



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS, OPCIÓN: RECURSOS BIÓTICOS**

Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales

**FILOGEOGRAFÍA Y GENÉTICA DEL PAISAJE DE
Thryophilus sinaloa (AVES: Troglodytidae)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M.C. ANDREIA MALPICA TOPETE

Directora de tesis: Dra. Clementina González Zaragoza



Morelia, Michoacán, mayo de 2023

AGRADECIMIENTOS

La realización y conclusión de esta tesis fue posible gracias al apoyo de distintas Instituciones, fuentes de financiamiento y a la colaboración de muchas personas.

Agradezco sinceramente a mi asesora la Dra. Clementina González Zaragoza por haberme dado la confianza y la oportunidad de desarrollar mi proyecto doctoral bajo su dirección y apoyarme con todos los recursos necesarios para concluir esta tesis. Por su acompañamiento tanto en salidas de campo como por las enseñanzas en mi formación académica. Por compartir el gusto por las aves, espero que las colaboraciones en temas de interés mutuo sigan después de concluir esta fase.

A los miembros de mi comité tutorial, los doctores Antonio González Rodríguez, Rodolfo Pérez Rodríguez, Rafael Hernández Guzmán y la Dra. Yessica Rico Mancebo del Castillo por sus contribuciones en el desarrollo de este proyecto y por haberme asesorado con dudas puntuales. También por haber leído esta tesis y haber hecho valiosos comentarios que contribuyeron a mejorarla.

A la Dra. Carla Gutiérrez Rodríguez por haberme apoyado para poder hacer uso de la Plataforma de Servicios Bioinformáticos del Instituto de Ecología A. C (Inecol) para analizar los datos genómicos. Al M. en C. Emanuel Villafán de la Torre por haberme capacitado en el uso del cluster “Huitzilín” así como por haberme ayudado con dudas sobre su correcto uso. Al Dr. Luis Mendoza Cuenca (UMSNH) por la capacitación y asesoría en los análisis de reflectancia. A la Dra. Denise Spaan por su curso para obtención de financiamiento y la orientación en las propuestas de financiamiento sometidas pues fue de mucha ayuda. A los doctores Juan Francisco Ornelas (Inecol) y Dinesh Rao (Universidad Veracruzana) por el préstamo del espectrofotómetro.

A los doctores Laura y Fernando Villaseñor (Colección Ornitológica, UMSNH), Dr. Carlos Almazán- Nuñez (Colección Regional de Aves, UAGro), Dra. Patricia Escalante (Colección Nacional de Aves, IBUNAM), Dra. Blanca Hernández-Baños (Museo de Zoología Alfonso L. Herrera, UNAM) y a la Dra. Sharon Birks (Burke Museum), por su apoyo con donaciones de tejidos, plumas y acceso a museos para medir especímenes. Al Dr. James Maley (Moore Laboratory of Zoology, Occidental College) por su apoyo en la logística para hacernos llegar los tejidos donados por el Burke Museum.

A la Dra. Katherine Renton y el staff de la Estación de Biología Chamela (IBUNAM), Arquitecto Ari Nieto y Biól. Edgar Gómez Carmolinda del Rancho CIQALA, Dra. Martha E. López-Araiza (UAGro), Biól. Lydia Lozano (Naturaleza y Cultura Internacional) y el staff de la Reserva Monte Mojino, al Parque Ecológico Huilotán, Biól. Alejandra Monsiváis (Estudiantes Conservando la Naturaleza AC), Biól. Said Felix (EcoKaban), Biól. Luis Morales-Vallín (San Pancho Bird Observatory) y a Franceli Macedo de Rancho Los Curindales por su apoyo en la logística durante las colectas de campo. A la SEMARNAT y SENASICA por los permisos otorgados para las colectas de campo e importación de tejidos respectivamente.

Las colectas de campo fueron posibles gracias a la colaboración y apoyo de varias personas: Francisco Ruz, Francisco Pérez, Said Felix, Sergio Villaverde, Alejandra Monsiváis y F. García, Luz Zamudio, Ulises Alexandre, Alberto Sánchez, Adrián Ceja, Verónica González, Franceli Macedo, Sara Covarrubias, Antonio Accini, Mariana Hernández, Ricardo Ramírez, Damián Berra, Tomás Radilla y Diana Vega.

A Sara Covarrubias, Jessica Pérez-Alquicira, Víctor Piñeros y Christian Morán Titla su apoyo en los análisis genómicos. A Luz Zamudio, Sara Covarrubias, Martha E. Mejía, Christian Morán Titla, Alejandro Flores Manzanero y Xochiquetzal Cortés por su apoyo en análisis estadísticos y del paisaje.

A Sara Covarrubias y M. en C. Violeta Patiño (UNAM) por su apoyo en la extracción de ADN. A la Dra. Carla Sánchez de la UdeG por haber permitido usar su laboratorio, materiales y equipo para realizar el sexado molecular de los individuos colectados. A la secretaria Patricia Liliana Cerritos por su amabilidad para asesorarme en los tramites del posgrado.

A mis amigos de laboratorio Martha, Ari, Christian por apoyarme en el proceso y especialmente a Sarita por ir juntas de la manita. A l@s chich@s y mi familia que me echaron siempre porras. A mi hermano que me ayudó con la revisión de inglés de un artículo.

A mi mamá ya que siempre me ha demostrado que podemos ponerle buena cara a la vida, no importando lo difícil que puedan ser las circunstancias. Te admiro mucho y agradezco que estemos juntas en el camino.

A mi hermosa familia, mis hijos Alí y Matías y muy especialmente a mi esposo Ricardo. Gracias por amarme, acompañarme, apoyarme, alentarme y no dejarme caer durante esta intensa etapa. Los amo profundamente y doy gracias por estar juntos en esta vida. A ustedes mis amores les dedico este trabajo porque fue un esfuerzo de todos para que lograra mi meta académica.

A todos los *Thryophilus sinaloa* capturados que fueron el centro de esta bonita investigación.

Se agradece a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Doctorado en Ciencias Biológicas por haberme aceptado en su programa. Al Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales (INIRENA) por el apoyo logístico y uso de sus instalaciones para realizar parte de esta tesis. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada (No. becario 250341) así como el financiamiento del proyecto PDCPN 2015-1250 otorgado a la Dra. Clementina González Zaragoza con el cual fue posible cubrir gastos relacionados a este proyecto. A la American Ornithological Society (Alexander Wetmore Memorial Research Award) y National Geographic Society (Early Career Grant EC-61696R-19) por los financiamientos que se me otorgaron para realizar parte de esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN GENERAL	5
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	9
Factores que promueven la diferenciación genética y fenotípica	9
Representaciones reducidas del genoma	12
El bosque tropical caducifolio del Pacífico mexicano	13
El papel de los cambios climáticos del Pleistoceno en la diferenciación genética	14
Amenazas del bosque tropical caducifolio	15
Especie de estudio	16
OBJETIVOS	19
CAPÍTULO I	21
Landscape anthropization explains genetic structure of an endemic Mexican bird (<i>Thryophilus sinaloa</i> : Troglodytidae) across the Tropical Dry Forest biodiversity hotspot	
CAPÍTULO II	79
Filogeografía del Saltapared Sinaloense en el bosque tropical caducifolio del Pacífico mexicano: buscando señales de selección	
CAPÍTULO III	137
Color and morphological differentiation in the Sinaloa Wren (<i>Thryophilus sinaloa</i>) in the tropical dry forests of Mexico: the role of the environment and geographical isolation	
DISCUSIÓN GENERAL	168
REFERENCIAS GENERALES	178
ANEXO	190

RESUMEN GENERAL

Determinar los factores que promueven la diferenciación genética y fenotípica intraespecífica ha sido una de las preguntas fundamentales en biología evolutiva. Esta diferenciación puede ser impulsada por la restricción del flujo genético debido a barreras geográficas o barreras transitorias asociadas a cambios climáticos históricos, afectando la distribución de las especies. La diferenciación genética y fenotípica también puede ser afectada por el aislamiento debido a la transformación contemporánea de los paisajes por actividades humanas. De manera adicional, la variación fenotípica y/o genética puede ser el resultado de la selección natural divergente a lo largo de gradientes ambientales (i.e. adaptación local). La influencia tanto de los factores neutrales (flujo y/o deriva genética) como selectivos (adaptación local) en la diferenciación intraespecífica puede ser estudiada bajo diferentes escalas temporales y espaciales. En este proyecto utilicé como modelo de estudio a *Thryophilus sinaloa* (Troglodytidae), un ave territorial endémica de México, fuertemente asociada al bosque tropical caducifolio (BTC), para abordar preguntas que ayuden a entender los factores que promueven la diferenciación fenotípica y genética en este ecosistema mega diverso pero también altamente amenazado por perturbación humana. En el primer capítulo, usando polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs) y a una escala geográfica de paisaje, estudié cómo la heterogeneidad de un paisaje contemporáneo se relaciona con los patrones de estructuración genética para identificar elementos del paisaje que facilitan o limitan el movimiento de genes y por lo tanto de individuos. En el segundo capítulo, usando SNPs neutrales, estudié el papel de los cambios climáticos del Pleistoceno en explicar los patrones de variación y estructuración genética (neutral) de la especie a lo largo de su distribución. También identifiqué loci bajo selección que podrían potencialmente sugerir señales de adaptaciones a las condiciones ambientales locales. Finalmente, en el tercer capítulo estudié el papel que tiene tanto la variación en las condiciones ambientales como el aislamiento geográfico en promover la diferenciación fenotípica de la especie a lo largo de su distribución. Analicé también, la variación fenotípica en el contexto de las reglas ecogeográficas clásicas (Bergmann, Allen, Gloger y Bogert) y probé el conservadurismo de nicho entre subespecies. Los resultados del primer capítulo revelan que, a una escala de paisaje, las poblaciones están genéticamente estructuradas en dos grupos y que elementos del paisaje asociados a áreas abiertas (i.e. pastizales, suelos expuestos y asentamientos humanos) junto con la distancia geográfica reducen la conectividad genética entre las poblaciones. En el segundo capítulo identifiqué más de cien loci bajo selección. Los resultados muestran que la diversidad genética varía entre subespecies decreciendo de sur a norte. Los análisis sugieren que el número más probable de grupos genéticos es 3, lo cual corresponde a la delimitación de las subespecies, y que hay mayor estructura genética con los datos neutrales que con los selectivos. Con los datos neutrales las subespecies *cinereus* y *sinaloa* forman grupos genéticos distintos mientras que con los datos selectivos dichas subespecies forman un mismo grupo genético. Con ambos juegos de datos la subespecie *russeus* (al extremo sur de la distribución) está subestructurada en dos grupos genéticos. Los modelos de nicho ecológico sugieren que los cambios climáticos del Pleistoceno afectaron la distribución de la especie. Durante el Último Máximo Glacial (21,000 años) hubo una contracción al norte de la distribución con una posterior colonización hacia el norte. Durante el Último Interglacial (140,000-120,000 años), las áreas de distribución de las subespecies *cinereus* y *sinaloa* (norte y centro de la distribución) eran más restringidas que en la actualidad. La distribución actual

de la especie es más amplia que en el pasado. Finalmente, los resultados del tercer capítulo sugieren que el ambiente en conjunto con la distancia geográfica explican la mayor parte de la variación fenotípica de la especie a lo largo del BTC. Los resultados no dieron soporte a las reglas de Bergmann y Allen en el tamaño corporal y de las extremidades respectivamente. Hubo un soporte parcial a la regla de Gloger para plumajes más oscuros en ambientes más húmedos. El efecto de la temperatura en la coloración del plumaje fue más consistente con la regla de Bogert. Finalmente, detecté divergencia de nicho entre algunas de las subespecies. En conjunto los resultados obtenidos en esta tesis permiten entender los diferentes factores (i.e. heterogeneidad del paisaje, barreras climáticas transitorias, el ambiente y distancia geográfica) que a diferentes escalas espaciales y temporales son importantes en promover la diferenciación tanto genética como fenotípica de *Thryophilus sinaloa* en el BTC, lo cual puede ser útil para priorizar estrategias de conservación para este ecosistema biodiverso y altamente amenazado.

Palabras clave: aves; variación climática; geografía; divergencia de nicho; variación fenotípica; SNPs, variación genómica, cambios climáticos Pleistoceno.

SUMMARY

To determine the factors that explain intraspecific genetic and phenotypic differentiation has been a fundamental question in evolutionary biology. This differentiation can be explained by gene flow restriction due to geographic barriers or by historical climatic changes, affecting the species' distribution. Genetic and phenotypic differentiation could also be result of the contemporary landscape transformation due to human activities. Additionally, phenotypic and/or genetic variation may be the result of divergent natural selection along environmental gradients (i.e. local adaptation). The influence of both neutral (gene flow and/or genetic drift) and selective (local adaptation) factors on intraspecific differentiation can be studied under different temporal and spatial scales. In this project, I used *Thryophilus sinaloa* (Troglodytidae), an endemic territorial bird of Mexico, strongly associated with tropical deciduous forest (TDF) as a study model. I addressed questions that help to understand the factors that promote phenotypic and genetic differentiation in the TDF, a mega diverse ecosystem but also highly threatened by human disturbance. In the first chapter, at a landscape scale and using single nucleotide polymorphisms (SNPs), I studied how landscape heterogeneity promotes genetic structure by identifying landscape elements that facilitate or limit gene flow and therefore the movements of individuals. In the second chapter, using neutral SNPs, I studied the role of Pleistocene climatic changes in explaining the patterns of neutral genetic structure of the species across its distribution. I also identified loci outliers that could potentially suggest signs of adaptations to local environmental conditions. Finally, in the third chapter I studied the role that the variation in environmental conditions and geographic isolation has in promoting phenotypic differentiation of the species across its distribution. I also analyzed phenotypic variation in the context of classical ecogeographic rules (Bergmann, Allen, Gloger and Bogert) and tested for niche conservatism between subspecies. Results of the first chapter reveal that, at a landscape scale, populations are genetically structured into two groups and that open areas (i.e. grasslands, exposed soils, and human settlements) along with geographic distance reduce genetic connectivity between populations. In the second chapter I found over a hundred loci under selection. Results show that genetic diversity varied between subspecies, decreasing from south to north, and that the most likely number of genetic groups was 3, corresponding to the subspecies described. Results also suggest that there is a higher genetic structure with the neutral data than with the selective. With the neutral data the *cinereus* and *sinaloa* subspecies form different genetic groups, while with the selective data these subspecies form a single genetic group. With both data sets the subspecies *russeus* (at the southern limit of the distribution) was split into two genetic groups. Ecological niche models suggest that Pleistocene climate changes affected the distribution of the species. During the Last Glacial Maximum (21,000 years) there was a contraction to the north of the distribution with a subsequent northern colonization. During the Last Interglacial (140,000-120,000 years), the distribution of the *cinereus* and *sinaloa* subspecies (northern and central distribution) were more restricted than at present. The current distribution of the species is wider than in the past. Finally, the results of the third chapter suggest that the environment together with the geographical distance explain most of the phenotypic variation of the species throughout the TDF. The results did not support the Bergmann and Allen rules for body and limb size, respectively. There was partial support for Gloger's rule for darker plumages in more humid environments. The effect of temperature on plumage coloration was more consistent with Bogert's rule. Finally, I detected niche

divergence between some of the subspecies. Taken together, the results obtained in this thesis allow us to understand the different factors (i.e. heterogeneity of the landscape, transitory climatic barriers, environment and geographical distances) that at different spatial and temporal scales are important in promoting both genetic and phenotypic differentiation of *Thryophilus sinaloa*.

Keywords: birds; climatic variation; geography; niche divergence; phenotypic variation; SNPs, genomic variation, Pleistocene climate changes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Factores que promueven la diferenciación genética y fenotípica

El estudio de los factores evolutivos y ecológicos que promueven la variación fenotípica y genética intraespecífica, así como su distribución en el espacio geográfico es uno de los temas centrales en el estudio de la biología (Schluter 2001, 2009; Rundle & Nosil 2005; Sobel et al. 2010). Los patrones de variación genética y fenotípica intra e interespecífica son moldeados por diversos factores tales como el aislamiento debido a barreras geográficas o a la distancia geográfica, los cambios climáticos históricos los cuales pueden aislar o (re)conectar la distribución de las poblaciones, los cambios contemporáneos en el flujo genético debido a la heterogeneidad en los paisajes, así como la interacción con los ambientes locales (e.g. Bradburd et al. 2013; Wang & Bradburd 2014; Weber et al. 2017; Moreira et al. 2020). El papel que tiene cada uno de dichos factores en estructurar geográficamente la variación fenotípica y/o genética no es mutuamente excluyente ya que pueden potencialmente operar en conjunto (e.g. Colombelli-Négrell 2016; Friis et al. 2018; Malpica et al. 2022). Entender el grado en que cada uno de estos factores influye en la diferenciación de las poblaciones y potencialmente en los procesos de especiación es importante porque puede ayudar a promover la conservación y mantenimiento de los ecosistemas a largo plazo y por lo tanto la conservación de la diversidad genética de las especies que en ellos habitan.

A partir de los factores antes mencionados (i.e. distancia geográfica, barreras geográficas, cambios climáticos históricos, heterogeneidad del paisaje e interacción con el ambiente) se pueden proponer escenarios o hipótesis alternativas para explicar los patrones de diferenciación genética y fenotípica. Por ejemplo, los patrones de diferenciación pueden

ser el resultado del aislamiento por distancia (Isolation by distance, IBD; Wright 1943), donde los individuos están más diferenciados a mayor distancia geográfica. Factores históricos, como la presencia de barreras geográficas (e. g. cadenas montañosas), o barreras transitorias causadas por los cambios climáticos pasados (e. g. aislamiento o reconexión entre poblaciones durante periodos glaciales del Pleistoceno), pueden promover la diferenciación (e. g. Vasconcellos et al. 2019). La heterogeneidad en un paisaje (e.g. presencia de cultivos, zonas urbanas, ríos, tipos de vegetación, carreteras, etc.) puede promover o restringir el movimiento de los individuos y por lo tanto el flujo genético entre poblaciones promoviendo así la diferenciación genética, modelo conocido como aislamiento por resistencia (Isolation by Resistance, IBR; McRae 2006). A su vez, la interacción de los organismos con el ambiente también puede explicar los patrones de diferenciación donde las diferencias fenotípicas o genéticas incrementa en función de las diferencias ambientales (Isolation by Environment, IBE; Orr & Smith 1998; Schneider et al. 1999; Wang & Bradburd 2014). En las hipótesis de IBR, por factores históricos e IBE, la panmixia (i. e. el apareamiento aleatorio entre individuos) es la hipótesis nula, mientras que el aislamiento por distancia (IBD) es una de las hipótesis alternativas a probar para determinar cuál factor podría explicar mejor los patrones de diferenciación genética y/o fenotípica.

En las hipótesis de IBD, por factores históricos e IBR, la divergencia entre poblaciones es debida a fuerzas evolutivas neutrales tales como la deriva génica y/o mutación, donde la restricción de flujo genético puede promover la divergencia entre las poblaciones en un periodo de tiempo dado. La divergencia fenotípica y/o genética puede también ser el resultado de la selección natural divergente a lo largo de gradientes ambientales (Endler 1977). Este proceso, conocido como adaptación local, puede ser el

catalizador de la especiación reduciendo el flujo genético entre poblaciones que habitan en condiciones ambientales distintas (Doebeli & Dieckmann 2003; Sobel et al. 2010).

La mutación, deriva génica y selección natural afectan de distinta manera al genoma (Wu 2001; Burri et al. 2015; Samuk et al. 2017). La mutación y la deriva genética producen señales a lo largo del genoma, mientras que la selección natural actúa en regiones que afectan la adecuación de los individuos (e. g. regiones codificantes y reguladoras; Feder et al. 2012). De este modo, en escenarios de aislamiento por distancia (IBD), por factores históricos o por resistencia (IBR) se esperan señales a lo largo del genoma, mientras que el aislamiento por ambiente (IBE) tiende a afectar regiones que se expresan fenotípicamente (Coop et al. 2010; Le Corre & Kremer 2012; Savolainen et al. 2013), donde es posible encontrar valores de diferenciación superiores (loci outliers) a aquellos explicados por los efectos neutrales (loci neutrales).

A nivel fenotípico, si no se cuenta con la información exacta de la heredabilidad de un rasgo, separar los efectos de la deriva, la selección natural y la plasticidad fenotípica es complejo (Mitchell-Olds et al. 2007; Zamudio et al. 2016). Por ejemplo, si la variación fenotípica coincide con barreras geográficas o está positivamente relacionada con la distancia geográfica, ésta podría ser principalmente explicada por la deriva genética. Por otro lado, si es explicada mayormente por la variación ambiental, podría ser un indicador de que la adaptación local está actuando. Sin embargo, la variación fenotípica relacionada al ambiente puede también ser el resultado de la plasticidad fenotípica, variación que no es explicada por las diferencias genéticas (Pfennig et al. 2010; Gruber et al. 2013). Por lo tanto, reunir información sobre la variación fenotípica, variación genética y ecológica puede ayudar a entender los mecanismos que promueven los patrones de diferenciación genética y fenotípica (Cicero & Koo 2012; Rausher & Delph 2015; Cabanne et al. 2014).

La mayoría de las investigaciones sobre la variación fenotípica de las aves se han llevado a cabo en el contexto de especies distribuidas a lo largo de gradientes ambientales altitudinales, a lo largo de una amplia distribución geográfica (e. g. Malpica & Ornelas 2014; Rheindt et al. 2011; Nuñez-Zapata et al. 2018) o con distribución disyunta (e. g. González et al. 2011; Zamudio-Beltrán et al. 2022). Sin embargo, los efectos del ambiente y el aislamiento geográfico en la variación fenotípica de especies que habitan ecosistemas continuamente distribuidos a lo largo de gradientes ambientales latitudinales han sido escasamente explorados (pero ver Arbeláez-Cortés et al. 2014a,b; Chavarría-Pizarro 2019). Los estudios de diferenciación fenotípica acompañados de pruebas de divergencia de nicho que ayudan a determinar si hay una retención del nicho ambiental ancestral (i.e. conservadurismo de nicho) o adaptación a diferentes condiciones ambientales (i.e. divergencia de nicho) han sido útiles para identificar los procesos que pueden conducir a la diferenciación entre linajes (Cicero & Koo 2012). La evidencia desde múltiples perspectivas podría ayudar a identificar el papel de la adaptación local, en la que la selección natural divergente promueve la diversificación a través de la adaptación a nuevos entornos (Endler 1977).

Representaciones reducidas del genoma

Con el rápido desarrollo de la tecnología, es posible obtener una representación reducida del genoma sin tener un genoma de referencia. Una de las técnicas más usadas es la de Restriction-site-Associated DNasequencing (RAD-seq) (Miller et al. 2007), en la que se pueden obtener cientos o miles de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). Los SNPs son marcadores moleculares que varían en un solo nucleótido, se encuentran distribuidos por todo el genoma y tienen herencia biparental (Morin et al. 2004). Con los SNPs es posible

obtener información de loci neutrales (i.e. afectados por fuerzas evolutivas neutrales como la deriva génica) y loci bajo selección (i.e. afectados por la selección natural), con lo cual es posible separar el efecto de los procesos neutrales y selectivos que promueven la divergencia. Adicionalmente, con la gran cantidad de información (a menudo cientos o miles de SNPs) que se puede obtener a lo largo del genoma, podemos inferir patrones de estructuración genética tanto a escalas geográficas relativamente pequeñas o amplias y en tiempos contemporáneos o históricos.

El bosque tropical caducifolio del Pacífico mexicano

En México, el bosque tropical caducifolio (BTC) es uno de los ecosistemas más extensos y bien representados (Rzedowski 1978). Se distribuye de manera más o menos continua sobre extensas áreas desde Sonora hasta Chiapas a lo largo de la vertiente del Pacífico (Becerra 2005), sin barreras geográficas aparentes para la dispersión de distintos organismos incluidas las aves (excepto la fragmentación contemporánea). Los BTC mesoamericanos son reconocidos como ecosistemas terrestres con altos niveles de riqueza de especies, endemismo y especialización (García-Marmolejo et al. 2008; Ceballos et al. 2010; Ríos-Muñoz & Navarro-Sigüenza 2012; Prieto et al. 2019). Los BTC a lo largo de la vertiente del Pacífico en el oeste de México y América Central albergan 42 especies de aves endémicas (Gordon & Ornelas 2000); muchas de las cuales muestran variación fenotípica subespecífica (Dickinson 2003), lo que podría sugerir etapas tempranas en el proceso de especiación.

Los BTC se caracterizan por una marcada estacionalidad, presentado una severa estación seca de cinco a ocho meses consecutivos y una estación lluviosa donde se presenta la mayor parte de la precipitación (Rzedowski 2006). Una adaptación de la vegetación a esta marcada estacionalidad es la senescencia de las hojas durante la estación seca y la producción

de follaje nuevo durante la estación lluviosa (Murphy & Lugo 1986). Además, a través de la distribución de los BTC a lo largo de la vertiente del Pacífico mexicano, se ha descrito una alta variabilidad en las condiciones ambientales (ver capítulo 3), como los regímenes de temperatura y precipitación, así como la estructura y composición de la vegetación (Trejo-Vásquez 1998; Trejo & Dirzo 2002; Rzedowski 2006). Es probable que esta alta variabilidad podría exponer a las poblaciones a diferentes presiones selectivas (ambientales) que podrían explicar la divergencia genética y fenotípica de algunas de las especies que habitan en él debido a adaptaciones locales.

El papel de los cambios climáticos del Pleistoceno en la diferenciación genética

Otra de las hipótesis que se han planteado para explicar el origen de la gran diversidad y endemismos de diversos taxa en el BTC es la de los refugios del Pleistoceno (Haffer 1969). Dicha hipótesis postula que durante los periodos alternos del Pleistoceno (glaciales-interglaciales), la distribución de especies cambió cíclicamente en respuesta a las bajas temperaturas a nivel mundial y regímenes de lluvia reducidos (Haffer 1969; Hewitt 1996, 2000). Se ha postulado que, durante los ciclos glaciales, la distribución de los BTC de la cuenca del Amazonas pudo haberse expandido, promoviendo la conectividad mientras que en los periodos interglaciales pudo haberse contraído (Pennington et al. 2000), restringiendo el flujo genético entre las poblaciones. En contraste, en México se ha observado un patrón contrario, donde la distribución de especies de aves asociadas a los BTC parece haberse contraído durante los periodos glaciales (Chora-Castillo et al. 2021).

Amenazas del Bosque Tropical Caducifolio

A pesar de ser reconocidos como un hotspot de biodiversidad, los BTC de México se encuentran entre los ecosistemas más vulnerables y amenazados del mundo debido al impacto humano (Miles et al. 2006), quedando el 30% de la vegetación original, donde solo el 0.2% está bajo protección (Trejo & Dirzo 2000; Portillo-Quintero & Sánchez-Azofeita 2010). Por ejemplo, a lo largo de la costa del Pacífico en México, una de las pocas áreas protegidas de BTC es la Reserva de la Biosfera Chamela-Cuixmala (CCBR). Esta reserva está rodeada por un paisaje heterogéneo que incluye coberturas modificadas por el hombre, pero también por otras áreas no protegidas que aún mantienen una proporción importante de BTC continuo y relativamente intacto. Sin embargo, el papel de las áreas protegidas en la conservación de la biodiversidad a diferentes niveles jerárquicos ha sido cuestionado debido a la baja conectividad con sus áreas circundantes no protegidas, siendo la mayoría de las veces islas dentro de un mar de paisaje fragmentado (Toledo 2005). Debido a lo anterior, existe una necesidad urgente de identificar elementos del paisaje que promuevan el movimiento de organismos y, por lo tanto, el flujo de genes entre las poblaciones dentro de áreas protegidas y sus alrededores para mantener la conectividad y aumentar la persistencia de especies en ecosistemas tropicales en peligro.

Una manera de abordar este problema es a través de la genética del paisaje (GP). Esta disciplina, relativamente reciente (Manel et al. 2003), permite la integración de datos genéticos de alta resolución (como microsatélites y SNPs) con datos espaciales que permiten probar hipótesis sobre los factores que determinan la variación genética, flujo genético y adaptaciones a través de paisajes heterogéneos (Holderegger & Wagner 2006). La GP ha permitido identificar barreras específicas a la dispersión, así como cuantificar el impacto que tiene la fragmentación del hábitat o el cambio del paisaje sobre la diversidad y conectividad

genética de las poblaciones (Storfer et al. 2007), a escalas temporales contemporáneas y a escalas espaciales finas. Sin embargo, los estudios de GP parecieran tener un sesgo taxonómico ya que, a comparación con otros grupos, las aves parecen estar poco representadas, probablemente por la alta vagilidad que las caracteriza en comparación con otros grupos taxonómicos (Kozakiewics et al. 2018). No obstante, estudios recientes en aves han demostrado una alta diferenciación genética incluso en áreas geográficas relativamente pequeñas (e. g. Bertrand et al. 2014; Arnoux et al. 2014; Khimoun et al. 2016, 2017; Graham et al. 2022). De manera particular, los estudios de GP han servido para identificar una variedad de elementos del paisaje (tanto naturales como antropogénicos) que limitan o facilitan la conectividad entre poblaciones de aves (e. g. Alda et al. 2011; Jahner et al. 2016; VanRees et al. 2018; Tan 2018; Khimoun et al. 2016). Desafortunadamente, estos estudios se han centrado principalmente en ecosistemas templados (Storfer et al. 2010; Berkman et al. 2013; Adams & Burg 2015; Dyer 2015; Jahner et al. 2016; Lindsay et al. 2018), mientras que los ecosistemas tropicales, que albergan la mayor diversidad de especies y también tienen las mayores tasas de pérdida de hábitat y fragmentación (Myers et al. 2000; Hansen et al. 2010), han sido menos explorados (pero ver; Storfer et al. 2010; Khimoun et al. 2016, 2017; Miller et al. 2013; Tan et al. 2018).

Especie de estudio

El Saltapared Sinaloense (*Thryophilus sinaloa*, Aves: Troglodytidae) es un ave insectívora endémica de México (Grant 1966), que se distribuye desde Sonora hasta Oaxaca a lo largo de la vertiente del Pacífico (Figura 1) así como en la depresión del Balsas, cubriendo una distancia lineal de aproximadamente 2000 km. La especie está estrechamente asociada a los

BTCs, tal como lo demuestra su selección específica de hábitat para la reproducción (observación personal). Ambos sexos son fenotípicamente similares, pero se ha reportado que los machos son un poco más grandes y pesados que las hembras (Ridgway 1904). Hasta la fecha, se han descrito tres subespecies a lo largo de la distribución de la especie, basadas en diferencias sutiles en la coloración del plumaje, el cual está basado en melaninas (i.e. plumajes cafés, Malpica et al. 2022). *Thryophilus sinaloa cinereus* (Brewster 1889) se distribuye desde el noreste de Sonora y oeste de Chihuahua hasta el norte de Sinaloa; *Thryophilus sinaloa sinaloa* (Baird 1864) ocurre desde el centro de Sinaloa y oeste de Durango hasta Michoacán y *Thryophilus sinaloa russeus* (Nelson 1903) se distribuye en Guerrero y oeste de Oaxaca. Phillips (1986) ha sugerido que hay una subespecie sin describir en las regiones costeras del oeste de Nayarit a Colima o Michoacán, basado en las diferencias de color, particularmente en los flancos. Estas subespecies habitan áreas dentro del BTC que difieren significativamente en sus condiciones ambientales (ver mayores detalles en Malpica et al. 2022) y que podrían exponer a las poblaciones a presiones selectivas divergentes. Adicionalmente, es una especie relativamente común a lo largo de gran parte de su distribución y habita principalmente el sotobosque. Los machos realizan cantos complejos para atraer a las hembras y exhiben un comportamiento fuertemente territorial durante la época reproductiva y supuestamente se dispersan distancias cortas (Grant 1966). Aunque la distancia de dispersión no se conoce exactamente para *T. sinaloa*, un estudio basado en la especie hermana *Thryophilus rufalbus* (Graham et al. 2017), sugiere que la dispersión natal para esta especie es relativamente corta (~600 – 1600 m).



Figura 1. Imagen donde se ilustra la distribución y la variación fenotípica de las tres subespecies de *Thryophilus sinaloa*. Al norte de la distribución se encuentra *T. s. cinereus*, al centro *T. s. sinaloa* y al sur *T. s. russeus*. Dentro del área de distribución de la especie se resalta la variación en las condiciones ambientales con un gradiente de verdes, en donde los tonos más claros corresponden a condiciones más secas (norte) y tonos más oscuros a condiciones más húmedas (sur). La ilustración fue realizada por Ariadna Tobón Sampedro y estuvo basada en fotografías tomadas durante las colectas de campo.

En esta tesis usé al Saltapared Sinaloense como sistema de estudio para entender los factores neutrales y selectivos que promueven su variación fenotípica y genética a lo largo del BTC del Pacífico mexicano a dos escalas geográficas distintas. En el capítulo 1, a una escala geográfica de paisaje, usando datos genómicos (SNPs) y variables del paisaje, estudié el papel de la heterogeneidad del paisaje en explicar los patrones observados de estructuración genética neutral. Particularmente, evalué qué elementos del paisaje (antropogénicos o naturales) promueven o restringen el flujo genético entre las poblaciones

y por lo tanto explican mejor los patrones de estructuración genética actuales. Este capítulo está en revisión en la revista Landscape Ecology. En el capítulo 2, usando también una base de SNPs con la que pude separar loci neutrales y bajo selección a lo largo de la distribución de la especie, estudié el papel de las barreras históricas transitorias asociadas a los cambios climáticos del Pleistoceno en explicar los patrones de variación y estructuración genética (neutral) de la especie a lo largo de su distribución. También identifiqué loci bajo selección que podrían potencialmente sugerir señales de adaptaciones a las condiciones ambientales locales. Finalmente, en el capítulo 3 estudié el papel del ambiente y el aislamiento geográfico en explicar la variación fenotípica de la especie a lo largo de su distribución, usando datos de morfología y coloración, así como variables ambientales. También, analicé la variación fenotípica de la especie en el contexto de las reglas ecogeográficas clásicas (Bergmann, Allen, Gloger y Bogert) y probé el conservadurismo de nicho entre subespecies. Los resultados de este capítulo fueron publicados en la revista Plos One en junio de 2022.

OBJETIVOS

General

Entender los factores neutrales y selectivos que promueven la variación fenotípica y genética en *Thryophilus sinaloa* en el bosque tropical caducifolio a dos escalas geográficas distintas (escala del paisaje y escala de distribución de la especie).

Particulares

CAPÍTULO I

1. A una escala de paisaje, examinar los patrones de diversidad genética en poblaciones de *Thryophilus sinaloa* localizadas dentro del bosque continuo y fragmentado, y examinar patrones de estructura genética.
2. Determinar los niveles de flujo genético contemporáneo entre los grupos genéticos detectados.
3. Identificar los elementos del paisaje que promueven o restringen la conectividad genética a través del paisaje.

CAPÍTULO II

1. Describir la variación y estructura genética neutral de *Thryophilus sinaloa* a lo largo de su distribución.
2. Buscar señales que pudieran sugerir adaptaciones locales, identificando loci outliers a través de genoma y describir la estructura genética con esos loci.
3. Evaluar el papel de las barreras transitorias asociadas a los cambios climáticos del Pleistoceno mediante modelos de nicho ecológico para determinar si éstas pueden explicar la estructura genética neutral encontrada.

CAPÍTULO III

1. Caracterizar la variación fenotípica (morfología y coloración) entre sexos y subespecies.
2. Analizar la relación entre la variación fenotípica y ambiental en el contexto de las reglas ecogeográficas clásicas y cuantificar el papel de ambiente y el aislamiento geográfico, así como su interacción en explicar la variación fenotípica.
3. Evaluar si las subespecies habitan condiciones ambientales similares o distintas mediante pruebas de conservadurismo y divergencia de nicho.

CAPÍTULO I

**Landscape anthropization explains genetic structure of an endemic
Mexican bird (*Thyophilus sinaloa*: Troglodytidae) across the Tropical Dry
Forest biodiversity hotspot**

Manuscrito en revisión en Landscape Ecology

Abstract

Context

Tropical Dry Forests (TDFs) are one of the richest ecosystems but also one of the most threatened due to human activities. In Mexico, a minimal proportion of TDF is conserved in protected areas, typically surrounded by human-modified landscapes. Habitat modification can impact an individual's movement by promoting or restricting gene flow, affecting the populations' genetic structure and ultimately the long-term persistence of natural populations.

Objectives

We examined the influence of landscape features on the genetic structure of *Thryophilus sinaloa*, a common and highly territorial TDF-associated bird species. We conducted our study in a landscape where a protected area exists surrounded by heterogenous human-modified landscape in Mexico.

Methods

We genotyped 90 individuals from 20 localities at 24,549 SNPs derived from 3RADseq and *de novo* assembling techniques to examine the relationship between population genetic patterns and landscape features using a resistance surface optimization framework.

Results

Populations were genetically structured in two groups across the landscape. An open-areas resistance surface, where grasslands, exposed soils, and urbanization were included along

with geographic distance, reduced genetic connectivity across the landscape. This finding suggest that protected areas are partially isolated from the surrounding landscape.

Conclusions

Our research highlights the impact of human-induced activities on the genetic connectivity of a common bird within the altered TDFs. Our study reveals that an important TDF reserve is mostly disconnected from other non-protected areas of continuous forest. The growing deterioration of the habitat could eventually have stronger impacts in genetic patterns in areas where small habitat patches are isolated.

Keywords

Birds, genetic structure, habitat fragmentation, landscape genetics, Sinaloa Wren, SNPs.

Introduction

The process of dispersal plays a vital role in connecting isolated populations, increasing genetic diversity and mitigating inbreeding, but can be affected by landscape features that may restrict gene flow (Ronce 2007). Deforestation and land conversion cause a loss in vegetation continuity, acting as barriers to organismal dispersal between patches of remaining original vegetation. Such habitat discontinuities across landscapes have been shown to reduce genetic diversity, effective population sizes and gene flow, increasing genetic differentiation among previously connected populations and the likelihood of local extinction (Frankham 2005; Keyghobadi 2007). To counteract these negative impacts, the preservation of genetic connectivity is crucial. This ensures the maintenance of sufficient genetic diversity, allowing populations to adapt to changing ecological conditions and increasing their long-term survival prospects (Reed and Frankham 2003; Frankham 2005).

In natural heterogeneous landscapes, the reduction of gene flow could be explained by Isolation By Distance (Wright 1943), or by non-suitable habitat for the species (Isolation By Resistance; McRae 2006), among other factors. Combining population genetics and landscape ecology the relatively new discipline of landscape genetics (LG) offers a framework to explicitly test the effects of landscape features on microevolutionary processes such as gene flow, genetic drift and selection (Balkenhol et al. 2015; Manel et al. 2003; Storfer et al. 2010). LG studies in birds and in most taxa have been focused on temperate forest ecosystems (e.g. Berkman et al. 2013; Adams and Burg 2015; Jahner et al. 2016; Klinga et al. 2020), whereas studies in tropical ecosystems are underrepresented, although recently increasing (e.g. Miller et al. 2013; Capurucho et al. 2013; Olah et al. 2017; Khimoun

et al. 2017; Tan et al. 2018; Ritter et al. 2021; Serrano-Rodríguez et al. 2022; Johnson et al. 2023).

Mesoamerican Tropical Dry Forests (TDFs) are among the terrestrial ecosystems with the highest levels of species richness, endemism, and specialization (Prieto-Torres et al. 2019). Despite being recognized as a biodiversity hotspot, TDFs are among the most threatened and least conserved ecosystems worldwide (Miles et al. 2006), being mostly threatened by deforestation and land conversion for agriculture (Sanchez-Azofeifa et al. 2005; Miles et al. 2006). Protected areas have contributed to stopping ecosystem degradation and maintaining essential ecological processes and biodiversity (Hannah et al. 2007). However, in Mesoamerica only 5.7% of TDFs are conserved within protected areas (Miles et al. 2006; Sanchez-Azofeifa et al. 2013). Moreover, current Mexican protected areas may be insufficient to stop the degradation processes of TDFs, in part because few studies and efforts have helped to establish appropriate conservation strategies for their protection (Trejo and Dirzo 2000). In fact, the efficacy of protected areas in conserving biodiversity at different hierarchical levels (i.e. genes, species, communities and ecosystems) has been questioned due to the low connectivity with their surroundings, being most of the time isolated islands within fragmented landscapes. Therefore, there is an urgent need to analyze the degree to which the protected areas are connected to other habitat patches at their surroundings by identifying landscape features that promote or restrict the movement of organisms, and therefore gene flow. This could help to increase populations and species persistence in tropical threatened ecosystems (e.g. Yumnam et al. 2014; Thatte et al. 2018).

Along the Pacific coast in Mexico, one of the few and important protected areas of TDF is the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve. In terms of biodiversity and concentration

of endemism, this region represents a priority for conservation (Gentry 1982). However, the reserve is surrounded by a highly fragmented heterogeneous landscape that includes human-induced covers but also other non-protected areas that still maintain an important proportion of continuous and relatively undisturbed TDF (Sanchez-Azofeifa et al. 2009). Deforestation in the region began approximately 60 years ago (Sanchez-Azofeifa et al. 2009), and recent analyses of the land use and land cover changes over three decades (1986-2017) indicate a general trend of natural vegetation loss while human-induced covers increase, a trend that is likely to continue in the future (Hernández-Guzmán et al. 2019).

The Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*, Baird 1864) is a common bird from the Family Troglodytidae closely associated with the understories of TDFs in western Mexico. Males exhibit strongly territorial behavior and putatively disperse short distances (Grant 1966). Although exact dispersal distances are unknown for *T. sinaloa*, a study based on the sister species *Thryophilus rufalbus* (Graham et al. 2017), suggests that natal dispersal distances on this species are relatively short (~600 – 1600 m). These characteristics make *T. sinaloa* an ideal study system to determine genetic structure at small geographic scales as well as the effect of landscape features in promoting or restricting genetic connectivity in a heterogeneous human-induced landscape that includes a protected area.

Here, we investigated the influence of landscape features (natural and anthropogenic) in promoting or restricting genetic connectivity of *Thryophilus sinaloa* populations, by employing an integrative approach including genetic, geographic and ecological data. Specifically, in a heterogeneous landscape, composed of large extensions of continuous TDF under protection, large extensions of continuous unprotected TDF and modified areas for anthropic activities in central-western Mexico, we: 1) examined patterns of genetic diversity

between continuous and fragmented TDF, and examined genetic structure patterns of *T. sinaloa* populations across the landscape, 2) determined contemporary levels of gene flow between genetic groups, and 3) identified landscape features that promote or restrict genetic connectivity across the studied landscape.

Due to the high landscape heterogeneity, territoriality, putatively low dispersal, and specific breeding sites of the species, we predicted that populations within large extensions of original continuous TDF will harbor higher levels of genetic diversity and lower levels of inbreeding compared to those situated within fragmented forest. We also predicted genetic differentiation due to gene flow restriction promoted by open anthropogenic-induced open areas such as grasslands, exposed soils, urban areas and two-lane roads as well as natural features such as rivers and higher slope. Our findings will help to understand how landscape features affect genetic connectivity and gene flow of species inhabiting a highly threatened ecosystem, as well as the degree to which the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve is connected to other habitat patches.

Methods

Study species

Thryophilus sinaloa is a common insectivorous bird distributed along the Pacific coast of Mexico. It inhabits the understory of TDF, forest edges, scrub, second growth vegetation, and occasionally plantations (Grant 1966; Soberanes-González et al. 2020). Males perform complex and loud songs to attract females and establish well delimited territories of about 100 m² (Grant 1966; AM and CG personal observation). Although the species' home-range is unknown for the species, an area of 1.8 – 2.4 ha has been estimated for the sister species

Thryophilus rufalbus (Martínez et al. 2011). While dispersal distances for *T. sinaloa* are not known neither, the female-biased natal dispersal of the sister taxon *Thryophilus rufalbus* (females, 1,644 m; males, 675 m; Graham et al. 2017) suggests that *T. sinaloa* which is similar in size and habits could have similar dispersal distances. Furthermore, data from *T. rufalbus* suggests that these dispersal distances have an important influence on spatial genetic structure (Graham et al. 2017).

Study area

The study landscape is located on the Pacific slope of west-central Mexico within the state of Jalisco, encompassing an area of ~1,080 km². The predominant vegetation is TDF, but evergreen forest, mangrove, and gallery forest are also present (hereafter referred as original vegetation), occurring at elevations that ranges from 0 to ~300 m above sea level (m.a.s.l.) (Table 1). Gallery forests associated with rivers and streams are particularly important as they maintain their foliage throughout the year, and serve as important reservoirs of fruits, flowers and water for vertebrate species (Sanchez-Azofeifa et al. 2009).

The region has been highly transformed due to human activities since the late 1960's, resulting in a highly heterogeneous landscape. This landscape includes protected and non-protected areas of original TDF, evergreen forest, mangroves, exposed soils mainly used for livestock and crops, human settlements (Sánchez-Azofeifa et al. 2009), and a two-lane highway (federal highway No. 200 Barra de Navidad-Puerto Vallarta) that bisects the study area (Figure 1). The study area encompasses the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, an important protected area spanning 13,142 ha that accounts for 1.1% of the total extent of

original TDF in Mexico. Our study area also includes other important non-protected areas, that still conserve important extensions of TDF (Selva de Melaque) (Figure 1).

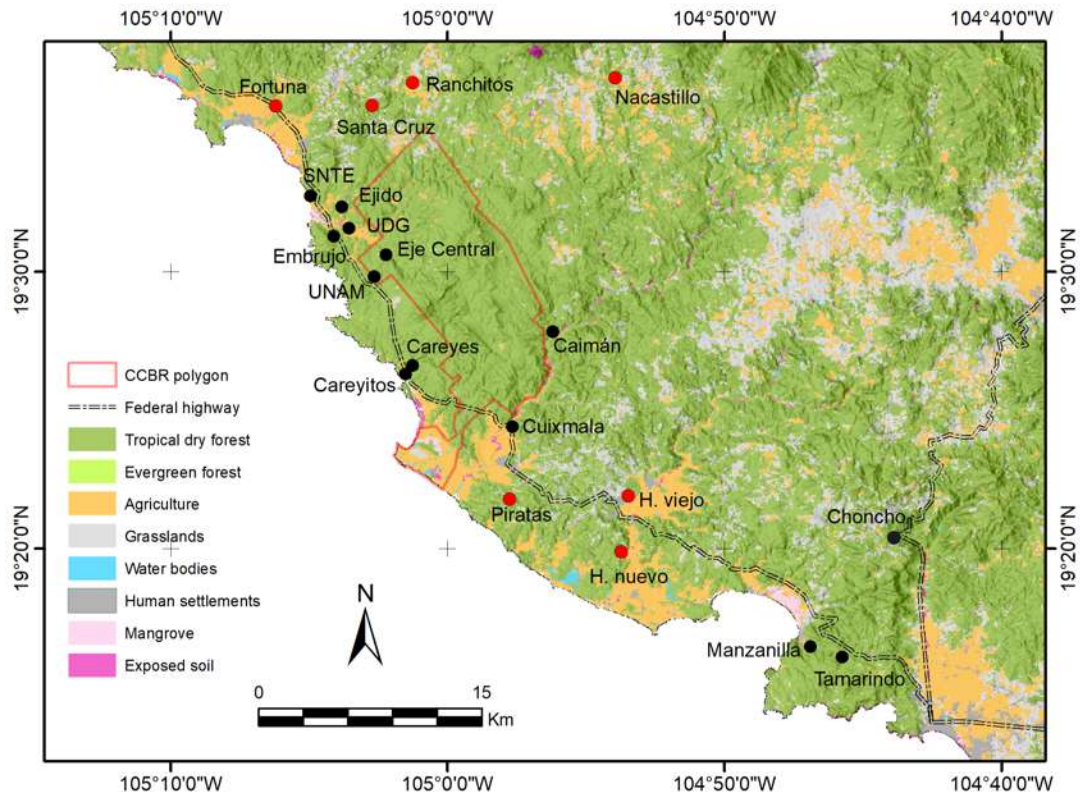


Figure 1. Sampling localities of *T. sinaloa* across the studied landscape. Red dots indicate sampling localities at fragmented forest while black dots indicate sampling localities at continuous forest. The red polygon shows the area of the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve.

