en el grupo de los quetzales y cuatro por parte de miembros del género Trogon. En base al análisis biogeográfico podemos concluir que el "subclado elegans" ha evolucionado en México, y dos linajes de este (i.e. *T. rufas*, *T. personatus*) han regresado posteriormente a Sudamérica. Dentro del "subclado violaceus" se registran tres colonizaciones independientes de México, todas dentro de los últimos 5 millones de años. Si comparamos los tiempos de divergencia de los Trogoniformes con los de otros grupos de aves como los córvidos (Helm-Bychowski & Cracraft 1993), nos damos cuenta que los trogones representan un linaje relativamente viejo dentro de las aves y que su radiación evolutiva se ha dado de una manera rápida especialmente en el Neotrópico.

Una Clasificación Filogenética para los Trogoniformes

Solamente las clasificaciones que reflejen la historia evolutiva de los organismos son útiles para abordar estudios de tipo comparado, o de manejo de recursos. Basado en la hipótesis filogenética recobrada con el presente estudio se propone la siguiente clasificación para el Orden trogoniformes:

ORDEN Trogoniformes

FAMILIA Trogonidae

Subfamilia Apaloderminae GÉNERO *Apaloderma*

Subfamilia Trogoninae

Tribu Harpactini

GÉNERO *Harpactes*

Tribu Trogonini

GÉNERO *Priotelus*

GENERO *Tragón*

GÉNERO *Pharomachrus*

Basándome en las distancias genéticas obtenidas tanto para el cit-b y el 125, propongo que el enero Euptilotis debe desaparecer, y su única especie debe pasar a formar parte del género

Pharomachrus. La variabilidad observada entre *Euptilotis* y los otros quetzales es en promedio del 14.9% en el cit-b y del 8% en el 12S. Ambos valores se encuentran en el rango o *por debajo del* promedio registrado para las especies dentro de los otros géneros de Trogoniformes (e.g., 15 % en cit-b y 7.9% en 12S para las *especies de Harpactes*).

Cuadro 1. Lista de especies de Trogoniformes secuenciados durante este trabajo. Cit-b = fragmento perteneciente al citocromo b; 12S = Fragmentos pertenecientes al gen 12S.

Taxa	L14678-H15149	L15087-H15563	L15507-H15915	L1244-H1825	L1729-H2251
<i>Harpactes oreskios</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Harpactes ardens</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Harpactes diardii</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Priotelus temnurus</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Apaloderma narina</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Apaloderma vittatum</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Pharomachus antisianus</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Pharomachus auriceps</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Pharomachus pavoninus</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Pharomachus mocinno*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Euptilotis neoxenus*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon curucui</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon violaceus*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon viridis</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon comptus</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon melanurus</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon elegans*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon rufus</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon collaris*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon mexicanus*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon personatus</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon massena*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon melanocephalus*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S
<i>Trogon citreolus*</i>	Cit-b	Cit-b	Cit-b	12S	12S

*.- Especies distribuidas en México.

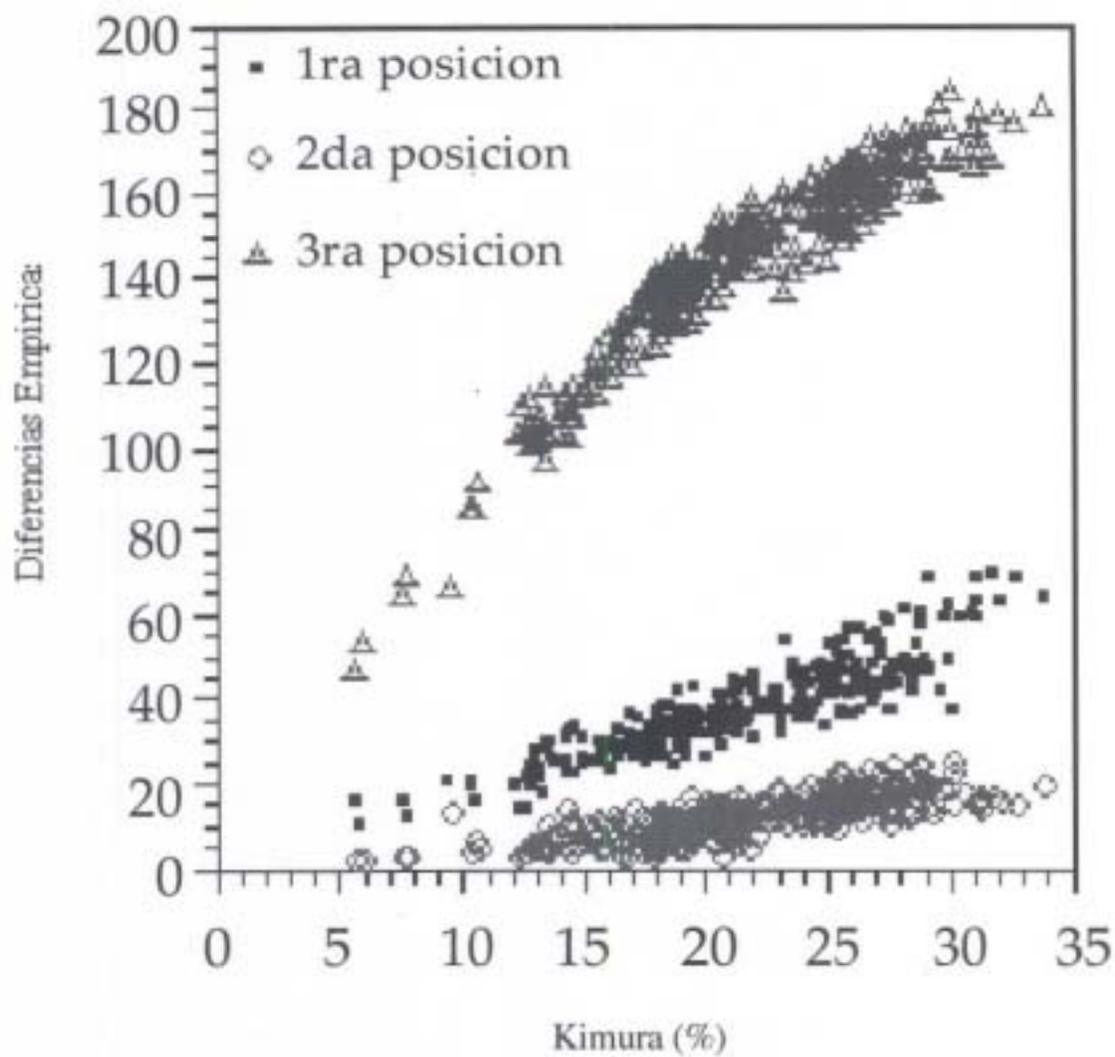


Fig. 1. Curvas de saturación para las diversas posiciones en el codon del gen del citocromo b de los Trogoniformes

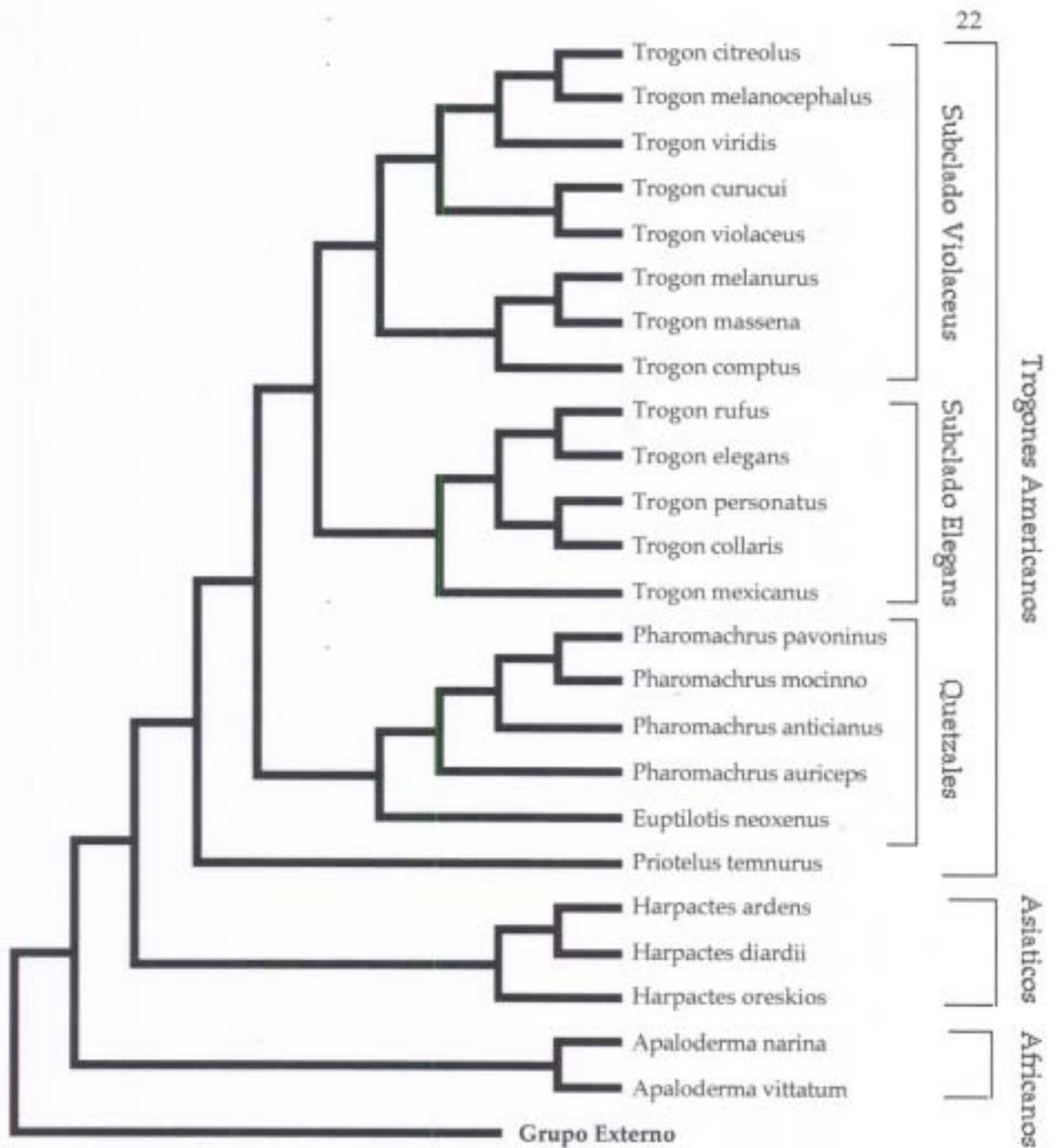


Fig. 2. Filogenia molecular del orden Trogoniformes. Las aves raton (Coliiformes) fueron usados como grupo externo para enraizar y polarizar el arbol.

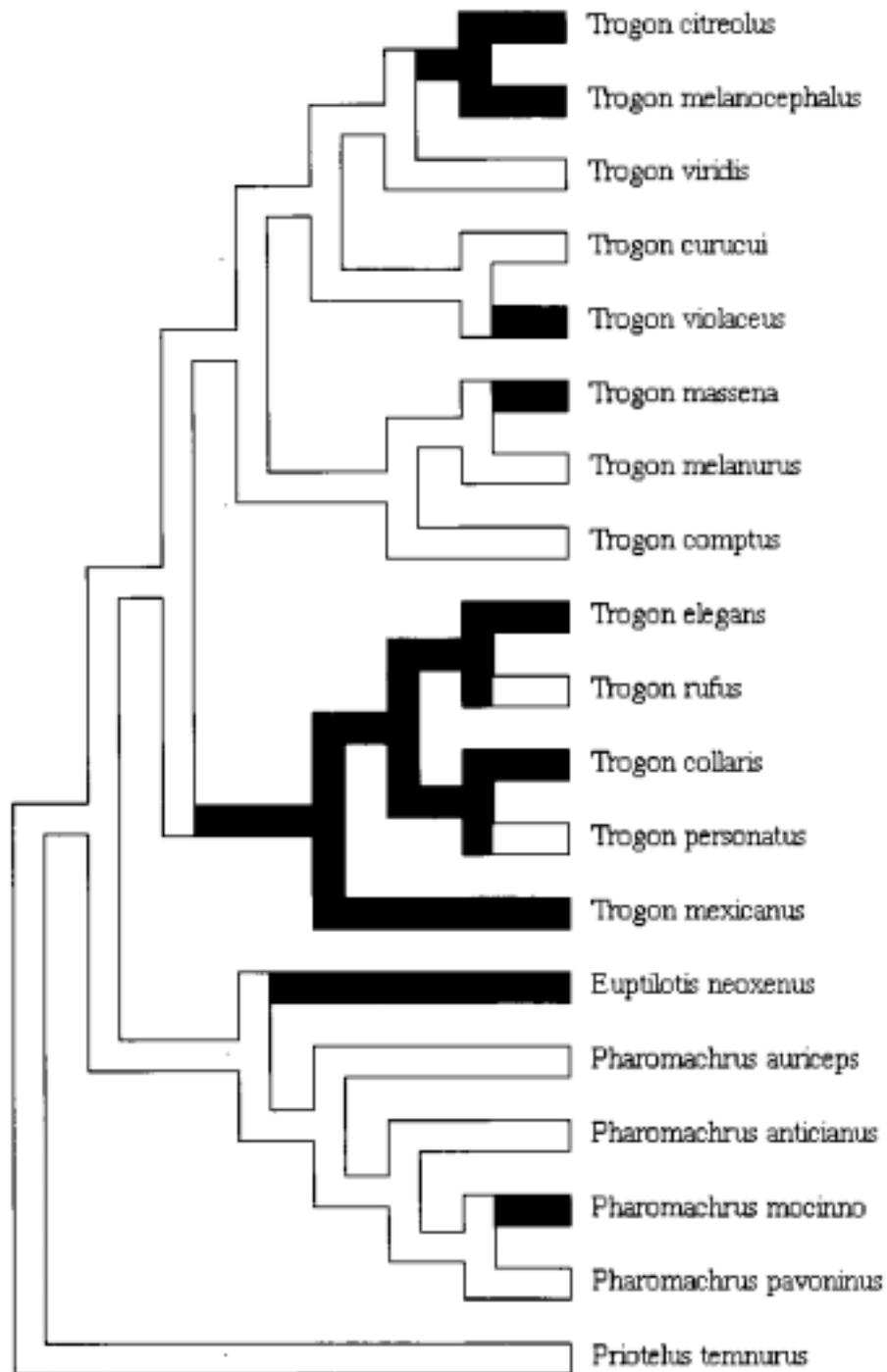


Fig. 3. Escenario biogeográfico sobre la invasión de Trogoniformes a México. Las líneas negras representan entradas independientes.