Sample collection

Across the study landscape, from April to July within the breeding seasons of 2019 and 2020, we utilized 8–10 mist-nets (6 or 12 m long, 30 mm size mesh) to capture a total of 92 birds across 20 sampling localities (Figure 1, Table 1). Mist-nets were generally placed along trails in places where males were singing, presumed to be within their territories, and were spaced roughly 30–40 m apart. Mist-nets were open from dawn (~6h45) to 11h00, and from 17h00

to 19h00. Each site was sampled for 1–3 days in order to complete sample size (~5 individuals). To ensure that we were not re-sampling the same bird, we banded each individual with a unique set of color rings. Blood samples (~ 100 μ L) were taken from the brachial vein using ultra-fine syringes and stored in 500 μ L Queen's lysis buffer. All individuals were safely released *in situ*. Sampling localities were chosen strategically to include areas of continuous TDF [including all sampling localities within the reserve and those outside the limits of the reserve but still within the large continuous of vegetation, as well as other non-protected areas (e.g. Selva de Melaque and Barranca del Choncho), herein referred to as continuous forest] and patches of TDF within human-transformed areas (herein, fragmented forest) (Figure 1). Thirteen sampling localities were located within continuous while seven within fragmented forest. Additionally, eight and five sites within continuous and fragmented forest, respectively were located on one side of the highway, while five and two sites within continuous and fragmented forest, respectively, were located on the other side of the highway.

Table 1. Name, sample size, geographic location, altitude and habitat type (continuous or fragmented Tropical Dry Forest) for each sampling locality of *Thryophilus sinaloa*.

No.	Locality	n	Latitude	Longitude	Altitude (m.a.s.l.)	Habitat
1	La Fortuna (FOR)	5	19°36'0''	105°6'12''	13	Fragmented
2	Santa Cruz (STC)	5	19°36'1''	105°2'43''	99	Fragmented
3	Ranchitos (RAN)	3	19°36'50''	105°1'15''	173	Fragmented
4	Nacastillo (NAC)	6	19°37'0''	104°53'57''	283	Fragmented
5	SNTE (SNT)	3	19°32'44.86''	105°4'57.08''	2	Continuous
6	Ejido (EJD)	4	19°32'21''	105°3'49''	33.5	Continuous
7	Embrujo (EMB)	5	19°31'17''	105°4'6''	7	Continuous
8	UDG (UDG)	4	19°31'35''	105°3'33''	15	Continuous
9	Eje central (EJC)	5	19°30'37''	105°2'13''	50	Continuous
10	UNAM (UNAM)	6	19°29'49.9''	105°2'38.10''	81	Continuous
11	Careyes (CAR)	5	19°26'36.80''	105°1'15.14''	0	Continuous
12	Careyitos (CAY)	5	19°26'18.96''	105°1'31.08''	8.6	Continuous
13	Caimán (CAM)	4	19°27'50''	104°56'11''	45	Continuous
14	Cuixmala (CUI)	4	19°24'24''	104°57'39''	14	Continuous
15	Callejón a Piratas (CAP)	6	19°21'47''	104°57'45''	75	Fragmented
16	Hidalgo Viejo (HIV)	5	19°21'54''	104°53'28''	44	Fragmented
17	Hidalgo Nuevo (HIN)	5	19°19'53''	104°53'43''	21	Fragmented
18	El Tamarindo (TAM)	4	19°16'27.30''	104°46'53.50''	22	Continuous
19	La Manzanilla (MAN)	3	19°16'4.56''	104°45'44.31''	176	Continuous
20	Melaque (MEL)	3	19°13'36''	104°42'59''	66	Continuous
21	Barranca del Choncho (CHO)	5	19°20'25''	104°43'47''	242	Continuous

RadSeq library preparation, SNP processing and calling

Total DNA extraction was performed using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen®), following the manufacturer's protocol, adding 80–100µL of blood and 4µL of RNAase with a final elution in AE Buffer of 50µL. The resulting genomic DNA was quantified using a Quantus™ Fluorometer (Promega), and standardized to 25µg/µL. RADSeq libraries were then prepared and sequenced at the BadDNA@UGA facility of the Department of Environmental Health Science of the University of Georgia. To construct reduced representation genome libraries were used a triple-enzyme restriction site-associated sequencing (3RAD). DNA samples were digested using the MspI and BamHI enzymes, and using a third enzyme (ClaI)

to reduce the number of adapter-dimers formed during the digestion and ligation step of the protocol (further details in Bayona-Vásquez et al. 2019). DNA fragments were ligated to adaptors with internal variable length barcodes (Bayona-Vásquez et al. 2019) and amplified with iTru- primers (Glenn et al. 2019). PCR products were purified using a 1X Speedbead clean (with Sera-Mag SpeedBeads® Carboxyl Magnetic Beads), and pooled in equimolar volume for sequencing by quantifying the concentration using a plate reader and the average size of the library from the gel. Sequencing was performed on an Illumina platform HiSeq X Ten platform. DNA fragments (approximately 150 base pairs) were read from each of their obtained ends. Information regarding sequence filtering can be found in supplementary information.

Due to the absence of a reference genome for the species, we performed a *de novo* assembly for constructing the genome using the *denovo_map* pipeline in STACKS (Catchen et al. 2013). To optimize parameters for *de novo* assembly, we used a subset of 28 samples defined as one population and the *-r 80* method (Paris et al. 2017) was followed. Briefly, three parameters were optimized: 1) the minimum number of raw reads to form a stack (m), 2) the maximum number of mismatches allowed between stacks (M) which allows to build a locus from *de novo* (using the *ustacks* module), and 3) the number of mismatches allowed between stacks (n), where loci are aligned according to the similarity of reads to create a catalog of all loci across samples (using the module *cstacks*). We run *de novo* several times adjusting one parameter at the time as specified in Paris et al. (2017) to maximize the number of polymorphic loci and SNPs. After several trial runs, we set to 3 the minimum depth of coverage when creating a stack ($-m$), allowing a maximum distance of 2 between stacks ($-M$), and allowing 2 mismatches between loci across samples ($-n$) when building a catalog in

cstacks. In the *populations* module of STACKS we retained loci present in at least 80% of the individuals (r) and in at least 80% of sampling localities (p), with a minimum frequency of the least common allele (*min_maf*) of 0.01 and with a maximum observed heterozygosity of 0.5 within samples. We used the *write_singles_snp* parameter to retain only the first SNP per locus to avoid linkage disequilibrium. Using VCFTOOLS v.0.1.16 (Danecek et al. 2011) we retained all samples with less than 30% missing data, and applied a threshold for SNPs showing highly significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.01$) to filter out false variants arising from the alignment of paralogous loci. To eliminate related individuals from the samples, we estimated pairwise kinship coefficients between individuals following the algorithm developed by Manichaikul et al. (2010) and using the `–relatedness2` flag implemented in VCFTOOLS on the final SNP dataset.

Outlier detection

As SNPs under divergent selection are suggested to be removed when assessing genetic connectivity studies (Beaumont and Nichols 1996), we performed outlier loci detection using two different approaches. First, we used a principal component analysis (PCA) with a Mahalanobis distance-based approach implemented in the *pcadapt* v.4.3.3 R package (Luu et al. 2017), which performs genome scans to detect loci under selection based on population genetic structure. Initially, 30 principal components (PC) were used to assess the best supported genetic clustering among sampled individuals, where the optimal number of PC was determined using Cattell’s graphical rule following Luu et al. (2017). A Bonferroni correction of 0.001 was used as a threshold cutoff for outlier detection. Second, we utilized the outlier detection approach implemented in Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier and Lischer

2010) by using a hierarchical finite island model, testing 20,000 simulations with 100 simulated demes and 2 groups, and a second analysis by using non-hierarchical finite island model, testing 20,000 simulations and 100 demes. Loci with a p -value < 0.01 were selected as potential outliers.

Summary statistics

We calculated overall nucleotide diversity (π), observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity, and inbreeding coefficient (F_{is}) using the *basic.stats* function in *hierfstat* v.0.5-11 (Goudet 2005) R package in R v.4.1.1 (R Core Team 2021). To assess genetic diversity within each sampling site, we obtained π , H_o , H_e , F_{is} and the mean frequency of the most frequent allele at each locus (P_m) using the *populations* module in STACKS. In order to test for significant differences in genetic diversity estimates between sampling sites within continuous and fragmented TDF we performed a Wilcoxon/Mann-Whitney test in R v.4.1.1.

We conducted two analyses of molecular variance (AMOVAs; Excoffier et al. 1992) with 20,000 permutations to determine the distribution of genomic variation shared within and among sampling localities/genetic groups. In the first AMOVA localities were treated as a single group; whereas in the second AMOVA, we grouped localities into two genetic groups according to STRUCTURE results. We calculated pairwise F_{st} between sampling localities and between genetic groups in Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier and Lischer 2010), assessing significance using a permutation approach.

Finally, we estimated current effective population size (N_e) for each of the two genetic groups and for the entire data set using the linkage disequilibrium information method implemented in NeEstimator v.2.1 (Do et al. 2014). We processed the data as a single sample

time because our sampling method is likely to contain a single generation. We assumed random mating and screened out alleles with frequencies below 0.05.

Genetic structure

To assess genetic structure, we utilized a Bayesian and a multivariate approach. We first used a Bayesian clustering method implemented in STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard et al. 2000). We ran STRUCTURE without population information under the admixture model with correlated allele frequencies. Bash scripts to perform the STRUCTURE analysis were created with STRAUTO v.1.0 (Chhatre and Emerson 2017), which allows parallel processing of the multiple iteration for the K parameter. Ten independent iterations were run for each K , from $K = 1$ to $K = 10$. Each run consisted of 50,000 MCMC generations after a burn-in period of 10,000. To determine the most likely value of K we used the criteria of Evanno et al. (2005) selecting the highest ΔK implemented in Structure Harvester v.0.6.94 (Earl and vonHoldt 2012) and used the CLUMPAK server to summarize the graphical representation of population structure (Kopelman et al. 2015).

We then conducted a Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC; Jombart et al. 2010), in *adegenet* v.2.0 R package (Jombart 2008). DAPC is a multivariate multilocus analysis that uses a nongenetic-based model and does not make assumptions of *a priori* groups and of underlying population genetic processes (Jombart et al. 2010). First, we used the *find.clusters* function to obtain the predicted number of clusters (K) after retaining all principal components (PCs), using a Bayesian information criterion (BIC) to select optimal K . As the BIC criterion suggested $K = 1$, we performed a DAPC analysis by using sampling localities as *a priori* groups. To identify the number of PCs to be retained in our

DAPC, we used the *xvalDapc* validation function using 1000 replications that selects the optimal number of PCs based on the highest successful assignment with the lowest mean squared error (Jombart et al. 2010).

Gene flow

To assess contemporary migration rates (m) among resulting genetic groups (see results), we used BA3-SNPs v.1.1 (Mussmann et al. 2019), a Bayesian approach that identifies the fraction of recent migrants per generation (m) among populations or genetic groups (Wilson and Rannala 2003), particularly for datasets containing thousands of SNPs. We conducted several rounds of optimization to adjust the size of the proposed changes to the parameter value at each iteration of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Following optimization, we established values of -a 0.25, -m 0.08 and -f 0.009 for the three mixing parameters: allele frequencies, migration rates and inbreeding coefficients respectively, with acceptance rates between 35% and 45%. The MCMC iterations were set to 1×10^7 after discarding the first 1×10^4 iterations as burn-in and with a sampling frequency of 1,000. We perform three replicate analyses with different seed values and assessed the mixing and convergence of each run using TRACER v.1.7 (Rambaut et al. 2018).

Landscape data

We used eight natural and anthropogenic landscape features (hereafter landscape surfaces) in order to identify those that promote or restrict genetic connectivity for the studied species across the landscape. Selection of these surfaces was based on previous research studies that report their significance in promoting or restricting bird avian dispersal and on AM and CG

personal observations of *in situ* landscape features that could affect the movement of *T. sinaloa*. Landscape surfaces included in the study were: 1) elevation and 2) slope (continuous variables), 3) wide rivers, 4) temporary streams, 5) two-lane roads, 6) original vegetation (including TDF, evergreen forest and mangrove), 7) open-areas (including exposed soils, grasslands and human settlements), and 8) agriculture (categorical variables).

Elevation has been reported to act as a barrier to gene flow in some bird species (e.g. Caizergues et al. 2003; Adams et al. 2016) and higher degree slope seems to restrict movements in *T. sinaloa* as male territories were often situated in lowlands between hills (AM and CG personal observation). Water bodies have been documented to be barriers for bird dispersal (Tremblay and St. Clair, 2009), therefore, wide mighty rivers could potentially act as barriers for dispersal. However, temporary streams seem to be highly used by the species as we captured several individuals near to dry streams, and probably facilitates dispersal. It has been documented that roads, monocultures, exposed soils and urbanization could have a negative impact on bird dispersal (e.g. Khimoun et al. 2017; Tan et al. 2018). Forested covertures and riparian zones may promote genetic connectivity between areas that otherwise become isolated for birds (e.g. Dallimer et al. 2012; Adams et al. 2016). Information on the construction of landscape layers is provided in the supplementary information.

Landscape genetic analyses

In order to test the effect of isolation by distance on genetic differentiation of *T. sinaloa*, we performed an analysis of multiple regression on distance matrices (MRM) with 999

permutations in Ecodist v.2.0.9 R package (Goslee and Urban 2007). We used pairwise F_{ST} as our response variable and geographic distance as explanatory variable.

All landscape surfaces were resampled at a spatial resolution of 300 m using the “Resample” function in ArcGIS. This resolution did not reduce the number of samples and one observation per cell was registered as required in *ResistanceGA* (see below). Categorical and continuous landscape surfaces were independently optimized in order to convert information on landscape spatial heterogeneity (elevation, slope, rivers, etc.) into movement costs (i.e. effective distances) inflicted by different landscape features using *ResistanceGA* v.4.2 R package (Peterman 2018). Briefly, to obtain effective distances, ResistanceGA uses genetic algorithms seeking to maximize the relationship between pairwise genetic distances (F_{ST}) and pairwise effective distances, based on the random-walk commute time approach, making no *a priori* assumptions about their relationships, using the *commuteDistance* function of *gdistance* v.1.3-6 R package (van Etten 2017). The random-walk approach considers that individuals can take multiple paths to disperse.

Optimization for continuous surfaces were performed using eight transformation functions (e.g. monomolecular and Ricker functions; Bolker 2008) and default parameters with the *max.cont* function, exploring resistance values up to 2,500. To determine the relationship between pairwise effective distances and genetic distances, the genetic algorithm identifies the best parameter values and models using linear mixed-effects models with a maximum-likelihood populations-effects parameterization (MLPE; Clarke et al. 2022). We used the Akaike’s information criterion corrected for small/finite sample size (AICc) as objective function (Nakagawa and Schielzeth 2013). This optimization was repeated until 50-300 generations have passed without the improvement of the AICc. To confirm

convergence and estimated parameters, three independent runs were conducted for each surface.

After each optimization, we evaluated the level of support for each model selection with a bootstrap analysis that incorporated pairwise geographic distance as a predictor (Peterman et al. 2014). ResistanceGA integrates the geographic spatial information of each locality (coordinates) and calculates a pairwise geographic distance, which was included in the model along with the eight optimized resistance surfaces. The bootstrap analysis randomly selected 75% of the pairwise effective and genetic distance matrices generated for each optimized surface, refit the MLPE model and calculated statistics for each of the eight surfaces. The frequency at which a surface was selected as the top ranked model following 10,000 iterations was used to determine the level of support. Landscape surfaces with a higher selection percentage than geographical distance alone constitutes a set of features important for the dispersal of *T. sinaloa*. To maximize the contribution of the most important variables, we performed a second bootstrap eliminating variables with 0% contribution. This model included open areas, agriculture, original vegetation, two-lane roads and elevation as well as geographic distance. Since only one variable explained a higher percentage than geographic distance, we were unable to perform a multivariate optimization (see results).

Due to ResistanceGA does not include graphics to explain the resistance cost inflicted by categorical surfaces, we created a map to visually represent connectivity between sampling localities across the landscape. We used the optimized effective distances from categorical surfaces that better explained genetic distances obtained with ResistanceGA, and applied circuit theory (McRae et al. 2008) implemented in CIRCUITSCAPE v.5 (www.circuitscape.org).

Results

DNA sequence data

We obtained a total of 554 million good quality paired-end reads of 150 bp for all individuals, representing an average of 2.51 million sequences by individual and an average depth of coverage in our dataset of 42X. After discarding reads without called bases and below a Phred Score of 35 we retained 470 million sequences. The data set after using *min_maf* (< 0.01), a maximum observed heterozygosity of 0.5, and retaining only one SNP per locus contained 25,928 SNPs. After filtering for HWE ($P = 0.01$) we kept a data set of 24,549 biallelic SNPs. After retaining only 30% of missing data resulted in the same number of SNPs (24,549). Two individuals that showed elevated kinship coefficients indicating full siblings (~ 0.25) were excluded (Manichaikul et al. 2010), resulting in 90 individuals (3 – 6 individuals per population; Table 1) used in subsequent analysis.

Outlier detection

We did not identify any loci under selection in our database by using principal components analysis. However we detected 29 outlier loci with Arlequin. To build a neutral dataset, we removed all candidate loci and retained a total of 24,520 loci for further analyses.

Summary statistics

Overall genetic diversity estimates across all sampling localities were as follows: $\pi = 0.1364$, $H_o = 0.1382$, $H_e = 0.1421$, and $F_{is} = 0.0273$. Diversity estimates were fairly similar among sampling sites (Table 2). In average, localities within the fragmented forest had significantly more private alleles (50.14) than continuous forest (33.35) ($W = 11.5$, $P = 0.007$). The

average frequency of the most frequent allele (P_m) was 0.91 for both, fragmented and continuous forests. Average for observed heterozygosity (H_o) was 0.13 for both conditions, while average expected heterozygosity (H_e) was 0.12 and 0.11 for fragmented and continuous forest respectively. Average nucleotide diversity (π) was 0.13 for both conditions and values from inbreeding coefficient (F_{is}) were positive in most of the localities, with average values close to zero (0.01) for both conditions. This indicates a level of inbreeding equal to the expected value based on allele frequencies in the population.

Table 2. Number of variable sites unique to each population (Private), nucleotide diversity (π), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), inbreeding coefficient (F_{is}) and mean frequency of the most frequent allele (P_m) for *Thryophilus sinaloa* at 24,928 SNPs from 20 sampled localities. Tags for continuous (C) and fragmented (F) samples sites across the Landscape (LS) are shown.

Pop ID	Private	π	H_o	H_e	F_{is}	P_m	LS
La Fortuna	54	0.1383	0.1290	0.1241	0.0208	0.9155	F
Santa Cruz	40	0.1403	0.1338	0.1258	0.0147	0.9143	F
Ranchitos	27	0.1364	0.1281	0.1136	0.0150	0.9194	F
Nacastillo	42	0.1404	0.1309	0.1259	0.0220	0.9140	F
SNTE	20	0.1411	0.1383	0.1175	0.0051	0.9165	C
Ejido	36	0.1370	0.1287	0.1199	0.0168	0.9173	C
Embrujo	23	0.1369	0.1331	0.1225	0.0089	0.9166	C
UDG	19	0.1337	0.1319	0.1114	0.0031	0.9209	C
Eje central	43	0.1406	0.1302	0.1261	0.0231	0.9138	C
UNAM	46	0.1375	0.1298	0.1256	0.0189	0.9156	C
Careyes	36	0.1388	0.1329	0.1243	0.0134	0.9154	C
Careyitos	25	0.1339	0.1285	0.1171	0.0114	0.9194	C
Caimán	25	0.1328	0.1234	0.1162	0.0197	0.9201	C
Cuixmala	27	0.1356	0.1286	0.1187	0.0146	0.9182	C
Callejón Piratas	61	0.1372	0.1299	0.1270	0.0198	0.9153	F
Hidalgo Viejo	79	0.1365	0.1308	0.1223	0.0128	0.9163	F
Hidalgo Nuevo	48	0.1392	0.1303	0.1248	0.0209	0.9152	F
El Tamarindo	25	0.1361	0.1274	0.1134	0.0158	0.9190	C
La Manzanilla	19	0.1288	0.1253	0.1127	0.0074	0.9225	C
Melaque	76	0.1250	0.1301	0.1041	-0.0093	0.9240	C
Barranca del Choncho	47	0.1401	0.1328	0.1254	0.0167	0.9147	C

Results from both AMOVAs revealed that most of the genetic variation (>99.49%) was explained by differences within populations (localities) while only a small fraction was explained by differences among populations or groups (Table 3). Pairwise F_{st} ranged from 0.014 to 0 among all sampling localities, and most of the significant pairwise comparisons resulted between sampling localities from both genetic groups (Table S1, FigureS1). Genetic differentiation between both genetic groups suggested by STRUCTURE were significant ($F_{st} = 0.0015$, $P < 0.0001$). Results from NeEstimator suggested a N_e of 7504.9 (95% CI: 4789.9 – 17271.8) for the northern genetic group and a N_e of 2419.7 (95% CI: 2038.3 – 2975.8) for the southern genetic group. Estimation of N_e for the entire data set was 5064.8 (95% CI: 3835.9 – 7441.0)

Table 3. Results of AMOVA models on *Thryophilus sinaloa* populations: (1) with no *a priori* groups defined, and (2) grouping by genetic groups identified with structure. ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Source of variation	df	Sum of squares	Estimated variance	%	Fixation indices
No groups defined					
Among populations	19	6585.6	1.7	0.51	
Within populations	158	52302.9	333.1	99.49	$F_{st} = 0.005^{***}$
Total	177	58888.5	334.8		
Two genetic groups (based on STRUCTURE (K = 2))					
Between groups	1	388.4	0.5	0.15	$F_{cr} = 0.001^{***}$
Among populations within groups	18	6197.2	1.5	0.45	$F_{sc} = 0.005^{**}$
Within populations	158	52302.9	331.1	99.40	$F_{st} = 0.006^{***}$
Total	177	55888.5	331.1		

Genetic structure

The highest value of ΔK based on STRUCTURE results indicated that the most likely number of genetic groups was K=2 (Figure 2A). Most individuals situated within the

continuous forest (including the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve) and individuals from localities within a fragmented area adjacent to the reserve at the north-eastern part of the studied landscape were assigned to the first genetic cluster (northern) (Figure 2B). Individuals located south the reserve within the fragmented forest, and individuals located within continuous forest at the southern extreme of the studied landscape, were mostly assigned to the second genetic cluster (southern; Figure 2B). Individuals located between both genetic groups (i.e. Careyitos, Careyes, Caimán and Cuixmala) represented admixed individuals because their ancestry values were lower than 0.70 (Figure 2B).

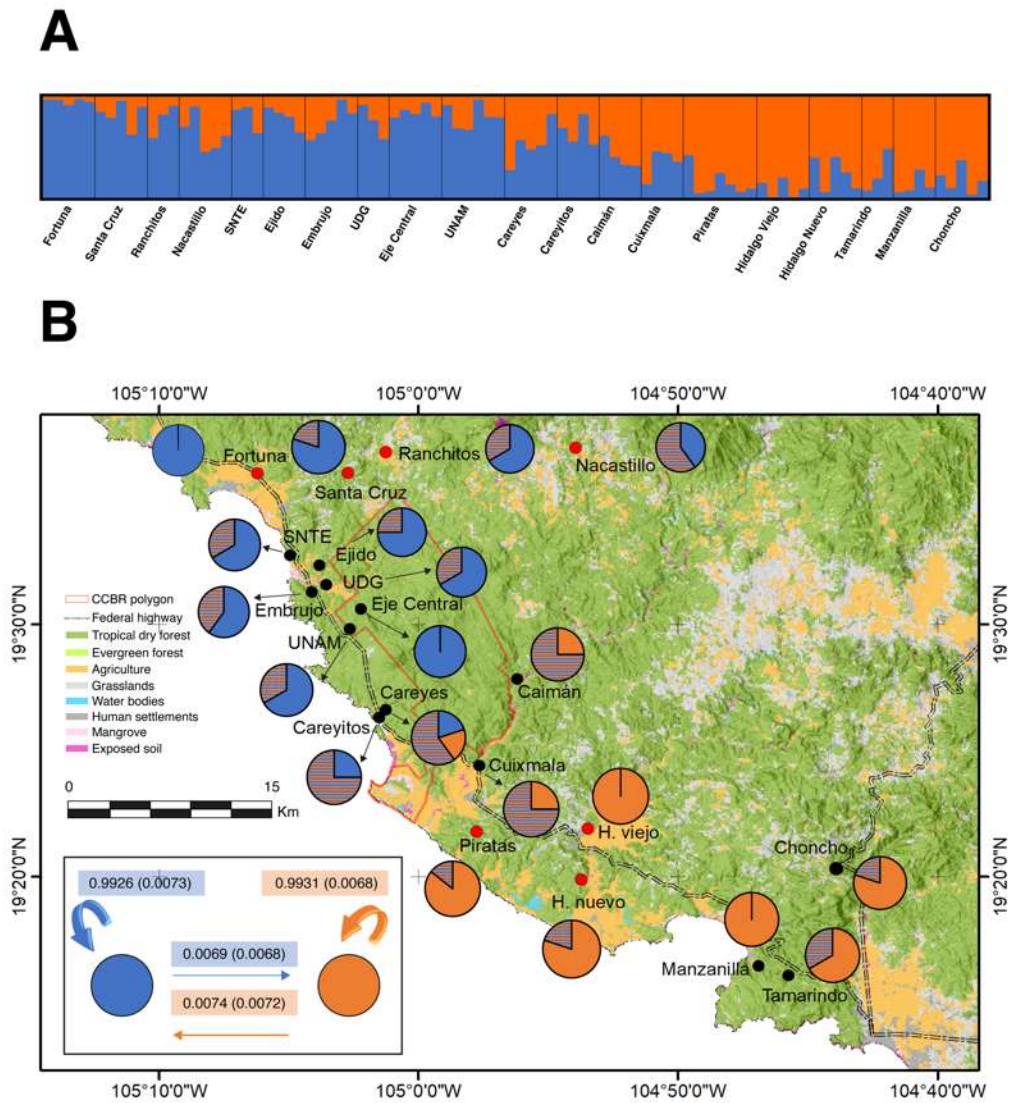


Figure 2. A) Genetic structure for *T. sinaloa* across the landscape inferred from STRUCTURE analysis. Each bar correspond to an individual, with colors corresponding to posterior assignment probabilities to each of a number of genetic clusters (K). B) Map of sampling localities indicating individual assignment based on the inferred ancestry values (q value) based on STRUCTURE results ($K=2$). An individual was assigned to a certain genetic group if its inferred ancestry value (q) was greater than 0.7. Individuals with q values < 0.7 were assigned to an additional group for admixed individuals (pattern of horizontal lines). Inside the box, contemporary migration rates (m) with 95% confidence intervals in parentheses between resulting genetic groups are shown.

Regarding the DAPC, where sampling localities were used as *a priori* groups and according to the *xvalDapc* validation function, 15 principal components and 20% of the cumulative variance were retained as optimal to be used in our DAPC. The first discriminant function separated most individuals from Nacastillo from the rest. The second discriminant function separated the northern and southern groups, with some degree of overlap (Figure 3). This overlap between groups is consistent with STRUCTURE results where some individuals have higher proportions to pertain to both groups (e.g. Careyes).

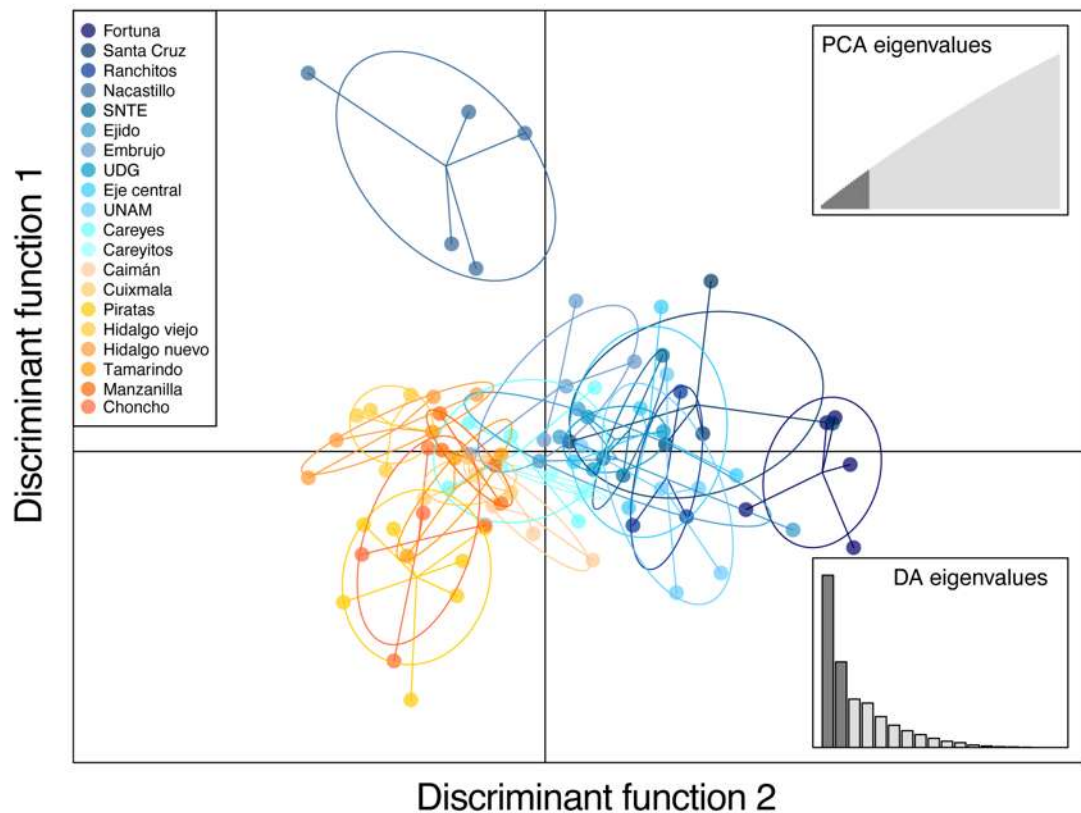


Figure 3. Plots from discriminant analysis of principal components (DAPC) where individuals were grouped into the 20 sampling sites. Points represent individuals with the 95% inertia ellipses. Different colors indicate sampling sites. The boxes within the plot represent the eigenvalues of the retained principal components (upper right), and the eigenvectors of the discriminant functions (bottom right).

Gene flow

The three runs of the BA3-SNPs analysis converged and provided consistent results, as confirmed by TRACER. The results indicated symmetrical migration rates between both genetic groups. A slightly higher proportion of recent migrants was detected from the southern to the northern genetic cluster ($m = 0.0074$), than the opposite direction ($m = 0.0069$; Figure 2B).

Landscape genetic analyses

Results from MRM analysis indicated a lack of dependence of genetic distance as a function of geographic distance ($r^2 = 0.02$; $P = 0.26$). Results from the resistance optimization for each landscape surface were consistent across the three replicates. *ResistanceGA* optimization and model selection based on the top ranked model using the eight landscape surfaces, indicated that the open-areas surface that included exposed soil, grasslands and human settlements was the variable that best explained genetic distances between sampling localities (42.1% of the times based on 10,000 bootstrap replicates) after geographical distance (56.6%: Table 4). Agriculture, original vegetation, two-lane roads and elevation resistance surfaces explained only a minor proportion of the variation (Table 4). The reduced analysis, removing variables that had no contribution, indicated that the open-areas surface better explained genetic distances (52.33%) followed by geographic distance (46%), with the rest of the variables explaining less than 1% each (Table 5). Accordingly, the lowest flow and therefore highest resistance values were associated to the presence of open areas across the landscape (Figure 4).

Table 4. Model selection results for the maximum-likelihood populations-effects (MLPE) mixed models optimized on genetic distance (linearized pairwise F_{st}) for *Thryophilus sinaloa* using eight continuous and categorical resistance surfaces. Open areas included exposed soils, grasslands, and human settlements. Original vegetation included TDF, evergreen forest, and mangrove.

Resistance surface	Transformation equation	k	Avg.AICc	Avg. Weighth	Avg. Rank	Top model (%)
Open-areas	NA	3	-962.32	0.129	1.35	42.1
Geographic distance	NA	2	-961.15	0.091	2.97	56.6
Agriculture	NA	3	-959.82	0.032	4.32	0.37
Two-lane roads	NA	3	-959.59	0.028	4.84	0.13
Rivers	NA	3	-959.50	0.024	5.58	0
Original vegetation	NA	3	-959.48	0.025	5.64	0.23
Streams	NA	3	-959.34	0.022	6.92	0
Elevation	Inverse-reverse Monomolecular	4	-956.63	0.005	8.34	0.55
Slope	Ricker	4	-953.62	0.001	9.91	0

k indicates the number of parameters in the transformation of continuous surfaces plus the intercept, or the number of categories in binary surfaces plus the intercept. Avg.AICc is the average of the Akaike information criterion for each model, corrected for the sample size. Avg.weight is the model weight that represents the probability that a model is the best in the model set, averaged over 1000 bootstrap replicates. Avg.rank is the average model ranking from 1000 bootstrap replicates. Top-ranked model is the proportion of times during the 1000 bootstrap iterations each model is ranked as the top model.

Table 5. Model selection results for maximum-likelihood populations-effects (MLPE) mixed models optimized on genetic distance (linearized pairwise F_{st}) for *Thryophilus sinaloa* excluding variables with 0% contribution from the previous analysis. Open areas included exposed soils, grasslands, and human settlements. Original vegetation included TDF, evergreen forest, and mangrove.

Resistance surface	Transformation equation	k	Avg.AICc	Avg. Weighth	Avg. Rank	Top model (%)
Open-areas	NA	3	-962.44	0.182	1.33	52.33
Geographic distance	NA	2	-962.01	0.136	2.54	46.0
Two-lane roads	NA	3	-959.91	0.046	3.99	0.44
Agriculture	NA	3	-959.97	0.040	4.33	0.24
Original vegetation	NA	3	-959.45	0.037	4.80	0.28
Elevation	Inverse-reverse Monomolecular	4	-956.04	0.008	5.50	0.68

k indicates the number of parameters in the transformation of continuous surfaces plus the intercept, or the number of categories in binary surfaces plus the intercept. Avg.AICc is the average of the Akaike information criterion for each model, corrected for the sample size. Avg.weight is the model weight that represents the probability that a model is the best in the model set, averaged over 1000 bootstrap replicates. Avg.rank is the average model ranking from 1000 bootstrap replicates. Top-ranked model is the proportion of times during the 1000 bootstrap iterations each model is ranked as the top model.

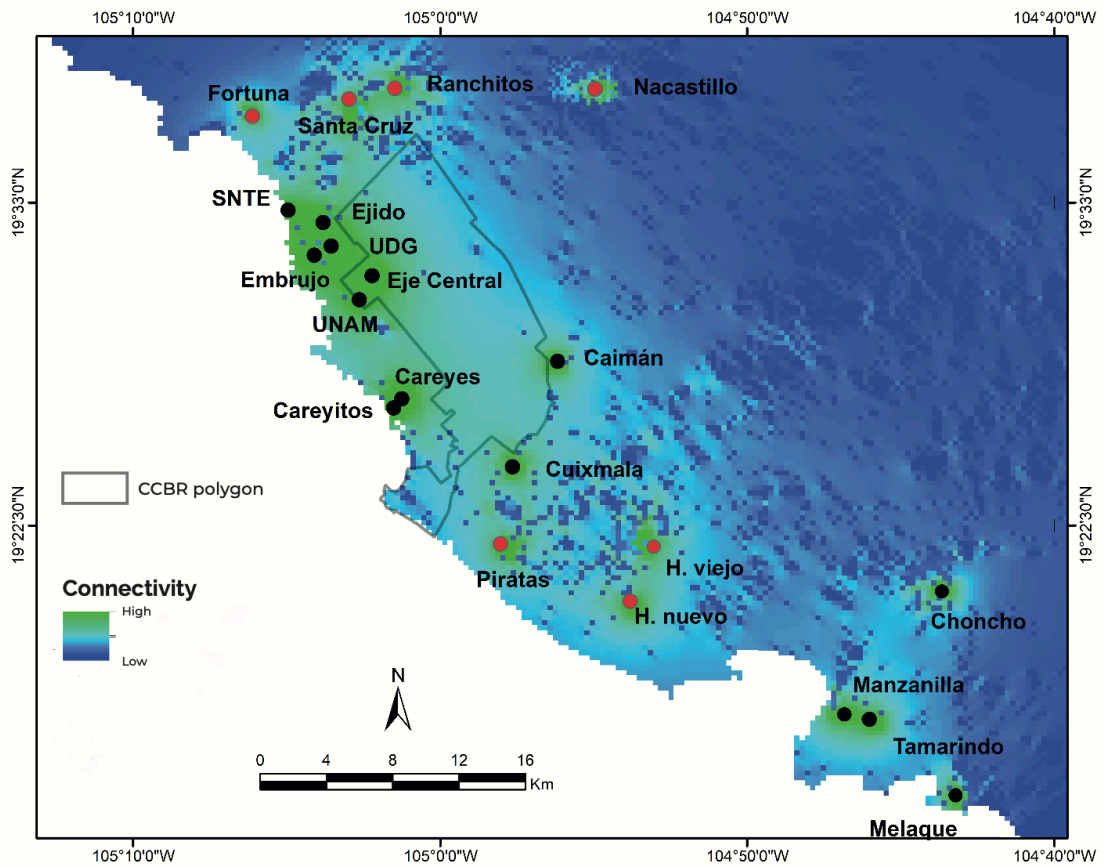


Figure 4. Map showing connectivity between sampling localities of *T. sinaloa* across the landscape obtained with CIRCUITSCAPE, based on the optimized effective distances from open-areas obtained with ResistanceGA.

Discussion

We identified genetic structure and limited gene flow between genetic groups at a relatively small spatial scale ($\sim 1080 \text{ km}^2$), and found an effect of human-induced habitat modification on the genetic connectivity of *T. sinaloa*. Despite their high abundance across the study area, and according to the strong territoriality that characterizes males and the putative short natal dispersal, we detected genetic structure in *T. sinaloa*. Our findings indicate that the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, is largely disconnected from other non-protected areas of continuous TDF. If habitat deterioration persists, it may have a stronger impact on genetic patterns, particularly in areas where small habitat patches are isolated. Such impacts could affect populations of *T. sinaloa* and similar species.

Genetic diversity, genetic structure and contemporary gene flow

Global diversity estimates based on genome-wide data suggest that *T. sinaloa* has similar levels of nucleotide diversity and expected heterozygosity to different geographic forms of the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*, Friis, et al. 2021), and higher compared to tropical birds, like the Yucatan Jay, an endemic bird of Mexico (*Cyanocorax yucatanicus*, Termignoni-García et al. 2017). In comparison to temperate birds, *T. sinaloa* exhibited higher levels of nucleotide diversity than *Lagopus lagopus* ($\pi = 0.008$; Quintela et al. 2010), *Zonotrichia albicollis* ($\pi = 0.0076$; Huynh et al. 2010), and to widespread *Ficedula* flycatchers (*Ficedula hypoleuca* $\pi = 0.0023$ and *F. albicollis* 0.0027; Primmer et al. 2002), was also higher. Contrary to our expectations, genetic diversity was maintained between continuous and fragmented forest, although the latter had significantly more private alleles

than the former, likely due to the lack of genetic connectivity among sampling sites in the fragmented forest.

According to our expectations, populations were genetically structured into two genetic clusters across the landscape, a pattern attributable to landscape characteristics along with geographic distance that reduce gene flow between groups (discussed below). A growing number of studies have detected genetic structure even at smaller geographic areas than *T. sinaloa* (e.g. *Setophaga plumbea*, Khimoun et al. 2017; *Centrocercus urophasianus*, Jahner et al. 2016; *Pyrrhonorax pyrrhonorax*, Morinha et al. 2017; *Thryophilus rufalbus*, Graham et al. 2022; *Campylorhynchus yucatanicus*, Serrano-Rodríguez et al. 2022), in part, due to the availability of increasingly powerful molecular tools.

The first genetic group consists of sampling localities situated within fragmented TDF at the northern part of the study area, as well as sampling localities included within the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve. This suggests that populations in the reserve are connected with those inhabiting secondary forest fragments. In a recent study based on ecological niche models, high connectivity was detected among suitable habitat patches for the Mexican Leaf Frog located north of the reserve (same localities as our study) with habitat patches within the reserve (Covarrubias et al. 2022). They suggested that secondary forest could function as corridors to maintain connectivity between these areas. Therefore, it is likely that suitable habitat is also available for connecting *T. sinaloa* populations. However, the secondary fragmented areas with which the reserve is connected (i.e. Ranchitos and Nacastillo) are heavily degraded and surrounded by grasslands for cattle, putting them at risk of disappearing soon. The second genetic group consists of sampling localities within the limits of the reserve from Caimán south to Tamarindo, including Barranca del Choncho

(Figure 2B, 3A). This group includes localities situated at the limits of the reserve (Caimán), localities included within other large extension of unprotected continuous TDF (e.g. Tamarindo, Manzanilla, and Barranca del Choncho, included at Selva de Melaque), and fragmented areas of TDF (e.g. Piratas, Hidalgo Viejo, Hidalgo Nuevo) situated between both areas of continuous forest (Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve and Selva de Melaque). However, according to the connectivity map obtained from the optimized anthropogenic surfaces in CIRCUITSCAPE (Figure 4), sampling localities included in the second genetic group are less connected compared to localities included in the first genetic group.

Although we detected genetic structure in *T. sinaloa* populations, most of the genetic variation was explained by differences within populations according to the AMOVAs results. The F_{st} values were lower compared to other bird studies that used SNPs at similar geographic scales. For example, F_{st} values for *Centrocercus urophasianus* in Nevada ranged from 0.050 to 0.020 (Jahner et al. 2016); and for *Mixornis gularis* across a small area in Singapore, they ranged from 0.007 to 0.026 (Tan et al. 2018). The relatively weak genetic structure in *T. sinaloa* could be attributable to the recent human landscape modification in the study area, which began in late 1960s and early 1970s when the *Ejidors* were created. However, the increasing deterioration of the habitat could eventually affect the effective population sizes of the species, and therefore in genetic structure and diversity in areas where small habitat patches are isolated.

Effect of landscape matrix on genetic structure

Our results suggested that genetic distances among sampling localities for *T. sinaloa* were mainly explained by the combined effect of open areas within the landscape (including

exposed soils, grasslands and human settlements) and geographic distance. These open areas related to anthropogenic activities, negatively impact the dispersal of this bird. *Thryophilus sinaloa* inhabits the understory of TDF, scrub, second-growth vegetation, and less frequently, plantations (Soberanes-González et al. 2020). It is a highly elusive bird and, according with our fieldwork observations, is always associated with some form of vegetation (bushes, climbing vines, plantations and trees, Malpica et al. 2022). Features included within the open-areas resistance surface are associated with reduced (grasslands) or to the absence (exposed soils and human settlements) of suitable vegetation for *T. sinaloa*, suggesting that this bird is reluctant to disperse across open and urbanized areas. Recently, it has been suggested that birds with low hand-wing indexes, as a proxy of flight efficiency, disperse less frequently across human-made gaps, making them more vulnerable to the effects of forest fragmentation in the Amazonia, such as *Microcerculus bambla*, a relative of *T. sinaloa* (Claramunt et al. 2022). Although estimates of the hand-wing index for *T. sinaloa* are not available, their wings are round and short, adapted to intricate microhabitats with climbing vines (Malpica et al. 2022), making them potentially less capable of dispersing across inhospitable habitat gaps. In addition, the loss of suitable habitat could lead to the loss of territories and potential local extinctions, as males are highly territorial and probably defend the same territories for several years (Grant 1966, AM and CG personal observation based on recapture ringed individuals).

Other studied landscape features seem to have little (agriculture, original vegetation, two-lane roads and elevation) or no effect (rivers, streams, and slope) in explaining genetic distances across the landscape. We observed *T. sinaloa* within mango plantations, which provide shaded areas for the species and probably facilitate dispersal among TDF patches. However, the mango plantations where we have observed the species were near TDF patches.

Other less common types of herbaceous crop fields reported for the study area, such as melon, squash, sorghum, maize (MacGregor and Schondube 2011), and pineapple generally lack enough cover and shade required for the species. Although elevation has been suggested to limit bird dispersal (Adams et al. 2016) because some altitudes may exceed their physiological tolerances, our results suggest that elevation does not impose a resistance to the dispersion of the species. Elevation within our study area gradually increases from 0 to ~300 m.a.s.l., which is probably not a dramatic change affecting the species dispersion, or the sampling sites close to the highest elevation included in the study were insufficient to detect an effect on genetic distances. Several studies have documented the negative effects of roads on understory bird dispersion (Develey and Stouffer 2001). However, our results suggested that two-lane roads do not constitute a barrier to the dispersion of the species. It is likely that the federal road may not be wide enough (~8m) to act as a barrier. Furthermore, in several parts trees grow from both sides of the road forming a bridge-like shade that could connect both sides, potentially acting as a corridor for certain birds.

Rivers and streams did not have an effect on genetic connectivity. Many male territories were associated to dry streams and partially dry rivers (AM and CG personal observations), suggesting that riparian habitats may be important for the genetic connectivity of the species. Those riparian-like habitats may contain important resources for the maintenance and connectivity of *T. sinaloa* populations, particularly during the dry season, as has been shown in other taxa (Saunders et al. 1991). Other landscape genetic studies have also suggested the role of riparian areas as important dispersal corridors for forest dependent species across large expanses of unsuitable grassland habitat (Adams and Burg 2015). However, the lack of extensive sampling along and across rivers and streams in this study,

may have missed detecting a significant effect. Finally, and contrary to our expectations, slope had no effect on genetic distances. We included slope because we observed in the field that male territories were often situated in lowlands between hills. Depending on their degree of slope, we thought hills could be a limitation for movement. The maximum slope at the study area is 40° in localities such as Barranca del Choncho; however, in most of the study area the slope is less than 20°, which may explain the lack of effect on genetic distance.

Conservation implications

Landscape genetics studies have become powerful tools to understand the patterns of genetic structure and gene flow through the landscape, as well as to identify landscape features (natural and anthropogenic) that may limit or promote genetic connectivity among bird populations in threatened (e.g. Jahner et al. 2016; van Rees et al. 2018), urban (Tan et al. 2018) as well as specialist and generalist bird species (Khimoun et al. 2017).

Our results suggest that open areas resulting from human activities restrict genetic connectivity of *T. sinaloa* in a landscape that compromises continuous areas of primary TDF, surrounded by a heterogeneous matrix of modified elements. Landscape features that negatively affect genetic connectivity should be avoided, highlighting the importance of conserving the original vegetation and restoring open areas to promote gene flow. Such conservation efforts are crucial to sustain genetic diversity and prevent local extinctions across the landscape. While our study provides insights into the conservation of *T. sinaloa*, it would be important to include other species from various taxa with different dispersal capacities, abundance, guilds, specialization degrees, risk categories, etc., as each species may respond differently to habitat modification (e.g. Amos et al. 2012). Comparative studies

can help identify unique or shared responses to landscape modification and provide inputs for integrated decision-making that promotes the conservation of this threatened ecosystem and its associated biota. TDFs are among the most exploited ecosystems for agriculture and cattle (Trejo and Dirzo 2000), and future projections for the study area indicate that land transformation into farmlands will persist (Hernandez et al. 2019).

Our results also suggest that the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve is completely disconnected from other non-protected areas such as Selva de Melaque which harbors important fragments of conserved TDF. In addition to declaring Selva de Melaque under official protection, it would be important to increase the connectivity between both conserved TDF fragments through biological corridors, while encouraging the participation of agricultural landowners. Riparian vegetation or even some plantations (e.g. mango) could potentially serve as corridors between isolated areas (e.g. Gillies and Clair 2008; Adams et al. 2016), but further studies are needed to design such corridors.

Acknowledgements

We thank A. González-Rodríguez, Y. Rico, R. Hernández-Guzmán, R. Pérez-Rodríguez for providing useful comments on previous versions of the manuscript; L. Zamudio-Beltrán, V. González, M. Mejía, S. Covarrubias, U. Alejandro, A. Sánchez and A. Ceja for field assistance as well as Katherine Renton and the staff of the “Estación de Biología Chamela” (UNAM) for their logistic support; A. K. Howard from the BadDNA@UGA facility for processing and sequencing DNA samples; S. Covarrubias, V. Piñeros, L. Zamudio-Beltrán, J. Pérez-Alquicira, for assistance with genomic analyses; A. Flores-Manzanero for ResistanceGA support; C. Gutiérrez-Rodríguez and E. Villafan for their help using the

Huitzilin cluster at INECOL; and M. Mejía for Figure 1 elaboration. This study constitutes partial fulfillment of Andreia Malpica' doctoral degree (Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas) at the UMSNH.

Statements & Declarations

Funding

Our research was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, <https://conacyt.mx>) through project grants PDCPN 2015-1250 to CG and by a doctoral scholarship (371634) to AM; and by the American Ornithological Society (Alexander Wetmore Memorial Research Award) to AM.

Competing of interests

The authors have no financial or non-financial interests to disclose.

Authors Contributions

AM and CG conceived the ideas, designed the methodology and collected the data. AM and CG led the manuscript conceptualization and data analysis. AM wrote the original draft. Both authors reviewed, edited and gave final approval for publication.

Data availability

Neutral SNPs dataset from the *de novo* alignment is accessible at OSF open platform (XXXXXX). Scripts of the analyzes performed in R packages can be found in the supplementary information.

Compliance with Ethical Standards

All sampling activities were adhered to the guidelines on the use of wild birds in research formulated by the Ornithological Council, and with the permission of Mexico's Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Vida Silvestre (permit numbers: SGPA/DGVS/10390/17 and SGPA/DGVS/05374/19).

References

- Adams RV, Burg TM (2015) Gene Flow of a Forest-Dependent Bird across a Fragmented Landscape. *Plos One* 10(11): e0140938.
- Adams RV, Lazerte SE, Otter KA, Burg TM (2016) Influence of landscape features on the microgeographic genetic structure of a resident songbird. *Heredity* 117(2):63–72
- Amos JN, Bennett AF, Mac Nally R et al (2012) Predicting Landscape-Genetic Consequences of Habitat Loss, Fragmentation and Mobility for Multiple Species of Woodland Birds. *Plos One* 7(2): e30888
- Baird SF (1864) Review of American birds, in the Museum of the Smithsonian Institution, Washington, Smithsonian Institution
- Balkenhol N, Cushman SA, Storfer A, Waits LP (2015) Introduction to Landscape Genetics – Concepts, Methods, Applications. In N. Balkenhol, SA Cushman, AT Storfer & P Waits (Eds.), *Landscape Genetics: Concepts, Methods, Applications* (pp. 1–7). Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd
- Bayona-Vásquez NJ, Glenn TC, Kieran TJ et al (2019) Adapterama III: Quadruple-Indexed, double/triple-enzyme RADseq libraries (2RAD/3RAD). *Peerj* 7:e7724

- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 263(1377):1619–1626
- Berkman LK, Nielsen CK, Roy CL, Heist EJ (2013) Population genetic structure among bobwhite in an agriculturally modified landscape. *Journal of Wildlife Management* 77(7):1472–1481
- Bolker BM (2008) *Ecological models and data in R*. Princeton, University Press, Princeton
- Caizergues A, Rätti O, Helle P et al (2003) Population genetic structure of male black grouse (*Tetrao tetrix* L.) in fragmented vs. continuous landscapes. *Molecular Ecology* 12:2297–2305
- Capurucho JMG, Cornelius C, Borges SH et al (2013) Combining phylogeography and landscape genetics of *Xenopipo atronitens* (Aves: Pipridae), a white sand campina specialist, to understand Pleistocene landscape evolution in Amazonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110(1):60–76
- Catchen J, Amores A, Bassham S et al (2013) Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1(3):171–182
- Chhatre VE, Emerson KJ (2017) StrAuto: automation and parallelization of STRUCTURE analysis. *BMC Bioinformatics* 18(192)
- Claramunt S, Hong M, Bravo A (2022) The effect of flight efficiency on gap-crossing ability in Amazonian forest birds. *Biotropica* 54(4):860–868
- Clarke RT, Rothery P, Raybould AF (2022) Confidence limits for regression relationships between distance matrices: Estimating gene flow with distance. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* 7:361–372

- Covarrubias S, Gutiérrez-Rodríguez C, Rojas-Soto O et al (2022) Functional connectivity of an endemic tree frog in a highly threatened tropical dry forest in Mexico. *Ecoscience* 29(1):69–85
- Dallimer M, Rouquette JR, Skinner AMJ et al (2012) Contrasting patterns in species richness of birds, butterflies and plants along riparian corridors in an urban landscape. *Diversity and Distributions* 18(8):742–753
- Danecek P, Auton A, Abecasis G et al (2011) The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics* 27(15):2156–2158
- Develey PF, Stouffer PC (2001) Effects of roads on movements by understory birds in mixed-species flocks in central Amazonian Brazil. *Conservation Biology* 15(5):1416–1422
- Do C, Waples RS, Peel D (2014) NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14:209–214
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2):359–361
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611–2620
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3):564–567

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131(2): 479–491
- Frankham R (2005) Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126(2):131–140
- Friis G, Atwell J, Fudickar A et al (2021) Rapid evolutionary divergence of a songbird population following recent colonization of an anthropogenic habitat. *Molecular Ecology* 31(9):2625–2643
- Gentry AH (1982) Neotropical floristic diversity: Phytogeographical connections between central and south America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden* 69(2):557–593
- Gillies CS, Clair CCS (2008) Riparian corridors enhance movement of a forest specialist bird in fragmented tropical forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(50):19774–19779
- Glenn TC, Nilsen RA, Kieran TJ et al (2019) Adapterama I: universal stubs and primers for 384 unique dual-indexed or 147,456 combinatorially-indexed Illumina libraries (iTru & iNext). *Peerj* 7:e7755
- Goslee SC, Urban DL (2007) The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software* 22(7):1–19
- Goudet J (2005) HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* 5(1):184–186
- Graham BA, Heath DD, Mennill DJ (2017) Dispersal influences genetic and acoustic spatial structure for both males and females in a tropical songbird. *Ecology and Evolution* 7(23):10089–10102

- Graham BA, Heath DD, Pulgarin P et al (2022). Habitat connectivity, gene flow, and population genetic structure in a Neotropical understory insectivore, the Rufous-and-white Wren. *Ornithology* 139(4) ukac030
- Grant P (1966) The coexistence of two wren species of the genus *Thryothorus*. *The Wilson Bulletin* 78(3):266–278
- Hannah L, Midgley G, Andelman S et al (2007) Protected area needs in a changing climate. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5(3):131–138
- Hernández-Guzmán R, Ruíz-Luna A, González C (2019) Assessing and modeling the impact of land use and changes in land cover related to carbon storage in a western basin in Mexico. *Remote Sensing Applications-Society and Environment* 13:318–327
- Huynh LY, Maney DL, Thomas JW (2010) Contrasting population genetic patterns within the white-throated sparrow genome (*Zonotrichia albicollis*). *BMC Genetics* 11(96)
- Jahner JP, Gibson D, Weitzman CL et al (2016) Fine-scale genetic structure among greater sage-grouse leks in central Nevada. *BMC Evolutionary Biology* 16:127
- Jombart T (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24(11):1403–1405
- Jombart T, Devillard S, Balloux F (2010) Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11:94
- Johnson O, Ribas CC, Alexio A et al (2023) Amazonian birds in more dynamic habitats have less population structure and higher gene flow. *Molecular Ecology* 10.1111/mec.16886.

- Keyghobadi N (2007) The genetic implications of habitat fragmentation for animals. *Canadian Journal of Zoology* 85(10):1049–1064
- Khimoun A, Peterman W, Eraud C et al (2017) Landscape genetic analyses reveal fine-scale effects of forest fragmentation in an insular tropical bird. *Molecular Ecology* 26(19):4906–4919
- Klinga P, Mikolas M, Delegan IV et al (2020) Temporal landscape genetic data indicate an ongoing disruption of gene flow in a relict bird species. *Conservation Genetics* 21(2):329–340
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M et al (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources* 15(5):1179–1191
- Luu K, Bazin E, Blum MGB (2017) pcadapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources* 17(1):67–77
- MacGregor-Fors I, Schondube JE (2011) Use of Tropical Dry Forests and Agricultural Areas by Neotropical Bird Communities. *Biotropica* 43(3):365–370
- Malpica A, Mendoza-Cuenca L, González C (2022) Color and morphological differentiation in the Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*) in the tropical dry forests of Mexico: The role of environment and geographic isolation. *Plos one* 17(6): e0269860.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution* 18(4):189–197

- Manichaikul A, Mychaleckyj JC, Rich SS et al (2010) Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics* 26(22):2867–2873
- Martínez A, Finegan B, DeClerck F et al (2011) Movimientos de *Thryothorus rufalbus* (aves: Troglodytidae) y conectividad funcional en el paisaje fragmentado de Mariguás, Nicaragua. *Agroforestería en las Américas* 48:94–102.
- McRae BH (2006) Isolation by resistance. *Evolution* 60(8):1551–1561
- McRae BH, Dickson BG, Keitt TH & Shah VB (2008) Using circuit theory to model connectivity in ecology, evolution, and conservation. *Ecology* 89(10):2712–2724
- Miles L, Newton AC, DeFries RS et al (2006) A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography* 33(3):491–505
- Miller MP, Gratto-Trevor C, Haig SM et al (2013) Population Genetics and Evaluation of Genetic Evidence for Subspecies in the Semipalmated Sandpiper (*Calidris pusilla*). *Waterbirds* 36(2):166–178
- Morinha F, Davila JA, Bastos E et al (2017) Extreme genetic structure in a social bird species despite high dispersal capacity. *Molecular Ecology* 26(10):2812–2825
- Musmann SM, Douglas MR, Chafin TK, Douglas ME (2019) BA3-SNPs: Contemporary migration reconfigured in BayesAss for next-generation sequence data. *Methods in Ecology and Evolution* 10(10):1808–1813
- Nakagawa S, Schielzeth H (2013) A general and simple method for obtaining R^2 from generalized linear mixed-effects models. *Methods in Ecology and Evolution* 4:133–142

- Olah G, Smith AL, Asner GP et al (2017) Exploring dispersal barriers using landscape genetic resistance modelling in scarlet macaws of the Peruvian Amazon. *Landscape Ecology* 32(2):445–456
- Paris JR, Stevens JR, Catchen JM (2017) Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution* 8(10):1360–1373
- Peterman WE, Connette GM, Semlitsch RD, Eggert LS (2014) Ecological resistance surfaces predict fine-scale genetic differentiation in a terrestrial woodland salamander. *Molecular Ecology* 23(10):2402–2413
- Peterman WE (2018) ResistanceGA: An R package for the optimization of resistance surfaces using genetic algorithms. *Methods in Ecology and Evolution* 9(6):1638–1647
- Prieto-Torres DA, Rojas-Soto OR, Santiago-Alarcon D et al (2019) Diversity, endemism, species turnover and relationships among avifauna of neotropical seasonally dry forests. *Ardeola* 66(2):257–277
- Primmer CR, Borge T, Lindell J, Saetre G-P (2002) Single-nucleotide polymorphism characterization in species with limited available sequence information: high nucleotide diversity revealed in the avian genome. *Molecular Ecology* 11(3):603–612
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2):945–959
- Quintela M, Berlin S, Wang B, Oglund HJ (2010) Genetic diversity and differentiation among *Lagopus lagopus* populations in Scandinavia and Scotland: evolutionary significant units confirmed by SNP markers. *Molecular Ecology* 19(12):2380–93
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D et al (2018) Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5):901–904
- Reed DH, Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17(1):230–237
- Ritter, C. D., Ribas, C. C., Menger, J., Borges, S. H., Bacon, C. D., Metzger, J. P., ... & Cornelius, C. (2021). Landscape configuration of an Amazonian island-like ecosystem drives population structure and genetic diversity of a habitat-specialist bird. *Landscape Ecology*, 36(9), 2565–2582.
- Ronce O (2007) How does it feel to be like a rolling stone? Ten questions about dispersal evolution. *Annual Review of Ecology, and Systematics* 38:231–253
- Sanchez-Azofeifa GA, Quesada M, Rodríguez JP et al (2005) Research priorities for neotropical dry forests. *Biotropica* 37(4):477–485
- Sanchez-Azofeifa GA, Quesada M, Cuevas-Reyes P et al (2009) Land cover and conservation in the area of influence of the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, Mexico. *Forest Ecology and Management* 258(6):907–912
- Sanchez-Azofeifa A, Powers JS, Fernandes GW, Quesada M (2013) Tropical dry forests in the Americas: ecology, conservation, and management. CRC Press
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR (1991) Biological consequences of ecosystem fragmentation - a review. *Conservation Biology* 5(1):18–32
- Serrano-Rodríguez A, Escalona-Segura G, Rodríguez AG et al (2022) Effects of anthropogenic habitat fragmentation on the genetic connectivity of the threatened and endemic *Campylorhynchus yucatanicus* (Aves, Troglodytidae) in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Diversity* 14, 1108.

- Soberanes-González CA, Arizmendi MC, Schulenberg TS (2020) Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*), version 1.0. In birds of the world Online (T. S. Schulenberg, Editor). Cornell Lab of Ornithology, Ithaca, NY, USA
- Storfer A, Murphy MA, Spear SF et al (2010) Landscape genetics: Where are we now? *Molecular Ecology* 19:3496–3514
- Tan DJX, Chattopadhyay B, Garg KM et al (2018) Novel genome and genome-wide SNPs reveal early fragmentation effects in an edge-tolerant songbird population across an urbanized tropical metropolis. *Scientific Reports* 8:12804
- Termignoni-García F, Jaramillo-Correa JP, Chable-Santos J et al (2017) Genomic footprints of adaptation in a cooperatively breeding tropical bird across a vegetation gradient. *Molecular Ecology* 26(17):4483–4496
- Thatte P, Joshi A, Vaidyanathan S et al (2018) Maintaining tiger connectivity and minimizing extinction into the next century: Insights from landscape genetics and spatially-explicit simulations. *Biological Conservation* 218:181–191
- Trejo I, Dirzo R (2000) Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation* 94(2):133–142
- Tremblay MA, St. Clair C (2009) Factors affecting the permeability of transportation and riparian corridors to the movement of songbirds in an urban landscape. *Journal of Applied Ecology* 46(6):1314–1322
- van Etten J (2017) R Package gdistance: Distances and Routes on Geographical Grids. *Journal of Statistical Software* 76(13):1–21

- van Rees CB, Reed JM, Wilson RE, Underwood JG, Sonsthagen SA (2018) Landscape genetics identifies streams and drainage infrastructure as dispersal corridors for an endangered wetland bird. *Ecology and Evolution* 8(16):8328–8343
- Wilson GA, Rannala B (2003) Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163(3):1177–1191
- Wright S (1943) Isolation by Distance. *Genetics* 28:114–138
- Yumnam B, Jhala YV, Qureshi Q et al (2014) Prioritizing Tiger Conservation through Landscape Genetics and Habitat Linkages. *Plos One* 9(11)

Supporting information

Methods

RadSeq library preparation, SNP processing and calling

Quality of raw sequence reads was evaluated with FastQC v.0.11.7 (Andrews 2010). We used STACKS v 2.55 (Catchen et al. 2013) to demultiplex (separate reads and assign to individuals according to their barcodes) and clean the data using the *process_radtags* module. Reads without called bases (-c) and below a Phred Score of 35 (-q) were discarded. As universal Illumina adapters were present in our raw data, we used TRIMGALORE v.0.6.4 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) to removed them, and then used TRIMMOMATIC v.0.38 (Bolger et al. 2014) to trim reads to 110 bp. Only samples where both reads passed quality filters were used in downstream analysis.

Landscape layer construction

Elevation layer was obtained from the digital elevation model (DEM) of the *Continuo de Elevaciones Mexicano*. Slope (in degrees) was calculated from the DEM using the *Spatial*

Analyst, *Surface* and *Slope* tools of ArcGIS (ESRI 2015). Roads were obtained from the *Red Nacional de Caminos* of the *Instituto Mexicano del Transporte*, assigning values of 1 to pixels that contained two-lane roads and values of 0 to the rest of the matrix using the *Reclasiffy* tool in ArcGIS (see Covarrubias et al. 2022 for details). Rivers and stream system layer was obtained from the DEM using the *Hydrology* function in ArcGIS, reclassifying with values of 0 and 1. From this layer we constructed two different surfaces: 1) wide rivers (~ 250 m in their widest parts), and 2) temporary streams (~ 2–33 m wide). We used a land use and land cover layer from Covarrubias et al. (2022), that was originally retrieved from the land use and land cover layer from 2015 from the North American Land Cover Change Monitoring System. The land use and land cover layer from Covarrubias et al. (2022) under a spatial resolution of 100 m was used to construct three different surfaces: 1) original vegetation surface, reclassifying with values of 1 to covers that included tropical dry forest, evergreen forest and mangrove and 0 to the rest of the matrix, 2) open-areas surface, reclassifying with values of 1 to pixels that included exposed soils/grassland/human settlement and 0 to the rest of the matrix, and 3) agriculture surface reclassifying with 1 and 0.

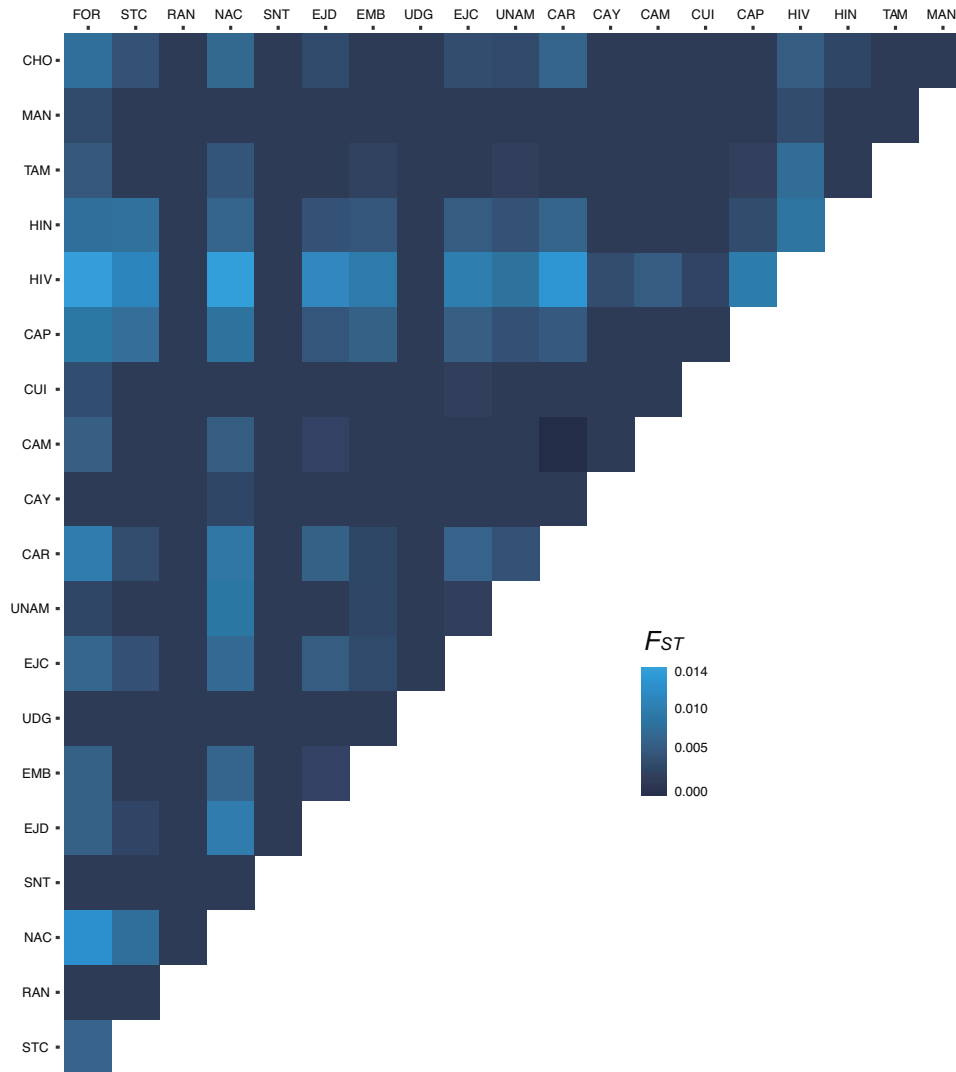
References

- Andrews S (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15):211–2120
- Catchen J, Amores A, Bassham S et al (2013) Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1(3):171–182
- Covarrubias S, Gutiérrez-Rodríguez C, Rojas-Soto O et al (2022) Functional connectivity of an endemic tree frog in a highly threatened tropical dry forest in Mexico. *Ecoscience* 29(1):69–85

Table S1. Pairwise genetic differentiation (F_{ST}) between the 20 sampling localities where *Thryophilus sinaloa* was collected. Values significantly different from zero are indicated by an asterisk. Populations names abbreviations correspond to those in Table 1.

	FOR	STC	RAN	NAC	SNT	EJD	EMB	UDG	EJC	UNAM	CAR	CAY	CAM	CUI	CAP	HIV	HIN	TAM	MAN	CHO
FOR	—																			
STC	0.005	—																		
RAN	0.000	0.000	—																	
NAC	*0.012	*0.007	0.000	—																
SNT	0.000	0.000	0.000	0.000	—															
EJD	0.005	0.002	0.000	*0.009	0.000	—														
EMB	*0.005	0.000	0.000	0.006	0.000	0.001	—													
UDG	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—												
EJC	0.006	0.003	0.000	*0.006	0.000	0.004	0.002	0.000	—											
UNAM	0.002	0.000	0.000	*0.008	0.000	0.000	*0.002	0.000	0.000	—										
CAR	*0.009	*0.002	0.000	*0.008	0.000	0.005	*0.002	0.000	*0.005	*0.003	—									
CAY	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—								
CAM	0.005	0.000	0.000	0.004	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	—							
CUI	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	—						
CAP	*0.008	*0.007	0.000	*0.008	0.000	0.004	*0.005	0.000	*0.005	0.003	*0.004	0.000	0.000	0.000	—					
HIV	*0.014	*0.011	0.000	*0.014	0.000	0.011	*0.009	0.000	0.010	0.007	*0.013	0.002	0.004	0.002	*0.009	—				
HIN	0.007	*0.007	0.000	0.005	0.000	0.003	0.004	0.000	0.004	0.003	*0.005	0.000	0.000	0.000	0.002	0.008	—			
TAM	0.004	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.007	0.000	—		
MAN	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	—	
CHO	*0.007	0.003	0.000	*0.006	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.002	*0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004	0.002	0.000	-0.006	—

Figure S1. A heat map displaying pairwise genetic distance (pairwise F_{st}) among sampling localities of *Thryophilus sinaloa* across the landscape. Localities abbreviations correspond to those of Table 1.



Scripts of the analyzes performed in R packages

Genetic global estimations

```
library(hierfstat)
library(vcfR)

# 1. Load VCF
sinaloa.loci <- read.vcf("sinaloa_neutral_database.vcf")

# 2. Convert VCF to genind format
sinaloa.genind <- loci2genind(sinaloa.loci)

# 3. Add population tags
pop.map <- read.delim("metadata.txt", header = F, col.names = c("Sample", "Pop", "LAT"))

# 4. Add the pop tags while creating a hierfstat object
sinaloa.hierfstat <- genind2hierfstat(sinaloa.genind, pop = pop.map$Pop)
basic.stats(sinaloa.hierfstat)
```

Analysis of multiple regression on distance matrices (MRM)

```
library(ecodist)

#Load coordinates to create a geographic distance matrix
points<- read.csv(file = "./sinaloa_coords.csv", header=T, sep=",")#
points
geography <- dist(cbind(puntos$Lon, puntos$Lat))
geography

geo_dist <-as.dist(geography)

fst<-read.csv(file = "/ Fst_Sinaloa.csv", header=F, sep=",")
fst_dist <- as.dist(fst)

MRM(fst_dist ~ geo_dist, nperm = 100)
```

Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC)

```
library("adegenet")
library(readr)

# 1. Import VCF file
vcf <- read.vcfR("sinaloa_neutral_database.vcf")
```

```

# 2. Create a genind object
Mydata<- vcfR2genind(vcf)
Mydata

# 2. Index populations
pops <-read_tsv("Popmap_samplinglelocations.tsv", col_names = FALSE)
View(pops)
individuals_in_genind<-pops

individuals_in_genind
names(individuals_in_genind)[1]<- paste("AccessID")
names(individuals_in_genind)[2]<- paste("population")

population<- individuals_in_genind$population #this is for strata
pop(Mydata) <- population
Mydata@pop
levels(Mydata@pop)

# 3. Define the stratifications for the data
indis<-individuals_in_genind$AccessID
local<-individuals_in_genind$population
local
la.strat.popmap<- data.frame(paste(local,indis, sep = "_" ))
strata(Mydata)<- la.strat.popmap
splitStrata(Mydata)<- ~local/indis ##### splitStrata command is used to index the
stratifications
Mydata@strata
nameStrata(Mydata)
nameStrata(Mydata)<- ~Localidad/Individuos

# 4. Identifying clusters using find.clusters function
grp<-find.clusters(Mydata)
table(pop(Mydata), grp$grp)
table.value(table(pop(Mydata), grp$grp), col.labels = paste("cluster", 1:2)# in cluster you
#can change the number 3 to the number of clusters of interest

# 5. DAPC analysis
dapc1 <- dapc(Mydata, var.contrib = TRUE, scale = FALSE, n.pca = 80, n.da =
nPop(Mydata) - 1)
dapc1

scatter(dapc1, cell = 0, pch = 16:18, cstar = 0, mstree = TRUE, lwd = 2, lty = 2)
set.seed(4)
contrib <- loadingplot(dapc1$var.contr, axis = 2, thres = 0.07, lab.jitter = 1)

```

```

Pram<- Mydata
dapcCross <- xvalDapc(tab(Pram, NA.method = "mean"), pop(Pram))
dapcCross[-1]

set.seed(999)
system.time(dapcCross <- xvalDapc(tab(Pram, NA.method = "mean"), pop(Pram),
                                n.pca = 15:20, n.rep = 100,
                                parallel = "multicore", ncpus = 4L))
dapcCross[-1]

# to select colors for each sampling location
myCol <- c("#000066", "#003366", "#003399", "#336699", "#006699", "#3399CC",
"#6699CC", "#0099CC", "#33CCFF", "#66CCFF", "#66FFFF", "#99FFFF", "#FFCC99",
"#FFCC66", "#FFCC00", "#FFCC33", "#FF9933", "#FF9900", "#FF6600", "#FF6633",
"#660066")

scatter(dapcCross$DAPC, cex = 2, legend = TRUE,
        clabel = FALSE, posi.leg = "topleft", scree.pca = TRUE,
        posi.pca = "topright", col=myCol, cleg = 0.75, xax = 1, yax = 2, inset.solid = 0.5)

```

Resistance surface optimization in ResistanceGA

FIRST PART to optimize resistance surfaces one by one

1. Load packages

```

library(raster)
library(ResistanceGA)
library(ggplot2)
library(gdistance)
library(gstudio)
library(PopGenReport)
library(doParallel)
library(sp)
library(adegenet)

```

2. Import landscape features

```

LF<- raster("elevation.asc") # we used a continuous landscape layer for this example
par(mar = rep(2, 4))
plot(LF)
crs(LF)

```

3. Import genetic distance matrix

```

dist<-read.csv(file = "./Fst_Sinaloa_Arlequin.csv", sep=",", row.names = 1)
dist1 <- as.matrix(dist)
dist1

```

```

# 4. Import geographic points
GP<- read.csv(file = "./sinaloa_coords.csv", header=T, sep=",")
pts <- SpatialPoints( GP[c(5,4)], proj4string=CRS("+proj=utm +zone=13 +ellps=WGS84
+datum=WGS84 +units=m +no_defs"))
plot(pts, add=TRUE)
crs(pts)

# 5. Create a directory to save results for each run
dir.create("./ResistanceGA_elevation")
dir.create(file.path("./ResistanceGA_elevation/", "run01_elevation"))

# 5.1. Select directory to write .asc files and results
write.dir <- "./ ResistanceGA_elevation /run01_elevation/"

# 6. Optimization
GA.inputs_All <- GA.prep(method = "AIC",
  ASCII.dir = LF,
  Results.dir = write.dir,
  min.cat=0 # For categorical surfaces, specify this number (e.g. 0.0001). Do
not use for continuous surfaces.
  max.cont= 2500,
  select.trans = list("A"), # change "A" for "NA" when optimizing categorical
surfaces.
  parallel = 4)

gdist.inputs <- gdist.prep(n.Pops = length(pts),
  samples = pts,
  response = lower(dist1),
  method = 'commuteDistance')

# 6.1. Run optimization
singlesurface_elevation <- SS_optim(gdist.inputs = gdist.inputs, GA.inputs =
GA.inputs_All)

#6.2. Saving optimization results
save(singlesurface_elevation, file = "singlesurface_elevation.rda")

# Repeat the same process for each landscape layer (feature), remember to create a new
directory with other name (and save results) for each landscape layer.

# SECOND PART for conducting bootstrap analysis using previous optimized surfaces

library(ResistanceGA)
library(PopGenReport)

# 1. Load optimized surfaces results

```

```

load("singlesurface_slope.rda")
mod1 <- singlesurface_slope

load("singlesurface_elevation.rda") # this is de landscape feature used as an example in the
first part of the script
mod2 <- singlesurface_elevation

load("singlesurface_openareas.rda")
mod3 <- singlesurface_openareas

load("singlesurface_agriculture.rda")
mod4 <- singlesurface_agriculture

load("singlesurface_originalvegetation.rda")
mod5 <- singlesurface_originalvegetation
load("singlesurface_roads.rda")
mod6 <- singlesurface_roads

load("singlesurface_streams.rda")
mod7 <- singlesurface_streams

load("singlesurface_rivers.rda")
mod8 <- singlesurface_rivers

# 2. Extract relevant components from optimization outputs
# Make a list of cost/resistance distance matrices

mat.list <- c(mod1$"cd", mod2$"cd", mod3$"cd", mod4$"cd", mod5$"cd", mod6$"cd",
mod7$"cd", mod8$"cd")
k <- rbind(mod1$"k", mod2$"k", mod3$"k", mod4$"k", mod5$"k", mod6$"k", mod7$"k",
mod8$"k")

# 3. Import genetic distance matrix
fst <- read.csv("Fst_Sinaloa_Arlequin.csv", sep = ",", header=TRUE, row.names = 1)
fst <- as.matrix(fst)
str(fst)
colnames(fst)<- NULL
rownames(fst)<- NULL
response <- fst

# 4. Perform bootstrap analysis
AIC.boot <- Resist.boot(mod.names = names(mat.list),
                        dist.mat = mat.list,
                        n.parameters = k[,2],
                        sample.prop = 0.75,

```

```
        iters = 10000,  
        obs = 20,  
        genetic.mat = fst)  
AIC.boot  
  
# 5. Saving bootstrap results  
boot<- AIC.boot  
write.csv(boot, file = "results_boot.csv")  
save(AIC.boot, file = "AICboot.rda")
```

CAPÍTULO II

Filogeografía del Saltapared Sinaloense en el bosque tropical caducifolio del Pacífico mexicano: buscando señales de selección

RESUMEN

Los bosques tropicales caducifolios (BTC) mesoamericanos son reconocidos por sus altos niveles de riqueza, endemismo, especialización, así como una gran variación en las condiciones ambientales, sin embargo, los factores que promueven la gran diversidad han sido poco explorados. Una hipótesis que explica el origen de esta gran diversidad es la de los refugios del Pleistoceno, donde la distribución de las especies se contrajo y expandió cíclicamente en respuesta a los cambios climáticos, restringiendo y promoviendo el flujo genético entre las poblaciones. Otra hipótesis que puede explicar la gran diversidad se relaciona con cómo los organismos interactúan con el ambiente, donde la variación en las condiciones ambientales puede resultar en procesos de adaptación local. Lo anterior puede reducir el flujo genético entre poblaciones que habitan en condiciones ambientales distintas. Usando como modelo de estudio al Saltapared Sinaloense (*Thryophilus sinaloa*), un ave endémica del BTC del Pacífico mexicano, la cual presenta variación subespecífica (*Thryophilus sinaloa cinereus*, *T. sinaloa sinaloa*, *T. sinaloa russeus*) y una matriz de 15,389 polimorfismos de nucleótido único (SNPs): 1) describí la diversidad y estructura genética neutral de *Thryophilus sinaloa*, 2) busqué loci outliers que potencialmente pudieran sugerir adaptaciones locales y describí la estructura genética con esos loci y 3) modelé la distribución potencial actual de la especie y hacia el pasado para determinar si los cambios en la distribución asociados a los cambios climáticos históricos, pueden explicar la estructura genética neutral. Detecté 139 loci outlier, y la diversidad genética decreció de sur a norte entre las subespecies. Un análisis de asignación en ADMIXTURE sugiere que el número más probable de grupos genéticos es 3 correspondiendo a las subespecies. Los análisis discriminantes de componentes principales (DAPC) sugieren una mayor estructura genética con los datos neutrales que con los selectivos, y en ambos casos la subespecie *russeus* (al sur de la distribución) estuvo subestructurada en dos grupos genéticos. Con los datos neutrales las subespecies *cinereus* y *sinaloa* forman grupos genéticos distintos mientras que con los datos selectivos dichas subespecies forman un grupo genético. Los modelos de nicho ecológico sugieren que la distribución actual de la especie es más amplia que en el pasado. Durante el Último Interglacial (140,000-120,000 años), las áreas de distribución de las subespecies *cinereus* y *sinaloa* (norte y centro de la distribución) eran más restringidas, y durante el Último Máximo Glacial (21,000 años) hubo una contracción al norte de la distribución. Los resultados ayudan a entender el papel de los cambios climáticos históricos, así como los potenciales procesos de adaptación local en explicar los patrones de estructura genética a lo largo de la distribución de la especie.

Palabras clave: Aves, modelos de nicho ecológico, SNPs.

INTRODUCCIÓN

El papel que juegan las diferentes fuerzas evolutivas en moldear los patrones de diversidad y estructura genética intraespecífica observados hoy en día, ha sido tema central de estudio en la biología evolutiva (Schluter 2001, 2009; Rundle & Nosil 2005; Sobel et al. 2010). La filogeografía estudia los procesos que explican la distribución geográfica actual de linajes genéticos (Avice 2000). Tanto los eventos históricos (e. g. formación de barreras montañosas o cambios climáticos históricos) que pudieron cambiar los patrones de flujo de genes entre poblaciones, como el apareamiento no aleatorio debido a la distancia geográfica y/o las interacciones con las condiciones ambientales locales son mecanismos tanto neutrales como selectivos que pueden promover las diferencias genéticas y/o fenotípicas entre poblaciones de las especies en sus áreas de distribución (Bradburd et al. 2013; Wang & Bradburd 2014; Weber et al. 2018). Los efectos de dichos mecanismos no son mutuamente excluyentes, ya que todos ellos en conjunto pueden influenciar los patrones genéticos y/o fenotípicos de las poblaciones a través de su historia evolutiva (e. g. Colombelli-Négrell 2016; Friis et al. 2018).

El bosque tropical caducifolio (BTC) de Mesoamérica es reconocido como un ecosistema terrestre con altos niveles de riqueza de especies, endemismo y especialización de diferentes taxa (García-Marmolejo et al. 2008; Ceballos et al. 2010; Ríos-Muñoz & Navarro-Sigüenza 2012; Prieto et al. 2019). A nivel mundial, el BTC es de los ecosistemas más extensos y mejor representados en zonas tropicales y subtropicales. En México, el BTC se distribuye de manera más o menos continua en áreas extensas desde Sonora hasta Chiapas a lo largo de la vertiente del Pacífico, sin barreras geográficas aparentes para la dispersión (excepto la fragmentación contemporánea) entre las poblaciones de vertebrados terrestres, incluidas las aves. Los BTCs a lo largo de la vertiente del Pacífico en el oeste de México y

América Central albergan entre 42 y 45 especies de aves endémicas (Gordon & Ornelas 2000; Peterson & Navarro 2000), muchas de las cuales muestran variación fenotípica subespecífica (Dickinson 2003), lo que podría sugerir etapas tempranas del proceso de especiación. Sin embargo, a pesar del reconocimiento del BTC como un hotspot de la biodiversidad (García-Marmolejo et al. 2008; Ceballos et al. 2010), los mecanismos que han generado y mantenido la alta diversidad de especies que alberga aún no se entienden con claridad. Esto se ve reflejado en los relativamente pocos estudios filogeográficos de aves u otros taxa que habitan el BTC (e. g. Arbeláez-Cortés & Navarro 2013; Arbeláez-Cortés et al. 2014 a,b; Castillo-Chora 2021; Vásquez-López et al. 2021), en comparación con estudios de taxa que habitan otros ecosistemas particularmente de zonas montañosas como los bosques mesófilos de montaña y bosques de pino o pino-encino (e. g. González et al. 2011; Barrera-Guzmán et al. 2012; Malpica & Ornelas 2014; Zamudio-Beltrán et al. 2020). Tampoco es bien entendido como han sido los cambios históricos en su distribución (pero véase Becerra 2005; Pérez-García et al. 2012).

Los BTC se caracterizan por una marcada estacionalidad, presentado una severa estación seca de cinco a ocho meses consecutivos y una estación lluviosa donde se presenta la mayor parte de la precipitación (Rzedowski 2006). A pesar de la distribución relativamente continua de los BTC del Pacífico Mexicano, diversos estudios han reportado una alta variabilidad en las condiciones ambientales, tales como los regímenes de temperatura y precipitación, la evapotranspiración, la incidencia de la radiación solar, el índice de vegetación de diferencia normalizada (NDVI), la cobertura arbórea, así como la estructura y composición de la vegetación (Trejo-Vásquez 1998; Trejo & Dirzo 2002; Rzedowski 2006; Malpica et al. 2022). Incluso Olson et al. (1998), propusieron diferentes ecorregiones del

BTC para Mesoamérica y el Caribe a partir de sus similitudes ambientales, estructura del hábitat y patrones de complejidad biológica (**Figura S1**). Esta alta variabilidad en las condiciones ambientales a lo largo de la distribución del BTC puede potencialmente exponer a las poblaciones a diferentes presiones selectivas, mostrando rasgos fenotípicos particulares que podrían sugerir adaptaciones locales a las condiciones ambientales, lo cual podría explicar parte de las diferencias fenotípicas intraespecíficas de algunas especies (e. g. Arbeláez-Cortés & Navarro 2013; Arbeláez-Cortés et al. 2014b; Vásquez-López et al. 2021; Malpica et al. 2022). De manera adicional, el efecto de la deriva génica debido al aislamiento por distancia, puede ser otro mecanismo que promueve la diferenciación genética y/o incluso fenotípica intraespecífica debido al apareamiento no aleatorio entre los individuos (Wright 1943). En otras palabras, los individuos de poblaciones más lejanas se aparean con menor frecuencia que los individuos de poblaciones geográficamente más cercanas reduciendo así el flujo genético y promoviendo la diferenciación genética y/o fenotípica (e. g. Seeholzer & Brumfield 2017).

Los cambios climáticos cíclicos del Pleistoceno también podrían explicar la gran diversidad y endemismos, así como la variación fenotípica y genética de las especies distribuidas en el BTC. Se ha propuesto que, durante los ciclos glaciales, la distribución de los BTC en la cuenca del Amazonas pudo haberse expandido, promoviendo su conectividad mientras que en los periodos interglaciares pudo haberse contraído y aislado (Pennington et al. 2000), restringiendo el flujo genético entre las poblaciones. De acuerdo con Castillo-Chora et al. (2021), quienes usando genes mitocondriales realizaron un estudio filogeográfico de cuatro especies de aves que se distribuyen a lo largo del BTC del Pacífico en México y Centro América, la diversificación intraespecífica se produjo en diferentes momentos durante

el Pleistoceno (en un periodo de tiempo entre 0.29 – 2.0 m.a.). Predijeron también, mediante modelos de distribución, un área de estabilidad climática dentro de lo que denominan la zona central de la costa Pacífica (Michoacán y Guerrero), la cual probablemente permitió la persistencia de poblaciones aisladas durante los periodos glaciales-interglaciares promoviendo así su divergencia.

El Saltapared Sinaloense (*Thryophilus sinaloa*, Aves: Troglodytidae) es un ave endémica de México (Grant 1966) que se distribuye de manera continua a lo largo de la vertiente del Pacífico desde el centro de Sonora hasta el norte de Oaxaca (Soberanes-González 2015). Se han descrito tres subespecies en la literatura (*Thryophilus sinaloa cinereus*, *T. s. sinaloa* y *T. s. russeus*) basadas en diferencias sutiles en la coloración del plumaje (Brewster 1889; Baird 1864; Nelson 1903). La variación fenotípica en la especie (coloración del plumaje y morfología) a través de su distribución en el BTC en el Pacífico Mexicano, fue recientemente estudiada por Malpica et al. (2022). Los resultados sugieren que la variación fenotípica detectada podría ser resultado tanto de adaptaciones a distintas condiciones ambientales a lo largo del BTC en las que habita cada subespecie, lo cual es también es apoyado con pruebas de divergencia de nicho, como de factores neutrales, como el aislamiento geográfico (Malpica et al. 2022). Sin embargo, son necesarios los datos genéticos para apoyar estas hipótesis, ya que también podría tratarse de plasticidad fenotípica (i. e. diferenciación fenotípica en la ausencia de diferenciación genética; Williams 1966).

En este estudio, usé como modelo de estudio al Saltapared Sinaloense (*Thryophilus sinaloa*), una especie de ave endémica del BTC que presenta variación subespecífica (*Thryophilus sinaloa cinereus*, *T. s. sinaloa*, *T. s. russeus*) para entender los procesos que explican los patrones de variación genética a lo largo de su distribución en el bosque tropical

caducifolio del Pacífico mexicano. De manera específica, usando polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), con los cuales es posible separar el efecto de procesos neutrales y selectivos: 1) describí la variación y estructura genética neutral (con loci neutrales) de *Thryophilus sinaloa* a lo largo de su distribución; 2) identifiqué loci outliers potencialmente bajo selección a través de genoma y describí la estructura genética con esos loci para buscar señales que pudieran sugerir adaptaciones locales; y 3) evalué el papel de las barreras transitorias asociadas a los cambios climáticos del Pleistoceno mediante modelos de nicho ecológico, en explicar la estructura genética neutral. Se espera detectar estructura filogeográfica en concordancia con las subespecies descritas en la literatura. Se espera también detectar loci outliers potencialmente bajo selección a lo largo del genoma y mayor estructura genética asociada a estos loci en comparación con los loci neutrales, debido a los rasgos fenotípicos descritos en Malpica et al. (2022) que se sugiere pudieran ser resultado de adaptaciones locales. Con respecto al papel de los cambios climáticos del Pleistoceno, se espera una mayor expansión y mayor conectividad en la distribución de la especie durante el Último Máximo Glacial, así como aislamiento durante el periodo interglacial. Finalmente, de acuerdo con las pruebas de divergencia de nicho en las que *T. s. cinereus* (al norte de la distribución) y *T. s. sinaloa* (al centro de la distribución) tienen nichos similares entre sí, pero divergentes de la subespecie del sur (*T. s. russeus*; Malpica et al. 2022), y debido a actuales expansiones en el norte de la distribución de la especie, se espera una reciente expansión al norte de la distribución asociada a los cambios históricos climáticos del Pleistoceno. Entender la influencia que tienen distintos procesos en explicar los patrones de diversidad en ecosistemas tan biodiversos es muy importante, ya que al entender los factores que

promueven la diversidad genética de las especies que los habitan, puede ayudar a promover su conservación y mantenimiento a largo plazo.

Metodología

Especie de estudio

Thryophilus sinaloa (Aves: Troglodytidae), es una especie endémica y común que habita principalmente el sotobosque del BTC en la vertiente del Pacífico mexicano (Grant 1966). Su distribución se extiende desde Sonora y sur de Chihuahua hasta el oeste de Oaxaca, así como tierra adentro en la depresión del Balsas. En la literatura se han descrito tres subespecies: *Thryophilus sinaloa cinereus* (Brewster 1889) que se distribuye desde el noreste de Sonora y oeste de Chihuahua hasta el norte de Sinaloa. *Thryophilus sinaloa sinaloa* (Baird 1864) ocurre desde el centro de Sinaloa y este de Durango hasta Michoacán. Finalmente, *Thryophilus sinaloa russeus* (Nelson 1093) que se encuentra distribuida en Guerrero y oeste de Oaxaca. Las subespecies han sido descritas en función de diferencias sutiles en la coloración del plumaje. Se ha sugerido que hay una subespecie no descrita en las regiones costeras desde el oeste de Nayarit hasta Colima o Michoacán, lo anterior basado en las diferencias de color del plumaje, particularmente en los flancos (Phillips 1986), sin embargo, hasta la fecha no hay estudios que confirmen a dicha subespecie.

Sitio de estudio

Los BTCs en México se encuentra establecidos de 0 a 1900 msnm, más frecuentemente debajo de los 1500 msnm (Rzedowski 2006). La temperatura media anual varía de 23.1°C durante la estación seca a 26.4°C durante la estación lluviosa, mientras que la precipitación

media anual varía de los 12 mm durante la estación seca a 758 mm durante la estación lluviosa (Malpica et al. 2022). La característica más distintiva de los BTCs es su marcada estacionalidad, que consiste en una sequía severa (generalmente de noviembre a mayo) y una estación lluviosa donde ocurre la mayor parte de precipitación anual (generalmente de junio a octubre; Rzedowski 2006). Una adaptación de la vegetación a la sequía extrema es la senescencia de las hojas durante la estación seca y la producción de follaje nuevo durante la estación lluviosa (Murphy & Lugo 1986), produciendo un cambio dramático de apariencia entre las dos estaciones.