CAPITULO II

EVOLUCIÓN DE LAS ESTRUCTURAS IRIDISCENTES EN LAS PLUMAS DE LOS TROGONIFORMES

Junto con los despliegues corporales y acústicos, la coloración en animales forma parte de la comunicación inter e intraespecífica. En las aves, la coloración no solo tiene un impacto en el comportamiento, también brinda a su portador ventajas como protección mecánica y física. También se ha ligado a la coloración con la adaptación de los animales a su ambiente. Las coloraciones crípticas brindan protección a los organismos al hacerlos inconspicuos dentro de su entorno. Jameson (1981) *presenta ejemplos* de reptiles, aves y mamíferos habitantes de desiertos, cuyas coloraciones pálidas les confieren algún tipo de ventaja, tomando en cuenta que existe muy poca vegetación que pudiera servirles como protección. En cambio, una coloración llamativa puede indicar que el portador es peligroso o poco palatable (coloración aposemática) o simplemente puede servir como un patrón de reconocimiento dentro del grupo (coloración fanérica). Las aves han desarrollado tanto coloraciones crípticas como fanéricas. En aves terrestres como Tinámidos y Galliformes, el color predominante suele ser pardo, mientras que en aves arborícolas, la coloración verde y sin patrones representa probablemente una función similar. Isley (En: Welty 1975) presentó evidencias del valor adaptativo que tiene la coloración. Este investigador experimentó ofreciéndoles a grupos de aves, saltamontes con coloraciones tanto crípticas como contrastantes. Sus resultados mostraron que el 66% de aquellos saltamontes con coloración críptica habían sobrevivido, contra tan sólo un 16 % de los contrastantes. De acuerdo con estos resultados y a otros similares, no es difícil pensar que la coloración críptica juegue el mismo papel protector dentro de todo el grupo de los vertebrados.

La coloración fanérica se caracteriza por presentar colores brillantes con fuertes contrastes y patrones llamativos. Los organismos con este tipo de coloración se caracterizan por realizar despliegues que tienen por objeto evidenciar estos caracteres. Este tipo de coloración además de servir como distintivo, se puede usar como señal de peligro o amenaza, evitando de esta manera combates reales (Welty 1975). La coloración más brillante en uno de los sexos, está usualmente asociada con el cortejo (Jameson 1981). Nekipelov (En: Welty 1975) presentó evidencias de que la coloración nupcial en machos es resultado de la selección sexual. En las aves, el dimorfismo sexual expresado en el color tiene relación con la atracción de la pareja, el cortejo, la estimulación y la sincronización del período receptivo.

El color que vemos en los animales depende de la longitud de onda que es reflejada por las estructuras incluidas en el tegumento. Estas pueden ser pigmentos (zocromos) o arreglos ultraestructurales de proteínas filamentosas (esquemocromos). En muchas ocasiones el color resultará de la combinación de ambos (Jameson 1.981). El color reflejado por un zocromo depende de la parte de la longitud de onda visible que absorbe, de acuerdo a su estructura molecular. Los zocromos se encuentran dentro de células especializadas, que pueden ser cromatóforos, las cuales tienen la capacidad de expandirse y contraerse, intensificando o minimizando el color respectivamente, o de cromatocitos, que no suelen sufrir modificaciones (Welty 1975). Hay dos tipos principales de zocromos: melaninas y lipocromos. Las melaninas se encuentran a manera de partículas microscópicas claramente delimitadas de aproximadamente 1 μ m de diámetro, y hay dos formas básicas: eumelaninas y feomelaninas. Las eumelaninas tienen forma cilíndrica, y son las responsables de los colores negros y grises. Las feomelaninas tienen forma de gránulos y producen colores cafés, marrones y amarillos. La cantidad y el tipo de melaninas producidas en parte dependerá de los aminoácidos incluidos en la dieta, especialmente tirosina, puesto que al parecer, las melaninas se producen por la oxidación de tirosina mediante la enzima tirosinasa. Los lipocromos producen colores amarillos, naranjas y rojos. Se encuentran generalmente difusos en partículas de grasa. Los tipos más comunes son carotenos y xantofilas, aunque existen otros como la turacina (roja), la turacoverdina (verde), la ptilopina (azul) y la rodoxantina (rojo profundo).

Como ya lo mencioné, los colores estructurales son el resultado del arreglo espacial de algunas proteínas, sin embargo, no todos los colores estructurales son iridiscentes. La iridiscencia sólo se origina cuando los cambios en la orientación del observador alteran la sumatoria de las distancias recorridas por los rayos de luz reflejados del interior de las bárbulas (Prum et al. 1994). En general, se proponen tres fenómenos que pueden producir colores estructurales: difracción, dispersión e interferencia. El término interferencia se refiere a cualquier situación en la que dos o más ondas se superponen en el espacio. Prum et al. (1.998) realizaron un estudio, en el que demuestran que el color en algunas aves es resultado de la interferencia constructiva entre las ondas de luz dispersadas coherentemente por el arreglo nanoestructural de queratina-melanina-aire en la matriz de las bárbulas. La similitud que hay entre las ultraestructuras en las plumas de las aves que también presentan coloración estructural, sugieren que la interferencia constructiva es, probablemente, el mecanismo responsable de los demás colores estructurales en plumas como *verdes*, *violetas* e *incluso* ultravioletas (Prum et al 1998).

Diversos tipos de ultraestructuras dentro de las bárbulas de las plumas son responsables de la

producción de color y la iridiscencia en las mismas. Monge-Nájera y Hernández (1994) utilizaron plumas del quetzal centroamericano (*Pharomachus mocinno*) en un estudio de microscopía electrónica de barrido (MEB). Ellos proponen que aún cuando el color estructural se origina en el interior de las bárbulas, la morfología externa de las mismas están también involucrada en el proceso. En su parecer, el color estaría correlacionado, además de la forma y organización del complejo melanina-queratina-aire, con la forma transversal, grosor, modo de inserción, largo y grosor de la corteza de la bárbula. Como lo he presentado, los colores estructurales y la iridiscencia son características ampliamente distribuidas dentro de las aves. Colibríes, estorninos, galliformes y tragones son tan sólo algunos de los grupos en donde este tipo de coloración puede ser observada. Sin embargo, a diferencia de otras aves, en los Trogoniformes se han descrito diferentes patrones de complejidad estructural y de distribución espacial para las ultraestructuras responsables de la iridiscencia (Durrer y Villiger 1966).

Debido a que las ultraestructuras (de aquí en adelante plaquetas) productoras de iridiscencia no son observables con microscopía de luz, Durrer y Villiger (1966) realizaron un primer estudio de microscopía electrónica de transmisión (MET) para el orden Trogoniformes. En dicho estudio fueron incluidas siete especies (i.e., *Pharomachus mocinno*, *P. pavoninus*, *Trogon rufus*, *T. violaceus*, *Priotelus temnurus*, *Apaloderma marina* y *Harpactes reinwardtii*). Sus resultados mostraron las siguientes variantes con respecto a las *plaquetas*: (a) *Pharomachus* muestra complejas "vainas" de melanina dispuestas en capas y a distancias regulares, (b) *Tragan* presenta finos tubos densamente agregados, (c) *Priotelus* tiene tubos de diámetro mayor a los de *Trogon*, estibados en pocas capas y a distancias regulares, (d) *Apaloderma* presenta los tubos de melanina dispuestos en cuatro capas y (e) *Harpactes* posee un arreglo intermedio entre la morfología descrita para *Apaloderma* y *Tragan*. Sin embargo, debido a la escasa información que se tenía para el grupo, no fue posible inferir como fue que ocurrió el cambio de las plaquetas dentro del orden.

Se recurre a escenarios evolutivos para proponer explicaciones a fenómenos biológicos. Una vez que se han especificado los estados ancestrales, una aproximación cladística indicará que transiciones son posibles. La polarización de los estados de carácter (Le., inferencia sobre la tendencia evolutiva en el cambio del mismo), se puede determinar mapeando la aparición de cada uno de ellos sobre el cladograma. El patrón de cambio predicho por un modelo, se puede corroborar mediante la presencia o ausencia de las combinaciones de caracteres que corresponden a cada uno de dichos estados (Carpenter 1989). Por lo tanto, utilizar reconstrucciones filogenéticas es una de las formas más recomendables para corroborar los modelos o escenarios propuestos.

Por lo anterior los objetivos particulares de *este capítulo* pretenden: a) Describir la microanatomía de las ultraestructuras productoras de la iridiscencia para el orden Trogoniformes. b) Inferir un escenario evolutivo para el cambio complejidad de las ultraestructuras productoras de iridiscencia del orden Trogoniformes.

METODOLOGÍA

Ultraestructuras Productoras de Iridiscencia

Para este análisis se emplearon todas las especies secuenciadas en el capítulo uno. Las plumas se obtuvieron de la Colección Ornitológica del American Museum of Natural History de Nueva York (AMNH). Todas las plumas fueron tomadas de la región lumbar (rabadilla) de las pieles de la mencionada colección.

Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

Se utilizó un protocolo modificado para plumas a partir del propuesto por Bozzola & Russell (1992), comprendiendo las siguientes fases: a) deshidratación, b) preinclusión, e) inclusión en resina, d) rebajamiento del bloque, e) obtención de cortes semifinos, f) obtención de cortes ultrafinos, g) contraste de los cortes para su posterior observación en el MET.

Se obtuvieron fragmentos de alrededor de 1 mm de longitud a partir de las barbas de las plumas utilizadas. Dichas barbas fueron seleccionadas de regiones con iridiscencia conspicua. Antes de deshidratarlas, fueron lavadas utilizando detergente común y agua corriente para quitarles la grasa, ya que su presencia dificultaba la acción de los alcoholes. Para la deshidratación de las muestras, se usó gradientes crecientes de etanol (J.T. Baker) a las siguientes concentraciones: 70%, 80%, 96%. 100%, 100% y 100%. Cada muestra permaneció una hora en cada concentración. La deshidratación tiene como objetivo reemplazar gradualmente el agua que se encuentre en la muestra por el alcohol. Después se realizaron dos cambios de óxido de propileno (Ted Pella) de 15 y 30 minutos cada uno. Éste desplaza al etanol, actuando como un disolvente intermediario, altamente miscible con la resina. Durante la preinclusión, el óxido de propileno es gradualmente reemplazado por monómeros plásticos líquidos. Se usó una mezcla de transición compuesta de óxido de propileno y resina, en la que aumentaba la proporción de ésta última se de manera gradual, hasta incluirlas en resina pura. Las mezclas resina-óxido de propileno usadas fueron las siguientes: 1:2 dos horas a 60 °C, 1:1 24 horas a temperatura ambiente y 2:1 24 horas a temperatura ambiente. Para su inclusión, se transfirieron las muestras a moldes (Flat Embedding Molds, Ted Pella)

debidamente etiquetados y con resina pura, dejándolos 24 horas en el horno a 60 °C. De esta manera, los componentes de la resina se polimerizaban hasta formar una matriz sólida, infiltrando al mismo tiempo la muestra en su totalidad. Las barbas se colocaban en los bloques con resina de manera tal que las bárbulas quedaran paralelas a la cuchilla de cristal del ultramicrotomo (Rcichert-Jung, Ultracut E) al momento de *efectuar los cortes*. La resina usada fue Araldita 6005 (Araldite 6005 Kit, Spi-Chem) debido a que presenta una polimerización uniforme, encoje muy poco durante el proceso y los cortes de ella obtenidos muestran buena estabilidad bajo el haz de electrones. Los reactivos y sus respectivas cantidades usadas para obtener la Araldita fueron los siguientes: Araldita 6005, 4.5 ml; DDSA (anhídrido dodecenyl succínico), 3.5 ml; DMP 30 (2,4,6-tridimetilamino metil fenol), 0.146 ml. El rebajar o darle forma al bloque consiste en formar al rededor de la muestra una pequeña cara, con el objeto de minimizar el estrés impuesto al filo de la cuchilla del ultramicrotomo al momento de realizar los cortes. Para esto, se quita el exceso de resina, exponiendo así la muestra a la superficie. Esto da al bloque la forma de una pirámide truncada, forma ésta que brinda buen soporte a la pequeña área expuesta.

Los cortes semifinos, de alrededor de 1500 Å, se tiñeron con Paragón [azul de toluidina (Sigma) al 0.1 % diluido en agua bidestilada y fucsina ácida (Sigma) al 0.1% diluida en alcohol al 15% en razón de 3:11 y tetraborato de sodio (Merck) al 1% diluido en agua bidestilada, observándolos al microscopio de luz para elegir la zona de la muestra de la cual obtendría los cortes ultrafinos. Hecho esto, se afina la cara, dejando únicamente el área deseada. Los cortes ultrafinos, de al rededor de 600 Å, se levantaron indistintamente sobre rejillas de níquel (Electron Microscopy Sciences) y de cobre (Spi-Chem), ambas con un diámetro de 3 mm y 300 mesh. Se recubrieron *las rejillas con Formvar 15195E* [formato de polivinilo (Sigma)], para proveer a los cortes de un soporte aún mayor. Antes de observarlos al MET, se contrastaron utilizando acetato de uranilo (Spi-Chem) en solución alcohólica al 5% y citrato de plomo (Spi-Chem) en solución acuosa al 0.4% durante 10 y 5 min. respectivamente.