Las condiciones ambientales del BTC durante la época seca varían a lo largo de la distribución de las tres subespecies. En el extremo norte, donde se encuentra la subespecie *cinereus*, se encuentran las condiciones más secas: menor precipitación anual (690 mm), menor evapotranspiración durante la época seca (1.76 mm), menor radiación solar UV-B ($4,498 \text{ J/m}^2/\text{día}^{-1}$) y una temperatura media anual intermedia (23.8°C) (Malpica et al. 2022). Adicionalmente, la cobertura arbórea durante la época seca es de 30%, donde los árboles pierden casi todas sus hojas, lo cual se refleja en un bajo valor del NDVI (0.36, en una escala del 0 al 1, donde 1 es más verde) (Malpica et al. 2022). En el centro, donde se distribuye la subespecie *sinaloa*, se presentan condiciones intermedias (1,084 mm de precipitación media anual, 16.80 mm de evapotranspiración durante la época seca y $4,983 \text{ J/m}^2/\text{día}$ de radiación solar), mientras que la temperatura media anual presenta los valores más altos de la distribución (24.9°C). En esta zona los árboles también pierden la mayoría de las hojas, aunque los valores de NDVI y cobertura arbórea son intermedios 0.58 y 44% respectivamente. Finalmente, en el extremo sur de la distribución, donde se encuentra la subespecie *russeus*, se presentan las condiciones más húmedas a lo largo de la distribución (Trejo-Vásquez 1999; 1500 mm de precipitación media anual, 24.73 mm de

evapotranspiración durante la época seca), la mayor radiación solar (5,202 J/m²/día) y una temperatura media anual intermedia (23.73°C). En esta área los bosques son más densos con una cobertura arbórea de 45% y la vegetación no pierde la mayoría del follaje presentando los valores más altos de NDVI (0.67).

En contraste con la estación seca, los BTCs son más homogéneos durante la época lluviosa. Por ejemplo, durante esta época, los valores de NDVI de los sitios donde se encuentran las subespecies son altos y muy similares (*cinereus* = 0.84, *sinaloa* = 0.82 y *russeus* = 0.82), reflejando la nueva producción de follaje a través de su distribución. La evapotranspiración también tiene valores similares entre los sitios de colecta de las subespecies durante la época de lluvias (*cinereus* = 45 mm, *sinaloa* = 35 mm y *russeus* = 33 mm).

Colectas de campo

Se capturaron 100 individuos de *Thryophilus sinaloa* de 20 localidades a lo largo de su distribución (**Tabla 1**). De cada individuo capturado se tomó una muestra de sangre (una a tres gotas) mediante venipunción de la vena sub-braquial y se almacenó en Queen's lysis buffer a -20°C en el laboratorio. Adicionalmente, también se obtuvieron muestras de tejidos donadas por el museo Burke de Washington ($n = 13$), el museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" de la facultad de ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (MZFC, UNAM, $n = 3$) y la Colección Nacional de Aves del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (CNAV, IBUNAM, $n = 3$), con lo cual se obtuvo un total de 119 individuos a través de 26 localidades cubriendo la mayor parte de la distribución de la especie (**Tabla 1, Figura 1**).

Tabla 1. Localidades de colecta de *Thryophilus sinaloa* a lo largo de su distribución con su respectiva abreviación. Se indica el número de individuos colectados por localidad (*n*) así como la fuente de la muestra: C = Campo, M = Museo.

Localidad	<i>n</i>	Estado	Subespecie	Latitud	Longitud	Altitud	Fuente
Palo Injerto (PAI)	4	Sonora	<i>cinereus</i>	27.0423	-108.7400	399	C
Arroyo Cuchujaqui (CUC)	5	Sonora	<i>cinereus</i>	27.0055	-108.7850	367	C
Choix (CHOI)	3	Sinaloa	<i>cinereus</i>	26.6540	-108.3900	461	M
Cosalá (COS)	3	Sinaloa	<i>cinereus</i>	24.3040	-106.7640	300	M
Mazatlán (MAZ)	4	Sinaloa	<i>cinereus</i>	23.3625	-106.3052	97	M
Matatán (MAT)	3	Sinaloa	<i>sinaloa</i>	23.0250	-105.7520	44	M
Singayta (SIN)	7	Nayarit	<i>sinaloa</i>	21.5710	-105.2337	55	C
Cuarenteño (CUA)	2	Nayarit	<i>sinaloa</i>	21.4708	-105.0029	1410	C
San Pancho (SAP)	6	Nayarit	<i>sinaloa</i>	20.9063	-105.3870	61	C
Huilotán (HUI)	2	Jalisco	<i>sinaloa</i>	20.8182	-103.2960	1531	C
Sierra del Águila (SIA)	6	Jalisco	<i>sinaloa</i>	20.2579	-104.0103	1762	C
Mísmaloya (MIS)	4	Jalisco	<i>sinaloa</i>	20.5268	-105.2658	140	C
Tuito (TUI)	3	Jalisco	<i>sinaloa</i>	20.3452	-105.3575	600	M
Nacastillo (NAC)	6	Jalisco	<i>sinaloa</i>	19.6167	-104.8992	283	C
La Fortuna (FOR)	5	Jalisco	<i>sinaloa</i>	19.6	-105.1033	13	C
Embrujo (EMB)	4	Jalisco	<i>sinaloa</i>	19.5213	-105.0683	7	C
Playa Careyitos (CAR)	4	Jalisco	<i>sinaloa</i>	19.4386	-105.0253	8.6	C
Barranca del Choncho (CHON)	5	Jalisco	<i>sinaloa</i>	19.3402	-104.7297	242	C
Tecomán (TEC)	6	Colima	<i>sinaloa</i>	18.9543	-103.8953	56	C
Rancho la Bonetera (BON)	3	Michoacán	<i>russeus</i>	17.9568	-102.1944	14	M
Río Santiago (RIO)	8	Guerrero	<i>russeus</i>	17.2529	-100.3145	703	C
Carretera Atoyac (CAT)	4	Guerrero	<i>russeus</i>	17.2506	-100.3671	622	C
San Miguel Reyes (SMR)	5	Oaxaca	<i>russeus</i>	16.9166	-97.8899	759	C
Santa María Tortolita (TOR)	6	Oaxaca	<i>russeus</i>	16.9333	-97.9001	824	C
San Pedro Siniyuvi (SIN)	4	Oaxaca	<i>russeus</i>	16.9815	-97.8379	842	C
San Juan Teponaxtla (SJT)	7	Oaxaca	<i>russeus</i>	17.0284	-97.8482	879	C

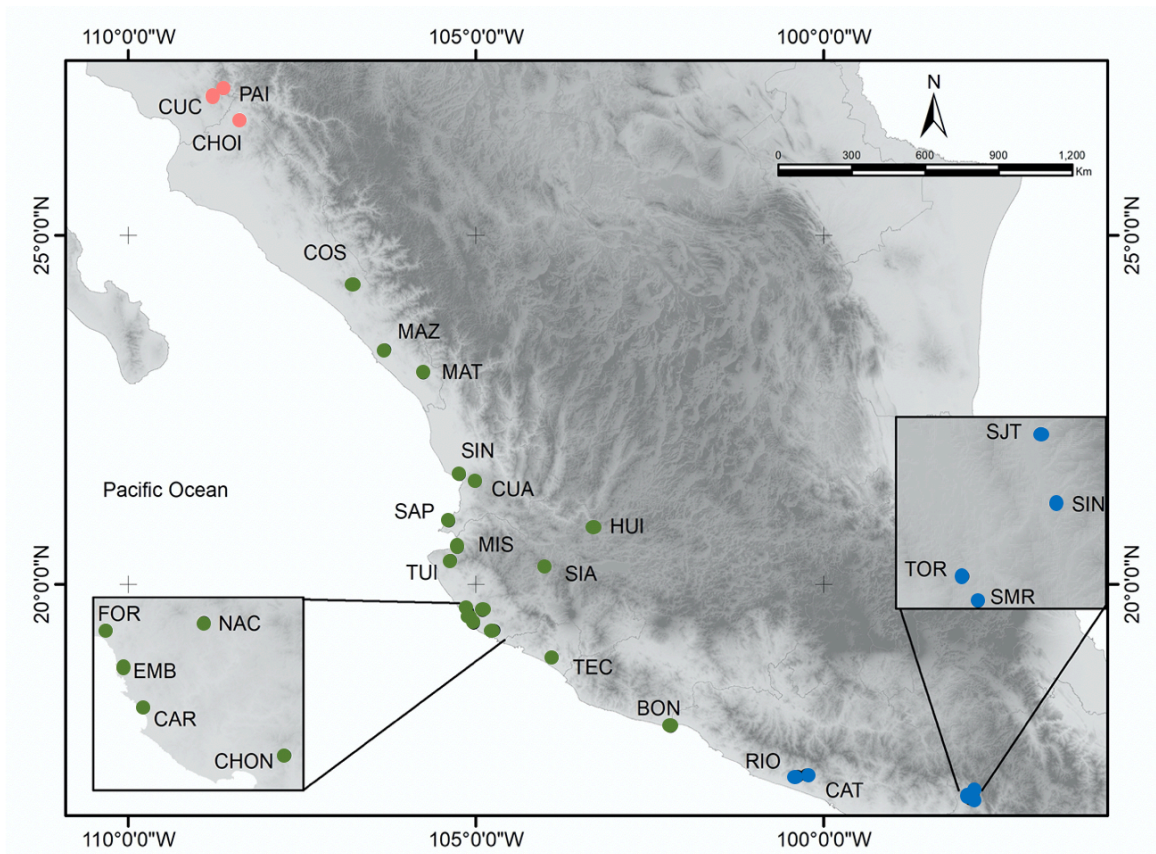


Figura 1. Mapa del área de estudio donde se indican las localidades donde fueron colectadas las muestras de *Thryophilus sinaloa*. Los puntos rosados indican las localidades donde se colectaron muestras de la subespecie *Thryophilus sinaloa cinereus*, en los puntos verdes se colectó la subespecie *T. s. sinaloa* y en los puntos azules la subespecie *T. s. russeus*. En el mapa se muestra la elevación con tonos grises.

Preparación de librerías RadSeq, preprocesamiento de secuencias y llamado de los SNPs

La extracción total de ADN fue realizada con el kit de extracción DNeasy Blood and Tissue (Qiagen®), siguiendo el protocolo del fabricante. Se añadió 80-100 µL de sangre y 4 µL de RNAasa para tener ADN libre de ARN. La elusión final se hizo en 50 µL de Buffer AE. El ADN genómico fue cuantificado usando un fluorómetro Quantus™ (Promega) y estandarizando a 25 µg/µL. Se construyeron bibliotecas genómicas de una representación reducida del genoma usando la técnica 3RAD la cual es una variante de la técnica RADSeq

(Restriction-site Associated DNA sequencing, Baird et al. 2008). El ADN fue digerido (cortado) usando las enzimas MspI y BamHI, así como una tercera enzima (ClaI) para reducir el número de dímeros de adaptadores que se forman en el paso de digestión y ligamiento (mayores detalles en Bayona-Vásquez et al. 2019). Los fragmentos de ADN fueron ligados a adaptadores con códigos de barras internos de diferentes longitudes (Bayona-Vásquez et al. 2019) y amplificados usando los primers iTru (Glenn et al. 2019). Los productos de PCR se purificaron y combinaron usando un volumen equimolar para su secuenciación, la cual fue realizada en una plataforma Illumina HiSeq X Ten. Se realizaron lecturas de los fragmentos de ADN de aproximadamente 150 pb a partir de cada uno de los extremos obtenidos. Las bibliotecas RADSeq fueron preparadas y secuenciadas en el laboratorio BadDNA@UGA del departamento de Ciencias de la salud ambiental de la Universidad de Georgia en Estados Unidos.

La calidad de las secuencias fue evaluada con FastQC v.0.11.7 (Andrews 2010). Siguiendo a Bayona-Vásquez et al. (2019), se usó el módulo *process_radtags* del programa STACKS v 2.55 (Catchen et al. 2011) para demultiplexar (separar las lecturas y asignarlas en un solo archivo a cada uno de los individuos de acuerdo a sus códigos de barras) y limpiar los datos. Durante este proceso de limpieza de los datos, las lecturas con bases no llamadas (-c) o con una calidad menor a 35 de Phred score (-q) fueron descartadas. Como los adaptadores Illumina estaban presentes en nuestras secuencias, se usó TRIMGALORE v.0.6.4 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) para removerlas y posteriormente se usó TRIMMOMATIC v.0.38 (Bolger et al. 2014) para cortar las lecturas a 110 pb. Al no tener un genoma de referencia se realizó un ensamble *de novo*, que consiste en unir los fragmentos contiguos de ADN para reconstruir la secuencia original del ADN.

Para el ensamble *de novo* se usó el pipeline *denovo_map* de STACKS. Para optimizar los parámetros del *de novo* que permiten detectar los SNPs a través de los loci se siguió el método *-r 80* (Paris et al. 2007). Con este método tres parámetros son optimizados: el número mínimo de lecturas que forman un stack (*m*) y el número máximo de diferencias permitido entre stacks (*M*) el cual permite construir un locus *de novo* usando el módulo *ustacks*. El número de diferencias permitidas entre stacks (*n*) donde se alinean los loci de acuerdo con la similitud de sus lecturas para crear un catálogo de todos los loci a través de las muestras usando el módulo *cstacks*. Finalmente, para obtener los loci de cada individuo se alinearon usando el catálogo como referencia en el módulo *sstacks*. Corrimos el pipeline de *de novo* varias veces ajustando un parámetro a la vez como se especifica en Paris et al. (2007) para obtener los parámetros óptimos que maximizan el número de loci polimórficos y SNPs. Después de varias pruebas, se estableció en 3 el número mínimo de secuencias (cobertura) para crear un stack (*-m*), permitiendo un máximo de 3 como la distancia entre stacks (*-M*), y permitiendo 4 diferencias entre loci a través de las muestras (*-n*) al construir el catálogo. En el módulo *populations* de STACKS se retuvieron los loci que estaban presentes en al menos el 80% de los individuos (*r*) y al menos en el 60% de las localidades de colecta (*p*), con una frecuencia mínima de alelo menos común (*min_maf*) de 0.05 y un máximo de heterocigocidad observada de 0.60. Se usó el parámetro *write_singles_snp* para retener solamente el primer SNP por locus para evitar el desequilibrio de ligamiento. Usando VCFTOOLS (Danecek et al. 2011) se retuvieron todas las muestras con menos del 30% de datos faltantes.

Detección de loci outliers

Para detectar loci outliers bajo selección se usó un análisis de componentes principales (PCA) con distancias de Mahalanobis implementado en el paquete de R *pcadapt* v.4.3.3 (Luu et al. 2017), el cual hace escaneos del genoma basado en la estructura genética poblacional. Inicialmente, 30 componentes principales (PC) fueron usados para evaluar el mejor soporte del agrupamiento genético de los individuos. El valor óptimo de PCs fue determinado usando la regla gráfica de Catell (Luu et al. 2017) y aplicando las correcciones de Bonferroni del 0.001 como un umbral para la detección de los outliers. Una vez encontrados, los loci outliers fueron separados de los loci neutrales en bases de datos distintas. Se aplicó también un umbral para los SNPs que muestran desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg equilibrium ($P = 0.01$) para filtrar falsos variantes surgidos de alineamiento de loci parálogos.

Diversidad y estructura genética

Para evaluar los niveles de diversidad genética en cada una de las poblaciones y grupos genéticos, se obtuvieron los siguientes parámetros usando el módulo *populations* de STACKS para la matriz de datos completa: número de alelos privados (AP), número de sitios polimórficos (SP), diversidad nucleotídica (π), heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{is}) y la frecuencia del alelo más frecuente (P_m).

Para evaluar la estructura genética con la base de datos totales (neutrales y selectivos) se usó el programa ADMIXTURE v.1.3.0, el cual usa una aproximación de máxima verosimilitud para detectar grupos genéticos (Alexander et al. 2011). En ADMIXTURE se corrió el análisis probando valores entre $K=1$ y $K=10$. La selección del valor de K más

probable es aquel que exhibe el menor valor de validación cruzada (error CV, Alexander et al. 2011). También se estimó la diferenciación genética entre sitios de muestreo y grupos genéticos (ver resultados) usando la matriz completa mediante F_{st} pareadas (Slatkin 1995), determinando la significancia con 10,000 permutaciones en el programa ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010).

Posteriormente, con la base de datos neutral (que incluye solamente loci neutrales) y la selectiva (incluyendo solamente loci outliers) se analizaron los patrones de estructura genética usando métodos de ordenamiento. Primero se realizaron análisis de componentes principales (PCA) en el paquete de R *Adegenet* v.2.1.1 (Jombart et al. 2008) para obtener los eigenvectores para graficar. Posteriormente se realizaron análisis discriminantes de componentes principales (DAPC; Jombart et al. 2010), que consiste en un método multivariado que maximiza la varianza explicada entre grupos mientras minimiza la varianza dentro de los grupos (Jombart et al. 2010), y es usualmente usado para agrupar individuos en grupos. DAPC es un análisis que no está basado en modelos genéticos, por lo cual no hace suposiciones de agrupaciones a priori ni de procesos genéticos (e. g. desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg) lo cual es común en otros métodos para detectar estructura genética. Se usó la función *find.clusters* para obtener el número de grupos (K) después de retener todos los componentes principales (PCs), usando el criterio de información Bayesiano (BIC) para seleccionar el K óptimo. Para identificar el número óptimo de PCs para retener, utilizamos la función de validación *dapcCross* que selecciona la cantidad óptima de PCs en función de la asignación exitosa más alta con el error cuadrático medio más bajo (Jombart et al. 2010). Finalmente, para cada base de datos (neutral y selectiva) se estimaron los valores de F_{st} pareadas entre poblaciones (Slatkin 1995), determinando la

significancia con 10,000 permutaciones en el programa ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010).

Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Para investigar la estructuración genética jerárquica de *T. sinaloa*, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) en ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010). Se realizaron AMOVAS usando la base de datos completa (loci neutrales y outliers), la base de datos neutral y la selectiva. Las poblaciones se agruparon de dos maneras distintas: (1) AMOVA global en la que la variación genética total se dividió entre poblaciones y dentro de las poblaciones y (2) AMOVA en la que las poblaciones se agruparon en tres grupos genéticos (basado en el número más probable de grupos genéticos de los resultados de ADMIXTURE $K=3$) el cual concuerda con la distribución de las subespecies.

Modelos de Nicho Ecológico

Para inferir las condiciones ambientales idóneas para la distribución de la especie en el presente y bajo escenarios climáticos pasados, se hicieron reconstrucciones de la distribución de la especie mediante una aproximación de modelado de nicho ecológico (MNE). Lo anterior permite identificar áreas potenciales de distribución durante distintos períodos de tiempo, así como identificar patrones de expansión o contracción y por lo tanto de conectividad y aislamiento durante las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Los registros de ocurrencia de la distribución total de la especie se descargaron de GBIF (Global Biodiversity Information Facility) desde R vía *rgbif* (<https://github.com/ropensci/rgbif>; taxon key: 7341103; <https://doi.org/10.15468/dl.z5r355>). La limpieza de los datos se realizó en

múltiples pasos usando distintos paquetes para R, eliminando registros sin información georreferenciada (*dplyr*, Wickham et al. 2021; *CoordinateCleaner*, Zizka et al. 2019), duplicados en un radio de 0.01666 equivalente a 2 km² (*nichetoolbox*, Osorio-Olvera et al. 2020), registros que caen fuera de un rango altitudinal de 0-2000 msnm (*raster*, Hijmans et al. 2016), registros que caen fuera de la región Neotropical donde la especie se encuentra, ya que pueden ser presuntos errores. Las provincias dentro de la región Neotropical donde se encuentra la especie son: Sierra Madre Occidental, Eje Neovolcánico Transversal, Sierra Madre del Sur, Tierras bajas del Pacífico y Cuenca del Balsas (Löwrenberg-Neto 2014, Morrone 2014). En décadas recientes se ha documentado una expansión en la distribución de la especie hacia el norte (Russell & Monson 1998) desde el sur de Sonora y noreste de Sonora hacia el sur de Arizona, sin embargo, solamente se incluyeron registros que caen dentro de la distribución histórica de la especie, ya que podría influir en los escenarios de distribución al pasado. Después de la limpieza de los datos se obtuvieron 909 registros de ocurrencia únicos.

Las capas bioclimáticas del presente fueron obtenidas de la base de datos de WorldClim (Hijmans et al. 2005; Braconnot et al. 2007; Booth et al. 2014) con una resolución espacial de 30-arc-segundos (i. e. 1 km²). Las capas climáticas del pasado desarrolladas por el Paleoclimatic Modelling Intercomparison Project Phase II (Braconnot et al. 2009) fueron descargadas también de la base de datos de WorldClim. Los escenarios pasados modelados fueron: 1) Último Máximo Glacial (LGM, hace ~21 000 años atrás) del Community Climate System Model (CCSM: 2.5 arc-segundos; Collins et al. 2006), 2) el LGM a partir del Model for Interdisciplinary Research on Climate (MIROC: 2.5 arc-segundos; Hasumi & Emori 2004), y 3) el Último Interglaciario (LIG, hace 140 000–120 000 años atrás, 30 arc-segundos;

Otto-Bliesner et al. 2006). La selección de variables bioclimáticas se basó principalmente en un análisis de componentes principales, donde se consideraron las variables más importantes de los primeros 3 componentes principales asegurando que no se seleccionaran variables correlacionadas de acuerdo a la correlación de Pearson ($r \geq 0.8$; ver materiales suplementarios **Figura S4**) para eliminar variables redundantes. Las variables ambientales usadas fueron: BIO2 (intervalo de temperatura medio diario), BIO4 (estacionalidad de la temperatura), BIO5 (temperatura máxima del mes más caliente), BIO 6 (temperatura mínima del mes más frío), BIO8 (temperatura promedio del mes más húmedo), BIO12 (precipitación anual), BIO14 (precipitación del mes más seco), BIO15 (precipitación estacional), BIO18 (precipitación del cuarto más caliente) y BIO19 (precipitación del cuarto más frío). El área de estudio fue definida basada en la distribución geográfica conocida para *T. sinaloa* (área de accesibilidad para la especie = M) usando un polígono cóncavo delimitando los puntos de ocurrencia con un buffer de distancia de 75 km. Dicha calibración fue realizada usando el paquete *ellipsenm* (Cobos et al. 2020) en *R*.

La calibración del modelo fue realizada y evaluada usando el paquete *Kuenm* de *R* (Cobos et al. 2019), el cual genera una gran cantidad de modelos candidatos. Los datos de ocurrencia se dividieron aleatoriamente en datos de entrenamiento y prueba (75% y 25% respectivamente), y se establecieron tres combinaciones diferentes de las variables bioclimáticas elegidas en el proceso de evaluación utilizando parámetros predeterminados. Una selección final de los mejores modelos realizada en el paquete *kuenm* de *R* se basó en la importancia, la capacidad predictiva y la complejidad del modelo (AICc) (Cobos et al. 2019). El modelo final se creó con 10 réplicas de bootstrap, sin extrapolación y se proyectó en los tres escenarios pasados diferentes (LGM del CCSM y MIROC, LIG) y para el presente.

Las predicciones geográficas se representaron utilizando la mediana de las réplicas. Para binarizar los resultados de MaxEnt, se tomaron en cuenta los umbrales logísticos de “presencia de entrenamiento del percentil 10” y “sensibilidad de entrenamiento máxima más especificidad”.

RESULTADOS

Secuenciación del ADN y detección de loci outliers

Para los 119 individuos se obtuvieron un total de 324 millones de lecturas (162 millones en cada extremo de ADN secuenciado). Posterior a los filtros de calidad se retuvieron 307 millones. El promedio de lecturas obtenidas por individuo fue de 3.37 millones y la cobertura promedio de la base de datos es de 46.32 X. Con los parámetros óptimos para el ensamble *de novo* siguiendo la metodología de Paris et al. (2017) e incluyendo los filtros se obtuvieron un total de 24,765 loci y 19,087 SNPs. Se detectaron 194 loci outliers mediante el programa *pcadapt* (**Figura S2**), los cuales fueron extraídos de la base de datos totales para crear las bases de datos neutral y selectiva por separado.

Diversidad y estructura genética

En general, los estimadores de diversidad genética fueron muy similares entre localidades de colecta (**Tabla 2**). Sin embargo, los estimadores obtenidos por grupos genéticos (basados en el número de grupos más probables de acuerdo con los resultados de ADMIXTURE) mostraron un patrón en donde los valores diversidad genética fueron más bajos en el norte (**Tabla 3**). El número de alelos privados (AP) es mayor (1614) en el grupo genético del sur donde se incluyen los individuos de la subespecie *russeus*, el número de alelos en la subespecie *sinaloa* al centro de la distribución fue de 471, mientras que en la subespecie

cinereus al norte de la distribución el número de alelos privados fue mucho menor con 24. Los valores de heterocigocidad observada (H_o) fueron mayores en la subespecie *sinaloa*, seguido de la subespecie *russeus* y finalmente los valores más bajos se obtuvieron para la subespecie *cinereus*. Los valores de diversidad nucleotídica (π) y el coeficiente de endogamia (F_{is}) fueron mayores para la subespecie *russeus*. Valores intermedios se obtuvieron para la subespecie *sinaloa* y los valores más bajos se obtuvieron para la subespecie *cinereus*.

Tabla 2. Estimadores de diversidad genética de *Thryophilus sinaloa* calculados para cada localidad de colecta. Se incluye el nombre y la abreviación de las localidades de colecta, el número de individuos muestreados (n), la frecuencia promedio del alelo más frecuente (P_m), alelos privados (AP), la heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), la diversidad nucleotídica (π) y el coeficiente de endogamia (F_{is}).

Localidad	n	P_m	AP	H_o	H_e	π	F_{is}	Subsp
Palo Injerto (PAI)	4	0.882	0	0.169	0.156	0.178	0.019	<i>cinereus</i>
Arroyo Cuchujaqui (CUC)	5	0.881	0	0.166	0.158	0.177	0.023	<i>cinereus</i>
Choix (CHOI)	3	0.898	0	0.170	0.131	0.157	-0.020	<i>cinereus</i>
Cosalá (COS)	3	0.878	0	0.180	0.160	0.192	0.022	<i>cinereus</i>
Mazatlán (MAZ)	3	0.878	0	0.178	0.161	0.194	0.028	<i>cinereus</i>
Matatán (MAT)	4	0.867	0	0.191	0.178	0.203	0.025	<i>sinaloa</i>
Singayta (SIN)	7	0.860	0	0.196	0.192	0.209	0.030	<i>sinaloa</i>
Cuarenteño (CUA)	2	0.878	0	0.191	0.154	0.206	0.022	<i>sinaloa</i>
San Pancho (SAP)	6	0.859	0	0.194	0.193	0.212	0.040	<i>sinaloa</i>
Huilotán (HUI)	2	0.887	0	0.183	0.142	0.190	0.010	<i>sinaloa</i>
Sierra del Águila (SIA)	6	0.862	0	0.195	0.188	0.206	0.023	<i>sinaloa</i>
Mismaloya (MIS)	4	0.869	0	0.205	0.190	0.217	0.025	<i>sinaloa</i>
Tuito (TUI)	3	0.869	0	0.191	0.174	0.209	0.032	<i>sinaloa</i>
Nacastillo (NAC)	6	0.857	0	0.204	0.198	0.216	0.029	<i>sinaloa</i>
La Fortuna (FOR)	5	0.860	0	0.200	0.193	0.215	0.033	<i>sinaloa</i>
Embrujo (EMB)	4	0.873	0	0.194	0.174	0.199	0.010	<i>sinaloa</i>
Playa Careyitos (CAR)	4	0.878	0	0.195	0.164	0.188	-0.011	<i>sinaloa</i>
Barranca del Choncho (CHON)	5	0.860	0	0.206	0.193	0.216	0.022	<i>sinaloa</i>
Tecomán (TEC)	6	0.850	0	0.211	0.207	0.230	0.044	<i>sinaloa</i>
Rancho la Bonetera (BON)	3	0.869	1	0.196	0.173	0.208	0.021	<i>russeus</i>
Río Santiago (RIO)	8	0.849	0	0.198	0.206	0.220	0.052	<i>russeus</i>
Carretera Atoyac (CAT)	4	0.853	1	0.204	0.195	0.223	0.038	<i>russeus</i>
San Miguel Reyes (SMR)	5	0.857	4	0.194	0.189	0.211	0.036	<i>russeus</i>
0.20523Santa María Tortolita (TOR)	6	0.858	7	0.201	0.187	0.205	0.009	<i>russeus</i>
San Pedro Siniyuvi (SIN)	4	0.859	0	0.193	0.184	0.210	0.034	<i>russeus</i>
San Juan Teponaxtla (SJT)	7	0.854	4	0.194	0.195	0.210	0.037	<i>russeus</i>

Tabla 3. Estimadores de diversidad genética calculados para los tres grupos genéticos determinados para *Thryophilus sinaloa* mediante en análisis en ADMIXTURE. Se incluye información el número de individuos muestreados (n), la frecuencia promedio del alelo más frecuente (P_m), alelos privados (AP), la heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), la diversidad nucleotídica (π) y el coeficiente de endogamia (F_{is}).

Grupo	n	P_m	AP	H_o	H_e	π	F_{is}
<i>cinereus</i>	22	0.8619	24	0.1762	0.1907	0.1956	0.05
<i>sinaloa</i>	60	0.8464	471	0.2020	0.2212	0.2234	0.07
<i>russeus</i>	37	0.8307	1614	0.1989	0.2355	0.2389	0.14

Los resultados de ADMIXTURE con la base de datos completa sugieren una fuerte estructuración genética a lo largo de la distribución. De acuerdo a los valores de CV, el número de grupos más probable es de $K = 3$ (CV = 0.4438) seguido de $K = 4$ (CV = 0.4505), sin embargo, la mayoría de las agrupaciones exploradas tienen sentido geográfico (**Figura 2**). Para el caso de $K = 2$, los individuos de la subespecie *russeus* se encuentran separados del resto, mientras que los individuos de las subespecies *cinereus* y *sinaloa* se encuentran en el mismo grupo genético. En el resto de las agrupaciones ($K = 3 - 7$), los individuos de los estados de *cinereus* son asignados al primer grupo genético, mientras que los individuos que se distribuyen desde Nayarit a Colima, que coinciden con la distribución de la subespecie *sinaloa*, así como los individuos que se distribuyen de Michoacán a Guerrero que corresponden con la distribución de la subespecie *russeus*, se distinguen de dos a tres grupos genéticos. En algunos casos, los individuos colectados en los límites de la distribución entre subespecies tienen probabilidades similares de pertenecer a ambos grupos genéticos, por ejemplo, algunos individuos colectados en Sinaloa en las agrupaciones de $K = 3 - 7$ o los individuos colectados en Michoacán en las agrupaciones $K = 3 - 4$.

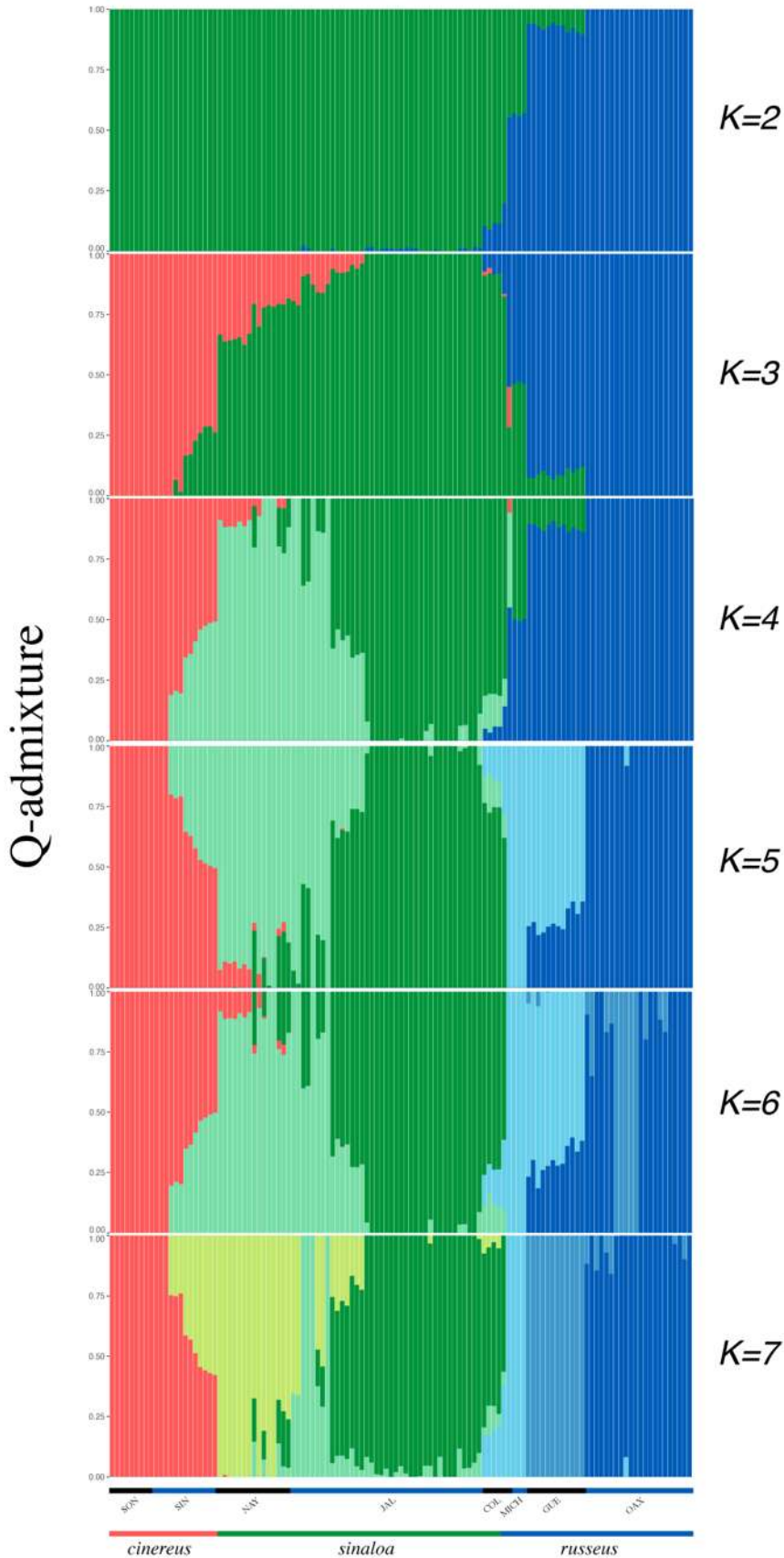


Figura 2. Probabilidades de asignación de los individuos de *Thryophilus sinaloa* a grupos genéticos obtenido en ADMIXTURE. (A) Probabilidad de los individuos (barras verticales) de pertenecer al número óptimo de grupos genéticos ($K = 2$ a $K = 7$) indicados por los colores. Los estados donde fueron colectados están señalados con abreviaturas.

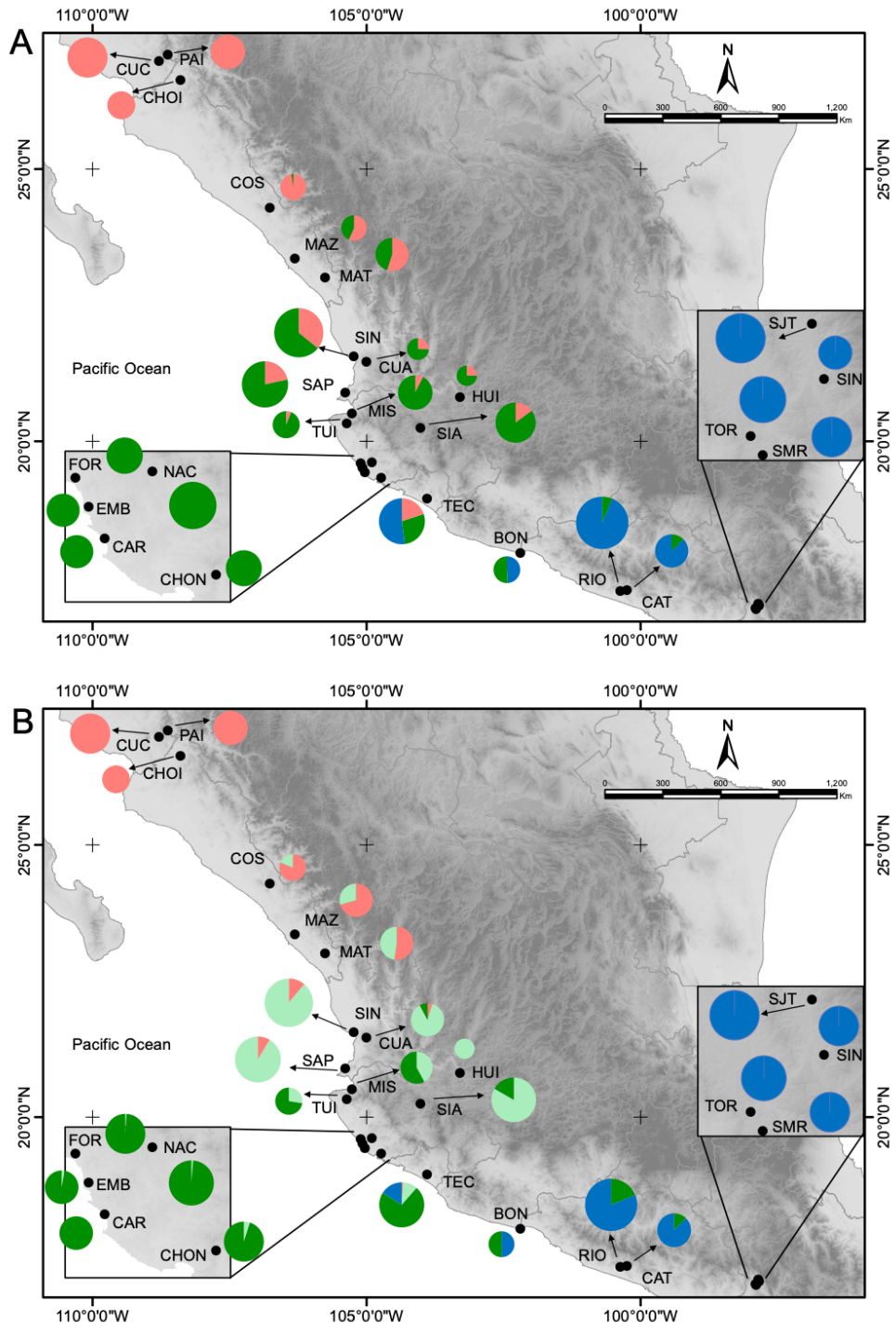


Figura 3. Distribución geográfica de los sitios de colecta, indicando la probabilidad de pertenencia de los individuos a los grupos genéticos mediante diagramas de pays, basado en los resultados de ADMIXTURE. (A) Probabilidad de los individuos de pertenecer al número óptimo de grupos genéticos ($K = 3$) indicados por los colores. (B) Probabilidad de pertenencia de los individuos a cuatro grupos genéticos ($K = 4$). La variación en el tamaño de los pays indica el tamaño de la muestra en cada localidad.

Los valores de diferenciación genética calculados mediante las F_{st} pareadas entre localidades a lo largo de la distribución muestran una diferenciación genética media y alta (**Tabla 4**). Los valores más altos de diferenciación corresponden a las comparaciones pareadas entre localidades de las subespecies *cinereus* vs. *russeus* con un intervalo de valores de F_{st} que van desde 0.26 hasta 0.44, de las cuales el 92.85% fueron comparaciones significativas entre localidades de las dos subespecies. Valores de diferenciación intermedios se obtuvieron entre las subespecies *sinaloa* vs. *russeus* con valores de F_{st} que van desde 0.17 hasta 0.39, de los cuales el 91.20% fueron comparaciones significativas. Finalmente, los valores de F_{st} más bajos se encontraron entre las subespecies *cinereus* y *sinaloa*, con valores de F_{st} entre 0.05 y 0.20, de los cuales el 82.05% fueron comparaciones significativas. También se encontraron valores de diferenciación significativos entre localidades de la misma subespecie, aunque de manera general dichos valores fueron más bajos que entre las localidades de subespecies distintas (**Tabla 4**). El mismo patrón de diferenciación entre localidades se detectó tanto con los datos neutrales, así como con los selectivos, sin embargo, los valores de diferenciación genética fueron mucho más altos con los datos selectivos que con los neutrales (**Tablas S1 y S2**).

Los valores de F_{st} calculados por grupos genéticos muestran el mismo patrón general que entre localidades, donde el valor más alto de diferenciación corresponde a la comparación entre la subespecie *cinereus* vs. *russeus* ($F_{st} = 0.31$), seguido de la comparación entre *sinaloa* vs. *russeus* ($F_{st} = 0.27$), mientras que el valor de diferenciación fue más bajo entre las subespecies *cinereus* vs. *sinaloa* ($F_{st} = 0.09$) (**Tabla 5**). Todas las comparaciones entre subespecies fueron significativas.

Tabla 4. Valores pareados de diferenciación genética (F_{ST}) usando la base de datos completa entre las localidades de colecta de *Thryophilus sinaloa*. Comparaciones pareadas significativamente diferente de cero se indican en negritas.

	PAI	CUC	CHOI	COS	MAZ	MAT	SIN	CJA	SAP	HUI	SIA	MIS	TUI	NAC	FOR	EMB	CAR	CHON	TEC	BON	RIO	CAT	SMR	TOR	SIN	SIT
PAI	0																									
CUC	0.00788	0																								
CHOI	0.07568	0.07482	0																							
COS	0.04519	0.04623	0.08011	0																						
MAZ	0.07023	0.07234	0.11139	0.01039	0																					
MAT	0.08861	0.08938	0.13204	0.03131	0.02396	0																				
SIN	0.12809	0.12752	0.15867	0.07502	0.04853	0.05496	0																			
CJA	0.15128	0.15682	0.19718	0.09459	0.06391	0.06940	0.04123	0																		
SAP	0.14716	0.15143	0.16979	0.08970	0.06355	0.07676	0.03325	0.00954	0																	
HUI	0.17756	0.18079	0.22581	0.12449	0.09827	0.10443	0.06847	0.05940	0.05596	0																
SIA	0.18004	0.17638	0.20104	0.11845	0.09952	0.11413	0.07137	0.05333	0.05440	0.06919	0															
MIS	0.15480	0.16459	0.18368	0.10240	0.08305	0.09366	0.04728	0.04518	0.03478	0.04337	0.04310	0														
TUI	0.16864	0.17447	0.20057	0.11794	0.09724	0.10173	0.06099	0.04379	0.03718	0.06843	0.06331	0	0													
NAC	0.17875	0.18236	0.20170	0.12605	0.10354	0.11466	0.06843	0.05005	0.04230	0.06856	0.05905	0.01353	0.01235	0												
FOR	0.17886	0.17916	0.20713	0.12112	0.10594	0.11480	0.06515	0.04687	0.04386	0.07499	0.05999	0.01203	0.01651	0	0											
EMB	0.15024	0.15501	0.18719	0.09758	0.07947	0.08173	0.04740	0.01988	0.02458	0.05123	0.03755	0	0	0	0	0										
CAR	0.19895	0.20370	0.23408	0.14823	0.13092	0.13755	0.08985	0.07825	0.07026	0.09584	0.08258	0.03973	0.03438	0.01776	0.02381	0	0									
CHON	0.18170	0.18602	0.21571	0.12418	0.11387	0.12065	0.07032	0.05513	0.04734	0.08354	0.05878	0.01557	0.02293	0.00726	0.00493	0	0.02692	0								
TEC	0.18757	0.18608	0.22277	0.13726	0.11509	0.12196	0.08267	0.08684	0.06043	0.11504	0.06374	0.03131	0.04630	0.02508	0.03094	0.01260	0.05803	0.03097	0							
BON	0.31584	0.31583	0.33932	0.26786	0.25895	0.26902	0.25629	0.23201	0.24428	0.24749	0.24093	0.22161	0.22045	0.21803	0.22281	0.19954	0.23316	0.22546	0.16899	0						
RIO	0.35027	0.35204	0.36489	0.31011	0.29799	0.31208	0.30670	0.27196	0.29451	0.29464	0.29360	0.27716	0.27076	0.27146	0.27369	0.25676	0.27997	0.27356	0.21024	0.12207	0					
CAT	0.36038	0.36205	0.36622	0.31153	0.29840	0.31709	0.31346	0.26218	0.29827	0.27969	0.29312	0.27213	0.26310	0.27636	0.27589	0.26095	0.28310	0.27800	0.21728	0.11921	0	0				
SMR	0.40384	0.40221	0.41327	0.36043	0.34851	0.36830	0.36607	0.32433	0.35795	0.34337	0.35211	0.33504	0.32348	0.33673	0.33933	0.32047	0.34555	0.33761	0.28232	0.19931	0.10095	0.09250	0			
TOR	0.43084	0.43115	0.44074	0.39436	0.38030	0.39785	0.39289	0.35969	0.38963	0.37425	0.38181	0.36646	0.35923	0.36798	0.37038	0.34930	0.37439	0.36995	0.31326	0.22616	0.12631	0.11965	0.04131	0		
SIN	0.42220	0.42180	0.43351	0.37955	0.36349	0.38468	0.38337	0.34241	0.37579	0.35818	0.37077	0.34981	0.34301	0.35758	0.35648	0.33822	0.36215	0.35624	0.30377	0.21445	0.11061	0.10204	0.00626	0.03823	0	
SIT	0.41031	0.41179	0.41916	0.37411	0.36082	0.37749	0.37345	0.33499	0.36756	0.35456	0.36353	0.34638	0.33472	0.34404	0.34773	0.32778	0.35209	0.34447	0.28486	0.21333	0.11028	0.10676	0.01306	0.03940	0.01047	0

Los resultados del PCA basado en los datos neutrales, considerando el PC1 contra el PC2 (15.05% y 4.11% de varianza explicada respectivamente), revelan una estructuración genética considerable, diferenciándose 4 grupos genéticos (**Figura 4A**). Los individuos de Sonora a Sinaloa (de Palo Injerto a Matatán), señalados con un gradiente de colores rojos forman un grupo genético, con un individuo de Matatán cercano a otro grupo genético (amarillo-verde). Los individuos de Nayarit a Colima (de Singayta a Tecomán) se encuentran agrupados en un grupo genético distinto señalado con un gradiente de color de verde-amarillo. Los individuos de Michoacán y Guerrero se encuentran formando un grupo genético señalado en un gradiente de colores de azules claros, con un individuo de La Bonetera, Michoacán agrupado con el grupo genético de azules oscuros. Finalmente, los individuos de Oaxaca se encuentran diferenciados de los anteriores en un grupo señalado con tonos de azul más oscuros, con un individuo de San Miguel Reyes agrupado con el grupo genético señalado de azules claro. El gráfico de los componentes principales basado en los datos selectivos (loci outliers) muestra que la varianza explicada del PC1 contra el PC2 es de 38.34% y 5.45%, respectivamente (**Figura 4B**), donde se pueden diferenciar tres grupos genéticos. Los individuos localizados desde Sonora hasta Colima (Palo Injerto a Tecomán) se encuentran en un mismo grupo genético, y a su vez están ordenados conforme a un gradiente latitudinal (tonos rojos y verdes). Se encuentran también diferenciados los individuos de Michoacán y Guerrero en el grupo genético de azules claros. Los individuos de Oaxaca forman un grupo genético distinto (azul obscuro). De la misma manera que con los datos neutrales, hay dos individuos en cada grupo de los azules que se agrupa con el grupo de azul “contrario” (**Figura 4B**).