Análisis Ultraestructural

El análisis ultraestructural se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 100 CXII. Se seleccionó un corte por especie, el cual se fotografió dos veces, una a ocho mil aumentos, con el propósito de estandarizar al momento de las mediciones, y otro a un aumento tal que fuera visible la mayor parte de la estructura, con el propósito de describirla. La exposición fue con una abertura de 6.5 y una velocidad de 5 segundos, sobre película de alto contraste (Kodak Kodalith Ortho tipo 3). Para el revelado de las placas se siguió este proceso: tres minutos de *revelado* en Kodalith (Kodak), veinte segundos de revelado en D 19 1:1 (Kodak), cuarenta

segundos de enjuague con agitación, dos minutos de fijación (fijador rápido Kodak) y cinco minutos de lavado final.

Las imágenes se digitalizaron para su análisis utilizando un scanner ScanJet 4c/T (Hewlett Packard). Cada foto se capturó con una definición de 600 ppi. Las mediciones de las plaquetas se hicieron con el software Image Pro Plus, versión 3.0 (Media Cybernetics 1993). La pantalla se calibró para el número de aumentos utilizados. Dicha calibración fue de 188 pixels/micrómetro tanto para el eje X como para el Y. Las medidas tomadas por cada foto fueron área de la plaqueta (n=50), área de la luz de la plaqueta (n=50) y diámetro de la plaqueta (n=50). El programa determina el área del polígono definido mediante el cálculo del número de pixels comprendidos por la figura, mientras que la longitud (diámetro) será la medida de una línea recta. Las medidas vienen dadas en términos de la unidad espacial elegida durante la calibración [i.e., micrómetros en este caso (Image Pro Plus Reference Manual)]. Con la diferencia entre el área de la plaqueta y el área de la luz de la plaqueta, se obtuvo el área ocupada por la melanina y finalmente se calculó la razón entre ésta y el área del tubo expresada en forma de porcentaje. Con el objeto de comparar el número de plaquetas entre las especies, se contó el número de éstas en las partes interna y externa de la corteza, así como en la médula de la bábula, en seis cuadrantes de 1cm² cada uno. Debido a que el área utilizable de la foto a 8(x)0 aumentos es de 8.75 M² el área de cada cuadrante corresponde a 1.25 ;². El número de plaquetas reportado corresponde al promedio de las seis mediciones.

RESULTADOS

Microanatomía de las Ultraestructuras

Como en el caso de otras aves, las ultraestructuras productoras de iridiscencia en los Trogones son plaquetas de queratina con melanina en la periferia y un centro que contiene aire, acomodadas dentro de las bábulas de la pluma (Fig. 4). Debido a la gran variabilidad que presentan los microtubos dentro de las bábulas, en el Cuadro 2 se presenta de manera comparativa la descripción morfométrica de las ultraestructuras responsables de la producción de colores iridiscentes en los trogones.

Reconstrucción del Escenario Evolutivo

Las ultraestructuras productoras de iridiscencia son una característica compartida por todos los géneros de Trogoniformes excepto por al menos algunas especies del género asiático *Harpactes*.

Al mapear las distintas medidas que se obtuvieron del estudio morfológico de las plumas sobre la filogenia presentada en el Capítulo 1, se encuentran ciertas tendencias conforme se asciende en la escala filogenética. A continuación presento las tendencias generales inferidas a partir del escenario evolutivo:

a) Existe una disminución del área y diámetro de las plaquetas. Los promedios del *área* y *el* diámetro de las plaquetas en *Apaloderma*, género más basal de la filogenia, son respectivamente de 0.160 p² y 0.598 p. Los mismos promedios para los demás géneros son de 0,096P² y 0,41.2Y para *Priotelus*, 0.111 p² y 0.525 yr para *Euptilotis*, 0.0988 p² y 0.439 p para *Pharomachrus* y 0.056 p² y (1.340 p para *Trogon*.

b) Existe una disminución del área de la luz de la plaqueta. En *Apaloderma*, *el* promedio de ésta es de 0.026 p², mientras que en *Priotelus* es de 0.018 p², *en* *Euptilotis* 0.013 p², *en* *Pharomachrus* 0.021 p² y *en* *Trogon* 0.017 p².

e) Se presenta una disminución del área del tubo ocupada por melanina y del porcentaje de melanina con respecto al área total. El promedio del área de melanina varía de 0.133 p² en *Apaloderma*, representando el 84% del área total, a 0.077 p² (81 %) en *Priotelus*, 0.097 p² (88%) *en* *Euptilotis*, 0.075, u² (76%) *en* *Pharomachrus* y 01.039 p² (701'7) *en* *Trogon*.

d) Se observa un aumento de la cantidad de plaquetas por área (densidad) y tendencia a un acomodo definido de las mismas a lo largo de la bábula. En contraposición de lo que ocurre en los demás géneros, *en* *Apaloderma* hay pocas plaquetas, un promedio de 12 en la parte exterior y 5 en la parte interior de la corteza y 13 en el centro; *en* *Priotelus* hay 21 plaquetas en la parte exterior, 20 en la parte interior de la corteza y 12 en el centro; *en* *Euptilotis* 22 plaquetas promedio por cada zona; 18 plaquetas por zona para *Pharomachrus*, y *en* *Trogon* 40 en la zona exterior, 29 en la exterior y 20 en la central. Aún cuando *en* *Apaloderma* las plaquetas empiezan a tener una tendencia a acomodarse en líneas, no tienen todavía un patrón bien definido como se encuentra después en los demás géneros.

Tendencias por Clado

Los Coliiformes, utilizados como grupo externo, carecen de plaquetas (Fig.. 5a), y por lo tanto no presentan coloración iridiscente. La presencia de éstas constituye, pues, una innovación para el orden Trogoniformes. En el género *Apaloderma*, que es el clado más basal del orden, Las

plaquetas son pocas y grandes (Cuadro 2), sin un patrón de acomodo bien definido dentro de las bárbulas (Fig.. 5a). Las especies del género *Harpactes* estudiadas (*H. oreskios*, *H. ardens* y *H. diardii*) tienen la rabadilla de color calé y no presentan iridiscencia, por lo tanto, según la filogenia, la iridiscencia se ha perdido al menos una vez dentro de la familia (Fig.. 5b). Sin embargo, se puede apreciar que la distribución de la melanina en estas tres especies también presenta una tendencia. En *H. oreskios*, la melanina se distribuye hacia la periferia, en granos muy bien definidos. En *H. diardii*, la melanina migra hacia el centro y los gránulos son menos claros, mientras que en *H. ardens*, la melanina se encuentra de una manera muy difusa. Se debe de considerar que hay once especies del género *Harpactes*, de los cuales sólo tres están representadas en este estudio. Durrer y Villiger (1966) reportan plaquetas para *H. reinwardtii*, pero debido a la falta de información filogenética para el grupo, no es posible inferir que estado es ancestral en él, ni como es que han ocurrido los cambios dentro del mismo. En *Priotelus* se nota un cambio en las plaquetas con respecto a las de *Apaloderma*, reduciéndose área, diámetro, luz y cantidad de melanina (Fig.. 5b, Cuadro 2). La densidad de plaquetas aumenta, además de que éstas tienden a migrar hacia la corteza.

Las plaquetas de *Euptilotis* son más grandes que las de *Priotelus*, pero menores que las de *Apaloderma* (Cuadro 2). El área ocupada por melanina es muy grande, por lo que la luz del tubo esta muy reducida. Las plaquetas están muy cerca unas de otras y acomodadas en líneas (Fig.. 6a). Este estado precede a la fusión de plaquetas que se observa en los demás quetzales. En las especies de *Pharomachrus*, las plaquetas tienen entre dos y cuatro cámaras de aire en ellas, separadas por paredes de queratina (Fig.. 6a). Muy posiblemente, éstas se originan por la fusión de varias plaquetas individuales. Dentro del ciado hay tendencia a la disminución del área, diámetro, luz y cantidad de melanina. El acomodo de las plaquetas es en líneas concéntricas, excepto en *P. antisianus*, donde este patrón se ha perdido por completo; sin embargo, esto no parece afectar a la iridiscencia de esta especie. Aún cuando la cantidad de plaquetas se reduce con respecto a los demás trogones del Nuevo Mundo (Cuadro 2), en realidad se optimiza la interacción que hay entre la luz y la interfase de melanina-queratina-aire. Esto es debido a que en cada plaqueta, la luz pasa varias veces por las diferentes densidades ópticas que la constituyen, y el hecho de que la iridiscencia de estas plumas sea mayor a la los otros géneros, podría ser un resultado de lo anterior.

En las especies del género *Trogon*, las plaquetas son tubos más o menos circulares. La mayor parte de éstas se distribuyen con la corteza de la bárbula, separadas entre sí por cantidades muy pequeñas de queratina. A comparación con el número de plaquetas en la corteza, en la médula el número de éstas es menor, se encuentran más dispersas y están separadas por gruesas paredes de

queratina. El área, diámetro, luz y melanina del "subclado violaceus" (Fig.. 6b, Cuadro 2) tienden a disminuir respecto a las del "subclado elegans", al tiempo que aumenta la cantidad de plaquetas distribuidas en la médula de la bárbula [i.e., mientras que en el "subclado elegans" el promedio de plaquetas en la médula es de 14, el promedio para el "subclado violaceus" es de 21 (Cuadro 2)]. No se *aprecia un cambio* notable en el número de plaquetas distribuidas en la bárbula entre los dos subclados (Fig.. 6b y 7).

DISCUSIÓN

Aún cuando la coloración estructural en los trogones siempre produce iridiscencia, esta sólo se percibe con los cambios en la luz incidente o con el movimiento de los individuos. Debido a que estas aves pasan mucho tiempo perchadas sin ningún tipo de movimiento, la brillantez de su plumaje suele pasar desapercibido. Es importante entonces, distinguir entre las implicaciones que tienen por sí mismos los colores producidos estructuralmente y por otro lado el efecto iridiscente. En el primer caso, los colores estructurales en las plumas de trogones incluyen verdes, azules y violetas,. En casi todas las especies estos colores abarcan cabeza, barbilla, garganta, parte superior del pecho, dorso y rabadilla. Esta coloración resulta crítica dentro del entorno boscoso en el cual habitan la mayor parte de los trogones, brindándoles protección. Por otro lado, la iridiscencia podría estar jugando un papel de comunicación interespecífica entre los individuos. Tratándose de aves con colores y conductas que tienden a hacerlos poco conspicuos y con ambientes donde los niveles de luz incidente son bajos, el brillo en el plumaje puede representarles una ventaja.

Mientras que el patrón de coloración general puede protegerles, confundiéndolos con su entorno, la iridiscencia puede ser parte de un patrón de reconocimiento e incluso de despliegue. De hecho, es en los machos donde el área corporal iridiscente es mayor. Aunque la iridiscencia es un estado ancestral dentro del orden trogoniformes, esta no es igual en cada uno de los géneros debido a las diferencias observadas en los patrones de las ultraestructuras que la producen. Las especies africanas son mucho menos brillantes que las especies americanas. Dentro de estas, los quetzales son, sin duda alguna, los que poseen iota iridiscencia más marcada. Es en estas mismas aves en donde se presenta el desarrollo de crestas, elongación de cobertoras de las alas y cobertores superiores de la cola. La combinación entre la posesión de estos ornamentos y el aumento en la iridiscencia, podría ser evidencia de que en realidad el desarrollo de ésta ha representado ventaja en la comunicación interespecífica.

No obstante las anteriores consideraciones, Monge Nájera y Hernández. (1994), citan referencias en donde se propone que cuando la depredación es mayor a las presiones sexuales, las aves tienden

a volverse monomórficas en cuanto a color, lo que explicaría el porqué los quetzales centroamericanos (*Pharomachrus moccino*) machos son apenas más brillantes que las hembras.

Sin embargo, este argumento pierde fuerza debido a que a) la hembra de *P. mocinno* es justamente la hembra de trogón con más verde en su plumaje, por lo que no es válido inferir a partir de esto, el estado de coloración del macho, y b) el macho de *P. mocinno* ha desarrollado más las ornamentaciones (i.e., crestas, elongación de cobertoras de las alas y cobertores superiores de la cola) que ningún otro trogón con un claro componente sexual. Estos mismos autores proponen a la coloración estructural del quetzal como una adaptación críptica.

Cuadro 2. Medidas tomadas para las plaquetas de las especies incluidas en la filogenia. Las especies de *Harpactes* no están incluidas, puesto que carecen de estructuras iridiscentes.

Especie	Area de plaqueta μ^2	Diámetro de plaqueta μ	Area luz de plaqueta μ^2	Area melanina μ^2	Porcentaje melaninica'rea	plaquetas exterior	plaquetas interior	plaquetas centro
<i>Apaloderma vittatum</i>	0.141	0.587	0.020	0.120	85%	10	6	12
<i>Apaloderma narina</i>	0.179	0.610	0.032	0.147	83%	14	4	14
<i>Priotelus temnurus</i>	0.096	0.412	0.018	0.077	81%	21	20	12
<i>Euptilotis neoxenus</i>	0.111	0.525	0.013	0.097	88%	22	22	22
<i>Pharomachrus auriceps</i>	0.129	0.508	0.022	0.106	83%	18	18	18
<i>Pharomachrus pavoninus</i>	0.126	0.506	0.037	0.088	70%	14	14	14
<i>Pharomachrus mocinno</i>	0.065	0.390	0.010	0.055	85%	24	24	24
<i>Pharomachrus antisianus</i>	0.074	0.344	0.016	0.058	78%	17	17	17
<i>Trogon mexicanus</i>	0.073	0.423	0.027	0.046	63%	29	25	21
<i>Trogon personatus</i>	0.060	0.361	0.014	0.045	76%	42	38	13
<i>Trogon collaris</i>	0.052	0.350	0.010	0.040	79%	68	49	11
<i>Trogon rufus</i>	0.051	0.298	0.016	0.034	67%	17	22	18
<i>Trogon melanocephalus</i>	0.054	0.329	0.019	0.034	68%	51	21	8
<i>Trogon elegans</i>	0.070	0.406	0.026	0.043	62%	30	20	9
<i>Trogon melanurus</i>	0.072	0.440	0.017	0.055	76%	34	35	18
<i>Trogon comptus</i>	0.050	0.310	0.011	0.038	77%	53	42	18
<i>Trogon massena</i>	0.062	0.330	0.023	0.038	63%	41	43	17
<i>Trogon citreolus</i>	0.054	0.286	0.012	0.042	77%	53	16	33
<i>Trogon viridis</i>	0.036	0.253	0.009	0.027	75%	45	19	24
<i>Trogon violacens</i>	0.061	0.343	0.019	0.042	69%	29	19	28
<i>Trogon curucui</i>	0.040	0.289	0.013	0.026	66%	34	22	32



Fig. 4. Microfotografías de *Trogon citreolus* (A; 2700 x), y *Pharomachrus mocinno* (B; 8000 x) mostrando las ultraestructuras responsables de la coloración iridiscente.

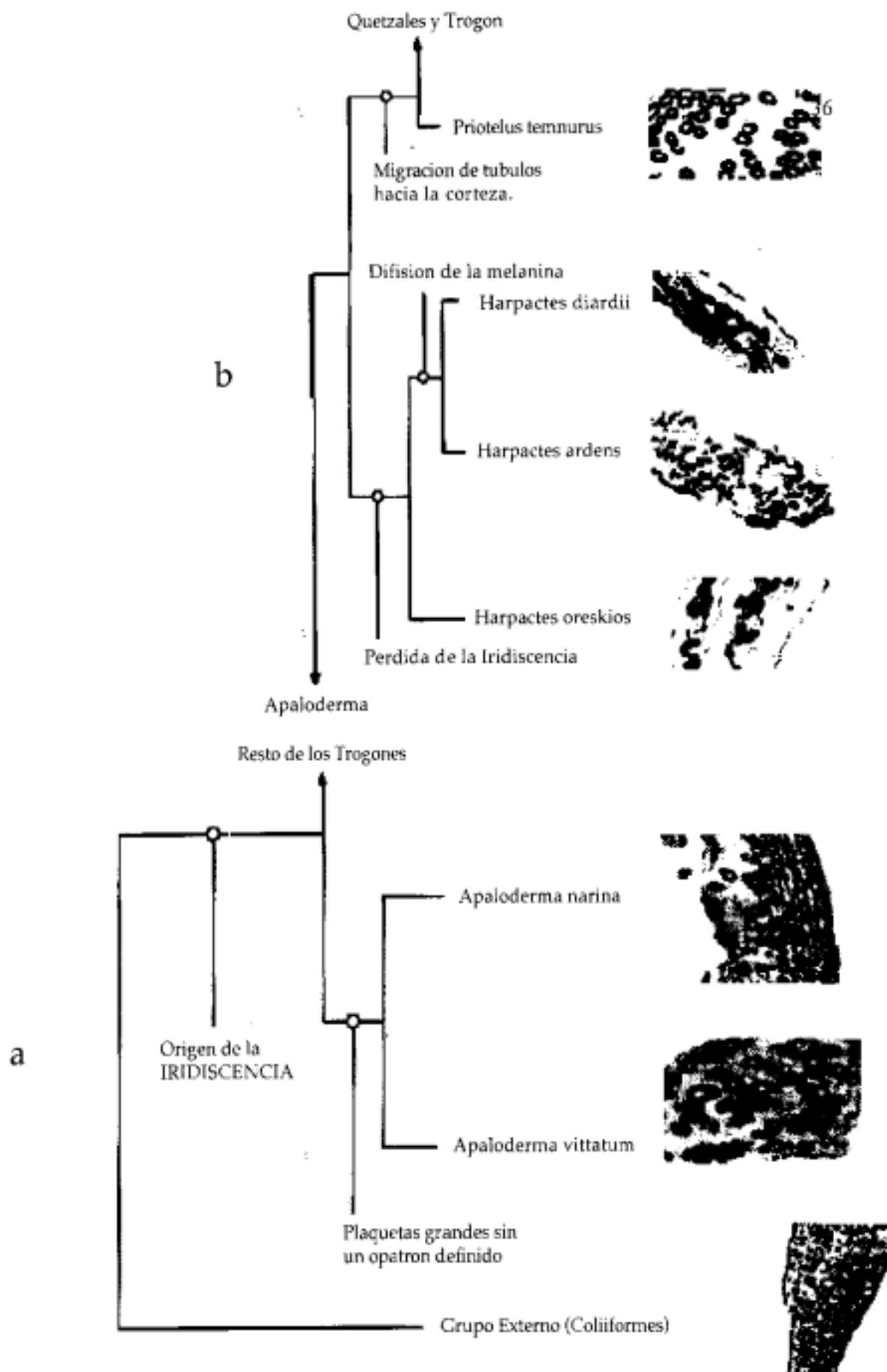
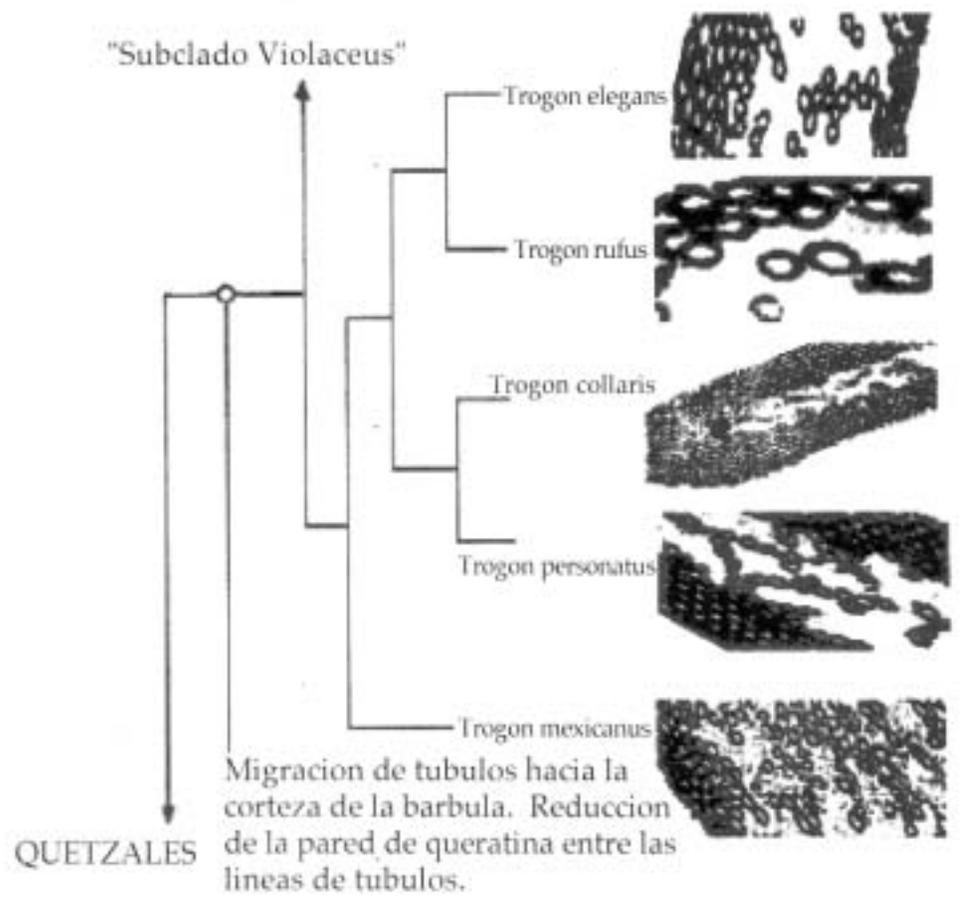
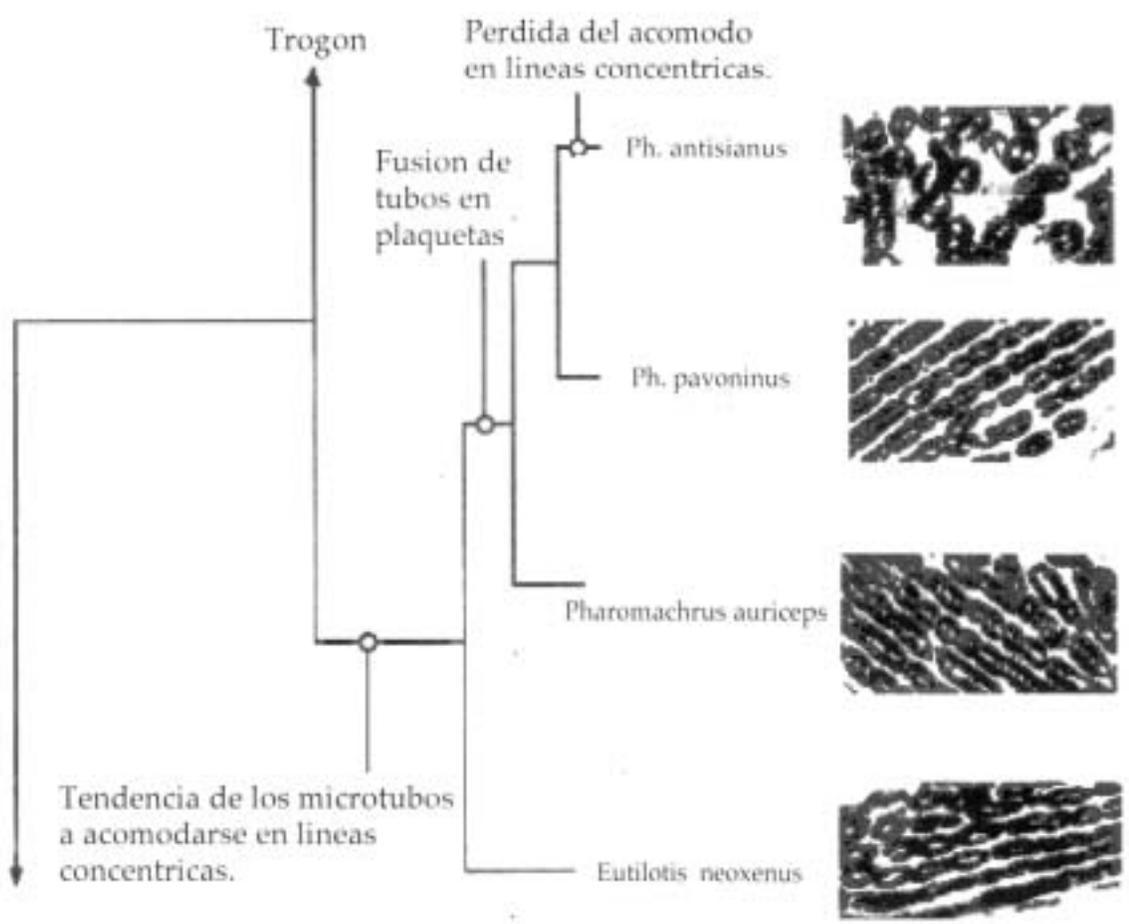


Fig. 5. Tendencias evolutivas en las estructuras responsables de la iridiscencia.
 a) Arceopten y Trogones Africanos; b) Trogones Asiaticos y Trogon Cubano



b



a

Fig. 6. Tendencias evolutivas en las estructuras responsables de la coloracion iridiscente.

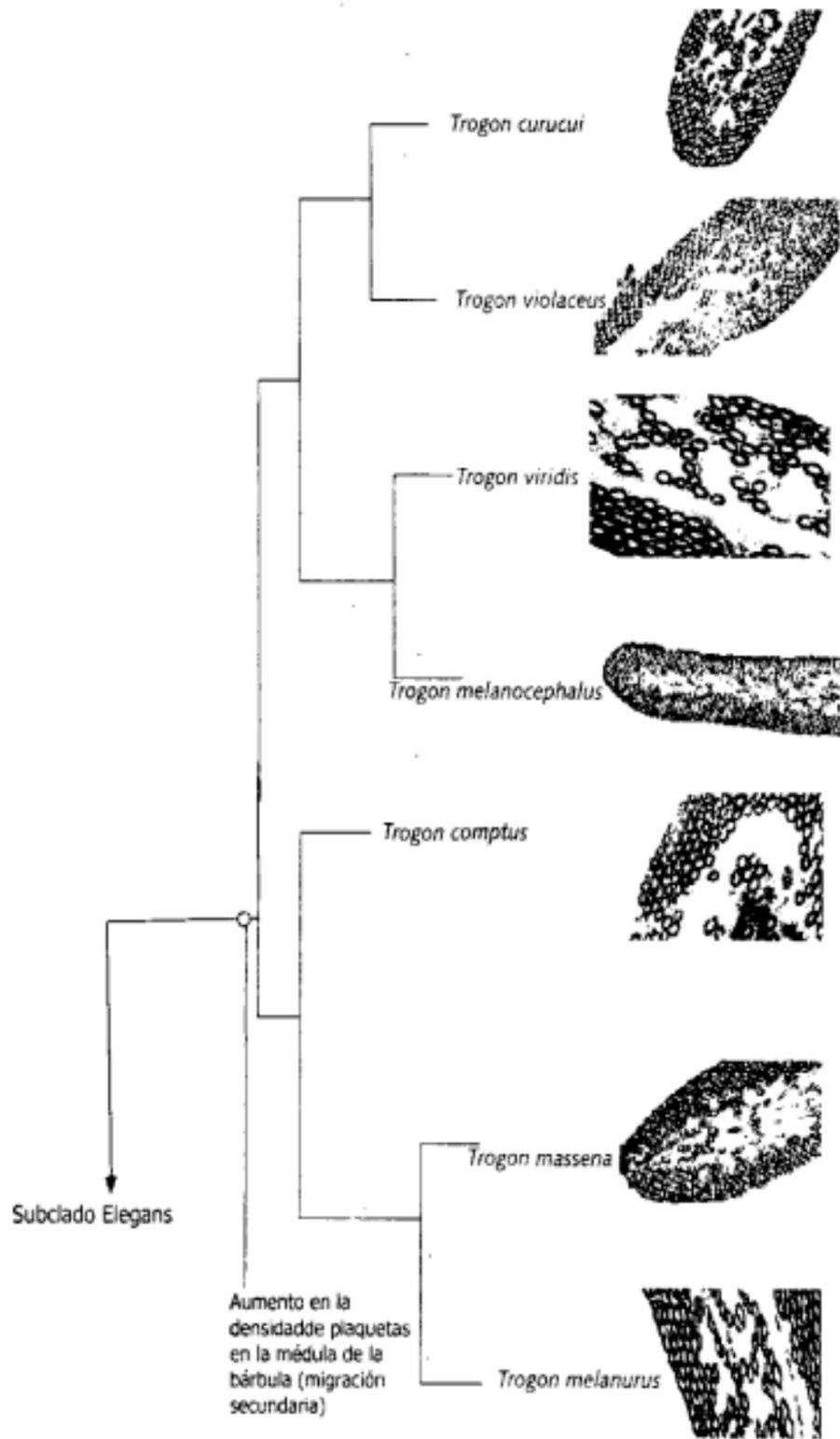


Fig. 7. Tendencias evolutivas en las microestructuras responsables de coloracion iridiscente en el "Subclado Violaceus".