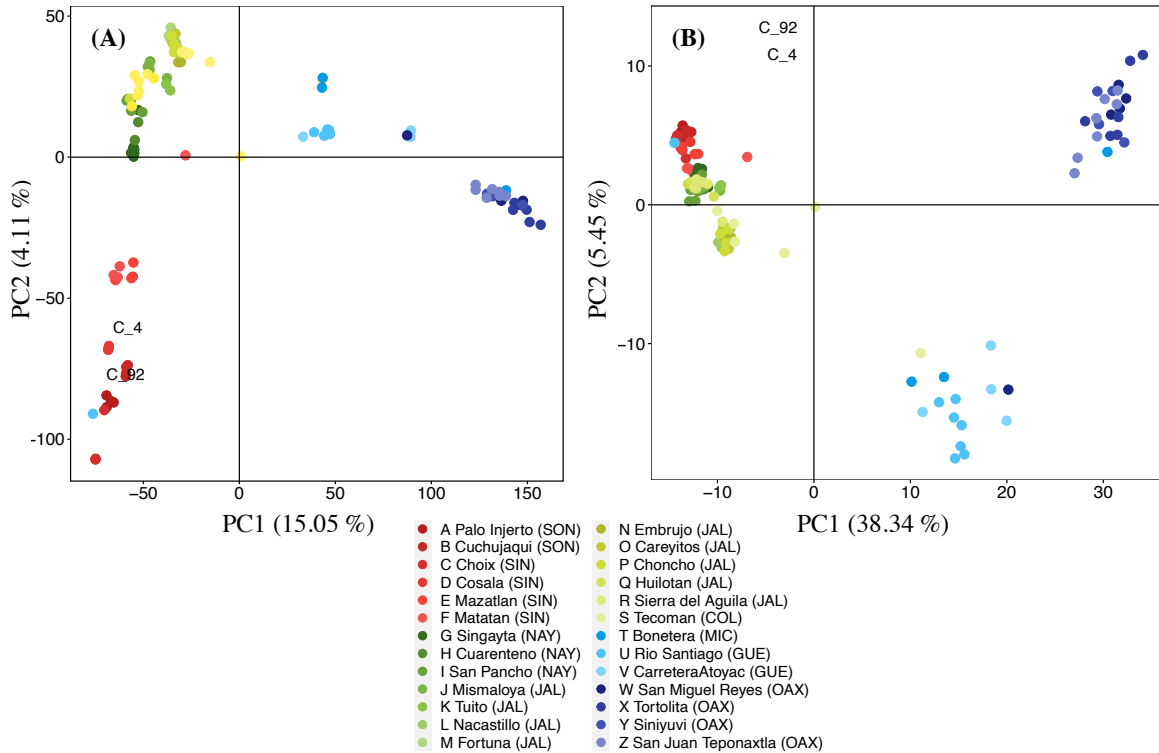


Figura 4. Estructura genética de *Thryophilus sinaloa* mediante análisis de componentes principales (PCA). (A) Gráfica de los ejes PC1 contra el PC2 del PCA conforme a la base de datos neutral. (B) Gráfica de los ejes PC1 contra el PC2 del PCA conforme a la base de datos selectiva. El porcentaje de variación explicada se muestra dentro de los paréntesis.

El análisis de DAPC basado en datos neutrales retuvo 20 componentes principales (PCs), identificando cuatro grupos genéticos (BIC = 4, **Figura 5A**, **Figura S3**). La asignación de los individuos con la función *find.clusters* en los cuatro grupos concuerda con los resultados de PCA basado en datos neutrales. Para los datos selectivos, el DAPC retuvo los primeros 20 PCs, representando el 87% de la varianza acumulada como predictor del análisis discriminante, identificando también 4 grupos genéticos (BIC = 4). La agrupación de los individuos concuerda con los resultados de los datos selectivos de PCA, donde los individuos desde Sonora (Palo Injerto) hasta Sinaloa (Matatán) fueron asignados al grupo genético 4 (**Figura 5B**, **Figura S3**), mientras que los individuos de Jalisco (Singayta) a Colima

(Tecomán) fueron asignados al grupo genético 3 (**Figura 5B**), sin embargo, en el gráfico se muestra un traslape entre los individuos de estos dos grupos. Finalmente, los individuos de Michoacán y Guerrero (azul claro) forman un grupo genético distinto a los individuos de Oaxaca (azul oscuro, **Figuras 5B**).

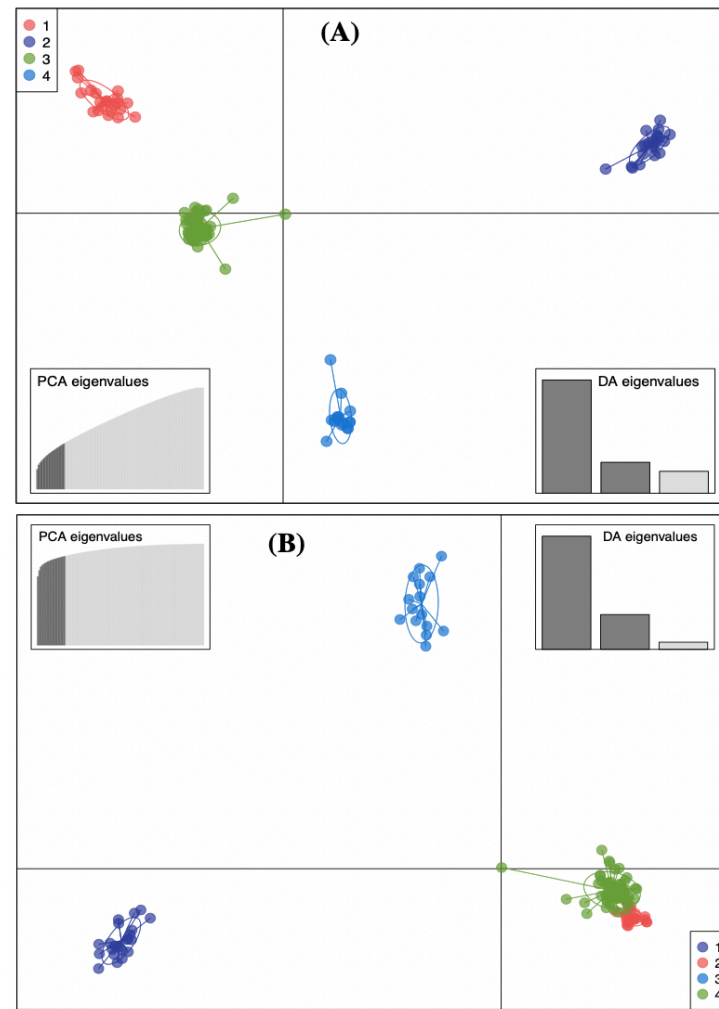


Figura 5. Estructura genética de *Thryophilus sinaloa* mediante análisis discriminante de componentes principales (DAPC). (A) Individuos agrupados en cuatro grupos genéticos mediante la función *find.clusters* usando la base de datos neutral, ver también la Figura S3. (B) Individuos agrupados en cuatro grupos genéticos mediante la función *find.clusters* usando la base de datos selectiva, ver también la Figura S3. Los ejes corresponden a las primeras dos primeras funciones discriminantes y los puntos representan los individuos con las elipses de inercia del 95%. Los colores coinciden con aquellos de la Figura 3 y 4.

Los resultados de las AMOVAs sin definir grupos a priori, usando tanto las bases de datos completos y neutrales, revela que la mayor parte de la variación genética se explica por las diferencias dentro de las poblaciones (78.13% y 79.26%, respectivamente) (**Tabla 5**). De manera contraria, los resultados de la AMOVA sin grupos a priori usando los datos selectivos, mostraron que el mayor porcentaje es explicado por las diferencias entre poblaciones 86.58%, mientras que un 13.42% es explicado por las diferencias dentro de las poblaciones (**Tabla 5**). Tanto para datos neutrales como los datos totales en las AMOVAs donde se agruparon en tres grupos genéticos, la mayor parte de la variación está explicada por las diferencias dentro de las poblaciones (72.94 – 71.39 % respectivamente, **Tabla 5**). Sin embargo, con los datos selectivos, la mayor parte de la variación está explicada por las diferencias entre grupos cuando se agrupan en 3 grupos genéticos de acuerdo con los resultados de ADMIXTURE (86.20%, **Tabla 5**).

Tabla 5. Resultados de los modelos de AMOVA para *Thryophilus sinaloa* tanto con la base de datos neutrales, selectivos y completos. (1) Sin grupos definidos a priori; (2) las poblaciones se agruparon en tres grupos genéticos (basado en el número más probable de grupos genéticos de los resultados de ADMIXTURE $K=3$).

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Varianza estimada	%	Índices de fijación
<i>Datos neutrales</i>					
Sin agrupaciones definidas					
Entre poblaciones	25	14952.662	46.244	20.74	$F_{st} = 0.207$ ***
Dentro de las poblaciones	212	37467.002	176.731	79.26	
Total	237	52419.664	222.975		
Tres grupos genéticos					
Entre grupos	2	8479.456	53.998	22.29	$F_{ct} = 0.222$ ***
Entre poblaciones dentro de los grupos	23	6473.207	11.552	4.77	$F_{sc} = 0.061$ ***
Dentro de las poblaciones	212	37467.002	176.731	72.94	$F_{st} = 0.270$ ***
Total	237	52419.664	242.281		
<i>Datos selectivos</i>					
Sin agrupaciones definidas					
Entre poblaciones	25	1421.645	6.136	86.58	$F_{st} = 0.865$ ***
Dentro de las poblaciones	212	201.645	0.951	13.42	
Total	237	1623.290	7.087		
Tres grupos genéticos					
Entre grupos	2	1303.385	8.831	86.20	$F_{ct} = 0.862$ ***
Entre poblaciones dentro de los grupos	23	118.260	0.462	4.51	$F_{sc} = 0.327$ ***
Dentro de las poblaciones	212	201.645	0.951	9.28	$F_{st} = 0.907$ ***
Total	237	1623.290	10.245		
<i>Datos completos</i>					
Sin agrupaciones definidas					
Entre poblaciones	25	15948.528	50.279	21.87	$F_{st} = 0.218$ ***
Dentro de las poblaciones	212	38074.367	179.596	78.13	
Total	237	54022.895			
Tres grupos genéticos					
Entre grupos	2	9362.629	60.233	32.94	$F_{ct} = 0.239$ ***
Entre poblaciones dentro de los grupos	23	6585.899	11.740	4.67	$F_{sc} = 0.061$ ***
Dentro de las poblaciones	212	38074.367	179.596	71.39	$F_{st} = 0.286$ ***
Total	237		251.570		

Modelos de Nicho Ecológico

Al usar los parámetros predeterminados al ejecutar la función *kuenm_cal* del paquete *kuenm* R, se construyeron 1479 modelos candidatos significativos. El modelo M_3_F_lph_Set_1 fue elegido durante el proceso de calibración como el mejor modelo que cumplió con la tasa

de omisión y los criterios AICc. Este modelo obtuvo los siguientes valores de métricas de evaluación: $omission_rate = 0.044$, $AICc = 22723,76$ y $P\ value < 0.005$. El AUC de entrenamiento promedio para las corridas repetidas fue de 0.818 ($DS \pm 0.005$). El valor umbral para la presencia y ausencia previstas se fijó en 0.3 (presencia de entrenamiento percentil 10: 0.2432 , $DS \pm 0.011$; sensibilidad máxima de entrenamiento más especificidad: 0.3913 , $DS \pm 0.024$). El polígono de área de accesibilidad de la especie (M) así como la distribución potencial actual y en escenarios al pasado se muestran en la **Figura 5**. Las proyecciones en escenarios del LGM y LIG sugieren que la idoneidad de las condiciones ambientales, donde *T. sinaloa* se encuentra actualmente (dentro del área M), ha cambiado con el tiempo. Durante el período del LIG hace 140,000 -120,000, se proyectó un área reducida y fragmentada en el extremo norte de la distribución de la especie donde está actualmente la subespecie *cinereus*, con una porción pequeña proyectada en la zona de Álamos y norte de Sinaloa (**Figura 5**). También durante el LIG, la distribución donde actualmente se encuentra la subespecie *sinaloa*, se proyectó reducida en las zonas costeras y la distribución en las zonas altas de Jalisco y Colima estaban prácticamente ausentes durante este periodo. En contraste, se registra un aumento en el área de distribución donde actualmente se encuentra la subespecie *russeus*, con condiciones idóneas para la especie hacia el sur de su distribución actual tanto en zonas costeras como en zonas más altas, incluso atravesando el Istmo de Tehuantepec (**Figura 5**). Durante ambos escenarios del LGM hace 21,000 años, hay una reducción significativa de las condiciones adecuadas para la especie (**Figura 5**). Bajo el modelo MIROC se proyecta un área de distribución solamente donde se encuentra actualmente la subespecie *sinaloa*. Mientras que con el modelo CCSM se proyectan las áreas de distribución donde se encuentran actualmente las subespecies *sinaloa*

y *russeus*, aunque más restringidas hacia la costa. Finalmente, la proyección de la distribución actual de *T. sinaloa* coincide cercanamente con la distribución conocida (puntos negros), aunque hay ciertos lugares como en el extremo norte de la distribución en Sonora y al centro de la distribución como son las zonas altas de Jalisco y en la depresión del Balsas donde no se predice la distribución de la especie, a pesar de contar con registros incluidos en los modelos. Las áreas proyectadas fuera de la distribución actual de *T. sinaloa* se consideran áreas con potencial de ser invadidas, pero inalcanzables por la biología y capacidad de dispersión de la especie.

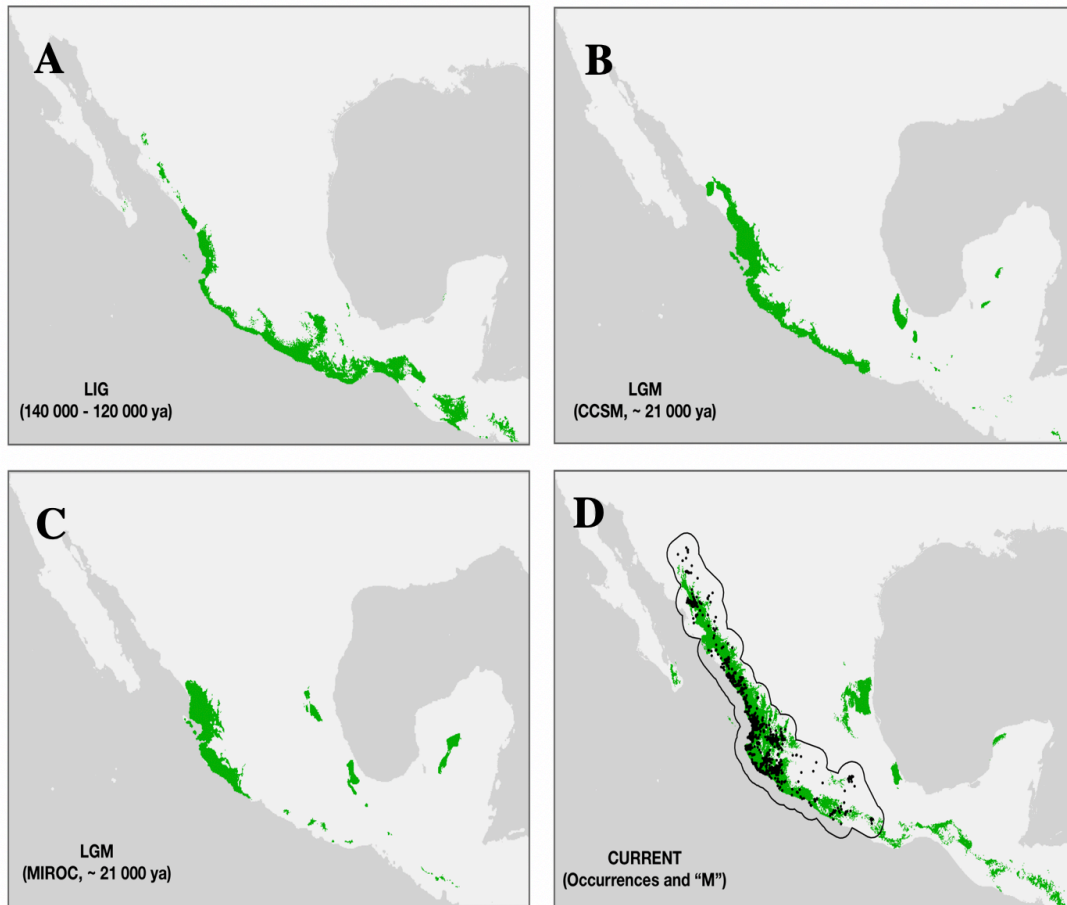


Figura 5. Modelos de Nicho Ecológico para *Thryophilus sinaloa* en el LIG (140,000 - 120,000 años) (A), LGM (modelo CCSM, 21,000 años) (B), LGM (modelo MIROC, 21,000 años) (C). Los puntos negros corresponden a los registros únicos de presencia ($n=909$) usados para modelar la distribución actual de la especie (D).

DISCUSIÓN

De manera general y de acuerdo con los objetivos de este estudio encontré: 1) Fuerte estructura genética a lo largo de la distribución de la especie en ausencia de barreras geográficas aparentes; 2) loci outliers, que podrían ser la base de señales de adaptación a las condiciones ambientales; 3) diferencias en la estructura genética entre loci neutrales y outliers, donde contrario a las expectativas, la estructura con los loci neutrales fue mayor en comparación con los outliers, pero la estructura con los outliers mostró mayores valores de diferenciación genética; 4) que la distribución de la especie cambió en respuesta a los cambios climáticos del Pleistoceno, con una importante contracción durante el LGM principalmente al norte de la distribución donde actualmente se distribuye la subespecie *cinereus*.

Patrones de estructuración genética

A pesar de la aparente distribución continua del BTC en el Pacífico mexicano, sin aparentes barreras para la dispersión de la especie, encontré una fuerte estructuración genética en *T. sinaloa* a lo largo de su distribución. Considerando la base de datos completa, los valores de CV del análisis de ADMIXTURE sugiere que el número de grupos genéticos más probable es de $K = 3$, seguido de $K = 4$. Sin embargo, casi todos los niveles de estructura jerárquica explorados tienen sentido geográfico. En el caso de la agrupación de $K = 2$, los individuos distribuidos desde Sonora hasta Colima son agrupados en un mismo grupo genético, localidades que coinciden con la distribución de las subespecies *cinereus* y *sinaloa*. Mientras que los individuos con distribución desde Michoacán hasta Oaxaca, que coinciden con la distribución de la subespecie *russeus*, se encuentran en un grupo genético distinto. Lo anterior

sugiere una divergencia más profunda entre *russeus* vs. el resto, y que la divergencia entre *sinaloa* y *cinereus* es más reciente. Sin embargo, para dar sustento a la idea anterior sería útil contar con una filogenia datada para poder determinar los tiempos en que divergieron los grupos genéticos encontrados. En cuanto a la estructura jerárquica mayor de acuerdo con ADMIXTURE, se detectaron tres grupos genéticos bien definidos donde las principales discontinuidades filogeográficas se detectaron entre el centro-sur de Sinaloa y norte de Nayarit, así como entre Jalisco-Michoacán y Guerrero. Algunos individuos colectados en localidades de los límites de dichas discontinuidades muestran una ancestría mezclada entre grupos, como es el caso de los individuos colectados en Matatán y Mazatlán al centro-sur de Sinaloa, así como los individuos de Michoacán (**Figura 3**). La discontinuidad filogeográfica entre el sur-centro de Sinaloa y Nayarit detectada para *T. sinaloa* no ha sido reportada con anterioridad en otras aves o grupos taxonómicos. Dentro de la planicie costera de Nayarit hasta el norte de Sinaloa, se encuentran varias lagunas costeras con presencia de manglares. Adicionalmente, en la actualidad gran parte de dichas planicies costeras son altamente usadas como zonas de cultivos. Lo anterior, crea una discontinuidad en la distribución del BTC en la costa, lo cual podría actuar como una barrera a la dispersión de las especies y donde el BTC está más continuamente distribuido lejos de la costa, entre 20 – 50 km adentro del continente. Una discontinuidad filogeográfica que ha sido reportada para otras aves en latitudes cercanas es entre Jalisco y Nayarit como en el caso de *Vireo hypochryseus* (Arbelaez-Cortés et al. 2014b) así como entre las especies de urracas *Callocitta colliei* y *C. formosa* (Castillo-Chora et al. 2021). La explicación que se ha propuesto para dicha discontinuidad filogeográfica es la cercanía de la Faja Volcánica Transmexicana (FVT) a la costa, lo cual restringe de cierta manera la distribución del BTC en las zonas bajas o costeras

(Arbeláez-Cortés et al. 2014a), funcionando potencialmente como una barrera. Para el caso de *T. sinaloa* al nivel jerárquico de agrupación genética de $K = 3$, la FVT pareciera ser una barrera permeable ya que no se detecta una discontinuidad filogeográfica en esta zona. Sin embargo, de manera más detallada, en las agrupaciones de $K = 4 - 6$ de ADMIXTURE, los individuos colectados en Nayarit y zonas más altas en Jalisco (Sierra del Águila y Huilotán) que se ubican al norte de la FVT forman un mismo grupo genético, mientras que los individuos colectados al sur de la FVT en Jalisco (Tuito y Mismaloya) y zonas costeras de Jalisco y Colima forman un grupo genético distinto. Lo anterior, podría sugerir que la FVT podría haber jugado un papel más reciente en la estructuración genética en esta zona.

En cuanto a la discontinuidad filogeográfica detectada para *T. sinaloa* entre Jalisco-Michoacán y Guerrero no es del todo clara ya que en algunos resultados de ADMIXTURE ($K = 2 - 4$) los individuos de Michoacán tienen ancestría mezclada. No obstante, en los resultados de PCA y DAPC, los individuos de Michoacán son asignados al grupo genético más sureño. Un muestreo más intensivo en Michoacán y la inclusión de más muestras de la región del Balsas en Guerrero y Morelos (no incluidas en este estudio) podría ayudar a delimitar de manera más clara el límite entre ambos grupos genético y entre las subespecies (*sinaloa* y *russeus*). No obstante, la discontinuidad filogeográfica entre Michoacán y Guerrero ya ha sido reportada para otras especies, como en *Momotus mexicanus* (Arbeláez-Cortés et al. 2014a) así como en especies de serpientes del género *Trimorphodon* y *Porthidium* (Devitt 2006; Bryson et al. 2008). Se ha propuesto que el río Balsas el cual drena la FVT y forma una franja estrecha pero profunda en los límites de Guerrero y Michoacán antes de desembocar en el Pacífico, es lo que podría explicar esta discontinuidad. Por otro lado, la discontinuidad filogeográfica entre Michoacán y Jalisco ha sido reportada para el

pájaro carpintero *Melanerpes chrysogenys* (Arbeláez-Cortés et al. 2014a), donde potencialmente la Sierra de Coalcomán en Michoacán podría actuar como una barrera.

En el caso de los resultados de DAPC y PCA así como en algunas agrupaciones de ADMIXTURE ($K = 5 - 7$), se detectó una clara diferenciación entre los individuos de Guerrero y Oaxaca, los cuales en la literatura pertenecen a la subespecie *russeus*. Se ha propuesto que la Sierra Madre del Sur en Guerrero puede explicar esta discontinuidad (Arbeláez-Cortés et al. 2014a), ya que de manera similar que la FVT, la proximidad del inicio de zonas montañosas con la costa reduce el ancho de las llanuras costeras, lo que podría causar una reducción en el flujo de genes. Esta discontinuidad filogeográfica se ha reportado para otras especies de aves que habitan el BTC, como *Passerina leclancherii* y *Momotus mexicanus* (Arbeláez et al. 2014a) y para otros grupos taxómicos como *Rana forreri* (Zaldívar-Riverón et al. 2004), la serpiente *Trimorphodon biscutatus* (Devitt 2006) y la iguana *Ctenosaura pectinata* (Zarza et al. 2008). Esta zona también ha sido propuesta como una zona de contacto para especies como las chachalacas *Ortalis wagleri* – *O. poliocephala* (Howell & Webb 1995). Sin embargo, las diferencias genéticas encontradas entre Guerrero y Oaxaca merecen estudiarse con mayor detalle, incluyendo estudios de conservadurismo o divergencia de nicho, estudios fenotípicos más detallados y/o de variación en los cantos.

De acuerdo con la evidencia, muchas de las discontinuidades filogeográficas reportadas para diversos taxa a través del BTC en el Pacífico mexicano coinciden con la cercanía de las montañas a la costa (FVT, Sierra Madre del Sur, etc), lo cual potencialmente podría disminuir la extensión del BTC en las tierras bajas interrumpiendo el flujo genético entre poblaciones. Sin embargo, como reporta Arbeláez-Cortés (2014), la orogénesis del occidente de México tanto de la FVT (20–3 millones de años, Becerra 2005; Devitt 2006) así

como la actividad volcánica de la Sierra Madre de Sur (35 – 20 millones de años, Morán-Zenteno et al. 2000) preceden a los tiempos de divergencia encontrados para sus especies de estudio. En *T. sinaloa* vemos que la FVT podría ser una barrera permeable que no define estrictamente la estructura genética a niveles jerárquicos superiores pero que a una escala más fina podría tener un efecto en estructurar a las poblaciones. No podemos descartar que otros factores adicionales al aislamiento por barreras puedan explicar las diferencias a través del BTC, como por ejemplo la adaptación a condiciones climáticas particulares debido a la cercanía de las montañas a las costas.

El papel del aislamiento geográfico y del ambiente en explicar los patrones genéticos

Los patrones de estructuración obtenidos con los loci outliers y neutrales son concordantes en cierta medida, por ejemplo, con ambos juegos de datos se distinguen dos grupos genéticos, uno que corresponde a los individuos de Michoacán-Guerrero y otro a los de Oaxaca. Sin embargo, los patrones de estructuración también difieren parcialmente entre juegos de datos: los grupos genéticos del norte y centro (grupos genéticos rojo y verde) que corresponden a las subespecies *cinereus* y *sinaloa* fueron agrupados en un mismo grupo genético con los loci outliers, a diferencia de dos grupos genéticos detectados usando los loci neutrales. Estos patrones de estructuración distintos entre marcadores afectados por procesos neutrales y por procesos selectivos resultan interesantes. En un trabajo previo donde comparamos el nicho entre las subespecies, encontramos traslape y conservadurismo de nicho entre las subespecies *cinereus* y *sinaloa* (Malpica et al. 2022), indicando que ambas ocupan condiciones ambientales similares (aunque no equivalentes). Al analizar la variación fenotípica, encontramos que el brillo y la saturación del plumaje de las espaldas y flancos

fueron más similares entre estas subespecies que con respecto a la subespecie *russeus*, que de manera general tiene plumajes más saturados y menos brillantes. El hecho de que *cinereus* y *sinaloa* tengan nichos y plumajes similares y que con los loci outliers se agrupen en un mismo grupo genético, podría sugerir que la diferenciación genética detectada entre estos dos grupos no es resultado de procesos de adaptación local, puesto que las condiciones en las que habitan son similares. Por lo tanto, esta diferenciación puede ser resultado de procesos neutrales como la deriva genética resultado, probablemente, del aislamiento por distancia debido a una reciente colonización del norte. En cambio, se reportó divergencia de nicho entre *cinereus*–*sinaloa* vs. *russeus*. La subespecie *russeus* habita en condiciones mucho más húmedas, con mayor radiación UV-B y donde la vegetación no pierde sus hojas por completo, en comparación a las primeras dos subespecies. El plumaje más oscuro y saturado de *russeus*, se asoció con esas condiciones de mayor humedad y cobertura vegetal, lo cual es consistente con la regla ecogeográfica de Gloger (Rensch 1929). También se asoció con una mayor radiación UV-B, patrón sugerido como un mecanismo de protección contra los rayos UV-B también detectado en otras especies de aves (Galván et al. 2018). Lo anterior refuerza la idea de que la diferenciación genética encontrada entre el grupo *cinereus*–*sinaloa* y el grupo *russeus* junto con la variación fenotípica descrita, pueden ser resultado de procesos de adaptación local.

En este estudio al hacer un ensamble *de novo* del genoma, no se tiene información sobre la ubicación de los loci outliers, los cuales potencialmente están sujetos a procesos de selección natural. En este sentido, sería importante hacer un ensamble de los datos obtenidos para *T. sinaloa* contra un genoma de referencia anotado de alguna especie de ave cercanamente relacionada, para obtener información sobre la ubicación, identidad y

funcionalidad de los potenciales loci bajo selección encontrados. Estos loci a su vez podrían relacionarse con las condiciones ambientales relevantes a través del BTC para explicar la variación fenotípica de la especie (ver Malpica et al. 2022). Con lo anterior, se podría entender de mejor manera como la variación ambiental influye en la variación fenotípica y determinar con precisión si las diferencias genéticas y fenotípicas de *russeus* vs. el resto son resultado de procesos de adaptación a las condiciones locales.

Lo anterior indica que tanto factores neutrales (e. g. divergencia por deriva genética) como selectivos (e. g. adaptación local), podrían explicar los patrones de estructura genética en *T. sinaloa* a lo largo del BTC. Ambos factores no son independientes en la historia de las especies, operando a menudo en conjunto (e. g. Colombelli-Négrell 2016; Friis et al. 2018; Malpica et al. 2022).

Influencia de las glaciaciones del Pleistoceno en la variación genética y demografía del Saltapared Sinaloense

Estudios que integran la filogeografía y los MNE han sido útiles para explicar patrones de evolución intraespecífica asociados a las oscilaciones climáticas del Pleistoceno (e. g. Malpica & Ornelas 2014; Zamudio-Beltrán et al. 2021; Castillo-Chora et al. 2021). Durante estos periodos se crearon barreras geográficas transitorias debido a las contracciones de la distribución, influyendo así en los patrones filogeográficos de diferentes taxa, los cuales han sido ampliamente explorados tanto en especies de regiones templadas del norte de Europa y Norte América (Hewitt 2000; Weir & Schluter 2004), como en especies de regiones áridas de Sudamérica o África (Allal et al. 2011; Turchetto-Zolet et al. 2013). Sin embargo, los efectos climáticos oscilatorios del Pleistoceno en los patrones filogeográficos de taxa

distribuidos en tierras bajas de Mesoamérica ha sido poco explorados (pero ver Castillo-Chora et al. 2021). De acuerdo con Pennington et al. (2000), durante los periodos glaciales del Pleistoceno, la distribución de los BTCs en Sudamérica se pudo haber expandido, promoviendo la conectividad y contrayendo su distribución durante los periodos interglaciales, conduciendo al aislamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos de la distribución de *T. sinaloa* durante el LGM, el patrón fue contrario, mostrando una contracción en las áreas de distribución. De acuerdo, al escenario de distribución potencial MIROC en el LGM, hubo una contracción en el norte de la distribución de la especie, la cual llegaba cerca de la zona de Mazatlán-Matatán en Sinaloa justamente en la zona donde se detecta la discontinuidad entre los grupos genéticos del norte (*cinereus*) y del centro (*sinaloa*) de la distribución. Dicha zona (Mazatlán-Matatán en Sinaloa) podría haber funcionado como una zona de contacto entre las subespecies durante la glaciación explicando la ancestría mezclada entre subespecies. Adicionalmente, esta zona (de Sonora a Sinaloa hacia zonas costeras) concuerda con una de las eco-regiones del BTC propuesta por Olson et al. (1998), la cual se define como “Sonoran-Sinaloan transition subtropical dry forest” y también concuerda con las diferencias climáticas detectadas en Malpica et al (2022) dentro de la distribución de *T. sinaloa*. La contracción en la distribución del BTC en el Pacífico mexicano durante el LGM también fue detectada por Castillo-Chora et al. (2022) quienes estudiaron los patrones filogeográficos de cuatro especies de aves, sugiriendo que los cambios climáticos del Pleistoceno han sido importantes en explicar los patrones de diferenciación encontrados.

Por otro lado, los patrones de menor diversidad genética para la subespecie *cinereus* son consistentes con una reciente expansión de la distribución hacia el norte posterior al LGM

resultado de un posible efecto fundador. De acuerdo con los MNE bajo los dos escenarios modelados (CCSM y MIROC) se predice una contracción principalmente al norte de la distribución donde actualmente se distribuye la subespecie *cinereus*. Este patrón de baja diversidad genética en zonas norteñas recientemente colonizadas después del LGM, ha sido descrito para varias especies de aves (e. g. Milá et al. 2006 en *Junco phaeonotus*; Malpica & Ornelas 2014 en *Selasphorus platycercus*; Licona-Vera et al. 2018 en el género *Calothorax*). Sería importante hacer estimaciones de demografía histórica de la subespecie *cinereus* para tener una estimación más detallada de la expansión al norte después del LGM (e.g. Castillo-Chora et al. 2021). Las estimaciones más altas de diversidad genética para *sinaloa* y *russeus*, en comparación con *cinereus*, de manera más notoria en los alelos privados y sitios polimórficos, son consistentes con áreas que fungieron como potenciales refugios en el BCT del Pacífico mexicano. En el este de Oaxaca se han reportado refugios para algunas aves (Arbeláez-Cortés et al. 2014a), lo cual coincide con áreas de diversificación de *Bursera* (Espinosa et al. 2006; Becerra & Venable 2008), el género de árbol predominante en el BTC. Otro refugio se ha reportado en Nayarit-Jalisco, para *Melanerpes chrysogenis* lo cual explica su alta diversidad genética (Arbeláez-Cortés et al. 2014a). Por lo tanto, la contracción de la distribución de la subespecie *russeus* bajo el escenario MIROC al sur de la distribución parece poco probable. Finalmente cabe mencionar que tanto en los modelos del presente como los del LGM no hay una predicción de la distribución de la especie tanto en el extremo norte en Sonora, así como en las partes altas de Jalisco y la depresión del Balsas en el presente. Sin embargo, durante el LIG si hubo una mejor predicción de dichas zonas a excepción del norte de Sonora. No podemos descartar que esta falta de predicción de los modelos de nicho se deba a posibles colonizaciones muy recientes de dichas áreas, como ha

sido bien documentado para el norte de la distribución de la especie. Finalmente, sería también importante documentar los cambios en los tamaños efectivos poblacionales en las subespecies para entender mejor los procesos demográficos asociados a los cambios climáticos del Pleistoceno.

CONCLUSIONES

Tanto procesos neutrales como selectivos han moldeado la historia evolutiva de *T. sinaloa*, sin embargo, no se sabe el grado en que cada uno de ellos contribuyen a la diferenciación genética. Nuestros resultados resaltan la importancia de los cambios climáticos del Pleistoceno en moldear los patrones filogeográficos de la especie. Al identificar loci outliers y que muestran valores de diferenciación más altos que los neutrales, sugiere que la estructura genética puede ser explicada por posibles procesos de adaptación a las condiciones ambientales locales. Sin embargo, sería necesario realizar análisis más detallados para demostrar lo anterior. Por otro lado, se encontraron ciertas concordancias entre discontinuidades filogeográficas y la cercanía de ciertas montañas a las zonas costeras, lo cual podría funcionar como barreras al flujo genético. Estudios que puedan cuantificar cuanto de la variación genética es explicada por factores neutrales (e. g. cambios climáticos del Pleistoceno, barreras geográficas o aislamiento geográfico) o por factores selectivos (ambiente) serían necesarios para identificar las fuerzas evolutivas que tiene mayor importancia en explicar los patrones de diversificación en esta especie y probablemente en otras especies co-distribuidas. Este estudio contribuye a la creciente evidencia para tratar de explicar los factores que promueven la gran diversidad del BTC en el Pacífico mexicano.

REFERENCIAS

- Allal, F., Sanou, H., Millet, L., Vaillant, A., Camus-Kulandaivelu, L., Logossa, Z. A., Lefèvre., Bouvet, J. M. (2011). Past climate changes explain the phylogeography of *Vitellaria paradoxa* over Africa. *Heredity*, 107, 174-186. <https://doi.org/10.1038/hdy.2011.5>
- Alexander, D. H., & Lange, K. (2011). Enhancements to the ADMIXTURE algorithm for individual ancestry estimation. *BMC Bioinformatics*, 12(246), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-246>
- Andrews, S (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Arbeláez-Cortés, E., Milá, B., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2014). Multilocus analysis of intraspecific differentiation in three endemic bird species from the northern Neotropical dry forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 362-377. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.006>
- Arbeláez-Cortés, E., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2013). Molecular evidence of the taxonomic status of western Mexican populations of *Phaethornis longirostris* (Aves: Trochilidae). *Zootaxa*, 3716(1), 81-97. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3716.1.7>
- Arbeláez-Cortés, E., Roldán-Piña, D., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2014). Multilocus phylogeography and morphology give insights into the recent evolution of a Mexican endemic songbird: *Vireo hypochryseus*. *Journal of Avian Biology*, 45(3), 253-263. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2013.00335.x>
- Avice, J.C. (2000). Phylogeography, the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, USA.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *Plos One*, 3(10), e3376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Baird, S. F. (1866). Review of American birds, in the Museum of the Smithsonian Institution. Smithsonian Institution. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7509>
- Barrera-Guzmán, A. O., Milá, B., Sánchez-González, L. A., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2012). Speciation in an avian complex endemic to the mountains of Middle America

- (Ergaticus, Ayes: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(3), 907-920. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.020>
- Bayona-Vásquez, N. J., Glenn, T. C., Kieran, T. J., Pierson, T. W., Hoffberg, S. L., Scott, P. A., Faircloth, B. C. (2019). Adapterama III: Quadruple-Indexed, double/triple-enzyme RADseq libraries (2RAD/3RAD). *Peerj*, 7, e7724. <https://doi.org/10.7717/peerj.7724>
- Becerra, J. X. (2005). Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10919-10923. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409127102>
- Becerra, J. X., & Venable, D. L. (2008). Sources and Sinks of Diversification and Conservation Priorities for the Mexican Tropical Dry Forest. *Plos One*, 3(10), e3436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003436>
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 211-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Booth, T. H., Nix, H. A., Busby, J. R., & Hutchinson, M. F. (2014). BIOCLIM: the first species distribution modelling package, its early applications and relevance to most current MAXENT studies. *Diversity and Distributions*, 20(1), 1-9. <https://doi.org/10.1111/ddi.12144>
- Braconnot, P., Otto-Bliesner, B., Harrison, S., Joussaume, S., Peterchmitt, J. Y., Abe-Ouchi, A., Zhao, Y. (2007). Results of PMIP2 coupled simulations of the Mid-Holocene and Last Glacial Maximum - Part 2: feedbacks with emphasis on the location of the ITCZ and mid- and high latitudes heat budget. *Climate of the Past*, 3(2), 279-296. <https://doi.org/10.5194/cp-3-261-2007>
- Bradburd, G. S., Ralph, P. L., & Coop, G. M. (2013). Disentangling the effects of geographic and ecological isolation on genetic differentiation. *Evolution*, 67(11), 3258-3273. <https://doi.org/10.1111/evo.12193>
- Brewster, W. (1889). Descriptions of supposed new birds from western North America and Mexico. *The Auk*, 6(2), 85-98. <https://doi.org/10.2307/4067024>
- Bryson, R. W., de Oca, A. N. M., & Velasco, J. R. (2008). Phylogenetic position of *Porthidium hespere* (Viperidae: Crotalinae) and phylogeography of arid-adapted

- hognosed pitvipers based on mitochondrial DNA. *Copeia* (1), 172-178. <https://doi.org/10.1643/ch-07-043>
- Castillo-Chora, V. D., Sánchez-González, L. A., Mastretta-Yanes, A., Prieto-Torres, D. A., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2021). Insights into the importance of areas of climatic stability in the evolution and maintenance of avian diversity in the Mesoamerican dry forests. *Biological Journal of the Linnean Society*, 132(4), 741-758. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa202>
- Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe P., Cresko, W., Postlethwait, J. H. (2011) Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1(3):171-182
- Ceballos, G., Martínez, L., García, A., Espinoza, E., & Bezaury, J. (Editores) (2010). Áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico mexicano. Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico de México, *Fondo de cultura económica*, 387-392.
- Cobos, M. E., Peterson, A. T., Barve, N., & Osorio-Olvera, L. (2019). kuenm: an R package for detailed development of ecological niche models using Maxent. *PeerJ*, 7, e6281. <https://doi.org/10.7717/peerj.6281>
- Cobos ME, Osorio-Olvera L, Soberon J, Peterson TA. ellipsenm: Ecological Niche's Characterizations Using Ellipsoids. In: R. package version 0.3.4.
- Colombelli-Negrel, D. (2016). Both natural selection and isolation by distance explain phenotypic divergence in bill size and body mass between South Australian little penguin colonies. *Ecology and Evolution*, 6(22), 7965-7975. <https://doi.org/10.1002/ece3.2516>
- Collins, W.D., Bitz, C.M., Blackmon, M.L., Bonan, G.B., Bretherton, C.S., Carton, J.A., Kiehl, J.T. (2006). The community climate system model version 3 (CCSM3). *Journal of Climate*, 19(11), 2122–2143. <http://doi.org/10.1175/JCLI3761.1>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A. Genomes Project Anal, G. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>

- Dickinson, E.C., (2003). The Howard & Moore complete checklist of the birds of the world. 3rd Edition. Princeton University Press, New Jersey.
- Devitt, T. J. (2006). Phylogeography of the Western Lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic-Neotropical transition. *Molecular Ecology*, *15*(14), 4387-4407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03015.x>
- Espinosa, D., Llorente, J., & Morrone, J. J. (2006). Historical biogeographical patterns of the species of *Bursera* (Burseraceae) and their taxonomic implications. *Journal of Biogeography*, *33*(11), 1945-1958. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01566.x>
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, *10*(3), 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Friis, G., Fandos, G., Zellmer, A. J., McCormack, J. E., Faircloth, B. C., & Milá, B. (2018). Genome-wide signals of drift and local adaptation during rapid lineage divergence in a songbird. *Molecular Ecology*, *27*(24), 5137-5153. <https://doi.org/10.1111/mec.14946>
- Galván, I., Jorge, A., Pacheco, C., Spencer, D., Halley, D. J., Itty, C., Negro, J. J. (2018). Solar and terrestrial radiations explain continental-scale variation in bird pigmentation. *Oecologia*, *188*(3), 683-693. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4238-8>
- García-Marmolejo, G., Escalante, T., & Morrone, J. J. (2008). Establecimiento de prioridades para la conservación de mamíferos terrestres neotropicales de México. *Mastozoología neotropical*, *15*(1), 41-65.
- Glenn, T. C., Nilsen, R. A., Kieran, T. J., Sanders, J. G., Bayona-Vásquez, N. J., Finger, J. W., Faircloth, B. C. (2019). Adapterama I: universal stubs and primers for 384 unique dual-indexed or 147,456 combinatorially-indexed Illumina libraries (iTru & iNext). *Peerj*, *7*, e7755. <https://doi.org/10.7717/peerj.7755>
- González, C., Ornelas, J.F., & Gutiérrez-Rodríguez, C. (2011). Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological

- divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology*, 11. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-11-38>
- Gordon, C. E., & Ornelas, J. F. (2000). Comparing endemism and habitat restriction in Mesoamerican tropical deciduous forest birds: implications for biodiversity conservation planning. *Bird Conservation International*, 10(4), 289-303. <https://doi.org/10.1017/s0959270900000241>
- Grant, P. (1966). The coexistence of two wren species of the genus *Thryothorus*. *The Wilson Bulletin*, 266-278.
- Hadley, W., Romain, F., Lionel, H., & Kirill, M. (2021). A Grammar of Data Manipulation [R package dplyr version 1.0.7]. In: Comprehensive R Archive Network (CRAN).
- Hasumi, H., Emori, S. (2004). K-1 Coupled GCM (MIROC) Description. Center for Climate System Research, University of Tokyo, Japan, Tokyo.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913. <https://doi.org/10.1038/35016000>
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., & Jarvis, A. (2005). Very high-resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25(15), 1965-1978. <https://doi.org/10.1002/joc.1276>
- Hijmans, R. J., Van Etten, J., Cheng, J., Mattiuzzi, M., Sumner, M., Greenberg, J. A., Shortridge, A. (2015). Package ‘raster’. *R package*, 734.
- Howell, S.N.G., & Webb, S. (1995). A guide to the birds of Mexico and northern Central America. Oxford University Press.
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11, 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Licona-Vera, Y., Ornelas, J. F., Wethington, S., & Bryan, K. B. (2018). Pleistocene range expansions promote divergence with gene flow between migratory and sedentary populations of *Calothorax* hummingbirds. *Biological Journal of the Linnean Society*, 124(4), 645-667. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly084>

- Löwenberg-Neto, P. (2014). Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalisation. *Zootaxa*, 3802(2), 300. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3802.2.12>
- Luu, K., Bazin, E., & Blum, M. G. B. (2017). pcadapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 67-77. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12592>
- Malpica, A., & Ornelas, J. F. (2014). Postglacial northward expansion and genetic differentiation between migratory and sedentary populations of the broad-tailed hummingbird (*Selasphorus platycercus*). *Molecular Ecology*, 23(2), 435-452. <https://doi.org/10.1111/mec.12614>
- Milá, B., Smith, T. B., & Wayne, R. K. (2006). Postglacial population expansion drives the evolution of long-distance migration in a songbird. *Evolution*, 60(11), 2403-2409.
- Morán-Zenteno, D. J., Martiny, B., Tolson, G., Solís-Pichardo, G., Alba-Aldave, L., Hernández-Bernal, M. D. S., Macías-Romo, C., Martínez-Serrano, R. E., Schaaf, P. and Silva Romo, G. (2000). Geocronología y características geoquímicas de las rocas magmáticas terciarias de la Sierra Madre del Sur. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 53: 27–58.
- Morrone, J. J. (2014). Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*, 3782(1), 1-110. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3782.1.1>
- Murphy, P.G., Lugo, A.E. (1986). Ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 17: 67-88. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.00043568>
- Nelson, E. W. (1903). Descriptions of new birds from southern Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*.
- Olson, D.M., Dinerstein, E., Robin, A., Allnut, T., Carpenter, C., McClanachan, L., Amico, J., Hurley, P., Kassem, K.m Strand, H., Taye, M., Thieme, M. (1998). The Global 200: A representation approach to conserving the earth's distinctive ecoregions. *Conservation Biology*, 12, 502-515. <http://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1998.012003502.x>
- Osorio-Olvera, L., Lira-Noriega, A., Soberon, J., Peterson, A. T., Falconi, M., Contreras-Díaz, R. G., Barve, N. (2020). ntbox: An r package with graphical user interface for

- modelling and evaluating multidimensional ecological niches. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(10), 1199-1206. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.13452>
- Otto-Bliesner, B.L., Marshall, S.J., Overpeck, J.T., Miller, G.H., Hu, A. (2006). *Science*, 311(5768), 1751-1753. <https://doi.org/10.1126/science.1120808>
- Paris, J. R., Stevens, J. R., & Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1360-1373. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12775>
- Pennington, R. T., Prado, D. E., & Pendry, C. A. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27(2), 261-273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2000.00397.x>
- Pérez-García, E. A., Meave, J. A., & Cevallos-Ferriz, S. R. S. (2012). Flora and vegetation of the seasonally dry tropics in Mexico: Origin and biogeographical implications. *Acta Botanica Mexicana*, 100, 149-193.
- Peterson, A., Navarro-Sigüenza, A. G. (2000). Western Mexico: A significant centre of avian endemism and challenge for conservation action. *Cotinga* (14), 42-46.
- Phillips, A. R. (1986). The known birds of North and Middle America. Part I. Privately published, Denver Colorado.
- Prieto-Torres, D. A., Rojas-Soto, O. R., Santiago-Alarcón, D., Bonaccorso, E., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2019). Diversity, endemism, species turnover and relationships among avifauna of neotropical seasonally dry forests. *Ardeola-International Journal of Ornithology*, 66(2), 257-277. <https://doi.org/10.13157/arla.66.2.2019.ra1>
- Rensch, B. (1929). Das Prinzip geographischer Rassenkreise und das Problem der Artbildung. Gebrueden Borntraeger, Berlin. <https://doi.org/10.1038/124753a0>
- Ríos-Muñoz, C. A., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2012). Patterns of species richness and biogeographic regionalization of the avifaunas of the seasonally dry tropical forest in Mesoamerica. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 47(3), 171-182. <https://doi.org/10.1080/01650521.2012.734175>
- Rundle, H. D., & Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3), 336-352. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x>
- Russell, S.M., & G. Monson. (1998). The birds of Sonora. University of Arizona Press, Tucson, Arizona.