CAPITULO 111

ANÁLISIS DE VARIABILIDAD GENÉTICA DE QUETZALES

El Quetzal (*Pharomachrus moccino*) es una de las especies de aves más llamativas debido a los patrones de coloración e iridiscencia, además del hiperdesarrollo de las cobertoras de la cola. Aparte de su atractivo meramente estético, los quetzales son de gran importancia ya que actúan como dispersores de semillas (i.e., lauráceas), y al ser aves estrictas de bosque resultan ser buenos indicadores del deterioro ambiental. Debido a la grave depauperación de los bosques de niebla en nuestro país, esta especie forma parte de listados de aves amenazadas (King 1951, NOM-059ECOL 1994). Sin embargo, desconocemos aspectos básicos de esta especie como sus interrelaciones evolutivas, variabilidad genética, y estado actual de las poblaciones, los cuales deben ser criterios indispensables para desarrollar un plan de manejo y poder tomar decisiones para la protección tanto de la especie como de su hábitat.

Una de las metas principales en los estudios genéticos enfocados a la conservación, es la determinación del nivel y distribución de la variabilidad genética en especies amenazadas. La información genética es uno de los datos críticos para entender la estructura, y demografía de las poblaciones de una especie. Lamentablemente los programas de protección de especies y el diseño de reservas no han tomado en cuenta este factor, tal vez debido a la dificultad metodológica que este tipo de estudios implicaba. Durante los últimos años los análisis genéticos han sufrido un avance dramático. No solo por el rápido desarrollo e incorporación de nuevas tecnologías (e.g., PCR, y secuenciación directa), sino también por el surgimiento de kits comerciales y técnicas que facilitan el rápido procesamiento de muestras. Estos avances tecnológicos han permitido que los análisis genéticos sean accesibles para casi cualquier grupo interesado en la conservación.

Tal vez no resulte claro porqué equiparar la variabilidad y estructura genética de una población con la calidad de la misma. Esto principalmente depende de los procesos que influyen en el mantenimiento y herencia de las características que definen y ayudan a resistir los cambios a los que se enfrenta una población. Desde un punto de vista minimalista, una población es un conglomerado de información genética que interactúa dentro y entre poblaciones. Muchas de las diferencias que observamos entre los organismos son debidas a las diferencias que presenta el genotipo de ese individuo en particular. Son estas diferencias las responsables que un individuo pase o no las pruebas a que es sometido por la selección natural. Que un organismo "no sea apto" evolutivamente no necesariamente implica la muerte y desaparición de su genotipo, pero dadas las

condiciones selectivas en ese instante de la historia de la población, por lo menos resulta penalizado con un menor éxito reproductivo comparado con genotipos "más aptos". La reproducción diferencial es la consecuencia última del resultado de factores como mortalidad, fertilidad, fecundidad, éxito en conseguir pareja, y viabilidad de la descendencia. La selección natural actúa diferencialmente solo en las poblaciones donde existen diferencias genéticas entre los individuos de una población. Debido a que el tamaño de la población depende en última instancia de la capacidad de carga del hábitat, la adecuación (Le., éxito evolutivo) de un individuo es determinada por la "aptitud" relativa del genoma de ese individuo con respecto a la del resto de la población. En el mundo real, el éxito de un genotipo no se mantiene constante a lo largo del tiempo, ni bajo condiciones ambientales distintas. Por lo tanto, es preciso que la carga genética de las poblaciones se deba estar reinventando constantemente. En otras palabras nueva variabilidad genética debe aparecer para mantener saludable a la población.

El proceso natural por medio del cual se genera nueva variabilidad genética son las mutaciones. Paradójicamente, debido a que las poblaciones son el resultado de una larga interacción entre las condiciones ambientales con los genotipos individuales, la aparición de mutaciones en los descendientes generalmente implica una baja en la adecuación de sus portadores. Con el paso del tiempo, la selección natural actuará en contra de éstas mutaciones y en la mayoría de los casos las eliminará de la población junto con sus portadores. No solamente la selección natural es la responsable de filtrar organismos y sus genotipos. La sobrevivencia de un organismo se puede deber a causas completamente azarosas, y por lo tanto los genotipos no pasan de una generación a otra de una "manera dirigida" sino de forma aleatoria. Esto es lo que se conoce como deriva génica. La deriva génica también se explica como un error natural de muestreo en la población. Un ejemplo típico de esto es la unión de gametos aleatorios durante la reproducción. El error de muestreo aleatorio ocurre ya que en condiciones naturales la posible combinación de gametos distintos en cualquier generación siempre es mayor que el número de individuos que se producen en un evento reproductivo. Por lo tanto de manera aleatoria es posible perder características que existen en una población, y por lo tanto se reduce la variabilidad genética de la misma. La deriva génica es un proceso especialmente importante en poblaciones pequeñas, donde la pérdida de un individuo puede implicar la desaparición instantánea de un genotipo.

La fragmentación de los hábitats puede traer como consecuencia el empobrecimiento genético de una población debido a la pérdida aleatoria de alelos- La reducción de variabilidad genética en una población depauperada puede implicar que mutaciones deletéreas recesivas se expresen debido al incremento en la endogamia. Esto trae como consecuencia lo que se conoce como depresión por

endogamia, donde la adecuación de los organismos se reduce al acumularse alelos deletéreos recesivos en múltiples loci. Es por ello que la pérdida acumulada de variabilidad genética puede traer como consecuencia que la población sea incapaz de adaptarse a nuevos cambios en el medio ambiente, y por lo tanto ser más vulnerables a la extinción

Determinar la variabilidad genética de una especie es relativamente simple. Casi cualquier técnica molecular puede ser empleada para determinar el grado de variación entre los individuos de una población. La fuente de datos más comúnmente usada son las proteínas en especial las alozimas. Con la electroforesis de proteínas es posible determinar el nivel de homocigosis-heterocigosis presente en una población, y entre poblaciones de la misma especie. Una vez teniendo estos datos, con la ayuda de estimadores (e.g., estadísticos F) es posible saber si la especie se encuentra en equilibrio o si existe pérdida de heterocigosis debido a deriva génica y/o endogamia (Nei & Kumar 2000). En general, los datos de alozimas sugieren que la variabilidad genética observada en aves es similar a la de otros vertebrados (Corbin 1987, Corbin et al. 1979). Sin embargo, la variabilidad existente entre las poblaciones de una misma especie son extremadamente bajas (Barrowclough 1983). Por ejemplo, un estudio realizado con el Chipe de Rabadilla Amarilla (*Dendroica coronata*) descubrió una variación mínima entre las poblaciones de esta especie, aún cuando estas se encuentran aisladas geográficamente. El análisis directo de ADN ha venido a complementar las posibles rutas para evaluar la variabilidad genética dentro de una especie. Un método simple, rápido y económico es el conocido como RAPD's (Randomly Amplified Polymorphic DNA). Los RAPD's, al contrario de las proteínas, proveen de un muestreo mayor del genoma y en teoría puede muestrear un número ilimitado de loci para su análisis genético. Para esta técnica, una sonda (i.e., oligonucleótido) 10 pb de longitud es usada para realizar las reacciones de amplificación de ADN en un termociclador. Una cadena de ADN es amplificada para cada región genómica que esté flanqueada por un sitio de unión que contenga la secuencia adecuada para el reconocimiento del oligonucleótido. Estas cadenas pueden tener una longitud de tan solo unos cientos de bases hasta 5000 pb. El ADN genómico de dos individuos distintos produce un *patrón de fragmentos* diferentes si es *que* entre ellos existe cierto grado de variabilidad genética. Un fragmento de ADN que es amplificado para un individuo, pero no para el resto de la población representa un polimorfismo, y puede ser considerado como un marcador genético para ese organismo. Estos marcadores son heredados de una manera Mendeliana, y por ello es posible realizar estudios detallados sobre genética poblacional (Williams et al. 1990). La segregación de estos marcadores en la progenie de especies con reproducción sexual, pueden ser usados para la realización de mapas genéticos. La técnica de RAPD's presenta una gran ventaja sobre otros métodos, esta es que RAPD's requiere una muestra mínima de tejido. Esto es especialmente

importante cuando se trabaja con *especies* amenazadas en las cuales el sacrificar tan solo algunos *ejemplares puede poner* en riesgo la existencia de dicha especie.

En este sentido, los *objetivos* particulares de este análisis pretenden: a) Determinar la variabilidad genética de la población de *quetzales* en el polígono 1 de la *reserva* de la biosfera "El triunfo". b) Inferir los factores que pueden producir la pérdida de variabilidad genética en esta población y proponer medidas para reducir su efecto.

METODOLOGÍA

Muestreo de Individuos

El presente análisis representa un estudio piloto e incluyó un total de 19 individuos del Quetzal (*Pharomachrus moccino*). Las muestras de sangre se consiguieron en viales de campo a la

Reserva de la Biosfera El Triunfo en Chiapas. El viaje principal se hizo durante el mes de abril 2001. Ya que en este tiempo ocurre el período de reproducción del Quetzal (Solórzano 1995). El número de muestras sanguíneas dependió del número de nidos activos localizados. Se ha mostrado que la manipulación de individuos durante *este* período no afecta el éxito reproductivo de la especie (Ávila y Hernández 1990). Como ya ha sido mencionado, *Pharomachrus moccino* se encuentran consideradas dentro de NOM-059-ECOL-1994 y se considera como una especie en peligro.

Arcas de Muestreo

Reserva de la Biosfera "El Triunfo" (región 142).- El muestreo se hizo en el "Polígono 1" de la Reserva de la Biosfera, en el campamento El Triunfo (1900 msnm) y en el campamento Palo Gordo (1700 msnm). Ambos sitios se encuentran inmersos dentro de la zona reproductiva del quetzal. El área se encuentra en el estado de Chiapas y se localiza a los 15° 35 - 15' 45 N, 92° 4V- 92' 53'W, abarcando un área de 11,594 ha. La vegetación principal es el bosque mesófilo de montaña. La precipitación media anual excede los 4,000 mm. La humedad relativa es superior al 70%, y la temperatura media anual es de 1S' C.

Toma de muestras de sangre

La búsqueda de nidos se realizó por un período de cuatro semanas abarcando principalmente el mes de abril cuando los quetzales estaban terminando la etapa de cortejo. Se realizaron recorridos por los diferentes senderos Y cañadas del sitio de estudio para localizar nidos activos, los cuales fueron

ubicados por medio de un geoposicionador (GARMIN GPS 45). Se observaron los nidos por **al** menos dos días para obtener los turnos de empollamiento de cada uno de los padres. Esto se hizo para cerciorarse de que no estaba presente el otro miembro de la pareja cuando se realizó la captura, con el fin de que la pareja no abandone el nido. Solamente se realizó una captura por nido, pero posteriormente se hicieron observaciones para asegurarse que la manipulación no tuvo un efecto negativo sobre el nido. Para la captura de los ejemplares, se colocó una red cónica junto al nido desde un día anterior atada a un polín de colecta. En algunos casos fue posible capturar a los adultos con redes de niebla colocadas con poleas a alturas entre 5 y 10 m en las inmediaciones del nido. La *toma de muestra* de sangre se realizó cubriendo a los quetzales con una manta de algodón para minimizar el estrés del animal, además, la manipulación se realizó usando guantes de algodón. En ningún caso de tomaron muestras de sangre de polluelos. Todos los ejemplares capturados, sin excepción fueron liberados inmediatamente después de haberse tomado las muestras desangre,

Gen Secuenciado

Para poder realizar un análisis sobre la variación genética en base a secuencias a nivel poblacional es necesario usar un gen con una tasa de cambio extremadamente rápida. Dentro del genoma mitocondrial existe la región control del D-loop que ha demostrado poseer la variación suficiente para poder llevar al cabo este tipo de análisis. Para el presente proyecto se secuenció un fragmento de 420 pb de la porción media de la región control del D-Loop. Los métodos de extracción, amplificación y secuenciación usados son iguales a los detallados en el primer capítulo. y por lo tanto no serán repetidos aquí. Los primers usados para este segmento corresponden a los conocidos como D09 (5'-ccatacgcataccttacatgt-3') y D20 (5'-gtgatggatcttactaacacc-3').

RAPDs

Para el análisis de variabilidad genética en *Pharomachrus moccino*, se usó la técnica de RAPDs (Hadrys et al. 1992). Esta técnica, al contrario de las isoenzimas, provee de un muestreo mayor del genoma y en teoría puede muestrear un número ilimitado de loci para su análisis genético. Para la obtención de RAPDs, se siguieron técnicas estándar de PCR. Las reacciones fueron llevadas al cabo en un termociclador de alta calidad (ABI GeneAmp PCR System 2400) en volúmenes no mayores a 25 μ l, utilizando una solución de 10 mM Tris-Cl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl, 0.001 ABS, 100 μ M dATP, 100 μ M dGTP, 100 μ M dTTP, 100 μ M dCTP, 5 pM de primer, 25 ng de ADN genómico, y 0.5 unidades de Taq DNA Polimerasa. Las condiciones estándar para las reacciones de termociclación fueron: 95 °C por 20 s para la desnaturalización; 36 °C por 30 s para la hibridación del primer; y 72 °C por 90 s para la síntesis del templete. Los resultados se observaron en un gel de agarosa al 2%, el cual fue teñido con bromuro de etilo por 15 min.. El

número y secuencia de los primeros usados para la realización de este estudio pueden ser consultados en el apéndice III. Los resultados de esta técnica fueron evaluados por medio de un índice de similitud por bandas compartidas (Horn et al. 1996), y con el índice de similitud genética de Nei (Nei y Li 1979).