- Rzedowski, J. (2006) Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 504 pp.
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(7), 372-380. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02198-x](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02198-x)
- Schluter, D. (2009). Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science*, 323(5915), 737-741. <https://doi.org/10.1126/science.1160006>
- Seeholzer, G. F., & Brumfield, R. T. (2018). Isolation by distance, not incipient ecological speciation, explains genetic differentiation in an Andean songbird (Aves: Furnariidae: *Cranioleuca antisiensis*, Line-cheeked Spinetail) despite near threefold body size change across an environmental gradient. *Molecular Ecology*, 27(1), 279-296. <https://doi.org/10.1111/mec.14429>
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139(1), 457-462.
- Sobel, J. M., Chen, G. F., Watt, L. R., & Schemske, D. W. (2010). The Biology of Sspeciation. *Evolution*, 64(2), 295-315. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00877.x>
- Soberanes-González CA. Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*), version 1.0. In Neotropical Birds Online (Schulenberg T. S., Editor). Cornell Lab of Ornithology; 2015. <https://doi.org/10.2173/nb.sinwre1.01>
- Trejo, I., & Dirzo, R. (2002). Floristic diversity of Mexican seasonally dry tropical forests. *Biodiversity and Conservation*, 11(11), 2063-2084. <https://doi.org/10.1023/a:1020876316013>
- Trejo Vázquez, R. I. (1998). Distribucion y diversidad de selvas bajas de Mexico: relaciones con el clima y el suelo. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., Palma-Silva, C. (2012). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22(5), 1193-1213. <https://doi.org/10.1111/mec.12164>
- Vázquez-López, M., Cortés-Rodríguez, N., Robles-Bello, S. M., Bueno-Hernández, A., Zamudio-Beltrán, L. E., Rugg, K., & Hernández-Baños, B. E. (2021). Phylogeography and morphometric variation in the Cinnamon Hummingbird

- complex: *Amazilia rutila* (Aves: Trochilidae). *Avian Research*, 12(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s40657-021-00295-0>
- Wang, I. J., & Bradburd, G. S. (2014). Isolation by environment. *Molecular Ecology*, 23(23), 5649-5662. <https://doi.org/10.1111/mec.12938>
- Weber, J. N., Bradburd, G. S., Stuart, Y. E., Stutz, W. E., & Bolnick, D. I. (2018). Partitioning the effects of isolation by distance, environment, and physical barriers on genomic divergence between parapatric threespine stickleback. *Evolution*, 72(8), 1736-1736. <https://doi.org/10.1111/evo.13545>
- Weir, J. T. & Schluter, D. (2004). Ice sheets promote speciation in boreal birds. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences*, 271(1551), 1881-1887. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2803>
- Williams, G.C. (1966). *Adaptation and Natural Selection*. New Jersey: Princeton University <https://doi.org/10.2307/j.ctt7s4g0>
- Wright, S. (1943). Isolation by Distance. *Genetics*. 28, 114-138. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.2.114>
- Zaldivar-Riveron, A., León-Regagnon, V., & de Oca, A. N. M. (2004). Phylogeny of the Mexican coastal leopard frogs of the *Rana berlandieri* group based on mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(1), 38-49. [https://doi.org/10.1016/s1055-7903\(03\)00141-6](https://doi.org/10.1016/s1055-7903(03)00141-6)
- Zamudio-Beltrán, L. E., Ornelas, J. F., Malpica, A., & Hernández-Baños, B. E. (2020). Genetic and morphological differentiation among populations of the Rivoli's Hummingbird (*Eugenes fulgens*) species complex (Aves: Trochilidae). *Auk*, 137(4), ukaa032. <https://doi.org/10.1093/auk/ukaa032>
- Zarza, E., Reynoso, V. H., & Emerson, B. C. (2008). Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 17(14), 3259-3275. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03826.x>
- Zizka, A., Silvestro, D., Andermann, T., Azevedo, J., Ritter, C. D., Edler, D., Antonelli, A. (2019). CoordinateCleaner: Standardized cleaning of occurrence records from biological collection databases. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(5), 744-751. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.13152>

Material suplementario

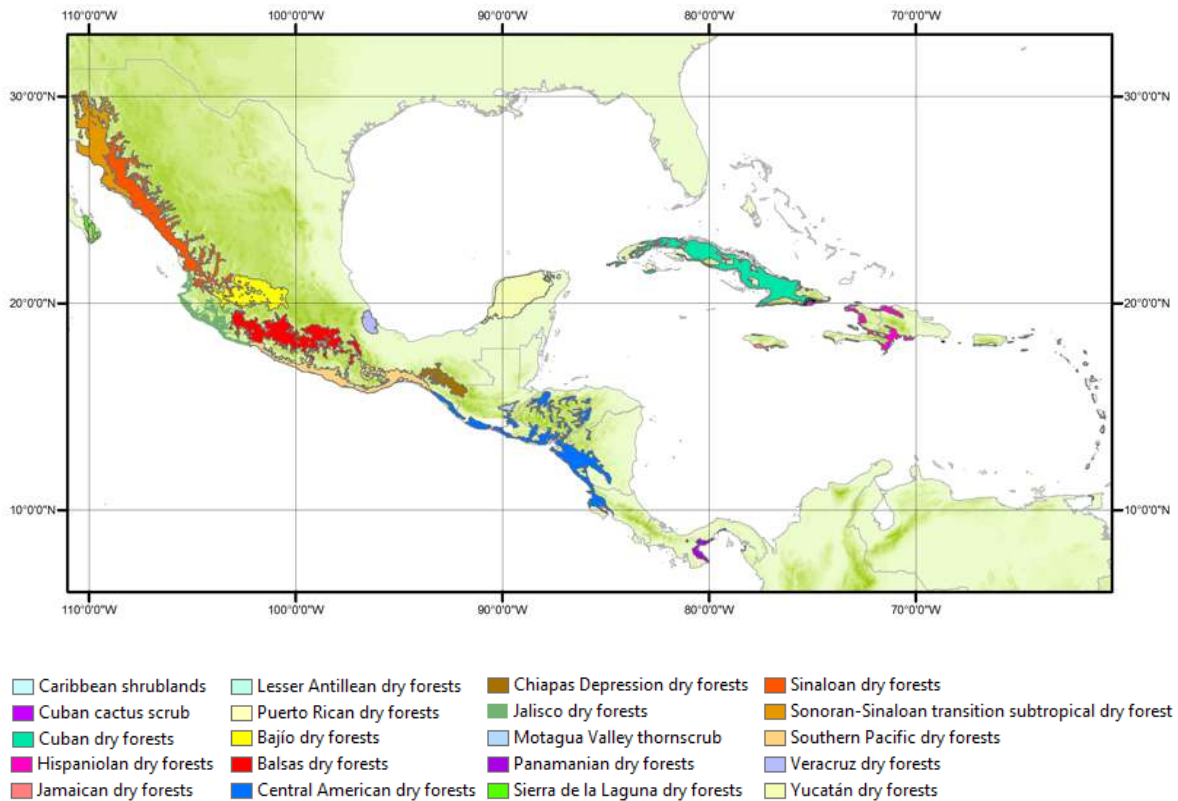


Figura S1. Bosque tropical seco en ecorregiones de Mesoamérica y el Caribe determinadas por Olson y colaboradores (1998). Imagen tomada de la tesis de maestría de Francisco Javier Balvino Olvera (Figura 2, Capítulo 1. Biogeografía del BTS en Mesoamérica: Dinámica histórica de la vegetación y patrones de endemismo).

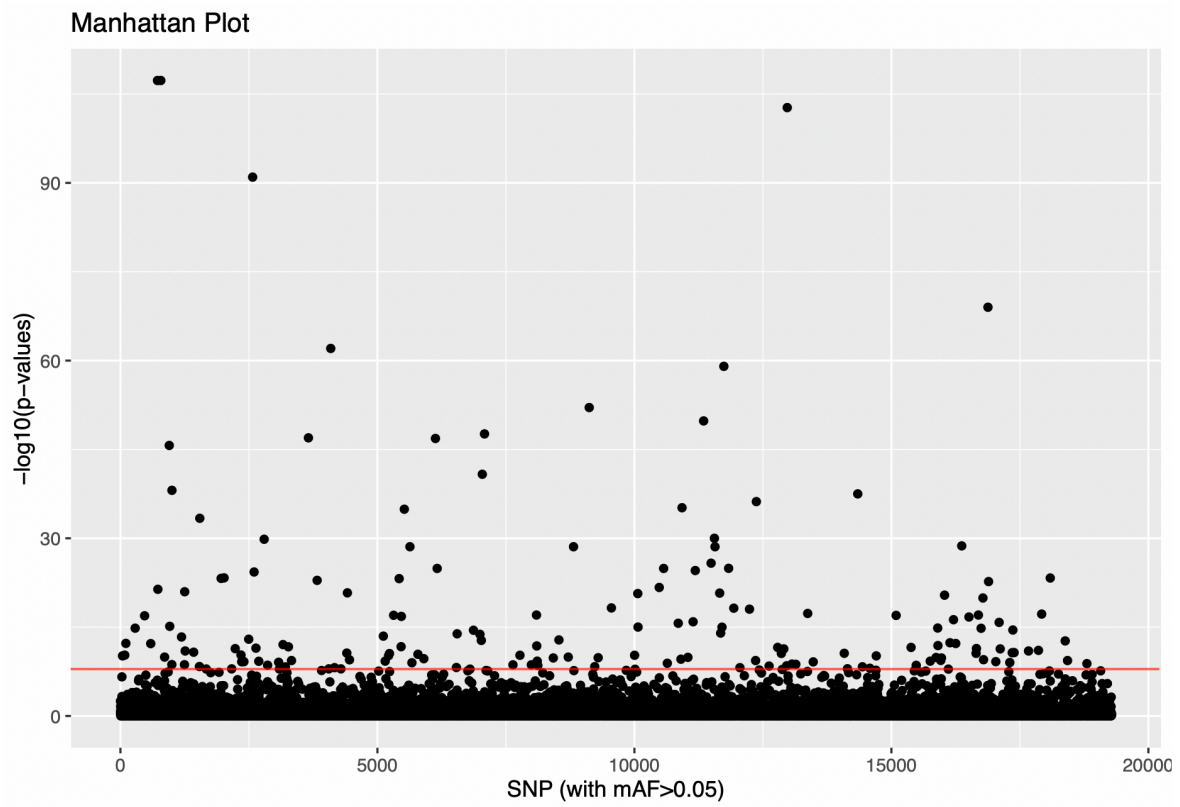


Figura S2. Manhattan plot para la búsqueda de loci outliers a través del genoma con respecto a los valores de P . La línea roja horizontal muestra el umbral de significancia, por arriba de este umbral, el análisis de *pcadapt* los identifica como loci outliers.

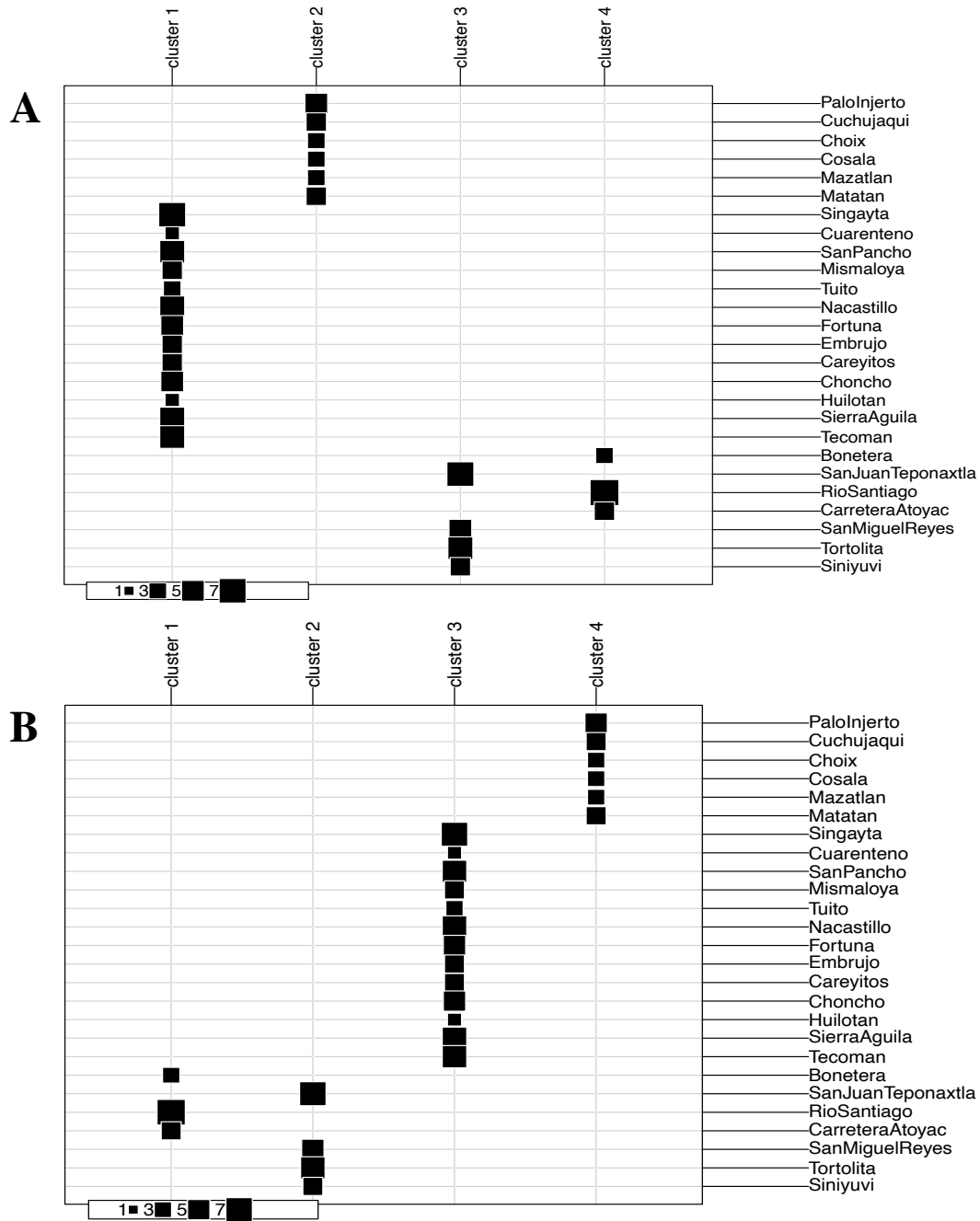


Figura S3. Tablas de asignación de las localidades a los grupos genéticos de acuerdo a la función *find.clusters* del análisis DAPC A) para la base neutral y B) para la base selectiva.

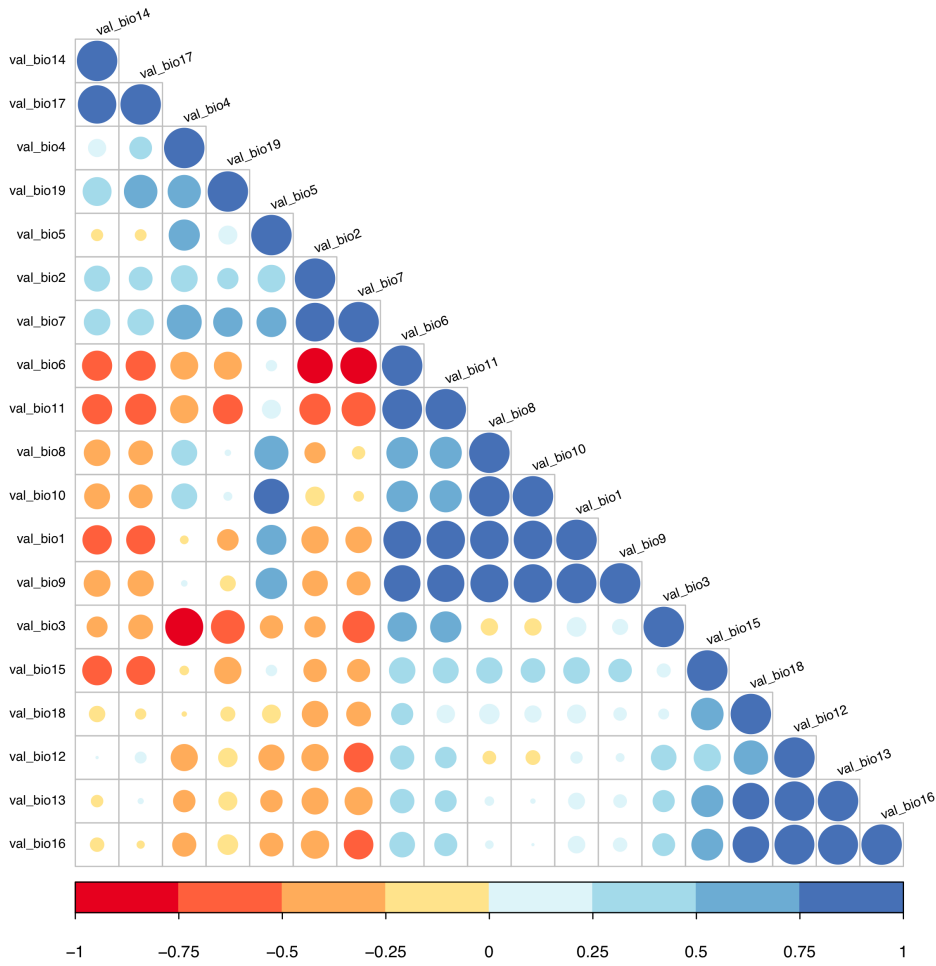


Figura S4. Visualización gráfica de una matriz de correlación (test de Pearson) a partir de valores de 909 puntos de ocurrencia (*Thryophilus sinaloa*) extraídos de las 19 variables bioclimáticas (base de datos WorldClim).

Tabla S1. Valores pareados de diferenciación genética (F_{ST}) usando la base de datos neutral entre las localidades de colecta de *Thryophilus sinaloa*. Comparaciones pareadas significativamente diferente de cero se indican en negritas.

	PAI	CUC	CHOI	COS	MAZ	MAT	SIN	CUA	SAP	HUI	SIA	MIS	TUI	NAC	FOR	EMB	CAR	CHON	TEC	BON	RIO	CAT	SMR	TOR	SIN	SIT
PAI	0																									
CUC	0.00552	0																								
CHOI	0.07592	0.07029	0																							
COS	0.04955	0.04467	0.08114	0																						
MAZ	0.07099	0.06863	0.10850	0.00979	0																					
MAT	0.08633	0.08610	0.12957	0.03459	0.02669	0																				
SIN	0.12902	0.12594	0.16065	0.07801	0.05263	0.05608	0																			
CUA	0.14905	0.14692	0.19106	0.09235	0.05938	0.06486	0.03637	0																		
SAP	0.14295	0.14470	0.16784	0.08689	0.06183	0.07364	0.03180	0.00930	0																	
HUI	0.17800	0.17598	0.22714	0.12893	0.10339	0.10540	0.06827	0.05494	0.05595	0																
SIA	0.18084	0.17398	0.20112	0.12316	0.10236	0.11638	0.07495	0.05634	0.05460	0.06955	0															
MIS	0.14987	0.15599	0.17974	0.09891	0.07850	0.08974	0.04490	0.04158	0.03548	0.04333	0.04586	0														
TUI	0.16768	0.16887	0.20222	0.11432	0.09452	0.10144	0.06092	0.04316	0.03698	0.06924	0.06224	0	0													
NAC	0.17480	0.17628	0.19970	0.12182	0.09833	0.10948	0.06646	0.05069	0.04280	0.06895	0.05811	0.01264	0.01487	0												
FOR	0.17273	0.17060	0.20243	0.11610	0.09972	0.11089	0.06255	0.04486	0.04336	0.07693	0.06020	0.01285	0.01678	0	0											
EMB	0.14761	0.14741	0.18627	0.09682	0.07997	0.07897	0.04799	0.02059	0.02480	0.05517	0.03559	0	0	0	0	0										
CAR	0.20381	0.20178	0.24170	0.15141	0.13414	0.13829	0.09213	0.08176	0.07276	0.09989	0.08408	0.04353	0.03684	0.02265	0.02692	0	0									
CHON	0.17796	0.17869	0.21333	0.11951	0.10837	0.11565	0.06798	0.05394	0.04597	0.08295	0.05784	0.01265	0.02134	0.00692	0.00377	0	0.02754	0								
TEC	0.18370	0.17789	0.21917	0.13508	0.11284	0.11999	0.07941	0.08346	0.05483	0.11358	0.05782	0.02838	0.03970	0.01999	0.02615	0.00881	0.05576	0.02477	0							
BON	0.29931	0.29637	0.32513	0.25318	0.24173	0.25440	0.23651	0.21327	0.22367	0.23013	0.21861	0.20274	0.19859	0.19535	0.20080	0.17630	0.21313	0.20225	0.15360	0						
RIO	0.31816	0.31777	0.33269	0.27636	0.26011	0.27985	0.26998	0.23186	0.25555	0.26010	0.25569	0.24070	0.23157	0.22976	0.23219	0.21334	0.24290	0.23239	0.17666	0.12283	0					
CAT	0.33254	0.33225	0.33846	0.28242	0.26607	0.28964	0.28051	0.22880	0.26406	0.25078	0.25879	0.23907	0.23009	0.23995	0.23965	0.22450	0.25138	0.24132	0.18722	0.12169	0	0				
SMR	0.37729	0.37325	0.38690	0.33162	0.31710	0.34149	0.33434	0.29074	0.32545	0.31558	0.31935	0.30438	0.29086	0.30029	0.30410	0.28502	0.31515	0.30175	0.25363	0.19415	0.09234	0.08669	0			
TOR	0.40725	0.40568	0.41674	0.36900	0.35214	0.37403	0.36490	0.33047	0.36109	0.34942	0.35296	0.33976	0.33104	0.33732	0.34062	0.31903	0.34760	0.33919	0.28799	0.22286	0.11943	0.11593	0.04028	0		
SIN	0.39841	0.39562	0.40909	0.35463	0.33452	0.36040	0.35464	0.31211	0.34610	0.33292	0.34073	0.32211	0.31310	0.32616	0.32525	0.30671	0.33459	0.32437	0.27814	0.21017	0.10187	0.09742	0.00843	0.03913	0	
SIT	0.38569	0.38591	0.39513	0.34806	0.33134	0.35263	0.34448	0.30502	0.33788	0.32850	0.33398	0.31893	0.30617	0.31262	0.31660	0.29606	0.32519	0.31358	0.25992	0.20881	0.10391	0.10365	0.01383	0.03971	0.01222	0

Tabla S2. Valores pareados de diferenciación genética (F_{st}) usando la base de datos selectiva entre las localidades de colecta de *Thryophilus sinaloa*. Comparaciones pareadas significativamente diferente de cero se indican en negritas.

	PAI	CUC	CHOI	COS	MAZ	MAT	SIN	CUA	SAP	HUI	SIA	MIS	TUI	NAC	FOR	EMB	CAR	CHON	TEC	BON	RIO	CAT	SMR	TOR	SIN	SJT
PAI	0																									
CUC	0	0																								
CHOI	0.40571	0	0																							
COS	0.21205	0	0.02222	0																						
MAZ	0.24867	0	0.05714	0	0																					
MAT	0.00621	0	0.23382	0.02360	0.02360	0																				
SIN	0.37662	0.35742	0.41315	0.39073	0.27538	0.25138	0																			
CUA	0.68884	0.61353	0.40611	0.48624	0.42268	0.46067	0.19540	0																		
SAP	0.83423	0.75011	0.62663	0.70984	0.63490	0.64466	0.24282	0.17730	0																	
HUI	0.75786	0.64113	0.43473	0.54313	0.45899	0.50358	0.20677	0.00000	0.11111	0																
SIA	0.54516	0.51992	0.44418	0.50070	0.42600	0.46975	0.25278	0.02376	0.17403	0	0															
MIS	0.52834	0.50415	0.36739	0.45475	0.38837	0.43580	0.21795	0	0.12423	0	0.00083	0														
TUI	0.64386	0.59239	0.42857	0.51429	0.43333	0.48303	0.18531	0.00000	0.02090	0	0.08564	0	0													
NAC	0.48046	0.46478	0.39582	0.44126	0.35993	0.39874	0.11032	0	0.04075	0	0.03377	0	0	0												
FOR	0.68468	0.62482	0.48883	0.57995	0.51515	0.53798	0.21788	0	0.01038	0	0.05035	0	0	0.00367	0											
EMB	0.66667	0.61534	0.47416	0.55659	0.46431	0.50230	0.15464	0.02041	0	0	0.04626	0	0	0	0	0										
CAR	0.55357	0.52600	0.41109	0.46940	0.40468	0.45027	0.23224	0	0.16411	0	0	-0.197	0	0	0	0	0									
CHON	0.53242	0.5014	0.38967	0.46262	0.39314	0.42229	0.09284	0	0.01328	0	0.11402	0.00354	-0.071	0	0	0	0.03082	0								
TEC	0.41355	0.42727	0.35135	0.36868	0.31366	0.22777	0.34432	0.22724	0.37909	0.23936	0.30748	0.26769	0.26430	0.30303	0.33861	0.26970	0.25005	0.31868	0							
BON	0.84054	0.84852	0.78769	0.79429	0.79692	0.80656	0.86983	0.77249	0.88182	0.78208	0.83833	0.81053	0.80104	0.84364	0.85228	0.83337	0.79710	0.84301	0.68073	0						
RIO	0.90149	0.90421	0.88318	0.88547	0.88659	0.88717	0.91221	0.88092	0.91724	0.88436	0.89969	0.89005	0.88686	0.90181	0.90574	0.89886	0.88378	0.90143	0.81850	0.53051	0					
CAT	0.89659	0.90135	0.86499	0.86945	0.87051	0.87613	0.91290	0.85770	0.91961	0.86360	0.89366	0.87722	0.87105	0.89654	0.90274	0.89107	0.87075	0.89586	0.78817	0.42353	0.00264	0				
SMR	0.97122	0.96804	0.95200	0.95635	0.95683	0.95545	0.96813	0.95896	0.97724	0.96353	0.95362	0.95216	0.95909	0.95548	0.96793	0.96472	0.94987	0.96153	0.87224	0.67879	0.54703	0.49124	0			
TOR	0.93383	0.93430	0.91346	0.91681	0.91772	0.91809	0.93922	0.91418	0.94631	0.91860	0.92475	0.91801	0.91915	0.92697	0.93501	0.92910	0.91364	0.92948	0.84103	0.60279	0.42508*	0.33436	0.11316	0		
SIN	0.96713	0.96376	0.94348	0.94870	0.94929	0.94841	0.96444	0.95079	0.97470	0.95644	0.94749	0.94458	0.95241	0.94965	0.96365	0.95945	0.94180	0.95620	0.85474	0.60923	0.51111	0.42857	0	0.01685	0	
SJT	0.95205	0.95089	0.93525	0.93844	0.93913	0.93804	0.95319	0.93879	0.96050	0.94254	0.94046	0.93721	0.94072	0.94231	0.95136	0.94743	0.93388	0.94609	0.86458	0.67644	0.52866*	0.46131	0.00492	0.00682	0	0

CAPÍTULO III

Color and morphological differentiation in the Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*) in the tropical dry forests of Mexico: the role of the environment and geographical isolation

Publicado en *PlosOne* (Junio del 2022)


DOI: 10.1371/journal.pone.0269860

RESEARCH ARTICLE

Color and morphological differentiation in the Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*) in the tropical dry forests of Mexico: The role of environment and geographic isolation

Andreia Malpica¹ , Luis Mendoza-Cuenca² , Clementina González¹ *

1 Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México, **2** Laboratorio de Ecología de la Conducta, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México

 These authors contributed equally to this work.

* clementina.gonzalez@umich.mx



OPEN ACCESS

Citation: Malpica A, Mendoza-Cuenca L, González C (2022) Color and morphological differentiation in the Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*) in the tropical dry forests of Mexico: The role of environment and geographic isolation. PLoS ONE 17(6): e0269860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860>

Editor: Matthew Shawkey, University of Akron, UNITED STATES

Received: December 22, 2021

Accepted: May 27, 2022

Published: June 23, 2022

Copyright: © 2022 Malpica et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Reflectance data files and morphological measurements are accessible at OSF open platform (https://osf.io/6tkms/?view_only=b0592962013948c9af0b78d28bad8500).

Funding: Our research was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, <https://conacyt.mx>) through project grants PDCPN 2015-1250 to CG and by a doctoral scholarship (371634) to AM; by the American Ornithological Society (<https://americanornithology.org>) and by

Abstract

The role and the degree to which environment and geographic isolation contribute to phenotypic diversity has been widely debated. Here, we studied phenotypic variation (morphology and plumage reflectance) in the Sinaloa Wren, an endemic bird distributed throughout the tropical dry forest (TDF) on the Mexican pacific slope where a pronounced variability in environmental conditions has been reported. In particular, we aimed: 1) to characterize phenotypic variation between subspecies; 2) to analyze the relationship between phenotypic and environmental variation in the context of classic ecogeographic rules, such as Bergmann's, Allen's, Gloger's, and Bogert's, and to quantify the relative roles of environment and geographic isolation and their interaction in shaping phenotypic variation; and 3) to test for niche conservatism between subspecies. Our data revealed significant differences among subspecies morphology and plumage reflectance. The environment explained a higher proportion of the morphological variation, while geography explained a smaller proportion. However, variation in plumage reflectance was mainly explained by the joint effect of geography and environment. Our data did not support for Bergmann's and Allen's rule. However, longer tails and wings were positively associated with higher elevations, larger tarsus and culmens were positively related to higher latitudes and to greater tree cover, respectively. Our data partially supported Gloger's rule, where darker plumages were associated with more humid environments. The effects of temperature on plumage coloration were more consistent with Bogert's rule. In addition, we found darker plumages related to higher levels of UV-B radiation. Finally, niche divergence was detected between *T. s. cinereus* and *T. s. sinaloa* vs. *T. s. russeus*. In a continuously distributed ecosystem such as the TDF on the pacific slope of Mexico, the environmental conditions and geographic isolation have played an important role in promoting phenotypic differentiation in the Sinaloa Wren.

the National Geographic Society (grant number EC-61696R-19, <https://www.nationalgeographic.org>) to AM. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

In birds, phenotypic traits such as plumage coloration, morphological traits (e.g. body size), songs and behavioral displays are involved in conspecific recognition, as well as mate choice [1]. Divergence of these traits could therefore be an important driver of premating reproductive isolation [2,3]. Phenotypic divergence between populations might occur through local adaptation, as a result of natural selection when populations evolve advantageous traits under their local environment, or by phenotypic plasticity, where environmental variation influences phenotype by creating non-heritable trait variation [4]. Moreover, phenotypic divergence might also result from neutral effects of genetic drift [5], where the amount of gene flow between populations decreases as the geographic distance between them increases (e.g. [6]). The effects of these mechanisms are not mutually exclusive, since both could influence phenotypic differentiation between populations through the evolutionary history of species [7]. Studies that quantify the proportion of phenotypic variation explained by geography and environment are therefore essential in order to understand the factors that drive morphological variation (e.g. [8,9]), which can eventually contribute to speciation.

Geographic patterns of morphological and color plumage variation in birds have been associated with climate, latitude, elevation and resource availability [10–13]. For example, according to Bergmann's rule, temperature has been suggested as the principal factor shaping latitudinal body size variation, where larger bodies are expected in colder climates as a thermoregulatory response to prevent heat dissipation [14]. Likewise, Allen's rule predicts that homeothermic animals should have shorter appendages (e.g. tarsus and culmen) in cooler climates in order to minimize heat loss [15]. However, other factors have also been suggested to influence phenotypic variation; for instance, longer wings and tails have been positively associated with higher elevations where low atmospheric pressures and strong air currents prevail [16–18], which helps to increase flight efficiency, as well as contributing to balance and lift [19,20]. Moreover, environmental variables such as precipitation could impact habitat characteristics such as understory density and overall forest interior structure [21], which can influence tarsus, wing and tail morphology since these traits are respectively related to foraging, flight performance and maneuverability [22–24]. In addition, longer bills have been positively related to deeper substrates in more humid habitats [25], and to warm and humid habitats as a mechanism for heat dissipation [26,27]. Finally, temperature and humidity also have an effect on melanin-based feather coloration (e.g. [28,29]). According to the simple version of Gloger's rule, darker colorations are expected in more humid and warmer areas, and brighter colorations in cooler and dryer conditions [30,31] while, according to Bogert's rule [32], darker colorations are expected in colder habitats in order that individuals can absorb more solar radiation, with lighter colorations expected in warmer habitats [33–35]. In addition, recent studies have demonstrated the implication of other factors such as ultraviolet radiation in explaining melanin production and variation that may be a source of oxidative stress which can affect overall plumage coloration [29].

Tropical dry forest (TDF) is one of the most extensive ecosystems worldwide and is well represented in tropical and subtropical zones. In Mexico, TDF is almost continuously distributed over extensive areas along the Pacific slope from Sonora to Chiapas [36], with no apparent geographic barriers to dispersal (except for contemporary fragmentation) among populations of terrestrial vertebrates, including birds. The Mesoamerican TDFs are recognized as terrestrial ecosystems with high levels of species richness, endemism and specialization [37,38]. However, the factors that drive this huge diversity are poorly understood. Despite their recognition as a biodiversity hotspot, TDFs are highly threatened by human impact and the actions undertaken for their conservation have been minimal to date [39,40]. In Mexico,

TDF is the second richest habitat for bird species, and the forests along the Pacific slope are home to several endemic bird species [41], most of which show subspecific variation (e.g. [42]). TDFs are characterized by marked seasonality, with a dry season from November to May in which most of the vegetation loses its leaves, and a rainy season from June to October where most of the rainfall occurs. Moreover, high variability in the environmental conditions have been reported (see description in methods) throughout the TDF distribution along the Mexican Pacific slope, including the temperature and precipitation regimes (Fig 1), as well as in the vegetation structure and composition [43–45]. This high variability could expose populations to different selective (environmental) pressures that might explain phenotypic divergence within some species.

Most studies of bird phenotypic variation have been conducted in the context of species distributed along obvious environmental gradients (e.g., [46–52]). However, the effects of environment and geographic isolation on the phenotypic variation of species that inhabit single and continuously distributed ecosystems along latitudinal gradients of environmental conditions have been poorly explored (but see [21,53]). Studies of phenotypic differentiation accompanied by niche conservatism (i.e. retention of ancestral environmental niche) and niche divergence tests (i.e. adaptation to different ecological conditions) among subspecies have been helpful to identify the processes that can lead to lineage differentiation [54]. Specifically, such multi-perspective evidence could help to identify the role of ecological speciation, in which divergent natural selection promotes diversification through adaptation to new environments [55].

The Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*, Aves: Troglodytidae) is an endemic bird from Mexico [56], closely associated with TDFs along the Pacific slope. To date, three subspecies have been described along the distribution of the species based on subtle differences in melanin-based plumage coloration [57–59]. These subspecies inhabit areas within the TDF that differ significantly in terms of environmental conditions (see description in methods), which could subject their populations to divergent selective pressures. In this study, we tested the ecogeographic Allen's, Bergmann's, Gloger's and Bogert's rules, as well as other suggested environmental factors, to explain phenotypic variation in the Sinaloa Wren along its distribution, and quantified the relative role of environment and geography in shaping phenotypic variation. Specifically, we: 1) characterized phenotypic variation (morphology and plumage reflectance) between sexes and among subspecies, 2) analyzed the relationship between phenotypic and environmental variation in the context of classic ecogeographic rules and quantified the relative roles of environment and geography, as well as their interaction, in shaping phenotypic variation, and 3) tested for niche conservatism among subspecies. According to Bergmann's rule, we expected larger bodies (using wing chord as a proxy for body size) to be related to colder climates, while with Allen's rule, we expected shorter tarsi and culmens in colder climates. Since other factors have been proposed to influence morphological differences, we expected longer wings and tails to prevail in more open habitats and at higher elevations. According to Gloger's rule, we expected darker plumages to be related to humid and warmer conditions. In contrast, according to Bogert's rule, we expected darker colors in colder climates, based on the thermoregulatory advantages that darker plumages provide by absorbing more solar radiation. We also expected darker plumage colorations in places with more UV-B radiation as a mechanism of UV protection. Finally, we expected niche divergence between subspecies as a potential adaptation to different ecological conditions. Our results will help to better understand the mechanisms that promote phenotypic variation of species that inhabit this biodiverse ecosystem that is home to many endemic birds, but is also one of the most threatened habitats worldwide as a result of human perturbation.

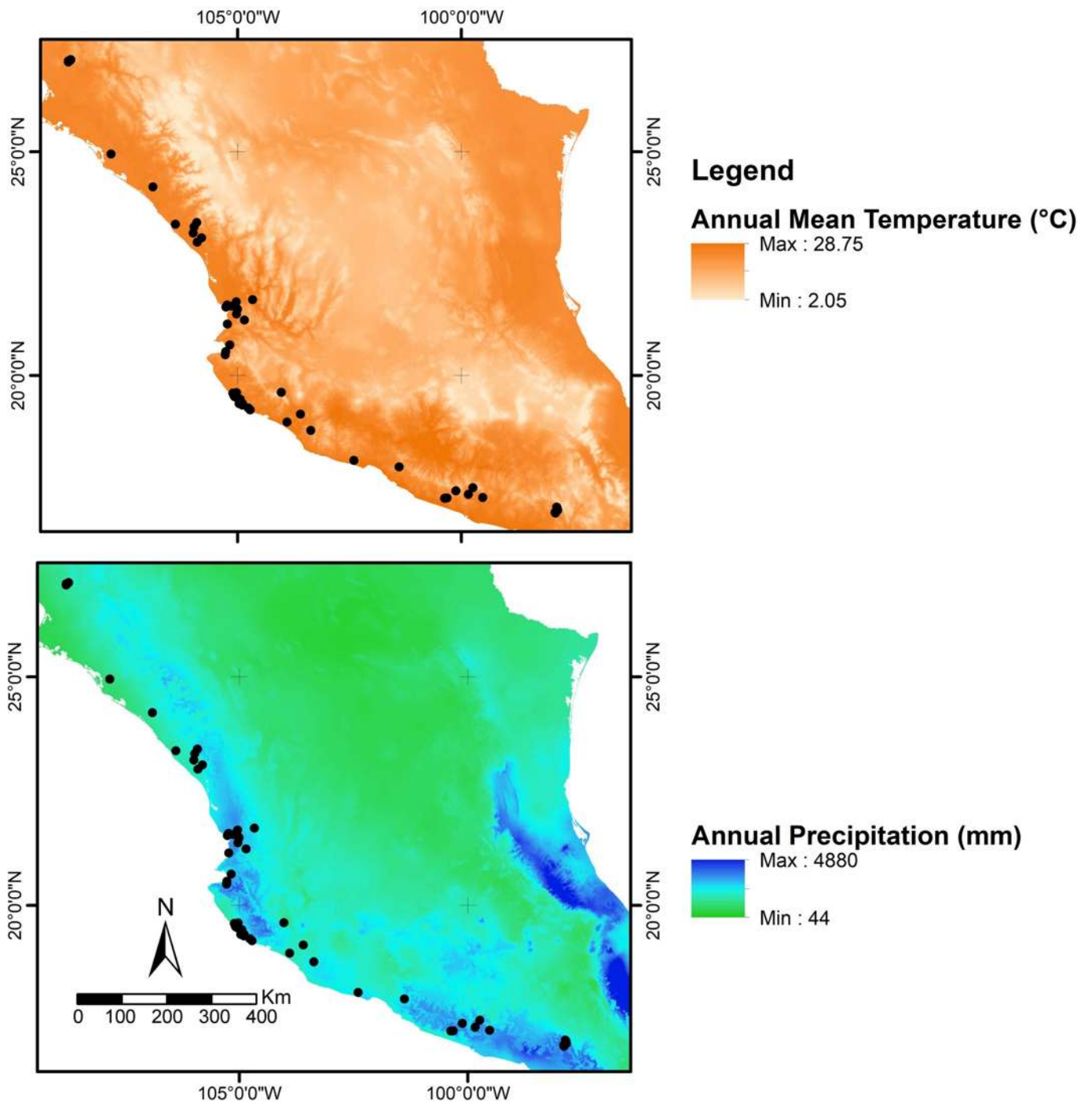


Fig 1. Environmental variation across the species distribution. BIOCLIM variables retrieved from WorldClim and projected into maps, showing (A) annual mean temperature (bio1) and (B) annual precipitation (bio12) across sampling localities of the Sinaloa Wren (black dots).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.g001>

Methods

Study species

The Sinaloa Wren is an insectivorous medium-sized wren that mainly inhabits the understory of the TDF [56,60]. It is endemic to western Mexico, and its distribution spans from Sonora

and south Chihuahua to western Oaxaca along the Pacific slope, and through the Río Balsas drainage system (S1 Fig, [61]), covering a linear distance of approximately 2,000 km. The sexes are similar, but the males are slightly larger and heavier than females [62]. Three subspecies are currently recognized in the literature (Figs 3B and S1): the nominate *Thryophilus sinaloa sinaloa* [57] occurs from central Sonora and western Durango south to Michoacán, *Thryophilus sinaloa cinereus* [58] is distributed in northwest Mexico, from northeastern Sonora and western Chihuahua to northern Sinaloa, and *Thryophilus sinaloa russeus* [59] occurs in Guerrero and western Oaxaca. These subspecies have been described based on subtle differences in melanin-based plumage coloration and color intensity. Phillips [63] suggested an undescribed subspecies in the coastal regions from western Nayarit to Colima or Michoacán, based on color differences, particularly on the flanks.

Study sites

In Mexico, TDFs are developed between 0 and 1900 m asl, most frequently below 1500 m asl [45]. The most distinctive characteristic of these forests is their marked seasonality, presenting a severe dry season of five to eight consecutive months (generally between November and May), depending on the geographic location and a rainy season (generally between June to October) during which most of the rainfall occurs [45]. Annual mean temperature ranges from 23.1°C during the dry season to 26.4°C during the rainy season (Fig 1). Annual precipitation ranges from 12 mm/yr during the dry season to 758 mm/yr during the rainy season (Fig 1). One adaptation of the vegetation to this marked seasonality is the senescence of leaves during the dry season and production of new foliage during the rainy season [64], producing a dramatic change of appearance between these two seasons.

The northern extreme of the distribution of the Sinaloa Wren at the Pacific Mexican coast, where the subspecies *cinereus* is distributed, shows a semiarid climate with the driest conditions ([65]; lower annual precipitation, 690 mm/yr; lower evapotranspiration during the dry season, 1.76 mm), lower UV-B radiation, 4,498 J/m²/day⁻¹ and intermediate temperature (23.8°C). In this area, the tree cover is 30%, and the trees lose almost all their leaves, which is reflected in low values of the Normalized Difference Vegetation Index (NDVI = 0.36, in a scale from 0 to 1, where 1 is greener) during the dry season, resembling an inhospitable habitat with “dead” vegetation where the understory has an intricate pattern due to the presence of climbing vines. The center of the distribution, where the subspecies *sinaloa* is distributed, presents intermediate conditions (1,084 mm/yr of precipitation, 16.80 mm of evapotranspiration during the dry season, 4,983 J/m²/day of UV-B radiation), except for temperature, which presents the highest annual mean values (24.9°C). Although the trees also lose almost all their leaves in this area, values of NDVI during the dry season are also intermediate (0.58), as is the tree cover (44%). In contrast, the southern extreme of the distribution of the Sinaloa Wren, where the *russeus* subspecies is distributed, presents the most humid conditions ([65]; 1,500 mm/yr of precipitation, 24.73 mm of evapotranspiration during the dry season), the highest UV-B radiation (5,202 J/m²/day), and intermediate temperature (23.73°C). The TDFs are denser in these areas, hosting many spiny plants [66] and showing a tree cover of 45%. The vegetation does not lose its entire foliage during the dry season, and presents the highest values of NDVI (0.67).

In contrast to the dry season, the TDFs are more homogeneous during the rainy season. Values of NDVI during the rainy season were higher and almost invariable across the distribution of the species (*cinereus* = 0.84, *sinaloa* = 0.82 and *russeus* = 0.82), reflecting the production of new foliage across the entire distribution of the TDFs. Mean evapotranspiration during the rainy season is also similar, at 45, 35 and 33 mm in the *cinereus*, *sinaloa* and *russeus* collecting sites, respectively.

Field procedures and molecular sexing

We captured 147 individuals of *Thryophilus sinaloa* from 34 localities (S1 Table), covering most of the distributional range of the species. From each bird captured in mist-nets (12 x 2.5 m x 36 mm), we collected three drops of blood by venipuncture of the sub-brachial vein and stored these samples in Queen's lysis buffer at -20°C in the laboratory for sex determination. We measured five morphological traits: 1) wing chord (from the carpal joint to the tip of the longest unflattened primary); 2) tail length (from the insertion of the two central rectrices to the tip of the longest rectrix); 3) total head length (from the occipital crest to the tip of the bill); 4) exposed culmen (from the feather base above the nostrils to the tip of the bill); and 5) tarsus length (from the inner bend of the tibiotarsal articulation to the base of the toes). Wing and tail measurements were taken with a wing ruler to the nearest 1 mm, while the rest of the measurements were taken with a dial caliper accurate to 0.1 mm. Finally, we collected five feathers from the back, flanks and head (crown) and the two outer rectrices for reflectance measurements. Since the back and flanks patches cover greater plumage areas, we took the interscapular region as a reference to collect back feathers and the lateral body apterium zone to collect flank feathers. Furthermore, we obtained morphological measurements (n = 35 males and 20 females) from ornithological collections: the Colección Nacional de Aves (IBUNAM), Colección Ornitológica (UMSNH) and Colección Regional de Aves (UAGro). We also obtained feather samples (n = 15) donated from IBUNAM and UAGro, and one outer rectrix collected from 5 individuals from Oaxaca.

Since there is no formal criterion with which to distinguish males and females in the Sinaloa Wren, we performed sex determination of the captured individuals using molecular techniques (polymerase chain reaction, PCR), following the method outlined in Çakmak et al. [67]. Briefly, the highly conserved chromodomain helicase DNA binding gene (CHD), located on the W chromosome and its homologous on the Z chromosome, is amplified using specific primers (P2/P8) [68]. This amplification results in distinct banding patterns on agarose gel as a result of length differences in intronic regions within this gene [67,68]. Given that male birds are homogametic (ZZ), while females birds are heterogametic (ZW), PCR products with double bands were scored as females, while PCR products with a single band were scored as males. Band patterns were confirmed with 23 tissue samples donated by the Burke Museum from individuals previously sexed by gonads description. DNA extraction was performed using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen®), following the manufacturer's protocol, adding 80–100µL of blood, in a final elution volume of 50µL.

All sampling activities adhered to the guidelines on the use of wild birds in research formulated by the Ornithological Council, and had the permission of Mexico's Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Vida Silvestre (permit numbers: SGPA/DGVS/10390/17 and SGPA/DGVS/05374/19).

Plumage reflectance analyses

To characterize variation in plumage reflectance between sexes and subspecies, a total of 124 adult specimens of *T. sinaloa* were included in the analyses. Reflectance measurements were taken from one feather collected from each of four plumage patches: crown, back, flanks and tail. Five feathers from each body patch were overlapped in the same direction and brushed to ensure that the barbules were in the same position with the exception of tail rectrices. Since the rectrices of the Sinaloa Wren have a brown and black banded pattern, reflectance measurements were taken from a single feather at the 3rd or 4th brown band. Each feather was measured at three different points covering most of the feather area. We used an RPH-1 reflection probe

holder (Ocean Optics, Dunedin, FL) where the optic fiber was placed at 90°. For twenty-four specimens, we compared reflectance curve measurements taken from the collected feathers and directly from each body part of the specimens. Collected feathers preserved the original reflectance curve as found in the specimens. Reflectance measurements were taken with an Ocean Optics Jaz-El200 spectrophotometer (Ocean Optics), coupled with a Premium QR600-7-SR125F optic fiber, collecting values at wavelengths of between 300 and 700 nm for all feathers. Measurements were standardized to a WS-1 diffuse white standard (Ocean Optics). We coded raw data files of measured reflectance spectra by subspecies and processed these in the R package *pavo* ver. 2.6.1 [69]. The values of three spectra from each measured feather were averaged using the *aggspec* function. Electrical noise from reflectance spectra was removed using the *opt* = “smooth” (span = 0.35) argument. To correct negative values from the raw spectral data, we used the *fixneg* = “admin” argument. Both of these processes used the *prospec* function.