Resultados

RAPD's

Los resultados presentados comprenden una muestra para 19 individuos. Ocho ejemplares fueron muestreados a mediados del año 2000 por investigadores no ligados a este proyecto (esto debido a lo problemas con la obtención del permiso de muestreo). De aquí en adelante estos individuos serán referidos con el nombre de "Donación #XX". De estos ejemplares no se cuenta con la localidad georeferenciada y tan solo están identificados como reserva El triunfo Polígono 1. Las muestras para los once individuos restantes (de aquí en adelante estos individuos serán referidos con el nombre de "Muestra #XX") fueron colectadas personalmente, por lo tanto el sitio de colecta se encuentra georeferenciado (Cuadro 3).

De los 50 oligonucleótidos utilizados para evaluar solamente 12 resultaron polimórficos (24%). Ninguna de las muestras presentó patrones de bandeo idénticos y por lo tanto podemos concluir que todas las muestras pertenecen a individuos diferentes. De igual forma, ninguno de los oligonucleótidos polimórficos produjo una distribución de bandas idénticas entre ellos. Esto es un indicador de lo relativamente alto nivel de variabilidad genética dentro de la población de quetzales en El Triunfo. En promedio el índice de similitud por bandas compartidas de Horn et al. (1996) indica una variabilidad genética del 12.06 %, para la población en el polígono 1 (ver archivo anexo en formato EXCEL). La menor variabilidad se registra entre la Muestra #01 y la Donación #05 con el 9.0 % de diferencia en el genoma. En cambio la mayor variabilidad genética fue registrada entre la Muestra #03 y la Muestra #10 con un 14.8 %. En el caso del índice de similitud genética de Nei (Nei y Li 1979) la variabilidad genética observada es del 10.4 %. Para este descriptor, la menor variabilidad se registra entre la Muestra #01 y la Donación #05 con un 7.56 %. En el extremo opuesto, la mayor variabilidad fue registrada entre la Muestra #05 y la Donación #06 con un 12.96 %.

Al ver este resultado podríamos considerar que tales valores parecen bajos. Sin embargo, en realidad reflejan un grado de variabilidad alto para una población con las características

conductuales de los Quetzales, en donde supuestamente los individuos son relativamente sedentarios y cuyo tamaño poblacional ha disminuido considerablemente. Aun cuando pocos estudios de este tipo se han realizado para evaluar la variabilidad genética en aves. Baker y su equipo de colaboradores (1994) realizaron una evaluación para 25 individuos de *Calidris canutus* (Knots) los cuales representaban un total de 10 poblaciones distintas. Uno de sus descubrimientos, es que las poblaciones han pasado por una pérdida considerable de variabilidad genética. El valor de variabilidad genética encontrada para esta especie fue del 3.5 % lo cual coloca a esta especie hasta el fondo en la lista de las aves en cuanto a variabilidad genética se refiere. Los casos más notorios son el del Chita (*Acⁱnonyx jubatus*), de los cuales se estima que existen entre 1,500 y 2,500 individuos. O'Brien y colaboradores 1985 evaluaron el nivel de variabilidad y encontraron que esta especie presentan cero variabilidad genética. Otro caso similar es el del Elefante Marino (*Mirounga angustirostris*), esta especie debido a la explotación masiva llevo a ver su tamaño poblacional reducido en 1890 a tan solo 20 individuos. Aún cuando, la especie se ha recuperado levemente, los análisis genéticos han demostrado cero variación genética (Bonnell & Selander 1974).

En base a las distancias genéticas estimadas con el índice de similitud genética de Nei se construyó un dendrograma de similitud total (Fig.. 8). Este dendrograma se construyó utilizando un algoritmo del tipo Neighbor-Joining, el cual utiliza las distancias mínimas entre pares de muestras agrupándolos en subconjuntos de máxima similitud genética para este caso. En este dendrograma los individuos fueron agrupados en dos líneas genéticas principales. Aún cuando estas dos líneas genéticas presentan claros subconjuntos dentro de ellas, los ejemplares no parecen anidarse dependiendo de la zona espacial en que fueron colectadas. Por lo tanto es posible deducir que existe un flujo genético constante al menos dentro de la población de quetzales que se encuentran en el área del polígono 1 de la reserva. Las muestras de RAPD's sugieren que existen al menos tantos aplotipos como individuos existen, lo cual nos hablaría de una población sana, y con bajos niveles de endogamia.

Tomando como punto de inicio la existencia de estas dos líneas genéticas dentro del polígono 1 se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA). El análisis se produjo resultados prácticamente idénticos para ambas matrices de distancia (i.e., bandas compartidas de Horn et al., y similitud genética de Nei). Los valores de probabilidad fueron calculados usando 1,(X)0 permutaciones aleatorias de las matrices originales de datos. La pérdida de variabilidad debida a endogamia es del 6.2 % ($O_{st} = 0.062$; $p < 0.001$). Este valor no es muy diferente a lo encontrado en otros grupos de aves cuyas poblaciones no están consideradas en peligro de extinción. Por

ejemplo Paterson y Snyder (1999) reportan que para *Oceanodroma leucorhoa* (Leach's Storm Petrels) la pérdida de variabilidad debido a endogamia en las poblaciones es del 5.1 %. Si consideramos que las colonias de estos petreles pueden alcanzar números de hasta varios cientos de miles de individuos, el efecto de la endogamia en la población de quetzales del polígono 1 del Triunfo no necesariamente es un factor que amenace la sobrevivencia de estas aves. Una pérdida de variabilidad del 6.2 % nos indica que los apareamientos no se están llevando al cabo de una manera aleatoria. Esta estructura que se observa en la población del polígono 1 muy probablemente es debida a que los nuevos individuos permanecen en una zona cercana a su sitio de nacimiento.

Secuencias de ADN

La secuencia general para las 420 pb de la porción media de la región control del D-Loop se presenta en el cuadro 4. La variación observada en la secuencia se resume en un total de cuatro haplotipos lo que en promedio representa un haplotipo por cada 5 individuos secuenciados. De los 420 sitios secuenciados 403 resultaron invariables (95.9 %), mientras que los 17 restantes (4.1 %) conforman los sitios indicadores de variación en la población muestreada (Cuadro 5). Todos los cambios observados corresponden a transiciones (siete T-C 41.2 %, y diez G-A 58.8 %). La mayoría de los cambios (76.5 %) se encuentran concentrados entre las posiciones 201 y 389, lo que indica una zona de alta variabilidad en la molécula.

Además del número de haplotipos y el número empírico de cambios entre las secuencias, para estimar la variabilidad dentro de la población se calcularon el índice de segregación de sitios (L) de Watterson (1975), y el índice de diversidad de nucleótidos (π) de Tajima (1983). Los intervalos de confiabilidad para estos estadísticos fueron calculados usando un bootstrap no paramétrico, con un mínimo de 1000 réplicas. La variabilidad de nucleótidos para la población del polígono 1 es del 2.3 %, $st = 0.0058$ (0.0019 - 0.0103), y $L = 0.0086$ (0.0016 - 0.0086). Estas medidas son consistentes con procesos normales de dinámica poblacional, no debido a una pérdida de variabilidad debida a cuellos de botella. Al realizar un análisis de relaciones entre los haplotipos se encontró un total de 6 redes igualmente parsimoniosas. La red de consenso se presenta en la figura 9. Aun cuando existe pocos datos se puede observar cierta estructura filogenética en la red. Los haplotipos 111 y IV están más cercanamente relacionados con el haplotipo II que con el haplotipo I. La red de relaciones de los haplotipos para el Dloop presenta algunas similitudes con el dendrograma de similitud genética total obtenido para el genoma basado en el análisis de RAPDs. En el caso de los haplotipos es posible identificar dos grupos, uno formado exclusivamente por el haplotipo I y el otro conteniendo a los haplotipos 111, y IV. El

haplotipo IV es idéntico a uno de los subgrupos dentro de una de las líneas genéticas, mientras que el haplotipo 1 recobra parcialmente a la otra línea genética obtenidas en base a RAPDs. Esto corrobora la idea de que en el Polígono 1 de la reserva de la biosfera de El Triunfo existen por lo menos dos líneas familiares en la población de quetzales.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta parte del proyecto se evaluó la variabilidad genética de la población de quetzales del polígono 1 de El Triunfo. Para cubrir este objetivo se emplearon dos técnicas complementarias. Es importante remarcar el hecho de que las secuencias de la región control del DLoop mostraron el alto número de haplotipos presentes en la población. Sin embargo la alta tasa evolutiva de cierta manera obscurece la posibilidad de recuperar claramente las relaciones entre los haplotipos observados. Aparente mente los cambios en las secuencias no están distribuidos de una manera aleatoria. Los datos sugieren que el gen del DLoop presenta zonas altamente conservadas y regiones hipervariables muy localizadas. En general la variabilidad genética observada en los quetzales es superior de lo esperado para *una especie* que se encuentra bajo fuertes presiones de extinción. Los datos obtenidos hasta el momento nos indican que el genoma presenta una fuerte variación tanto a nivel de haplotipos como de nucleótidos en particular. Sin embargo con las medidas simples de diversidad como lo son el número y la proporción de sitios variables en el genoma esta fuertemente correlacionada con el número de muestra usado, tanto a nivel del número de individuos como a el número de nucleótidos secuenciados.

El hecho de que toda la variación observada en las secuencias del DLoop representen *exclusivamente* transiciones nos indica que la especie se originó a partir de su ancestro en un periodo evolutivo relativamente reciente. Estimaciones realizadas para otras regiones mitocondriales han considerado que existe una tasa evolutiva de entre 1.58 % a 2.86% por cada millón de años (Nunn et al. 1996). En promedio las secuencias obtenidas presentan una variación corregida de acuerdo al modelo de Kimura de dos parámetros de 2.31 %. De acuerdo a esto y partiendo del supuesto de que el DLoop puede presentar una tasa de cambio similar a la reportada para otros grupos de aves, una fecha probable de origen de la especie estaría entre 1.5 y 0.8 millones de años. Indudablemente este dato es tan solo especulativo y requiere de futura corroboración por medio de evidencia fósil, o más estudios sobre la evolución del DLoop en aves en general y quetzales en particular. No obstante si esta fecha de origen para los quetzales es aproximadamente correcta, la especie representaría un linaje joven evolutivamente hablando, y por lo tanto el decaimiento en su número poblacional debe ser debido a presiones externas y no a efectos de senectud de la especie.

Basados en la teoría de coalescencia el estadístico t puede ser un estimador de la relación entre la tasa de mutación y el tamaño efectivo de la población ($4uNe$) para genes mitocondriales bajo

presiones de selección neutras (Nei 1987). Además, si los tamaños poblacionales han sido relativamente constantes L también puede ser un estimador del tamaño efectivo de la población (Nei 1987). Como ya se mencionó, lamentablemente no existe la suficiente evidencia fósil para calibrar la tasa de mutación particular para el gen del DLoop en quetzales. Nuevamente, si consideramos que la tasa de mutación (μ) para el DLoop es cercana a la tasa de cambio de otras particiones mitocondriales, es posible hacer una estimación aproximada del tamaño efectivo de la población de quetzales en el polígono 1. Los resultados obtenidos en el presente análisis estiman que el tamaño efectivo de la población se encuentra entre los 591 a 1076 individuos. Es importante recordar que el tamaño efectivo de la población se refiere exclusivamente a los individuos que contribuyen reproductivamente de una manera real en los procesos demográficos. En otras palabras los organismos juveniles que no han alcanzado la madurez sexual, los organismos *viejos*, y los individuos que por otras razones no logran reproducirse no forman parte de este valor. De igual forma, este valor se debe tomar con mucha reserva, ya que estos estimadores son altamente sensibles tanto al número de individuos como a la cantidad de bases utilizadas para realizar el análisis.

Slatkin (1989) y Hudson (1990) han estimado que si no existe flujo genético entre poblaciones durante un período de tiempo lo bastante largo (más de dos veces el tamaño efectivo de la población en generaciones) los haplotipos de la población deben de coalescer entre ellos eliminando cualquier evidencia de estructura filogenético entre ellos. Para el caso de la población de quetzales en el polígono 1 es evidente que aun se mantiene cierta estructura entre los haplotipos encontrados. Por lo tanto la pérdida de variabilidad y por lo tanto la reducción del tamaño poblacional representa un fenómeno evolutivamente reciente, muy probablemente debido a la fragmentación y pérdida del bosque de niebla.

En base a observaciones realizadas durante el periodo de estancia en El Triunfo, fue posible realizar observaciones cualitativas sobre la situación de la especie. Aparentemente, el número de individuos es alto (estimaciones en base a puntos de conteo sugieren al menos la existencia de una pareja por hectárea), y la actividad de cortejo es relativamente común. Sin embargo, aparente mente uno de los problemas que existen es la reducción de sitios de anidamiento apropiados. Esta especie requiere de troncos en estado de descomposición en los cuales existan cavidades previamente construidas por otras especies. Como es sabido, los quetzales no cavan sus nidos, sino que remodelan huecos abandonados. Si la falta de sitios de anidación es un factor que está contribuyendo a la reducción en el tamaño poblacional, una posible manera de reducir la tasa de decaimiento de la población es por medio de la instalación de cajas nido. Otro hecho que también

pudo ser observado y que representa un factor alto de mortalidad, es la depredación de nidos. Como evidencia anecdótica dos de los nidos que se monitorearon durante mi estancia en la reserva fueron depredados por tucanetas (*Aulacorhynchus prasinus*). Desafortunadamente en este caso no es posible colocar entradas de exclusión en los nidos ya que los depredadores son del mismo o menor tamaño que los quetzales. Es necesario realizar estudios más detallados en este respecto para poder tomar medidas que ayuden a minimizar el efecto de este factor.