Reflectance data were analyzed using three different approaches: 1) quantification of plumage coloration in the avian ultraviolet-visible wavelength range (hereafter, avian perspective; [70]), 2) quantification of plumage color in the human visible UV wavelength range (hereafter, colorimetric variables; [71]), and 3) measurement of plumage color discrimination in the avian visual space using a receptor noise model (hereafter, receptor noise model). To quantify coloration from the avian visual perspective, we plotted each plumage patch in the tetrahedral color space [70], which represents the possible avian color space based on relative stimulations of the four retinal cone types. Raw reflectance spectra were processed using the average ultraviolet sensitive avian system = “avg.uv”, and the “ideal” illuminant arguments of the *vismodel* function were used to determine the relative stimulation of the four avian cones and the calculation of quantum catches [70,72]. The cone stimulation values (u, s, m, l) were converted into a vector of three angles, which allows location of the points in the tetrahedral color space [70]. Three standard color variables were calculated from the avian tetrachromatic color space (avian perspective): hue theta (*h theta*), r vector (*r vec*), and maximum chroma (*r max*). Hue theta is the angle in radians that quantifies colors detected by the long-, medium-, and short-wavelength-sensitive cones [70]. Hue theta values ranged from $-\pi$ to $+\pi$; in our data set, the values ranged approximately from 0 to -0.2 , where values near -0.2 indicate red-shifted colors and values near 0 denote yellow-shifted colors [73]. The chroma or saturation of a color is given by the magnitude of *r*, which describes how a color differs from achromatic white/black [70]. The r vector (*r vec*) measures saturation or distance from the achromatic center, and maximum chroma (*r max*) measures the maximum r vector achievable for the hue of the color [70]. Higher values of *r vec* and *r max* indicate more saturated colors. We also obtained two colorimetric variables: mean brightness (*B2*: average reflectance over all wavelengths) and chroma (*S8*: relative difference between max and min reflectance considering the average brightness of the spectrum; [71]). Using the five color variables (hue theta, saturation, maximum chroma, brightness and chroma), we first compared individuals by sex within each subspecies and, after verifying that they did not differ statistically with a Wilcoxon-Mann-Whitney test (results not shown), we pooled the sexes together in subsequent analyses.

Finally, to assess whether birds could discriminate colors within plumage patches among subspecies, we measured plumage color discrimination in the avian space using a receptor noise model [74]. This model calculates the chromatic distance in the avian color space (ΔS) between the reflectance of two plumages. The ΔS represents a threshold of discrimination between two colors and is expressed in terms of JNDs (just noticeable differences). A theoretical threshold of 1.0 JND represents the distance in the avian color space at which two colorful traits are quite chromatically distinct. Values < 1.0 JND indicate plumage patches that are probably indistinguishable, while values > 1.0 JND indicate plumage regions that are chromatically discernible between subspecies [74].

Environmental data collection

We used 19 BIOCLIM variables from the WorldClim data base [75], which express mean, seasonal, and extreme conditions of temperature and precipitation. Climatic variables were obtained for each locality from which morphological and plumage reflectance data were obtained. Additionally, we included elevation data gathered from SRTM (Shuttle Radar Topography Mission, 90 m resolution; DOI number: /10.5066/F7PR7TFT), retrieved by *raster* package [76]. We also included three vegetation variables from the Terra Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer (MODIS): percentage tree cover TREE (MOD44B product: [77]), total evapotranspiration ET (MOD16A2 product: [78]) and Normalized Difference Vegetation Index NDVI (MOD13Q1 product: [79]), downloaded with the aid of *MODISTools* R package [80]. Since TDFs are characterized by a marked seasonality, we chose data for NDVI and ET corresponding to the peak of the dry (April, hereafter, ET_dry and NDVI_dry) and rainy (August, hereafter, ET_rain and NDVI_rain) seasons, based on precipitation data reported in Trejo-Vázquez [65]. Finally, we obtained annual mean ultraviolet-B radiation (UV-B, wavelengths of 280–315 nm) from the gIUV database [81] for use in the analyses.

Statistical analyses

Phenotypic variation. We performed Wilcoxon-Mann-Whitney tests [82] to document morphology and plumage coloration differences between sexes, using sex as fixed factor and each morphological trait measured, as well as each reflectance measure for each plumage patch, as dependent variables. To document morphology and plumage coloration differences between subspecies, we performed Kruskal-Wallis tests [83] using subspecies as fixed factors and morphology and reflectance data as dependent variables. Conover-Iman tests for multiple comparisons [84] were performed using the *conover.test* package. For both analyses, Bonferroni corrections were applied in order to correct for multiple simultaneous comparisons [85]. These analyses were performed in Rstudio ver. 1.2.1335 (R Studio Team 2016).

Color discrimination in the avian visual space (receptor noise model) was performed between pairs of subspecies for each of the four plumage patches separately. Following Maia and White [86], we estimated the geometric average of the ΔS values for all comparisons and calculated 95% confidence intervals (CI) performing a bootstrap using the function *bootcoldist* in *pavo*.

Relationship between phenotypic variation and environmental variables. To test the specific hypotheses about the relationship between environmental and phenotypic variation along the Sinaloa Wren distribution in the context of ecogeographic rules, as well as other factors that have been proposed to influence morphological variation (see [Introduction](#)), we performed a series of Generalized Linear Mixed-Effect Models (GLMM) with a Gaussian distribution and logit function. We constructed models including tree cover, elevation, latitude, ET_dry, ET_rain, annual mean temperature, annual precipitation and sex as fixed factors, with sampling site as the random effect, data collection method (field or museum) as a covariable, and wing chord (as a proxy of body size) for Bergmann's, tarsus and culmen for Allen's and tails (along with the other traits to test for alternative hypothesis) as response variables. To test for Gloger's and Bogert's rules of color variation, we constructed the model using locality-specific environmental variables related to temperature, precipitation, humidity (annual mean temperature, annual precipitation, ET_dry, ET_rain), greenness of vegetation (NDVI_dry, NDVI_rain) as fixed factors and mean brightness (*B2*) for each plumage patch as response variables. In order to account for the non-independence of individual measurements within a locality, we used sampling site as the random effect. Non-significant explanatory variables in the full model were backward eliminated to simplify the model. To test for the specific

hypothesis of UV-B radiation in shaping patterns of melanin-based plumages, we constructed the model using locality-specific UV-B values as fixed factor, B_2 for each plumage patch as response variable and sampling site as the random effect. Analyses were carried out in Rstudio ver. 1.2.1335 (R Studio Team 2016).

Redundancy analysis and variance partitioning. To explain the proportion of the phenotypic variation (morphology and plumage coloration from the avian perspective) explained by environment, geography and a joint effect, we performed redundancy analyses (RDA), a constrained technique that is a multivariate analog of a simple linear regression [87]. Studies have demonstrated that RDA has greater power than the Mantel test in terms of detecting relationships in autocorrelated data [88,89]. We first calculated variance inflation factors (VIFs) for our explanatory variables in order to avoid collinearity, using the function *vif.cca* [90]. After excluding variables with a VIF greater than 10, we performed a stepwise model selection using the function *ordistep* in *vegan* [91] to identify the variables that best explained phenotypic variation, followed by a significance test *anova.cca* with 10,000 permutations in both directions. The final environmental uncorrelated variables (tree cover, NDVI_r, NDVI_d, elevation, mean diurnal range (Bio2), mean temperature of driest quarter (Bio9), precipitation of wettest month (Bio13), precipitation of driest month (Bio14), precipitation seasonality (Bio15), precipitation of warmest quarter (Bio18), precipitation of coldest quarter (Bio19), ET_d, and ET_r) were used as explanatory variables in a series of redundancy (RDA) and partial redundancy (pRDAs) analyses. With RDA, it is possible to compute the variance between two sets of variables (e.g. morphology and environment) while controlling for the effects of a third set of covariables (e.g. geography). With pRDA, the independent and joint effects of multiple sets of predictor variables can be separated (e.g. [8,9]) and the proportion of phenotypic variance explained by the pure effects of environment, geography, and the interaction between these, can be quantified [92]. To accomplish this, three separated RDA were performed: i) a full RDA model with environmental and geographic variables (geographic coordinates) as explanatory variables; ii) a partial RDA (pRDA1) controlling for the effect of geography (i.e. a purely environmental model); and iii) a partial RDA (pRDA2) controlling for the effect of the environment (i.e. a purely geographic model). The significance of each RDA was estimated with 1000 permutations. The adjusted coefficient of multiple determination (R^2_{adj}) was calculated for all models [93]. Environmental and phenotypic data were log transformed and then centered and standardized prior to RDA analysis. Explanatory variables also included spatial variables defined using the principal coordinates of neighborhood matrices (PCNM), which were calculated from the geographic coordinates in decimal degrees [94]. The bases of phenotypic data (morphology and color from the avian perspective) were tested independently. These analyses were carried out in R using the *vegan* package [91].

Niche conservatism tests. We used occurrence records for all of the distribution of *T. sinaloa* from the Global Biodiversity Information Facility (GBIF 2020), accessed from R via *rgbif* (<https://github.com/ropensci/rgbif>; taxon key: 7341103; <https://doi.org/10.15468/dl.z5r355>). Data cleaning was performed in RStudio and included filters of: records without georeference information (*dplyr*: [95]; *CoordinateCleaner*: [96]), duplicates in a radius of 0.01666 equivalent to 2 km² (*nichetoolbox*: [97]), records that fell outside of an altitudinal range from 0–2000 m asl (*raster*: [76]), records that fell outside the Neotropical regions where the species occurs (provinces: Sierra Madre Occidental, Trans-Mexican Volcanic Belt, Sierra Madre del Sur, Pacific Lowlands, Balsas Basin; [98,99]), since these could be presumptive errors. Following data cleaning we obtained a total of 909 unique occurrence records.

We estimated four indices, using current bioclimatic variables from the WorldClim database ([75]), following Cortés-Ramírez et al. [100]. The indices were obtained by PCA, retaining the first principal component for each datum from the occurrence records (S1 Fig). Indices

were calculated from the following variables: **1) Temperature variation** (BIO1: annual mean temperature, BIO5: max temperature of warmest month, BIO6: min temperature of coldest month, BIO8: mean temperature of wettest quarter, BIO9: mean temperature of driest quarter, BIO10: mean temperature of warmest quarter, BIO11: mean temperature of coldest quarter), **2) Temperature range/seasonality** (BIO2: mean diurnal range, BIO3: isothermality, BIO4: temperature seasonality, BIO7: temperature annual range), **3) Variation of precipitation in the rainy season** (BIO12: annual precipitation, BIO13: precipitation of wettest month, BIO16: precipitation of wettest quarter, BIO18: precipitation of warmest quarter), and **4) Variation of precipitation in dry season** (BIO14: precipitation of driest month, BIO15: precipitation seasonality, BIO17: precipitation of driest quarter, BIO19: precipitation of coldest quarter).

To understand the role of ecological conditions in niche conservatism, we compared niche overlap between subspecies (*cinereus*, *sinaloa*, *russeus*) using an ordination approach, applying the Schoener's D index [101], as well as equivalency and similarity tests [102]. As described in Broennimann [103], this approach was performed in three steps: 1) calculating the density of occurrences records and environmental factors (first PC of four previous indices) along the environmental axes of a multivariate analysis, 2) measuring niche overlap along the gradient of this multivariate analysis, 3) performing statistical tests of equivalency and similarity to compare the empirical observed distributions of Schoener's D to 100 simulated values [102,103]. These analyses were implemented using the R package *ecospat* [104] which allows the performance of niche equivalency and similarity tests assessing the significance of a measured niche difference against null model niches taken randomly within a given background area [104]. We defined our study area (background) based on the known geographic distribution of *T. sinaloa* (accessible area for the species = M). The accessible area calibration was performed using the *ellipsenm* R package [105], defining a concave polygon delimiting occurrence points with a buffer distance of 75 km.

Niche overlap metrics range from 0 (no overlap) to 1 (complete overlap). Following Röder and Engler [106], the Schoener's D results suggest: 0–0.2 scores (no or limited overlap), 0.2–0.4 (low overlap), 0.4–0.6 (moderate overlap), and 0.6–0.8 (high overlap). Niche equivalency test determine whether the niches occupied by a pair of subspecies are equivalent. If the observed value of D falls within the density of 95% of simulated values, the null hypothesis of niche equivalency cannot be rejected. The similarity test addresses whether the environmental niche occupied by one subspecies is more similar to that of the other subspecies than would be expected by chance. If the observed overlap value is greater than 90% of the simulated values, the niches occupied by both subspecies are more similar than would be expected by chance. Hypotheses of niche conservatism based on niche similarity tests are accepted when the observed D values for niche overlap differ significantly ($P < 0.05$) from simulated overlap values [103]. All analyses were performed in Rstudio ver. 1.2.1335 (R Studio Team 2016).

Results

Morphology

All samples collected in the field were successfully and correctly sexed by molecular techniques. The band pattern we obtained was consistent with that reported in Griffiths et al. [68]; i.e., double bands for females and a single band for males. The correct sex assignment was consistent with the gonad descriptions of tissues samples from museum specimens. In general, the three subspecies showed males to be larger than females in all of the measured traits (S2 Table). Considering both the field and museum measurements, all between-sex comparisons were statistically significant except for tail length, head and exposed culmen in *cinereus* subspecies, and tarsus as well as exposed culmen in *russeus*, after Bonferroni corrections (S2 Table).

Considering the field measurements only, the exposed culmen was also not statistically different in the *sinaloa* subspecies (S2 Table). Kruskal-Wallis comparisons between males among subspecies showed significant differences in all studied traits after Bonferroni corrections, considering both museum and field measurements as well as field measurements only (Table 1 and Fig 2). Conover-Iman post hoc tests showed *russeus* as having the longest wings and longer tails than *sinaloa*, *cinereus* having larger heads than *sinaloa*, as well as a longer tarsus and culmen. In females, significant differences among subspecies were only detected for tail length and head (Table 1), considering both museum and field measurements after Bonferroni corrections. Conover-Iman post-hoc tests showed *cinereus* as having larger heads than *sinaloa* and *russeus*, and *sinaloa* having shorter tails than *cinereus* and *russeus*. Considering field measurements only, tail length was the only trait that maintained significant differences (Table 1 and Fig 2).

Plumage reflectance

No significant differences were detected using the Wilcoxon-Mann-Whitney tests to compare intersexual variation in the variables collected with reflectance spectrometry (hue, maximum chroma, saturation, brightness and chroma; results not shown), therefore the sexes were pooled together in subsequent analyses. From the avian perspective, we found significant differences among subspecies in all color variables for all plumage patches, except for hue on the head and flanks (Table 2). The *cinereus* and *sinaloa* subspecies showed back plumages with higher hue values, or more yellow-shifted color than *russeus* that showed more red-shifted color (Fig 3). However, the opposite pattern was found in the tail (Fig 3). Differences in maximum chroma among subspecies showed the same pattern in all of the studied plumage patches (Table 2 and Fig 3). The *cinereus* subspecies showed a dull plumage, while that of *russeus* was more vivid or intense (i.e. more chromatic) and *sinaloa* presented intermediated values (Fig 3). Finally, *russeus* showed more saturated plumage (higher values of *r vec*) while that of *cinereus* was less saturated (Fig 3). From the colorimetric variables, we found significant differences among subspecies when comparing mean brightness (*B2*) and chroma (*S8*) in all studied

Table 1. Intrasexual comparison of morphological traits among subspecies (*cinereus*, *sinaloa* and *russeus*).

	Museum and Field measurements			Field measurements		
	n = 155			n = 120		
<i>Males</i>	X ²	df	P-value	X ²	df	P-value
Wing chord	38.10	2	<0.001	36.44	2	<0.001
Tail length	36.15	2	<0.001	38.07	2	<0.001
Head	23.80	2	<0.001	24.45	2	<0.001
Tarsus length	24.58	2	<0.001	33.14	2	<0.001
Exposed culmen	22.46	2	<0.001	20.11	2	<0.001
<i>Females</i>	n = 47			n = 27		
Wing chord	6.80	2	ns	2.23	2	ns
Tail length	24.27	2	<0.001	15.2	2	<0.01
Head	12.78	2	<0.01	8.76	2	ns
Tarsus length	2.20	2	ns	2.10	2	ns
Exposed culmen	7.14	2	ns	4.65	2	ns

Comparisons were performed considering museum and field measurements together and only field measurements. Significant comparisons between subspecies are highlighted in bold after Bonferroni corrections. ns = non-significant comparisons.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.t001>

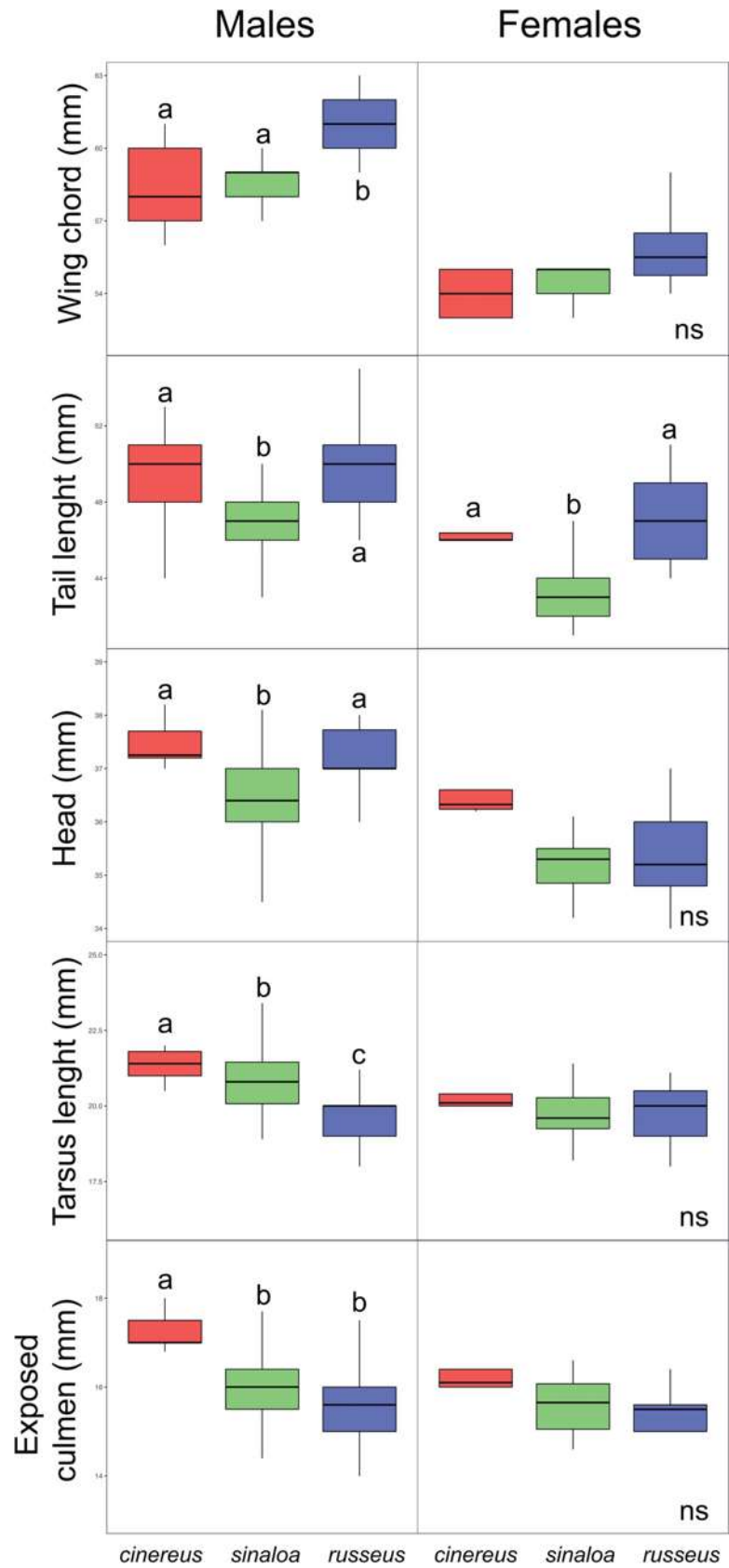


Fig 2. Boxplots from morphological traits within sexes among subspecies of *Thryophilus sinaloa* from field measurements. Boxplots show the percentiles of 25%, 50% (median), and 75%, upper and lower whisker show quartiles of 25%. Significant differences among subspecies are shown with different letters.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.g002>

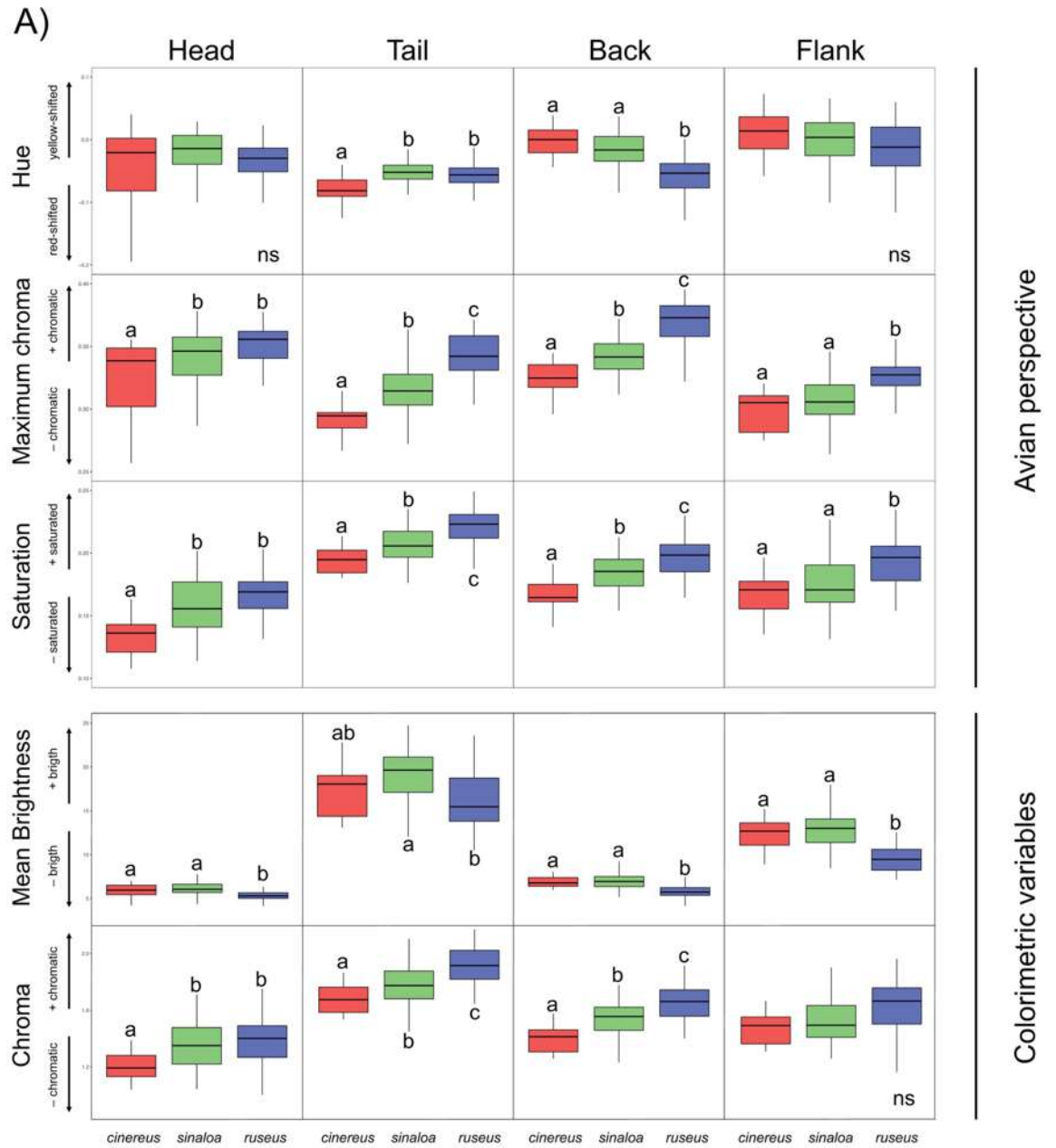
patches, except for chroma in flanks (Figs 3 and S2). The *cinereus* and *sinaloa* subspecies showed brighter plumage compared to *russeus*, while *sinaloa* and *russeus* presented more chromatic plumages (i.e. more intense or vivid).

Discriminant comparisons in plumage color among pairs of subspecies showed a general pattern of color discrimination in all of the studied patches (i.e. $\Delta S < 1$ JND, S3 Fig), except for flanks between *cinereus* and *sinaloa*, and for head between *russeus* and *sinaloa* subspecies (S3 Fig). Greater values of color discrimination were recorded between subspecies at the extremes of the distributional range (*cinereus* and *russeus*), with tail color patches being the most discernible among these subspecies (i.e. $\Delta S = 3.7$ JND). Similar JND mean values were recorded for *cinereus* vs. *sinaloa* and for *russeus* vs. *sinaloa* comparisons. For the *sinaloa* and *russeus* subspecies, all plumage patches were discernible between subspecies, apart from the head plumages (S3 Fig).

Environment and geography explaining phenotypic variation

The GLMM simplified models showed a significant and positive relationship of elevation, annual mean temperature and annual precipitation with wing chord and tail length (i.e. longer wings and tails at higher elevations, and in warmer and wetter areas, Table 3), as well as between latitude and tail length. A positive relationship of tree cover and latitude with culmen length was also found (i.e. longer culmen in more dense habitats and at higher latitudes), while for tarsus length, a positive and significant association was found with latitude (i.e. longer tarsus at higher latitudes, Table 3). The effect of sex was significant in all previous models. For plumage, we found a positive relationship between annual mean temperature and plumage brightness on the back, flanks and tails (i.e. brighter plumages in warmer habitats; Table 3). Back and flank plumage brightness was negatively associated with annual precipitation and back and tail plumage was positively associated with evapotranspiration during dry the season (i.e. darker plumages in more humid conditions). Plumage brightness on the back and tails was positively associated with NDVI during the dry season (i.e. darker plumages in greener areas). Head plumage brightness was not shown in the simplified model, since none of the predictor variables were found to be significant. UV-B radiation was significantly and negatively associated with plumage brightness in heads (t value = -2.23, $P < 0.05$) and backs (t value = -2.5, $P < 0.05$) (i.e. darker head and back plumages at more UV-B radiation, S3 Table). Not significant association was found in flank and tail plumages brightness and UV-B (S3 Table). Full GLMMs are shown in S3 Table.

The full RDA model for the combined effect of geographic and environmental explanatory variables on phenotypic variation was significant for both morphology and color from the avian perspective (Table 4). The partial RDA (pRDA1) for the association between environmental variables (purely environment) and morphology controlling for the effect of geographic distance was statistically significant. The proportion of morphological variation explained by the environment (13%) was higher than that explained by geography (8%) (Table 4). The pure effect of environment and geography explaining plumage variation from the avian perspective was not significant. Most of the variation in both phenotypic groups of variables was explained by the joint effect of environment and geography (morphology: 79% and color from the avian perspective: 95%, Table 4). The most important environmental



B)



T. s. cinereus

T. s. sinaloa

T. s. ruseus

Fig 3. Plumage variation among subspecies. A. Boxplots of reflectance variables from the avian perspective (hue, maximum chroma and saturation) and colorimetric variables (mean brightness and chroma) among *Thryophilus sinaloa* subspecies. Boxplots show the percentiles of 25%, 50% (median), and 75%; upper and lower whisker show quartiles of 25%. Significant differences among subspecies are shown with different letters. B. Photographs showing dorsal plumage variation among subspecies of the Sinaloa Wren.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.g003>

variables that best explained phenotypic variation included different precipitation related variables, temperature, evapotranspiration, elevation and NDVI (S4 and S5 Tables and S4 Fig).

Full model and two partial analyses are shown: pRDA1 (effect of environmental variables while controlling for geographic distance) and pRDA2 (effect of geographic distance while controlling for environmental variation). Variance (inertia) and the proportion of total variance explained by each model (proportion) are indicated in each case. The proportion of variance explained by both geographic and environmental effects is also indicated (joint environment/geography).

Table 2. Comparison of plumage reflectance data between subspecies of the Sinaloa Wren from the avian perspective and from colorimetric variables.

	χ^2	<i>df</i>	<i>P</i> -value
Avian perspective			
Hue (<i>hue theta</i>)			
Head	5.64	2	ns
Tail	15.76	2	<0.001
Back	41.48	2	<0.001
Flank	2.74	2	ns
Maximum chroma (<i>r max</i>)			
Head	14.35	2	<0.001
Tail	58.59	2	<0.001
Back	44.47	2	<0.001
Flank	28.74	2	<0.001
Saturation (<i>r vec</i>)			
Head	19.12	2	<0.001
Tail	36.97	2	<0.001
Back	35.20	2	<0.001
Flank	17.53	2	<0.001
Colorimetric variables			
Mean Brightness (<i>B2</i>)			
Head	24.97	2	<0.001
Tail	21.66	2	<0.001
Back	33.27	2	<0.001
Flank	5.35	2	<0.001
Chroma (<i>S8</i>)			
Head	14.51	2	<0.001
Tail	35.51	2	<0.001
Back	36.24	2	<0.001
Flank	13.63	2	ns

Significant comparisons are highlighted in bold after Bonferroni corrections.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.t002>

Table 3. Mixed effects models over phenotypic traits of *Thryophilus sinaloa*.

	Estimate	Std. Error	t value
Morphology			
Wing chord			
(Intercept)	4.13e+01	5.60e+00	7.36
Elevation	2.65e-03	7.66e-04	3.46***
Annual mean temperature	4.35e-01	2.18e-01	1.99*
Annual precipitation	1.36e-03	6.20e-04	2.19*
Sex	4.43e+00	3.10e-01	14.27***
Tail length			
(Intercept)	3.46	12.1919	0.284
Elevation	0.005	0.0013	4.149***
Annual mean temperature	1.05	0.3826	2.754**
Annual precipitation	0.003	0.0011	2.770**
Latitude	0.38	0.1288	2.961**
Sex	3.96	0.4100	9.662***
Exposed culmen			
(Intercept)	12.30	1.0718	11.484
Tree cover	0.01	0.0059	1.692*
Latitude	0.10	0.0355	2.816**
Sex	0.67	0.1350	4.993***
Tarsus length			
(Intercept)	18.14	0.9016	20.128
Latitude	0.09	0.0430	2.240*
Sex	0.80	0.1651	4.855***
Plumage brightness			
Back			
(Intercept)	3.77	2.1984	1.715
Annual mean temperature	0.23	0.0934	2.481*
Annual precipitation	-0.001	0.0005	-2.221*
Evapotranspiration dry	0.05	0.0164	3.337***
NDVI dry season	-4.07	1.4181	-2.871**
Flank			
(Intercept)	3.35	5.9769	0.561
Annual mean temperature	0.47	0.2343	2.021*
Annual precipitation	-0.003	0.0014	-2.420*
Evapotranspiration dry	0.05	0.0385	1.475
Tail			
(Intercept)	-2.35	10.1941	-0.231
Annual mean temperature	1.21	0.4378	2.776**
Evapotranspiration dry	0.18	0.0807	2.277*
NDVI dry season	-19.90	6.7216	-2.961**

Variables kept in the final model after backward elimination are shown. *** Significant values < 0.001,

** < 0.01,

* < 0.05 are highlighted in bold.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.t003>

Table 4. Results of the redundancy analysis (RDA) for the association between phenotypic variation (morphology and color from the avian perspective), geographic and environmental variables for *Thryophilus sinaloa* populations.

	Inertia	Proportion	R^2_{adj}	P-value
Morphology				
Full model: geography and environment	5.00	1.00	0.20	0.001
Pure environment (pRDA1)	0.65	0.13	0.10	0.001
Pure geography (pRDA2)	0.40	0.08	0.05	0.001
Joint environment/geography	3.94	0.79	0.04	NA
Color from avian perspective				
Full model: geography and environment	11.41	1.00	0.21	0.001
Pure environment (pRDA1)	0.31	0.03	0.00	0.241
Pure geography (pRDA2)	0.26	0.02	1.00^{-05}	0.462
Joint environment/geography	10.84	0.95	0.21	NA

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.t004>

Niche comparison tests

Factor loading and proportions of variance for the first component of the climatic indices are summarized (S6 Table). According to our PCA analysis, based on density records and the environmental factors (first PC of four previous indices), the first two components explained 46.32% and 33.39% of variation, respectively, and were used to represent the environmental niche for each subspecies in a two-dimensional gradient. According to the niche overlap D values between the subspecies pairs comparisons, moderate niche overlap is suggested for *cinereus* vs. *sinaloa* ($D = 0.41321$), and no or limited overlap for *cinereus* vs. *russeus* ($D = 0.00096$), and for *sinaloa* vs. *russeus* ($D = 0.13629$; Fig 4A). The equivalency test based on comparison between observed D values and simulated values showed that the niches occupied by the *cinereus* and *sinaloa* subspecies are more equivalent than would be expected by chance (Fig 4B). The opposite pattern was observed in the equivalency test for the *cinereus* vs. *russeus* and *sinaloa* vs. *russeus* subspecies comparisons (Fig 4B). Niche conservatism, based on similarity tests, was accepted for the *cinereus* and *sinaloa* niche comparison in both directions (Fig 4C). No niche conservatism was detected in the *cinereus* vs. *russeus* and *sinaloa* vs. *russeus* comparisons in either directions (Fig 4C), suggesting niche divergence.

Discussion

Using an integrative approach, we studied phenotypic variation in the Sinaloa Wren along its distribution in the TDF of the Mexican Pacific slope, in the absence of evident geographic barriers. According to the three objectives of our study, our results showed: 1) that the subspecies of the Sinaloa Wren (*cinereus*, *sinaloa* and *russeus*) exhibited significant phenotypic differences in morphology and plumage coloration, 2) that ecogeographic rules partially support the relationship between phenotypic and environmental variation, that the combined effect of geography and environment explained the major proportion of all of the studied phenotypic variation and that environmental variables explained a slightly greater proportion of the morphological trait variation than geography alone, and 3) there was moderate niche overlap between subspecies of the north and center of the distribution (*cinereus* and *sinaloa*), suggesting niche conservatism, and no or limited overlap between *cinereus* and *sinaloa* (north and center of the distribution) against *russeus* (south of the distribution) subspecies, suggesting niche divergence. This evidence indicates that, even when the TDF is a relatively continuously distributed habitat, variation in environmental conditions is important for promoting and maintaining morphological differentiation between populations. For plumage coloration, the

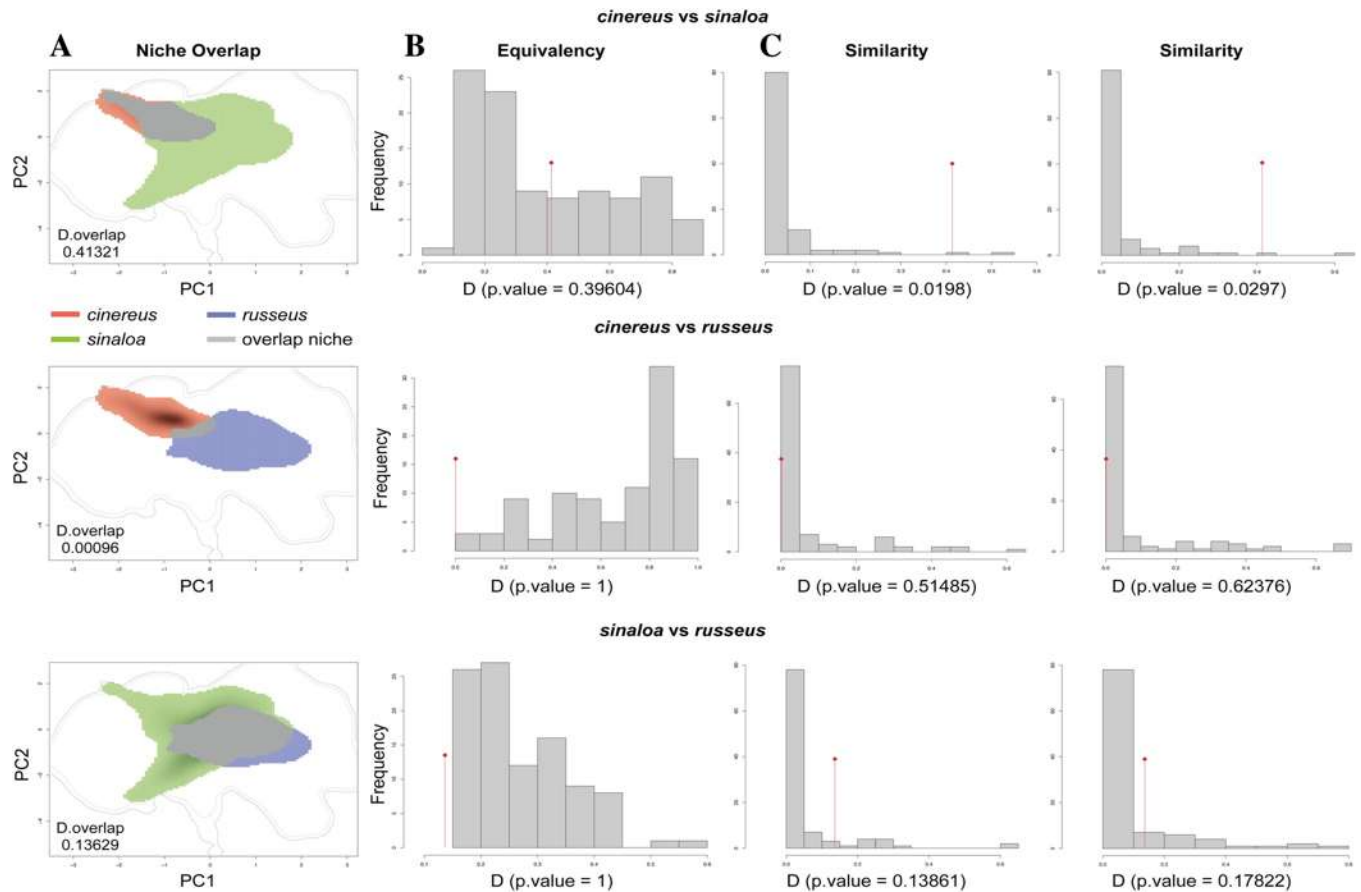


Fig 4. Graphical results of niche overlap, equivalence and similarity tests in environmental space for Sinaloa Wren. A. Graphical results of environmental niche overlap between pair of subspecies (gray areas) obtained from an ordination approach; B. Niche equivalence test between pair of subspecies, if the observed D values falls within the 95% density of simulated values, the null hypothesis of niche equivalency cannot be rejected; C. Similarity test between pair of subspecies in both directions, niche conservatism is accepted when the observed D values for niche overlap are significantly different ($P < 0.05$) from simulated values of overlap.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269860.g004>

combined effect of environment and geographic isolation could be the primary factor shaping color variation in the Sinaloa Wren.

Phenotypic variation

As previously recorded in Guallar et al. [107], our data support significant sexual dimorphism in the morphology of this species, with males generally presenting larger size than females in all of the traits studied within the subspecies. This sexual dimorphism was not maintained in the plumage coloration of the studied feather patches, since both sexes presented similar coloration from the avian perspective and according to the colorimetric variables. Despite finding significant differences in the morphological traits measured between subspecies, there was no clear direction in size differentiation. However, the differences among subspecies in specific morphological traits highlighted in our results suggest adaptation to local conditions (see below).

A general pattern was observed in plumage coloration among the subspecies that agreed with the subspecies descriptions. At the northern limit of distribution, the *cinereus* subspecies has yellowish, duller, brighter and less saturated plumages. In contrast, *russeus* at the southern

limit of distribution has reddish, darker and more vivid plumages (more saturated). Moreover, the chromatic differences based on avian discrimination modelling among the subspecies were greater than the theoretical discrimination in almost all of the studied patches, with the highest values found between subspecies at the extremes of the distribution (*cinereus* and *russeus*). This suggests that individuals from the three subspecies could discriminate members of the other subspecies through plumage coloration. Song differentiation was also detected among subspecies during fieldwork (A. M. and C. G. personal observations); however, specific studies of vocal variation as well as song recognition between subspecies are necessary in order to assess whether song plays a role as a premating mechanism of reproductive isolation (e.g. [108]).

Phenotypic variation patterns explained by the environment

Our analyses to examine the relative importance of environmental factors explaining morphology and plumage color differentiation suggested that the combined effect of geography and environment explained most of the phenotypic variance observed in the Sinaloa Wren. The pure effect of environment explained a slightly higher proportion of the phenotypic variance in morphology than geography alone. In contrast, only the combined effect of environment and geography were significant in explaining variation in plumage color; e.g., at the extremes of the latitudinal gradient, where the species is distributed along the TDF, contrasting environmental conditions are presented. According to our RDAs, variation in precipitation across the TDF rather than temperature is one of the most important factors explaining phenotypic variation. This is in accordance with the variation of annual mean precipitation, which ranges from 690 mm/yr in Sonora to 1460 mm/yr in Oaxaca, representing the two most extreme localities within the distribution of the Sinaloa Wren.

We found that longer wings were related to warmer areas, which contradicts Bergmann's rule, using wing chord as a proxy of body size. This rule explains that larger bodies are an advantage in more severe climates, since they irradiate less body heat per unit mass and therefore keep the individual warmer in colder climates [15]. Zink & Remsen [109] reviewed geographic body size variation in 92 North American bird species, indexed by wing length. From these, 42% of the studies agreed with Bergmann's rule, while 29% contradicted the rule's expectations, suggesting that the empirical basis for the existence of Bergmann's rule is weak, at least for North American birds.

According to Allen's rule, shorter appendages are expected to be related to colder climate conditions in order to reduce thermoregulatory costs. However, our data did not support this trend since no significant relationship was found between temperature and appendage length (tarsus or culmen). This ecogeographic rule has been largely ignored in the literature, and the results of the few studies that exist report patterns that only partially support the rule (e.g. [110] for culmen), and others that do not support it at all (e.g. [111]). Along the distribution of the Sinaloa Wren, differences in temperature are small and are probably insufficient to reflect these ecogeographic rules, since the organisms at this scale do not really experience harsh climates in terms of temperature.

Although our results did not support these rules, other morphological patterns could suggest ecological adaptations to specific habitat conditions. We found a significant positive relationship between wing and tail length and the parameters of elevation, annual mean temperature and annual precipitation. Longer wings and tails at higher altitudes have been suggested as an adaptation to increase flight efficiency and lift balance under more challenging air conditions, but proper studies are required in order to test this specific relationship. Individuals from the subspecies *russeus*, which had the longest wings and longer tails than *sinaloa*,

were generally captured at higher altitudes than the other subspecies. Differences in altitude among sampling sites where the subspecies were collected varied from 366 to 482 m asl in *cinereus*, from 22 to 1404 m asl in *sinaloa* and from 515 to 1598 m asl in *russeus*. Moreover, in the habitats where *russeus* was collected, the vegetation was greener (due to higher precipitation), and the understory of the region is not as dense or intricate as it is in the rest of the distribution of the species. This probably creates a more open habitat that influences longer wings in order to increase efficiency in direct flight [112]. On the other hand, the longer culmens found at the higher latitudes inhabited by *cinereus* could be associated with larger sized insect prey, but shorter wings could be associated with improved maneuverability in flight performance in a more intricate understory, a typical characteristic of the TDF in the driest areas, and a pattern expected in denser environments [112]. In addition, the longer tarsus found in *cinereus* in Sonora could be associated with the more intricate pattern of the understory that offers more perching options. Grant [113] has suggested that longer tarsi found in some island species may also be linked to greater ecological versatility.

Plumage brightness in most of the studied plumage patches was associated negatively with annual precipitation and NDVI and positively with evapotranspiration, which supports Gloger's rule. Evapotranspiration measures the loss of humidity from the land surface along with vegetation transpiration. Therefore, higher levels of evapotranspiration results in dryer habitats. Darker plumages in *russeus* were associated with more humid habitats at the southern limit of the distribution (annual mean precipitation = 1500 mm/yr on average), in contrast to the brighter plumages in *cinereus* at the northern limit of the distribution where the annual mean precipitation is less than half the values of the southern distribution (annual mean precipitation = 690 mm/yr on average; Fig 1). This part of the prediction of the Gloger's rule (darker plumage in rainy climates) has been widely supported, at both intraspecific [114,115] and interspecific [34,35,115,116] level. Furthermore, at continental scale (e.g. [31]), the relationship between humidity and darker coloration has been strongly supported in North American birds: from 52 studies, 96% display the trend predicted by Gloger's rule while only 4% do not [109]. However, plumage brightness was also positively associated with annual mean temperature, which contradicts Gloger's rule that predicts darker colorations in warmer climates. The prediction that animals should be darker in warmer areas has received little support [31]; indeed, the opposite pattern has generally been detected (e.g. [31,114,117]), supporting Bogert's rule that suggests the thermoregulatory advantages of this pattern. In the Sinaloa Wren, higher temperatures were found within the distribution of the *sinaloa* subspecies with brighter plumages, along with *cinereus*. These results agree with recent studies that found support for Gloger's rule exclusively related to precipitation but not to temperature, suggesting that this rule could be re-defined in terms of precipitation effects alone [31,117].

Several explanations have been proposed for Gloger's rule. It has been suggested that darker plumages increase resistance against feather degrading bacteria [118], since the increased melanization acts to make feathers more resistant to these bacteria, or confers a thermoregulatory advantage depending on the degree of pigmentation [119]. However, the association of darker plumages with humidity has also been suggested to be a manifestation of background matching to reduce detectability, while humidity per se has little direct influence [109,120,121]. Endler [121] states that animals inhabiting dark and closed environments should be darker compared to those inhabiting open areas with higher ambient light, a supported explanation to enhance crypsis in birds. This pattern is consistent with the so-called complex version of Gloger's rule which predicts that in warm/humid habitats animals tend to be gray or black since eumelanins prevail, while in warm/dry habitats animals tend to be brown or rufous since pheomelanins prevail (e.g. [116,117]). In the Sinaloa wren, the habitat of the *russeus* subspecies is found at higher altitudes in a transition zone between the TDF and pine-oak forest, in which

the trees do not lose all of their foliage, and therefore the evergreen vegetation remains green during the dry season (NDVI dry = 0.67), which would be more similar to a shaded forest condition, compared to the rest of the distribution of the species (NDVI dry for *cinereus* = 0.36 and for *sinaloa* = 0.58). This is consistent with the notion that plumage coloration evolves to maximize crypsis relative to the environment [120–122], in which brighter, less saturated plumages (*cinereus*) match more open drier/grayer habitats at the northern limit of the distribution, where the vegetation completely loses its foliage during the dry season, while darker more saturated plumages (*russeus*) match the more closed humid/green habitats where the vegetation preserves much of its foliage even during the dry season.

In addition to all these explanations to understand the relationship between the variation in plumage coloration and the environment, recent studies have demonstrated the possible influence of other factors in explaining melanin-based pigmentation. These include levels of UV radiation, natural ground radioactivity, as well as habitat and dietary factors, that may represent a source of oxidative stress or influence the synthesis of melanin, which would in turn affect body condition and ultimately melanin production and be manifested in different plumage colorations [29,35,123,124]. In this study, we only included UV-B radiation, which was negatively associated with plumage brightness in two of the studied patches (head and back). That is, darker plumage colorations were associated with higher levels of UV-B radiation. This pattern has been proposed as a mechanism of protection against the negative effects of solar UV radiation [35] such as oxidative stress as explained above. It is likely that head and back in the Sinaloa Wren could be the body parts mostly exposed and therefore the most relevant regions of the plumage in terms of protection against damage caused by solar UV radiation. Our results agreed with those found in Galván et al. [35] for *Aquila chrysaetos* at a continental scale, where eagles exposed to higher levels of UV-B radiation develop darker plumage phenotypes. Nevertheless, we cannot exclude the effects of natural ground radioactivity as well as diet as important factors influencing the melanin gradient pigmentation in the Sinaloa Wren, however, further studies are needed to explore this.