El presente reporte debe ser tomado solamente como un estudio piloto sobre la variabilidad genética y situación de la población de quetzales. Para poder tener resultados más confiables y por lo tanto conclusiones más robustas es necesario remuestrear la población en el futuro para determinar la dinámica de cambio tanto a nivel genético como poblacional. De igual forma es preciso muestrear poblaciones de otras localidades que permita establecer patrones claros de flujo génico, demográficos, y filogeográficos. En este momento no es posible afirmar o negar que la variabilidad genética registrada para esta población es vital, o al menos útil para mantener en buen estado la población de quetzales. Además, este tipo de estudios deben ser complementados con observaciones más precisas sobre historia natural de la especie, interacciones, y dinámica poblacional, así como monitorear constantemente la calidad del hábitat de la reserva.

Cuadro 3. Muestras de sangre obtenidas para el análisis de variabilidad genética del Quetzal.

Muestra	Latitud	Longitud
Muestra #01	15° 39' 48.5" N	92° 48' 37.6" W
Muestra #02	15° 39' 49.1" N	92° 49' 13.0" W
Muestra #03	15° 39' 00.4" N	92° 48' 34.7" W
Muestra #04	15° 39' 13.9" N	92° 48' 31.6" W
Muestra #05	15° 39' 08.6" N	92° 48' 35.4" W
Muestra #06	15° 39' 16.2" N	92° 48' 31.0" W
Muestra #07	15° 39' 26.0" N	92° 48' 32.9" W
Muestra #08	15° 39' 47.9" N	92° 48' 37.5" W
Muestra #09	15° 38' 47.9" N	92° 48' 39.0" W
Muestra #10	15° 40' 21.6" N	92° 50' 17.4" W
Muestra #11	15° 39' 30.1" N	92° 48' 58.4" W

Cuadro 4. Fragmento secuenciado para la región control del gen del D-Loop. Los asteriscos muestran los puntos donde los cambios se presentan en los distintos haplotipos encontrados.

BASE COUNT	118 A	131 C	54 G	117 T		
	*					
1	ATTAGACTTT	AACTACAGGA	ACCTGCCCCC	CCTTCCCCCC	CATCATGTTT	TTACATGATT
61	TATTTGGGTA	TGTATTACTT	TGCATACAAT	TATTGTCCAC	ATCAGACACT	ATATCAATGT
121	AGGATATTCC	ACATTATATG	TAATGCTCGT	CCCCATTAAA	CTCAAATACT	ATCGCCCATT
181	ACACCCCAAT	* ATTGGCACTT	* ACACCTCTAG	* GCACATTCCT	* ATTCAGGTA	CCAATAACCC
241	* AAGTGATCCT	* GCCTCATAGC	* ACAACACACG	* CGTTACCCCA	* GATCGAGACC	* TTCTCCCTAC
301	* AACCTAAGC	* CTATCCTACC	* AAACGAGGAA	* TATCCTGGTA	* CACAATTGAA	** CCCTCTAGTC
361	CATAAGTTCC	GCCCACCTCC	* TAGGGTTATA	* GTCCTGTCCA	* ACAGCCTTCA	* GGTGCTCACA

Cuadro 5. Haplotipos y número de individuos por haplotipo encontrados basado en las secuencias de la región control del gen D-Loop. Solamente se indican las posiciones variables en la secuencia.

Haplotipo	# Individuos	0	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4
		0	9	0	2	4	4	6	8	9	0	5	5	8	8	8	0	2
		2	5	1	1	2	7	4	8	1	8	4	5	1	4	9	9	0
H1	7	T	G	A	A	A	T	G	A	T	A	T	C	T	G	A	C	G
H2	5	C	.	.	G	G	C	T	A
H3	4	C	.	.	G	G	.	A	G	.	G	C	T	C	A	.	.	A
H4	3	.	A	G	.	.	C	A	.	C	G	.	T	C	A	G	T	A

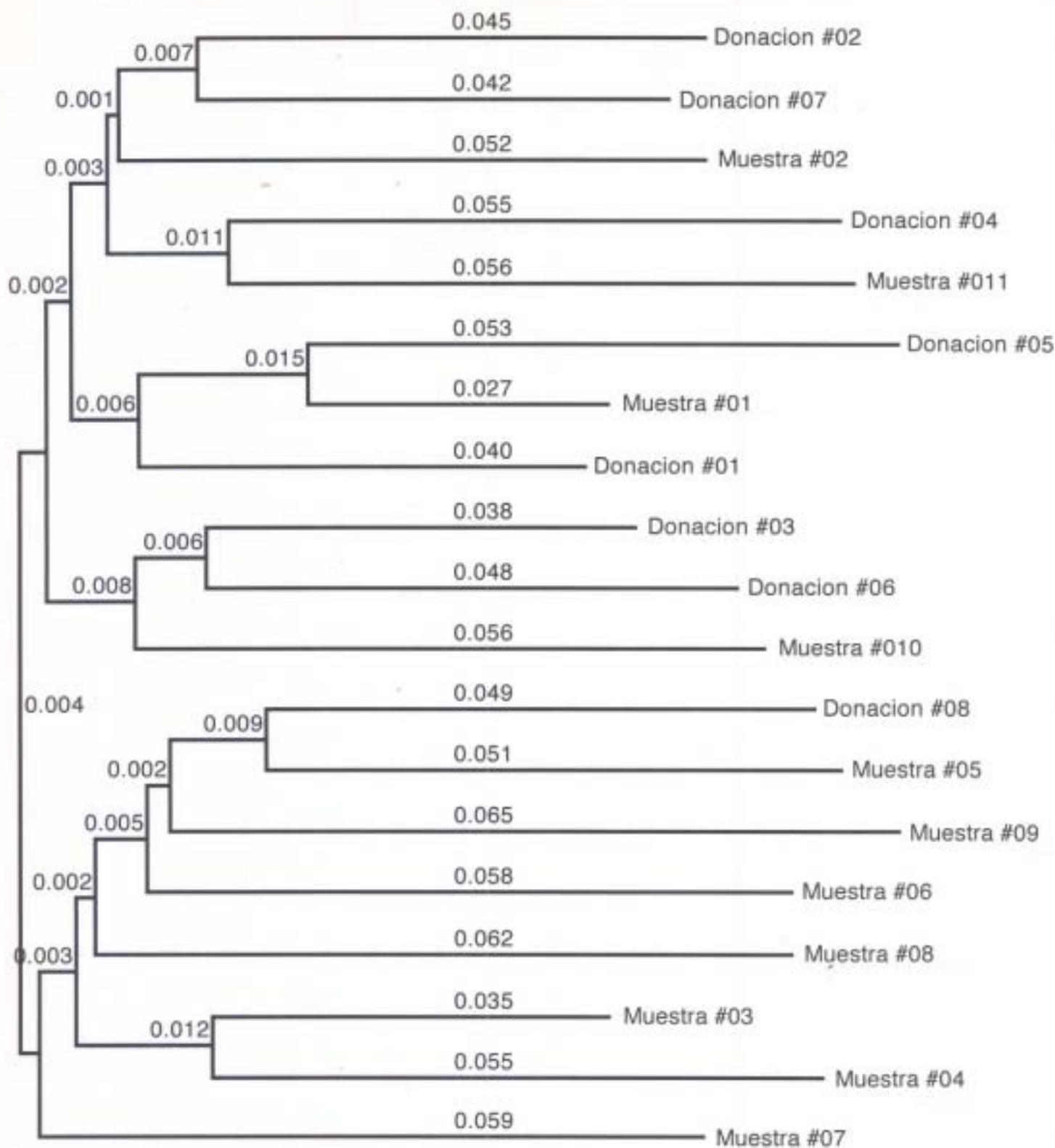


Fig. 8. Arbol que muestra las relaciones geneticas de las individuos de quetzales muestreados en el poligono I de la reserva El Triunfo construido con el algoritmos del "vecino mas cercano" (Neighbor-joining) en base a las distancias obtenidas con el analisis de RAPD's. El numero sobre las ramas representa el porcentaje de diferenciacion genetica. Para enraizar el arbol se uso la tecnica de punto medio.

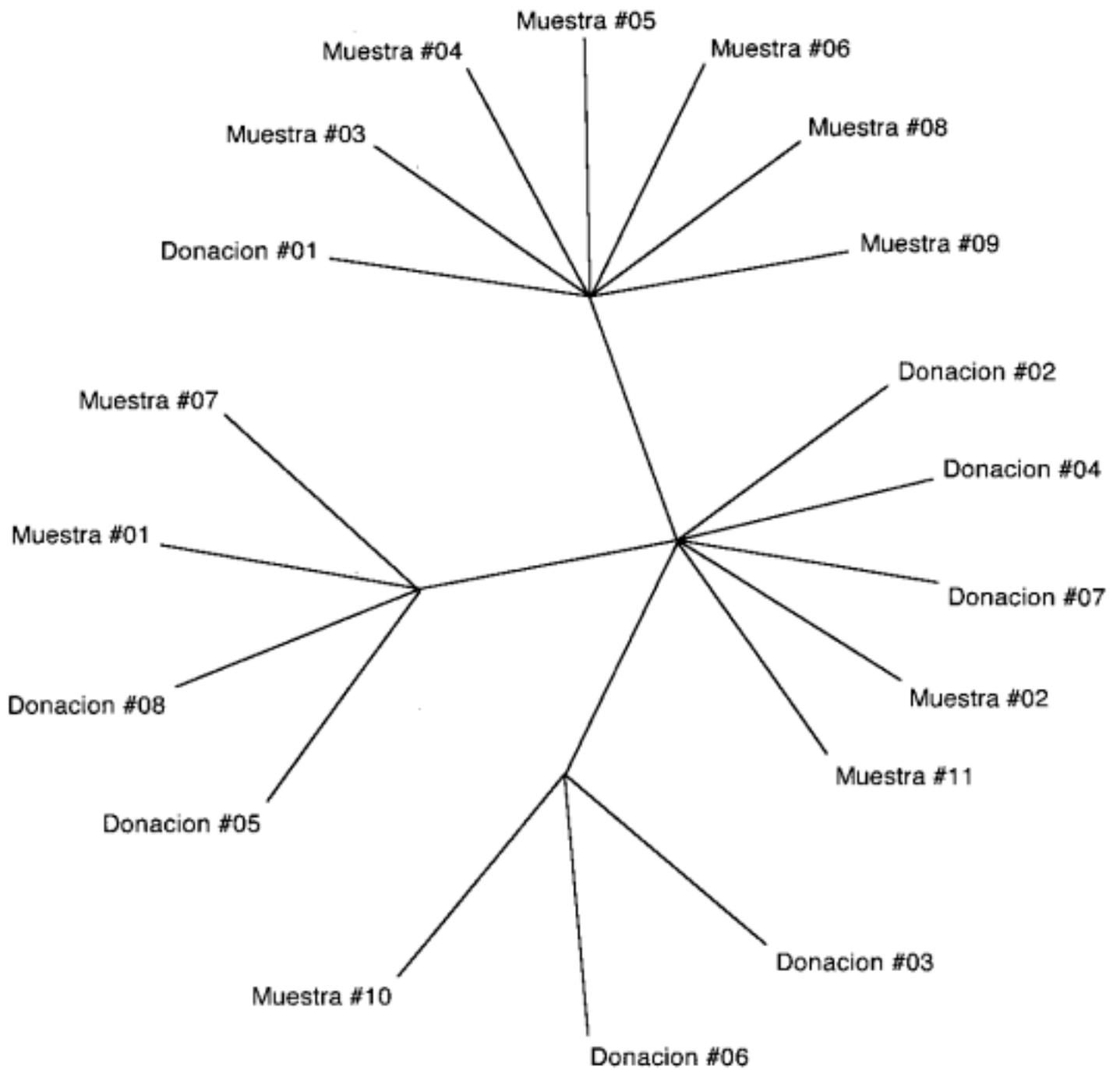


Fig. 9. Arbol de consenso estricto de cuatro arboles igualmente parsimoniosos. Las relaciones geneticas de los individuos estan basados en 420 pb de la region control del gen mitocondrial del D-Loop.

REFERENCIAS CITADAS

- Arctander, P. 1991. Avian systematics by sequence analysis of mtDNA. **Acta XX congressus Internationalis Ornithologici**. New Zealand Ornithological Congress Trust Board.
- Ávila M. L. & V. H. Hernández. 1990. Contribución a la biología y distribución del quetzal *Pharomachrus mocinno mocinno* (TROGONIDAE, AVES) en la reserva "El Triunfo", Chiapas. México. **Tesis de Licenciatura**. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F. México.
- Baker, A. J., T. Piersma, & L. Rosenmeier. 1994. Unraveling the intraespecific phylogeography of knots *Calidris canutus*: a progress report on the search for genetic markers. **J. Ornithol.** 135:599-608.
- Barrowclough, G. F. 1983. Biochemical studies of microevolutionary processes. p. 223-261. **En:** A. H. Brush & G. A. Clark Jr. [eds.], *Perspectives in ornithology*. Cambridge Univ. Press, New York.
- Bonnell, M. L. & R. K. Selander. 1974. Elephant seals: Genetic variation and near extinction. *Science* 184:908-909.
- Bozzola, J.J., & L.D. Russell 1992. **Electron microscopy principles and techniques for biologists**. Jones and Bartlett Pub., Boston.
- Bremer, K. 1992. Ancestral areas: A cladistic reinterpretation of the center of origin concept. **Systematic Biology** 41:436-445.
- Bremer, K. 1994. Branch support and the tree stability. **Cladistics** 10: 295-304.
- Bremer, K. 1995. Ancestral areas: Optimization and probability. **Systematic Biology** 44:255-259.
- Brown, W. M. 1985. The mitochondrial genome of animals. Pages 95-130 **En:** *Molecular evolutionary genetics* (R. J. MacIntyre, Ed.). Plenum Press, New York.
- Brown, W. M., E. M. Prager, A. Wang, and A. C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. **Journal of Molecular Evolution** 18:225-239.
- Brightsmith, D.J. 1999. The roles of predation and competition in nest niche differentiation: evidence from termitarium nesting parrots and trogons. **Ph. D. dissertation Duke University**. USA.
- Brundin, L. Z. 1981. Croizat's panbiogeography versus phylogenetic biogeography. Pages 94-138 **En:** *Vicariance biogeography, a critique*. (G. Nelson, and D. E. Rosen, Eds). Columbia University Press, New York.
- Brundin, L. Z. 1988. Phylogenetic biogeography. Pages 343-369 **En:** *Analytical biogeography*. (A. A. Meyers, and P. S. Giller, Eds). Chapman and Hall, London.

- Bull, J. J., J. P. Huelsenbeck, C. W. Cunningham, D. L. Swofford, & P. J. Waddell. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. **Systematic Biology** 42:384-397.
- Cain, S. A. 1971. **Foundations of plant geography**. New York Hafner Publishing Co.
- Carpenter, J. M. 1989. Testing scenarios: wasp social behavior. **Cladistics** 5:131-144.
- Clancey, P. A. 1959. Miscellaneous taxonomic notes on African birds. **Durban Museum Novitates** 5:151-179.
- Clark, H. L. 1918. Notes on the anatomy of the Cuban Trogon. **Auk** 35:268-289.
- Corbin, K. W. 1987. Geographic variation and speciation. p.321-353. **En:** F. Cooke & P. A. Buckley [eds.], Avian genetics. Academic Press, New York.
- Corbin, K. W., C. G. Sibley, & A. Ferguson. 1979. Genetic changes associated with the establishment of sympatry in orioles of the genus *Icterus*. **Evolution** 33:624-633.
- DeSalle, R., T. Freedman, E. M. Prager, and A. C. Wilson. 1987. Tempo and mode of evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. **Journal of Molecular Evolution** 26:157-164.
- Diegli-Espoti, M., S. de Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Patamello, & A. Meyer. 1993. Mitochondrial cytochrome b: Evolution and structure of the protein. **Biochimica et Biophysica Acta** 1143: 243-271.
- Durrer, H., & W. Villiger. 1966. Schillerfarben der Trogoniden. Eine Elektronenmikroskopische Untersuchung. **Journal für Ornithologie** 1.1-27.
- Edwards, S. V., P. Arctander, & A. C. Wilson. 1991. Mitochondrial resolution of a deep branch in the genealogical tree for perching birds. **Proceedings of the Royal Society of London** 243:99-107.
- Espinosa de los Monteros, A. 1997. Molecular phylogeny of Trogoniformes. **Ph. D. dissertation**. The City University of New York. New York, New York, USA
- Espinosa de los Monteros, A. 1998. Phylogenetic relationships among trogons. **Auk** 115:937-954.
- Espinosa de los Monteros, A. 2000. Higher-level phylogeny of Trogoniformes. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 14:20-34.
- Espinosa de los Monteros, A. & J. Cracraft. 1997. Intergeneric relationships of the New World jays inferred from cytochrome b gene sequences. **Condor** 99:490-502.
- Excoffier, L., & P. E. Smouse. 1994. Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: Molecular variance parsimony. **Genetics** 136: 346-359.
- Graybeal, A. 1993. The phylogenetic utility of the cytochrome-b: Lessons from bufonid frogs. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 2:256-269.

- Gutell, R. R., B. Weiser, C. Woese, & H. F. Noller. 1985. Comparative anatomy of 16S-like ribosomal RNA. **Nucleic Acid Research** 32:155-215.
- Hadrys, H., M. Balick, & B. Schierwägel. 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. **Molecular Ecology** 1:55-63.
- Helm-Bychowski, K., & J. Cracraft. 1993. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: Relationships within the corvid assemblage (Class Aves) as inferred from complete sequences of the mt DNA Cytochrome-b gene. **Molecular Biology and Evolution** 10:1196-1214.
- Horn, P. L., J. A. Rafalski, & P. J. Whitehead. 1996. Molecular genetic (RAPD) analysis of breeding magpie geese. **Auk** 113:552-557.
- Houde, P., A. Cooper, E. Leslie, A. E. Strand, & G. A. Montaña. 1997. Phylogeny and evolution of 12S rDNA in Gruiformes (Aves). Pages 121-158. **En: Avian molecular evolution and systematics.** (D. P. Mindell, Ed.). Academic Press New York.
- Howell, N. 1989. Evolutionary conservation of protein regions in the proton-motive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis. **Journal of Molecular Evolution** 29:157-169.
- Hudson, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. **Oxf. Surv. Evol. Biol.** 7:1-44.
- Huston, M. A. 1994. **Biological diversity. The coexistence of species on changing landscapes.** Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Irwin, D. M., T. H. Kocher, & A. C. Wilson. 1991. Evolution of cytochrome-b gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution** 32:128-144.
- Jannesson, E. W. 1981. **Patterns of Vertebrate Biology,** Springer-Verlag Pub., New York.
- Keast, A. 1973. Comparisons of contemporary mammal faunas on southern continents. Pages 19-87. **En: Evolution, mammals, and southern continents** (A. Keast, F. C. Erk, and B. Glass, Eds.). State University of New York Press, Albany.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 16:111-120.
- King, W.B. 1981. **Endangered Birds of the World.** Vol 2. The ICBP Bird Red Data Book. Smithsonian Institution Press & The International Council for Bird Preservation. Washington, D.C.
- Komegay, J. R., T. D. Kocher, L. A. Williams. & A. C. Wilson. 1993. Pathways of lysozyme evolution inferred from the sequences of cytochrome b in birds. **Journal of Molecular Evolution** 37:367-379.
- Longmire, J. L., M. Maltbie, & R. J. Baker. 1997. Use of "lysis buffer" in DNA isolation and its implications for museum collections. **Occas. Papers Mus. Texas Tech Univ,**

163: 1-3.

- Lynch, M. & B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology** 3:91-100.
- Mayr, G. 1999. A new trogon from middle oligocene of Céreste, France. **The Auk** 166: 427434.
- Mindell, D. P., M. D. Sorenson, C. J. Huddleston, H. C. Miranda, A. Knight, S. J. Sawchuk, & T. Yuri. 1997. Phylogenetic relationships among and within selected avian orders based on mitochondrial DNA. Pages 213-247 **En: Avian molecular evolution and systematics.** (D. P. Mindell, Ed.). Academic Press New York.
- Miyamoto, M. M., and S. M. Boyle. 1989. The potential importance of mitochondrial DNA sequence data to eutherian phylogeny. Pages 437-450 **En: The hierarchy of life** (B. Fernholm, K. Bremer, and H. Jornvall, Eds.). Elsevier, Amsterdam.
- Monge-Najera, J., & F. Hernández. 1994. Spatial organization of the structural color system in the quetzal, *Pharomachrus mocinno* (Aves: Trogonidae) and evolutionary implications. **Revista de Biología Tropical** 42 (Supl. 2):131-139.
- Moore, W. S., & V. R. DeFilippis. 1997. The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. Pages 83-120. **En: Avian molecular evolution and systematics.** (D. P. Mindell, Ed.). Academic Press New York.
- Nei, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics.** Columbia Univ. Press, New York.
- Nei, M., & W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76:5269-5273.
- Nei, M., & S. Kumar. 2000. **Molecular Evolution and Phylogenetics.** Oxford University Press.
- NOM-059-ECOL-1994. **Diario Oficial de la Federación.** 16 de mayo de 1994. Norma Oficial Mexicana (Nom-Ecol-1394). Lista de especies en peligro de extinción. México, D. F. México.
- Nunn, G. B., & J. Cracraft. 1996. Phylogenetic relationships among the major lineages of the birds-of-paradise (Paradisaeidae) using mitochondrial DNA gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 5:445-459.
- Nunn, G. B., J. Cooper, P. Jouventin, C. J. R. Robertson, & G. G. Robertson. 1996. Evolutionary relationships among extant albatrosses (Procellariiformes: Diomedidae) established from complete cytochrome-b gene sequences. **Auk** 113:784-801.
- Ogilvie-Grant, W. R. 1892. Catalogue of the Picariae in the collection of the British Museum. Pages 429-502 **En: Catalogue of the birds in the British Museum, vol. 17.** British Museum (Natural History), London.
- O'Brien, S. J., M. E. Roelke, L. Marker, A. Newman, C. A. Winkler, D. Meltzer, L. Colly, J. F. Evermann, M. Bush, & D. E. Wildt. 1985. Genetic basis for the species vulnerability in the cheetah. **Science** 227:1428-1.434.

- Olson, S. L. 1976. Oligocene fossils bearing on the origins of the Todidae and Momotidae (Aves: Coraciiformes). **Smithsonian Contributions to Paleobiology** 27:111-119.
- Olson, S. L. 1985. The fossil record of birds. Pages 79-238 **En:** Avian biology, vol. 8 (D. S. Farner, J. R. King, and K. C. Parkes, Eds.). Academic Press, London.
- Parkes, K. C. 1970. A revision of the Philippine Trogon (*Harpactes ardens*). **Natural History Bulletin of the Siam Society** 23:345-352.
- Paterson, I. G. & M. Snyder. 1999. Molecular genetic (RAPD) analysis of Leach's Storm Petrels. **Auk** 136:338-344.
- Petres, J. L. 1945. **Check-list of birds of the world**, vol. 5. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Potts, R., & A. K. Behrensmeyer. 1992. Late Cenozoic terrestrial ecosystems. Pages 419-541 **En:** Terrestrial ecosystems through time. Evolutionary paleoecology of terrestrial plants and animals (A. K. Behrensmeyer, J. D. Damuth, W. A. DiMichele, R. Pons, H. D. Sues, and S. L. Wing, Eds.). University of Chicago Press, Chicago.
- Prayer, E.M. & A.C. Wilson. 1988. Ancient origin of lactalbumin from lysozyme: Analysis of DNA and amino acid sequences. **Journal of Molecular Evolution** 27:326-335.
- Prum, R. O., R. L. Morrison, & G. R. Ten Eyck. 1994. Structural color production by constructive reflection from ordered collagen arrays in a bird (*Philepitta castanea*: Eurylaimidae). **Journal of Morphology** 222:61-72.
- Prum, R. O., R. H. Torres, S. Williamson, & J. Dyck. 1998. Coherent light scattering by blue feather barbs. **Nature** 396:28-29.
- Quinn, T. W. 1992. The genetic legacy of mother goose: Phylogeographic patterns of Lesser Snow Goose *Chen caerulescens caerulescens* maternal lineages. **Molecular Ecology** 1:105-117.
- Ridgway, R. 1911. The birds of North and Middle America vol V. U. S. **National Museum Bulletin** 50:729-859.
- Ronquist, F. 1994. Ancestral areas and parsimony, **Systematic Biology** 43:267-274. Ronquist, F. 1995. Ancestral areas revisited. **Systematic Biology** 44:572-575.
- Sharpe, R. B. 1900. **A hand-list of the genera and species of birds**, vol. 11. British Museum (Natural History), London.
- Schluter, D. 1988. The evolution of finch communities on islands and continents: Kenya vs. Galapagos. **Ecological Monographs** 58:229-249.
- Singer-Sam, J., R. L. Tanguay, & A. D. Riggs. 1989. Use of Chelex to improve PCR signals from a small number of cells. **Amplifications a forum for PCR users**. 3:11.
- Sibley, C. G. 1955. **A synopsis of the birds of the world. A manual of systematic**

ornithology. Cornell University. Ithaca, New York.

Sibley, C. G., & J. E. Ahlquist. 1990. **Phylogeny and classification of birds. A study in molecular evolution.** Yale University Press, New Haven, Connecticut.

Sibley, C.G. & B.L. Monroe. 1990. **Distribution and classification of the birds of the world.** Yale Univ. Press. New Haven, Connecticut.

Skutch, A.F. 1942. Life history of the Mexican Trogon. **Auk** 59: 341-363. Skutch,

A.F. 1944. Life history of the Quetzal. **Condor** 46: 213-235.

Skutch, A.F. 1948. Life history of the Citreoline Trogon. **Condor** 50: 137-147.

Slatkin, M. 1989. Detecting small amounts of gene flow from phylogenics of alleles. **Genetics** 121:609-612.

Smith, M. F., W. K. Thomas, & J. L. Patton. 1992. Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent. **Molecular Biology and Evolution** 9:204215.

Springer, M. S., & E. Douzery. 1996. Secondary structure and patterns of evolution among mammalian mitochondrial 12S rRNA molecules. **Journal of Molecular Evolution** 43:357-373.

Springer, M.S., L.J. Hollar, & A. Burk. 1995. Compensatory substitutions and the evolution of the mitochondrial 12S rRNA gene in mammals. **Molecular Biology and Evolution** 12:1138-1150.

Solórzano S. 1995. Fenología de 77 especies arbóreas y su relación con la migración altitudinal del quetzal (*Pharomachrus mocinno mocinno* De la Llave 1832), en la *Reserva* de la Biosfera El Triunfo, Chiapas, México. **Tesis de Licenciatura.** Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F. México.

Springer, M. S., & E. Douzery. 1996, Secondary structure and patterns of evolution among mammalian mitochondrial 12S rRNA molecules. **Journal of Molecular Evolution** 43:357-373.

Stanley, S.E. & R.G. Harrison. 1999. Cytochrome b evolution in birds and mammals: An evaluation of the avian constraint hypothesis. **Molecular Biology and Evolution** 16:1575-1585,

Stiassny, M. L. J. & M. C. C. de Pinna. 1994. Basal taxa and the role of cladistic patterns in the evaluation of conservation priorities: a view from freshwater. **In:** Systematics and conservation evaluation (*P. L. Forey, C. J. Humphries, and R. I. Vane-Wright*). Systematics Association special volume 50:235-249. Clarendon Press, Oxford.

Sueoka, N. 1988. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 85:2653-2657,

Swainson, W. 1837. **On the natural history and classification of birds**, vol. 2. Longman, Reos, Orme, Brown, Green, and Longman, London.

- Swofford, D. L. 2000. **PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)**, version 4.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationships of DNA sequences in finite populations. **Genetics** 105:437-460.
- Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. **Theor. Popul. Biol.** 7:256-275.
- Welty, J. C. 1975. **The life of birds**. 2nd. Edition W, B. Saunders co. Philadelphia.
- Wheeler, W. & D. Gladstein. 1992. **MALIGN** version [1.99](#). **Amer. Mus. Nat. Hist. New York**.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, & S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrare primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research** 18: 6531-6535.
- Zimmer, J. T. 1948. Studies of peruvian birds (No. 53): The family Trogonidae. **American Museum Novitates** 1380:1-56.