The niche overlap tests suggested moderate niche overlap and niche conservatism between *cinereus* and *sinaloa* (the northernmost and central subspecies, respectively). This result indicates that these two subspecies occupy similar environmental conditions. However, morphological and plumage color differentiation was supported for this pair of subspecies even when phenotypic differences in feather plumage between this pair of species seems minimal to the naked eye. Overlap and niche divergence were not found in the *cinereus*–*russeus* and *sinaloa*–*russeus* comparisons, suggesting that these pairs of subspecies inhabit different environmental conditions. The *russeus* niche divergence from the other two subspecies is plausible since records from *russeus* subspecies in online databases are rare on the coast (at lower elevations). This was confirmed by fieldwork conducted during this study, when we searched for *russeus* in some parts of the coast in Oaxaca and Guerrero but found no samples. The individuals of this subspecies included in this study were all captured in the ecotone between TDF and pine oak forest at higher elevations. The difference in niche occupancy was also accompanied by the greatest phenotypic differences between *cinereus* and *russeus*, suggesting the importance of environment as a promoter of phenotypic differences.

In contrast with evidence of phenotypic divergence within bird species from montane habitats, such as cloud, pine and pine-oak forests, as a result of drift in isolation by geographic barriers [46,50,125], our findings suggest that ecological barriers are important in terms of promoting phenotypic differentiation among lowland habitats with no apparent geographic barriers to dispersal. However, this is only the first evidence to contribute to our understanding of the mechanisms that promote phenotypic differentiation along the TDF. It is recognized that phenotypic traits variation could also arise via environmental plasticity or through local

adaptation as a result of natural selection. The inclusion of genetic data is necessary in order to distinguish between these two mechanisms that could promote phenotypic variation (e.g. [8,21,126,127]). Moreover, the use of neutral and under selection molecular markers (such as single nucleotide polymorphisms: SNPs) could help to separate the effect of drift and local adaptation in phenotypic variation. Other mechanisms such as sexual selection or even competition [128,129] could also explain phenotypic divergence. It is also recognized that the geographic history of a particular region where the species is distributed could deeply influence genetic and phenotypic patterns. The geographic history of the TDFs has been poorly studied and understood (but see [130]); however, past expansions and contractions of the habitat could also explain the phenotypic variation observed at present across the TDF. For example, Castillo-Chora et al. [130] suggested that the biogeographic history of the TDFs of the Pacific Slope has been highly dynamic, resulting in alternating periods of isolation and connectivity that could explain the genetic differentiation patterns found in five co-distributed bird species with a distribution similar to that of *T. sinaloa*. We cannot discount the possibility that past geographic climatic changes could also partly explain the phenotypic differences found in the Sinaloa Wren; indeed, niche conservatism in the *cinereus* and *sinaloa* subspecies could be result of a rapid and recent colonization of some part of the distribution. Present and past niche modelling for the distribution of the Sinaloa Wren would be important in order to assess this.

Conclusions

Our findings suggest that environmental variation (especially that related to precipitation regime and seasonality) across a single ecosystem such as the TDF on the Mexican Pacific slope is important and could be sufficient to promote phenotypic divergence among populations that inhabit this ecosystem. Nevertheless, it is essential to determine whether the patterns of phenotypic variation agree with genetic patterns in the species. This could be important to the differentiation between phenotypic plasticity and adaptation to local environments. Our study provides evidence that contributes to understanding the factors that promote the wide biodiversity and endemism observed in the TDF, a highly threatened ecosystem.

Supporting information

S1 Fig. Sinaloa Wren subspecies distribution. Occurrence records for the distribution of the Sinaloa Wren retrieved from the Global Biodiversity Information Facility (GBIF 2020), used for ecological niche tests. Putative distribution for each subspecies is shown with different colors.

(TIF)

S2 Fig. Mean spectra curves representing brightness in feather patches. We show examples of dull (blue), medium (green) and bright (red) feathers for each plumage patches: A) head, B) back, C) flank and D) tail.

(TIF)

S3 Fig. Visual representation of color discriminability in avian perceptual space (ΔS) for all plumage patches between subspecies pairs. Threshold for color differentiation is $\Delta S = 1$ JND (just noticeable differences). Values below this threshold (green line) are perceived as the same color.

(TIF)

S4 Fig. Environment-phenotypic associations (pRDA1) for the Sinaloa Wren. Points represents the projection of each individual on the first two RDA axes. The environmental variables

are shown by labeled vectors where arrows indicate the direction of the gradient variation and the length represents the contribution to each axes of the orthogonal projection. A) morphology, B) feather coloration from the avian perspective.

(TIF)

S1 Table. Collection localities for the Sinaloa Wren samples examined in this study. Source from which data was obtained is provided, F = field, M = museum.

(DOCX)

S2 Table. Measurements of five morphological traits in male and female Sinaloa Wren subspecies (*cinereus*, *sinaloa* and *russeus*). Statistically significant differences between sexes within subspecies are highlighted in bold after Bonferroni corrections *** <0.001, ** <0.01. ns = non-significant comparisons.

(DOCX)

S3 Table. Mixed effects full models over phenotypical traits of *Thryophilus sinaloa*. *** Significant values < 0.001, ** <0.01, * <0.05 are highlighted in bold, ns = not significant ($P > 0.05$).

(DOCX)

S4 Table. Partial redundancy analysis (RDA) model selection showing environmental variables that best explained phenotypical variation (morphology and color from the avian perspective). Akaike Information Criterion (AIC) and F statistics were included. P -values representing significant differences are shown in bold.

(DOCX)

S5 Table. Loadings of environmental variables into the first two axes of pRDA1. Environmental variables explaining phenotypical variation (morphology and color from the avian perspective).

(DOCX)

S6 Table. Summary of factor loadings and proportion of variance of the climatic indexes for the first principal component in a PCA. Summary of factor loadings and proportion of variance of the climatic indexes for first principal component in a PCA.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank R. Marcondes, A. González-Rodríguez, Y. Rico, R. Hernández-Guzmán, R. Pérez-Rodríguez and one anonymous reviewer, for providing useful comments on previous versions of the manuscript; S. Felix (Ecokaban), S. Villaverde-Gómez, F. Ruz-Rosado, F. Pérez, A. Monsiváis and F-García (Estudiantes Conservando la Naturaleza AC), L. Zamudio-Beltrán, V. González, U. Alejandro, A. Sánchez and A. Ceja for field assistance; C. Sánchez-Hernández (UdG) for laboratory assistance; C. Morán for statistical support; L. Zamudio-Beltrán for niche divergence tests support; J. F. Ornelas and D. Rao for lending us their equipment for reflectance measurements; and the División de Estudios de Posgrado de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo for providing the English proofreading services of the manuscript. We also thank F. and L. Villaseñor (UMSNH), R. C. Almazán-Nuñez (UAGro) and P. Escalante-Pliego (IBUNAM) for providing permission to collect feathers and take measurements from museum specimens; S. Birks (Burke Museum) for their support with tissues loans as well as Katherine Renton and the staff of the “Estación de Biología Chamela” (UNAM), L. Lozano-Angulo and the staff of the “Reserva Monte Mojino” and parque

ecológico Huilotán for their logistic support. This study constitutes partial fulfillment of Andrea Malpica's doctoral degree (Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas) at the UMSNH.

Author Contributions

Conceptualization: Andrea Malpica, Clementina González.

Formal analysis: Andrea Malpica, Luis Mendoza-Cuenca, Clementina González.

Funding acquisition: Andrea Malpica, Clementina González.

Investigation: Andrea Malpica, Luis Mendoza-Cuenca, Clementina González.

Methodology: Andrea Malpica, Luis Mendoza-Cuenca, Clementina González.

Supervision: Luis Mendoza-Cuenca, Clementina González.

Validation: Clementina González.

Writing – original draft: Andrea Malpica.

Writing – review & editing: Luis Mendoza-Cuenca, Clementina González.

References

1. Andersson M. Sexual Selection. Princeton University Press; 1994. <https://doi.org/10.1515/9780691207278>
2. Uy JAC, Borgia G. Sexual selection drives rapid divergence in bowerbird display traits. *Evolution*. 2000; 54: 273–278. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00027.x> PMID: 10937203
3. Uy JAC, Moyle RG, Filardi CE. Plumage and song differences mediate species recognition between incipient flycatcher species of the Solomon Islands. *Evolution*. 2009; 63: 153–164. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00530.x> PMID: 18803681
4. Williams GC. Adaptation and Natural Selection. New Jersey: Princeton University Press; 1966. <https://doi.org/10.2307/j.ctt7s4g0>
5. Wright S. Isolation by Distance. *Genetics*. 1943; 28: 114–138. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.2.114> PMID: 17247074
6. Seeholzer GF, Brumfield RT. Isolation by distance, not incipient ecological speciation, explains genetic differentiation in an Andean songbird (Aves: Furnariidae: *Cranioleuca antisiensis*, Line-cheeked Spinetail) despite near threefold body size change across an environmental gradient. *Molecular Ecology*. 2018; 27(1):279–296. <https://doi.org/10.1111/mec.14429> Epub 2017 Dec 18. PMID: 29134710.
7. Colombelli-Négrel D. Both natural selection and isolation by distance explain phenotypic divergence in bill size and body mass between South Australian little penguin colonies. *Ecology and Evolution*. 2016; 6: 7965–7975. <https://doi.org/10.1002/ece3.2516> PMID: 27878069
8. Friis G, Fandos G, Zellmer AJ, McCormack JE, Faircloth BC, Mila B. Genome-wide signals of drift and local adaptation during rapid lineage divergence in a songbird. *Molecular Ecology*. 2018; 27: 5137–5153. <https://doi.org/10.1111/mec.14946> PMID: 30451354
9. Leal-Saenz A, Waring KM, Menon M, Cushman SA, Eckert A, Flores-Renteria L, et al. Morphological Differences in *Pinus strobiformis* Across Latitudinal and Elevational Gradients. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.559697>
10. Graves GR. Bergmann rule near the equator: latitudinal clines in body size of an Andean passerine bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991; 88: 2322–2325. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2322> PMID: 11607166
11. Blackburn TM, Ruggiero A. Latitude, elevation and body mass variation in Andean passerine birds. *Global Ecology and Biogeography*. 2001; 10: 245–259. <https://doi.org/10.1046/J.1466-822X.2001.00237.X>
12. Hawkins BA, Diniz-Filho JAF, Jaramillo CA, Soeller SA. Climate, niche conservatism, and the global bird diversity gradient. *American Naturalist*. 2007; 170: S16–S27. <https://doi.org/10.1086/519009> PMID: 17874382
13. Roulin A. Melanin-based colour polymorphism responding to climate change. *Global Change Biology*. 2014; 20: 3344–3350. <https://doi.org/10.1111/gcb.12594> PMID: 24700793

14. Bergmann C. Über die Verhältnisse der Wärmeökonomie der Thiere zu ihrer Grösse. 1848.
15. Allen JA. The influence of physical conditions in the genesis of species. *Radical Review*. 1877; 1: 108–140. <https://doi.org/10.1038/SCIENTIFICAMERICAN05251907-26247SUPP>
16. Bears H, Drever C, Martin K. Comparative morphology of dark-eyed juncos *Junco hyemalis* breeding at two elevations: a common aviary experiment. *Journal of Avian Biology*. 2008; 39: 152–162. <https://doi.org/10.1111/j.2008.0908-8857.04191.x>
17. Sun YF, Ren ZP, Wu YF, Lei FM, Dudley R, Li DM. Flying high: limits to flight performance by sparrows on the Qinghai-Tibet Plateau. *Journal of Experimental Biology*. 2016; 219: 3642–3648. <https://doi.org/10.1242/jeb.142216> PMID: 27609759
18. Busi A, Cardona-Salazar LJ, Castillo DG, Ossa-Lopez PA, Rivera-Paez FA, Vasquez RA, et al. Morphological differences in a population of Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia capensis*, Status Muller, 1776) (Passerine, Emberizidae) at different elevations in the Tropical Andes. *Biota Neotropica*. 2020;20. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2019-0867>
19. Landmann A, Winding N. Niche segregation in high-altitude Himalayan chats (Aves, Turdidae): does morphology match ecology? *Oecologia*. 1993; 95: 506–519. <https://doi.org/10.1007/BF00317435> PMID: 28313291
20. Maybury WJ, Rayner JMV. The avian tail reduces body parasite drag by controlling flow separation and vortex shedding. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 2001; 268: 1405–1410. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1635> PMID: 11429141
21. Chavarría-Pizarro T, Gómez JP, Ungvari-Martin J, Bay R, Miyamoto MM, Kimball R. Strong phenotypic divergence in spite of low genetic structure in the endemic Mangrove Warbler subspecies (*Setophaga petechia xanthotera*) of Costa Rica. *Ecology and Evolution*. 2019; 9: 13902–13918. <https://doi.org/10.1002/ece3.5826> PMID: 31938490
22. Pennycuik CJ. A wind-tunnel study of gliding flight in the pigeon *Columba livia*. *Journal of experimental Biology*. 1968; 49: 509–526. <https://doi.org/10.1242/jeb.49.3.509>
23. Thomas ALR. The flight of birds that have wings and a tail: Variable geometry expands the envelope of flight performance. *Journal of Theoretical Biology*. 1996; 183: 237–245. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0217>
24. Mila B, Wayne RK, Fitze P, Smith TB. Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorhynchus spirurus*, a Neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology*. 2009; 18: 2979–2995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04251.x> PMID: 19538341
25. Wright NA, Steadman DW. Insular avian adaptations on two Neotropical continental islands. *Journal of Biogeography*. 2012; 39: 1891–1899. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02754.x> PMID: 23066173
26. Gardner JL, Symonds MRE, Joseph L, Ikin K, Stein J, Kruuk LEB. Spatial variation in avian bill size is associated with humidity in summer among Australian passerines. *Climate Change Responses*. 2016; 3: 1–11. <https://doi.org/10.118/s40665-016-0026-z>
27. Friedman NR, Harmackova L, Economo EP, Remes V. Smaller beaks for colder winters: Thermoregulation drives beak size evolution in Australasian songbirds. *Evolution*. 2017; 71: 2120–2129. <https://doi.org/10.1111/evo.13274> PMID: 28700095
28. Sirkkä PM, Virolainen M, Laaksonen T. Melanin coloration has temperature-dependent effects on breeding performance that may maintain phenotypic variation in a passerine bird. *Journal of Evolutionary Biology*. 2010; 23: 2385–2396. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02100.x> PMID: 20846173
29. Galván I, Rodríguez-Martínez S, Carrascal LM. Dark pigmentation limits thermal niche position in birds. *Functional Ecology*. 2018; 32: 1531–1540. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13094>
30. Rensch B. Das Prinzip geographischer Rassenkreise und das Problem der Artbildung. Gebroeden Borntraeger, Berlin, 1929. <https://doi.org/10.1038/124753a0>
31. Delhey K. A review of Gloger's rule, an ecogeographical rule of colour: definitions, interpretations and evidence. *Biological Reviews*. 2019; 94: 1294–1316. <https://doi.org/10.1111/brv.12503> PMID: 30892802
32. Bogert CM. Thermoregulation in reptiles, a factor in evolution. *Evolution*. 1949; 3: 195–211. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1949.tb00021.x> PMID: 18138377
33. Clusella Trullas S, van Wyk JH, Spotila JR. Thermal melanism in ectotherms. *Journal of Thermal Biology*. 2007; 32: 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.013>
34. Delhey K. Darker where cold and wet: Australian birds follow their own version of Gloger's rule. *Ecography*. 2018; 41: 673–683. <https://doi.org/10.1111/ecog.03040>

35. Galván I, Jorge A, Pacheco C, Spencer D, Halley DJ, et al. Solar and terrestrial radiations explain continental-scale variation in bird pigmentation. *Oecologia*. 2018; 188: 683–693. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4238-8> PMID: 30094635
36. Lott EJ, Atkinson TH. Mexican and Central American seasonally dry tropical forests: Chamela-Cuixmala, Jalisco, as a focal point for comparison. Neotropical savannas and seasonally dry forests. CRC Press; 2006. pp. 315–342. <https://doi.org/10.1201/9781420004496-13>
37. García-Trejo EA, Navarro AG. Patrones biogeográficos de la riqueza de especies y el endemismo de la avifauna en el oeste de México. *Acta Zoológica Mexicana*. 2004; 20: 167–185.
38. Rios-Muñoz CA, Navarro-Sigüenza AG. Patterns of species richness and biogeographic regionalization of the avifaunas of the seasonally dry tropical forest in Mesoamerica. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*. 2012; 47: 171–182. <https://doi.org/10.1080/01650521.2012.734175>
39. Miles L, Newton AC, DeFries RS, Ravillious C, May I, Blyth S, et al. A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography*. 2006; 33: 491–505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01424.x>
40. Sánchez-Azofeifa A, Powers JS, Fernandes GW, Quesada M. Tropical dry forests in the Americas: ecology, conservation, and management. CRC Press; 2013.
41. Navarro-Sigüenza AG, Peterson AT, Gordillo-Martínez A. Museums working together: The atlas of the birds of Mexico. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*. 2003; 123A: 207–225.
42. Arbeláez-Cortés E, Milá B, Navarro-Sigüenza AG. Multilocus analysis of intraspecific differentiation in three endemic bird species from the northern Neotropical dry forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2014; 70: 362–377. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.006> PMID: 24145367
43. Trejo Vázquez RI. Distribución y diversidad de selvas bajas de México: relaciones con el clima y el suelo. Tesis de grado; 1998.
44. Trejo I, Dirzo R. Floristic diversity of Mexican seasonally dry tropical forests. *Biodiversity and Conservation*. 2002; 11: 2063–2084. <https://doi.org/10.1023/a:1020876316013>
45. Rzedowski J. 2006. Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.
46. González C, Ornelas JF, Gutiérrez-Rodríguez C. Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology*. 2011; 11. doi:38 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-38>
47. Rheindt FE, Székely T, Edwards SV, Lee PLM, Burke T, Kennerley PR, et al. Conflict between Genetic and Phenotypic Differentiation: The Evolutionary History of a “Lost and Rediscovered” Shorebird. *Plos One*. 2011; 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026995> PMID: 22096515
48. Nuñez-Zapata J, Benites P, Gutiérrez-Arellano C, Ortiz-Ramírez MF, Navarro-Sigüenza AG. Local adaptation versus historical isolation as sources of melanin-based coloration in the white-throated thrush *Turdus assimilis*. *Journal of Avian Biology*. 2018; 49. <https://doi.org/10.1111/jav.01790>
49. Ramírez-Barrera SM, Velasco JA, Orozco-Tellez TM, Vázquez-López AM, Hernández-Baños BE. What drives genetic and phenotypic divergence in the Red-crowned Ant tanager (*Habia rubica*, Aves: Cardinalidae), a polytypic species? *Ecology and Evolution*. 2019; 9: 12339–12352. <https://doi.org/10.1002/ece3.5742> PMID: 31832165
50. Zamudio-Beltrán LE, Ornelas JF, Malpica A, Hernández-Baños BE. Genetic and morphological differentiation among populations of the Rivoli's Hummingbird (*Eugenes fulgens*) species complex (Aves: Trochilidae). *Auk*. 2020; 137: 1–20. <https://doi.org/10.1093/auk/ukaa032>
51. Soobramoney S, Downs CT, Adams NJ. Morphological variation in the Common Fiscal *Lanius collaris* along an altitudinal gradient in southern Africa. *Ostrich*. 2005; 76: 130–141. <https://doi.org/10.2989/00306520509485485>
52. Malpica A, Ornelas JF. Postglacial northward expansion and genetic differentiation between migratory and sedentary populations of the broad-tailed hummingbird (*Selasphorus platycercus*). *Molecular Ecology*. 2014; 23: 435–452. <https://doi.org/10.1111/mec.12614> PMID: 24299330
53. Arbeláez-Cortés E, Roldán-Pina D, Navarro-Sigüenza AG. Multilocus phylogeography and morphology give insights into the recent evolution of a Mexican endemic songbird: *Vireo hypochryseus*. *Journal of Avian Biology*. 2014; 45: 253–263. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2013.00335.x>
54. Cicero C, Koo MS. The role of niche divergence and phenotypic adaptation in promoting lineage diversification in the Sage Sparrow (*Artemisiospiza belli*, Aves: Emberizidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 2012; 107: 332–354. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8312.2012.01942.X>
55. Schluter D. Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science*. 2009; 323: 737–741. <https://doi.org/10.1126/science.1160006> PMID: 19197053

56. Grant PR. The coexistence of two wren species of the genus *Thryothorus*. *The Wilson Bulletin*. 1966; 266–278.
57. Baird SF. Review of American birds, in the Museum of the Smithsonian Institution. By S.F. Baird. Washington, Smithsonian Institution; 1864. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7509>
58. Brewster W. Descriptions of supposed new birds from western North America and Mexico. *The Auk*. 1889; 6: 85–98. <https://doi.org/10.2307/4067024>
59. Nelson EW. Descriptions of new birds from southern Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 1903; 16: 151–160.
60. Soberanes-González CA. Sinaloa Wren (*Thryophilus sinaloa*), version 1.0. In *Neotropical Birds Online* (Schulenberg T. S., Editor). Cornell Lab of Ornithology; 2015. <https://doi.org/10.2173/nb.sinwre1.01>
61. Howell SNG, Webb S. A guide to the birds of Mexico and northern Central America. Oxford University Press; 1995.
62. Ridgway R. The Birds of North and Middle America, Part III. *Bulletin of the United States National Museum* 50. Government Printing Office; 1904.
63. Phillips AR. The known birds of North and Middle America. Part I. Privately published, Denver Colorado; 1986.
64. Murphy PG, Lugo AE. Ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 1986; 17: 67–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.00043568>
65. Trejo Vázquez I. El clima de la selva baja caducifolia en México. *Investigaciones geográficas*. 1999; 40–52.
66. Miranda F, Hernández-X E. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Botanical Sciences*. 1963; 29–179. <https://doi.org/10.17129/BOTSCI.1084>
67. Çakmak E, Peksen CA, Bilgin CC. Comparison of three different primer sets for sexing birds. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2017; 29: 59–63. <https://doi.org/10.1177/1040638716675197> PMID: 28074715
68. Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. 1998; 7: 1071–1075. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x> PMID: 9711866
69. Maia R, Gruson H, Endler JA, White TE. pavo 2: New tools for the spectral and spatial analysis of colour in R. *Methods in Ecology and Evolution*. 2019; 10: 1097–1107. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.13174>
70. Stoddard MC, Prum RO. Evolution of avian plumage color in a tetrahedral color space: A phylogenetic analysis of new world buntings. *American Naturalist*. 2008; 171: 755–776. <https://doi.org/10.1086/587526> PMID: 18419340
71. Montgomerie R. Analyzing colors. In: Hill GE, McGraw KJ, editors. *Bird Coloration*. Cambridge, MA: Harvard University Press; 2006. pp. 90–147.
72. Endler JA, Mielke PW. Comparing entire colour patterns as birds see them. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2005; 86: 405–431. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2005.00540.x>
73. Demko AD, Sosa-López JR, Simpson RK, Doucet SM, Mennill DJ. Divergence in plumage, voice, and morphology indicates speciation in Rufous-capped Warblers (*Basileuterus rufifrons*). *Auk*. 2020; 137: 1–20. <https://doi.org/10.1093/auk/ukaa029>
74. Vorobyev M, Osorio D. Receptor noise as a determinant of colour thresholds. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*. 1998; 265: 351–358. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0302> PMID: 9523436
75. Fick SE, Hijmans RJ. WorldClim 2: new 1-km spatial resolution climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 2017; 37: 4302–4315. <https://doi.org/10.1002/joc.5086>
76. Hijmans RJ, van Etten J, Cheng J, Mattiuzzi M, Sumner M, Greenberg JA, et al. Package ‘raster.’ R package. 2015;734.
77. Dimiceli M, Carroll M, Sohlberg R, Kim D, Kelly M, Townshend J. MOD44B MODIS/Terra Vegetation Continuous Fields Yearly L3 Global 250m SIN Grid V006. NASA EODIS Land Processes DAAC; 2015.
78. Running S, Mu Q, Zhao M. MOD16A2.006: Terra Net Evapotranspiration 8-Day Global 500m | Earth Engine Data Catalog | Google Developers; 2017.
79. Didan K. MOD13Q1 MODIS/Terra Vegetation Indices 16-Day L3 Global 250m SIN Grid V006. NASA EODIS Land Processes DAAC; 2015.
80. Tuck SL, Phillips HRP, Hintzen RE, Scharlemann JPW, Purvis A, Hudson LN. MODISTools—downloading and processing MODIS remotely sensed data in R. *Ecology and evolution*. 2014; 4: 4658–4668. <https://doi.org/10.1002/ece3.1273> PMID: 25558360

81. Beckmann M, Václavík T, Manceur AM, Šprtová L, von Wehrden H, Welk E, et al. gUV: a global UV-B radiation data set for macroecological studies. *Methods in Ecology and Evolution*. 2014; 5: 372–383. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12168>
82. Bauer DF. Constructing confidence sets using rank statistics. *Journal of the American Statistical Association*. 1972; 67: 687–690. <https://doi.org/10.2307/2284469>
83. Hollander M, Wolfe DA. *Nonparametric statistical methods*. John Wiley & Sons; 1973.
84. Conover WJ, Iman RL. Multiple-comparisons procedures. Informal report; 1979. <https://doi.org/10.2172/6057803>
85. Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 1989; 43: 223–225. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04220.x> PMID: 28568501
86. Maia R, White TE. Comparing colors using visual models. *Behavioral Ecology*. 2018; 29: 649–659. <https://doi.org/10.1093/beheco/ary017>
87. Legendre P, Legendre L. *Numerical ecology*. Elsevier; 1998.
88. Legendre P, Fortin MJ. Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular Ecology Resources*. 2010; 10: 831–844. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02866.x> PMID: 21565094
89. Kierepka EM, Latch EK. Performance of partial statistics in individual-based landscape genetics. *Molecular Ecology Resources*. 2015; 15: 512–525. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12332> PMID: 25230016
90. Borcard D, Gillet F, Legendre P. *Numerical ecology with R*. Springer; 2011.
91. Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara RB, et al. Package 'vegan.' Community ecology package, version. 2013;2: 1–295.
92. Borcard D, Legendre P, Drapeau P. Partialling out the spatial component of ecological variation. *Ecology*. 1992; 73: 1045–1055. <https://doi.org/10.2307/1940179>
93. Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S, Borcard D. Variation partitioning of species data matrices: Estimation and comparison of fractions. *Ecology*. 2006; 87: 2614–2625. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[2614:vposdm\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[2614:vposdm]2.0.co;2) PMID: 17089669
94. Dray S, Legendre P, Peres-Neto PR. Spatial modelling: a comprehensive framework for principal coordinate analysis of neighbour matrices (PCNM). *Ecological Modelling*. 2006; 196: 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.02.015>
95. Wickham H, François R, Henry L, Müller K. *A Grammar of Data Manipulation [R package dplyr version 1.0.7]*. Comprehensive R Archive Network (CRAN); 2021.
96. Zizka A, Silvestro D, Andermann T, Azevedo J, Ritter CD, Edler D, et al. CoordinateCleaner: Standardized cleaning of occurrence records from biological collection databases. *Methods in Ecology and Evolution*. 2019; 10: 744–751. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.13152>
97. Osorio-Olvera L, Lira-Noriega A, Soberón J, Townsend Peterson A, Falconi M, Contreras-Díaz RG, et al. Ntobox: an R package with graphical user interface for modeling and evaluating multidimensional ecological niches. *Methods in Ecology and Evolution*. 2020; 11: 1199–1206. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13452>
98. Lowenberg-Neto P. Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalisation. *Zootaxa*. 2014; 3802: 300. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3802.2.12> PMID: 24871011
99. Morrone JJ. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*. 2014; 3782: 1–110. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3782.1.1> PMID: 24871951
100. Cortés-Ramírez G, Ríos-Muñoz CA, Navarro-Sigüenza AG. Influence of phylogenetic structure and climate gradients on geographical variation in the morphology of Mexican flycatcher forests assemblages (Aves: Tyrannidae). *PeerJ*. 2019;7. <https://doi.org/10.7717/peerj.6754> PMID: 31637112
101. Schoener TW. Nonsynchronous Spatial Overlap of Lizards in Patchy Habitats. *Ecology*. 1970; 51: 408–418. <https://doi.org/10.2307/1935376>
102. Warren DL, Glor RE, Turelli M. Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*. 2008; 62: 2868–2883. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00482.x> PMID: 18752605
103. Broennimann O, Fitzpatrick MC, Pearman PB, Petitpierre B, Pellissier L, Yoccoz NG, et al. Measuring ecological niche overlap from occurrence and spatial environmental data. *Global Ecology and Biogeography*. 2012; 21: 481–497. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00698.x>
104. di Cola V, Broennimann O, Petitpierre B, Breiner FT, D'Amen M, Randin C, et al. ecospat: an R package to support spatial analyses and modeling of species niches and distributions. *Ecography*. 2017; 40: 774–787. <https://doi.org/10.1111/ecog.02671>

105. Cobos ME, Osorio-Olvera L, Soberon J, Peterson TA. ellipsenm: Ecological Niche's Characterizations Using Ellipsoids. In: R. package version 0.3.4; 2020.
106. Rödder D, Engler JO. Quantitative metrics of overlaps in Grinnellian niches: advances and possible drawbacks. *Global Ecology and Biogeography*. 2011; 20: 915–927. <https://doi.org/10.1111/J.1466-8238.2011.00659.X>
107. Guallar S, Santana E, Martínez-Contreras S, Verdugo H, Gallés A. Paseriformes del Occidente de México: morfometría, datación y sexado. Ajuntament de Barcelona, Institut de Cultura Spain; 2009.
108. Cruz-Yepez N, González C, Ornelas JF. Vocal recognition suggests premating isolation between lineages of a lekking hummingbird. *Behavioral Ecology*. 2020; 31: 1046–1053.
109. Zink RM, Remsen JV. Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. *Current Ornithology*. 1986; 4: 1–69.
110. Symonds MRE, Tattersall GJ. Geographical variation in bill size across bird species provides evidence for Allen's rule. *American Naturalist*. 2010; 176: 188–197. <https://doi.org/10.1086/653666> PMID: 20545560
111. Johnston RF, Selander RK. Evolution in the House Sparrow. II. Adaptive Differentiation in North American Populations. *Evolution*. 1971; 25: 1–28. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1971.tb01855.x> PMID: 28562938
112. Rayner JVM. Form and function in avian flight. *Current ornithology*. Springer; 1988. pp. 1–66. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6787-5_1
113. Grant PR. Variation in the Tarsus Length of Birds in Island and Mainland Regions. *Evolution*. 1971; 25: 599–614. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1971.tb01920.x> PMID: 28564794
114. Amar A, Koeslag A, Malan G, Brown M, Wreford E. Clinal variation in the morph ratio of Black Sparrowhawks *Accipiter melanoleucus* in South Africa and its correlation with environmental variables. *Ibis*. 2014; 156: 627–638. <https://doi.org/10.1111/IBI.12157>
115. Marcondes RS, Nations JA, Seeholzer GF, Brumfield RT. Rethinking Gloger's Rule: Climate, Light Environments, and Color in a Large Family of Tropical Birds (Furnariidae). *American Naturalist*. 2021; 197: 592–606. <https://doi.org/10.1086/713386> PMID: 33908827
116. Delhey K, Dale J, Valcu M, Kempenaers B. Reconciling ecogeographical rules: rainfall and temperature predict global colour variation in the largest bird radiation. *Ecology Letters*. 2019; 22: 726–736. <https://doi.org/10.1111/ele.13233> PMID: 30779293
117. Marcondes SR, Stryjewski KF, Brumfield RT. Testing the simple and complex versions of Gloger's rule in the Variable Antshrike (*Thamnophilus caerulescens*, Thamnophilidae). *Ornithology*, 2020; 137: 1–13. <https://doi.org/10.1093/auk/ukaa026>
118. Burt EH, Ichida JM. Gloger's rule, feather-degrading bacteria, and color variation among song sparrows. *Condor*. 2004; 106: 681–686. <https://doi.org/10.1650/7383>
119. Hamilton WJ, Heppner F. Radiant solar energy and the function of black homeotherm pigmentation: an hypothesis. *Science*. 1967; 155: 196–197. <https://doi.org/10.1126/science.155.3759.196> PMID: 6015524
120. Endler JA. The color of light in forests and its implications. *Ecological Monographs*. 1993; 63: 1–24. <https://doi.org/10.2307/2937121>
121. Endler JA, Thery M. Interacting effects of lek placement, display behavior, ambient light, and color patterns in three neotropical forest-dwelling birds. *American Naturalist*. 1996; 148: 421–452. <https://doi.org/10.1086/285934>
122. Doucet SM, Mennill DJ, Hill GE. The evolution of signal design in manakin plumage ornaments. *American Naturalist*. 2007; 169: S62–S80. <https://doi.org/10.1086/510162> PMID: 29517930
123. Poston JP, Hasselquist D, Stewart I, Westneat DF. Dietary amino acids influence plumage traits and immune responses of male house sparrows, *Passer domesticus*, but not as expected. *Animal Behaviour*. 2005; 70: 1171–1181. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2005.02.015>
124. Galván I, Bijlsma RG, Negro JJ, Jarén M, Garrido-Fernández J. Environmental constraints for plumage melanization in the northern goshawk *Accipiter gentilis*. *Journal of Avian Biology*. 2018; 41: 523–531. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2010.04998.x>
125. Barrera-Guzmán AO, Milá B, Sánchez-González LA, Navarro-Sigüenza AG. Speciation in an avian complex endemic to the mountains of Middle America (*Ergaticus*, Aves: Parulidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2012; 62: 907–920. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.11.020> PMID: 22155712
126. Termignoni-García F, Jaramillo-Correa JP, Chablé-Santos J, Liu M, Shultz AJ, Edwards SV, et al. Genomic footprints of adaptation in a cooperatively breeding tropical bird across a vegetation gradient. *Molecular Ecology*. 2017; 26: 4483–4496. <https://doi.org/10.1111/mec.14224> PMID: 28664998

127. Moreira LR, Hernández-Baños BE, Smith BT. Spatial predictors of genomic and phenotypic variation differ in a lowland Middle American bird (*Icterus gularis*). *Molecular Ecology*. 2020; 29: 3085–3102. <https://doi.org/10.1111/mec.15536> PMID: 32621770
128. Galeotti P, Rubolini D, Dunn PO, Fasola M. Colour polymorphism in birds: causes and functions. *Journal of Evolutionary Biology*. 2003; 16: 635–646. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00569.x> PMID: 14632227
129. Zamudio KR, Bell RC, Mason NA. Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016; 113: 8041–8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602237113> PMID: 27432983
130. Castillo-Chora VDJ, Sánchez-González LA, Mastretta-Yanes A, Prieto-Torres DA, Navarro-Siguënza AG. Insights into the importance of areas of climatic stability in the evolution and maintenance of avian diversity in the Mesoamerican dry forests. *Biological Journal of the Linnean Society*. 2021; 132: 741–758. <https://doi.org/10.1093/BIOLINNEAN/BLAA202>

DISCUSIÓN GENERAL

El objetivo general de este trabajo se centró en entender los factores neutrales y selectivos que promueven la variación fenotípica y genética en *Thryophilus sinaloa* a través del bosque tropical caducifolio del Pacífico mexicano a dos escalas temporales y geográficas distintas. Para lo anterior, tomé en cuenta tanto el aislamiento geográfico, la heterogeneidad en el paisaje y procesos históricos, como factores ambientales que podrían explicar los patrones de diferenciación.

En ambas escalas temporales y geográficas encontré estructura genética, así como diferencias fenotípicas a través de la distribución de la especie. La estructura genética encontrada en ambas escalas geográficas resalta la alta resolución que pueden ofrecer los SNPs, lo cual permite inferir los factores contemporáneos o históricos que han moldeado la estructura genética de las especies (e.g. Jahner et al. 2016; Tan et al. 2018). La estructura genética encontrada en ambas escalas es explicada por factores distintos, los cuales explicaré a continuación. A una escala de paisaje, que es una geográfica relativamente pequeña (1080 km² aproximadamente), encontré que las poblaciones de *T. sinaloa* están genéticamente estructuradas en dos grupos genéticos, con flujo genético contemporáneo limitado entre los grupos. Encontré que ambos grupos genéticos se encuentran conformados por individuos que se encuentran tanto en sitios fragmentados y sitios continuos en el paisaje. Las diferencias genéticas encontradas a esta escala geográfica no parecen ser resultado de eventos históricos, ya que de acuerdo con el estudio filogeográfico de *T. sinaloa* a un nivel geográfico mayor, esos individuos pertenecen a un mismo grupo genético. Entonces, a escala de paisaje, las diferencias genéticas son explicadas por la transformación contemporánea del paisaje.

Encontré que las áreas abiertas del paisaje (i.e. zonas urbanas, suelos expuestos y pastizales) en conjunto con la distancia geográfica explican las diferencias genéticas entre las localidades de colecta. Lo anterior sugiere que las áreas abiertas junto con la distancia geográfica restringen la dispersión de *T. sinaloa*. El estudio de Claramunt et al. (2022) señala que especies con menor eficiencia de vuelo (medido a través del índice “mano-ala”) se dispersan menos frecuentemente a través de sitios abiertos, siendo más vulnerables a la fragmentación. Aunque dicho índice no se ha estimado para *T. sinaloa*, es probable que su eficiencia de vuelo sea baja debido a lo corto y redondeado de sus alas, adaptadas a microhábitats intrincados con presencia de lianas (Malpica et al. 2022). Otros elementos del paisaje estudiados tuvieron poco (agricultura, vegetación original, carreteras y elevación) o ningún efecto (ríos, arroyos y pendiente) en explicar las distancias genéticas a través del paisaje. Muchos territorios de la especie fueron asociados a arroyos secos, sin embargo, no se detectó un efecto de los ríos o arroyos en la conectividad genética de la especie. La falta de sitios de muestreo a lo largo y a través de los ríos y arroyos en este estudio probablemente fue la razón por la que no se detectó un efecto significativo.

Contrario a las expectativas, no encontré diferencias significativas en los estimadores de diversidad entre zonas continuas y fragmentadas del BTC, aunque las zonas fragmentadas tienen significativamente un mayor número de alelos privados. Lo anterior, probablemente se deba a la falta de conectividad entre sitios de muestreo en las zonas fragmentadas. Sin embargo, estimaciones de diversidad a diferentes escalas de tiempo en el futuro son necesarias, ya que el creciente deterioro del hábitat proyectado al futuro (Hernández et al. 2020) podría tener eventualmente un impacto en áreas con parches pequeños y aislados de vegetación.

Bajo un contexto histórico y a lo largo de la distribución de la especie en el Pacífico mexicano desde Sonora hasta Oaxaca (aproximadamente 2000 km lineales) encontré una fuerte estructuración genética, así como diferencias significativas en el tamaño y coloración del plumaje entre las tres subespecies descritas en la literatura. En la literatura hay una extensa evidencia que documenta que las oscilaciones climáticas del Pleistoceno han jugado un papel importante en promover la diversificación genética de aves, así como de otros taxa en bosques templados (Hewitt 1996; Hewitt 2000). Los resultados de los modelos de nicho ecológico sugieren que hubo cambios importantes en la distribución de *T. sinaloa* durante el Pleistoceno, afectando de manera importante su estructura y diversidad genética. Los resultados sugieren que durante el Último Máximo Glacial (LGM) hubo una contracción importante principalmente al norte de la distribución de la especie donde actualmente habita la subespecie *cinereus*. Posterior al LGM hubo una expansión al norte desde el centro de la distribución lo cual explica la relativa reciente divergencia entre los grupos genéticos de *cinereus* (norte de la distribución) y *sinaloa* (al centro de la distribución). Los patrones de menor diversidad genética para el grupo *cinereus* son consistentes con una reciente expansión resultado de un posible efecto fundador. Este patrón de baja diversidad genética en zonas norteñas recientemente colonizadas después del LGM ha sido descrito para varias especies de aves (e.g. Milá et al. 2006 en *Junco phaeonotus*; Malpica & Ornelas 2014 en *Selasphorus platycercus*; Licona-Vera et al. 2018 en el género *Calothorax*). Adicionalmente, la contracción en la distribución en el norte durante el LGM coincide con la zona geográfica donde se detectan las diferencias genéticas entre *cinereus* y *sinaloa* (en el centro-sur de Sinaloa). Esta reciente divergencia genética es acompañada con una mayor similitud a nivel

fenotípico y con traslape y conservadurismo de nicho entre *cinereus* y *sinaloa* en comparación con *russeus*.

La diversidad genética mayor detectada para los grupos *sinaloa* y *russeus* (al centro y sur de la distribución respectivamente) así como la distribución potencial proyectada durante el LGM para estos grupos, son consistentes con áreas que pudieron fungir como refugios para la especie. Para otras aves, se han reportado refugios en el BTC dentro de la distribución potencial disponible para *T. sinaloa*, como en Nayarit-Jalisco y Oaxaca (Arbeláez-Cortés et al. 2014a).

Además del efecto de las oscilaciones climáticas históricas en la estructura genética, en este estudio detectamos discontinuidades filogeográficas que coinciden con algunas reportadas anteriormente en la literatura. Por ejemplo, el inicio del Faja Volcánica Transmexicana (FVT) entre Nayarit y Jalisco, la sierra de Coalcomán en Michoacán (Arbeláez-Cortés et al. 2014a) y la Sierra Madre del Sur en Guerrero (Arbeláez-Cortés et al. 2014a; Devitt 2006; Bryson et al. 2008) se han propuesto como posibles barreras entre poblaciones de especies que habitan el BTC. Se ha postulado que la cercanía de estas cadenas montañosas a la costa, reduce la distribución del BTC en las llanuras costeras lo cual puede restringir el movimiento de los individuos y por lo tanto el flujo de genes. Sin embargo, Arbeláez-Cortés (2014a) reporta que las estimaciones de orogénesis tanto de la FVT (20–3 millones de años, Becerra 2005; Devitt 2006) como la actividad volcánica de la Sierra Madre de Sur (35 – 20 millones de años, Morán-Zenteno et al. 2000) preceden a los tiempos de divergencia encontrados para sus especies de estudio. Debido a lo anterior, no se puede descartar que otros factores adicionales al aislamiento por barreras puedan explicar las

diferencias a través del BTC, como por ejemplo la adaptación a condiciones climáticas particulares creadas por la cercanía de las montañas a la zona costera.

En este sentido, al trabajar con polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) pudimos separar los loci neutrales de los loci outliers (que potencialmente pueden estar bajo selección), separando así los efectos neutrales y selectivos del proceso evolutivo. Los resultados de los análisis realizados con los loci outliers, *sinaloa* y *cinereus* se agrupa en un mismo grupo genético. Lo anterior, sugiere que la diferenciación genética y fenotípica (aunque ligera) detectada entre estos dos grupos no es resultado de procesos de adaptación local. Esto está apoyado en la falta de divergencia de nicho, lo que indica que las condiciones en las que habitan son similares. Por lo tanto, esta diferenciación puede ser resultado de procesos neutrales como la deriva genética resultado, probablemente, del aislamiento por distancia o por la reciente expansión al norte posterior al LGM.

En contraste, tanto con los loci neutrales como los outliers, *russeus* forma un grupo genético distinto. Adicionalmente, se reportó divergencia de nicho entre *cinereus-sinaloa* vs. *russeus*, quien habita en condiciones mucho más húmedas, a mayores altitudes, con mayor radiación UV-B y donde la vegetación no pierde sus hojas por completo. De manera general, esta subespecie también es fenotípicamente más distintas en comparación a las otras, con un plumaje más oscuro y saturado. La evidencia anterior sugiere que las diferencias genéticas y fenotípicas de *russeus* podrían ser resultado de un proceso de adaptación local a condiciones ambientales particulares. Para probar esa hipótesis sería necesario contar con un genoma de referencia anotado de alguna especie de ave cercanamente relacionada a *T. sinaloa*, y así obtener información sobre la ubicación, identidad y funcionalidad de los potenciales loci bajo selección o loci candidatos encontrados. Otra alternativa, es relacionar dichos loci candidatos

con variables ambientales relevantes a través del BTC para explicar la variación fenotípica de la especie reportados en el capítulo 3.

Adicionalmente, el estudio fenotípico de *T. sinaloa* relacionado a la variación ambiental sugiere que el gradiente de precipitación (que oscila entre 690 – 1460 mm promedio anual entre los extremos de las localidades de colecta) es más importante que el gradiente de temperatura (que oscila entre 23.8 – 24.9 °C) en explicar los patrones fenotípicos a lo largo del BTC del Pacífico mexicano. Incluso, las reglas ecogeográficas de Allen y Bergmann que postulan que la temperatura es un factor importante en moldear a la variación fenotípica (en apéndices y tamaño respectivamente) no fueron apoyadas, debido a que las diferencias en temperatura son mínimas. Sin embargo, sí encontré apoyo para la regla de Bogert donde se esperan colores más claros en ambientes más cálidos. También encontré soporte para la regla de Gloger, la cual postula que colores más oscuros están asociados a ambientes más húmedos. Algunas explicaciones han sido propuestas para explicar los patrones de coloración de la regla de Gloger, una de ellas llamada la regla compleja de Gloger sugiere que tiene una función de camuflaje para reducir la detectabilidad (Zink & Remsen 1986; Endler 1993). Finalmente encontré soporte para una hipótesis poco explorada hasta el momento, donde se esperan plumajes más oscuros en sitios con mayor radiación UV-B, lo cual se ha propuesto como un mecanismo de protección contra los efectos negativos de la radiación solar UV (Galván et al. 2018). De manera adicional, algunos patrones de variación morfológica no relacionados a las reglas ecogeográficas, podrían sugerir procesos de adaptaciones a condiciones específicas a través del BTC. Por ejemplo, encontré alas y colas más largas a mayores altitudes, lo que se ha propuesto como un mecanismo de eficiencia de vuelo en condiciones de aire más desafiantes (Landmann et al. 1993; Maybury & Rayner

2001). Por último, alas más cortas en sitios más secos, lo que podría ser asociado una mejor maniobrabilidad en un sotobosque más intrincado (Rayner 1988), una característica típica de los BTCs en los sitios más secos, entre otros patrones.

Los resultados de este estudio concuerdan en cierta medida con los de Arbeláez et al. (2014a), quienes evaluaron la variación genética y morfológica de tres especies de aves distribuidas a lo largo de BTC del Pacífico mexicano, encontrando discontinuidades filogeográficas parcialmente congruentes a través de su distribución. Ambos estudios sugieren y concuerdan que la variación ambiental a través del BTC, así como el aislamiento por distancia son factores importantes en explicar la variación fenotípica y/o genética.

Este trabajo ayuda a entender cuáles son los factores que promueven la diferenciación genética y fenotípica a través del BTC. Como lo sugieren los análisis de redundancia, el efecto conjunto de la distancia geográfica y la variación ambiental explican la mayor proporción de la variación fenotípica. También, la variación genética es explicada por el efecto de las oscilaciones climáticas del Pleistoceno, y potencialmente por la presencia de cadenas montañosas cercanas a la costa que, aunque no crean distribuciones disyuntas, potencialmente pueden favorecer adaptaciones locales por las condiciones climáticas particulares. Por lo tanto, factores neutrales y selectivos parecen operar de manera conjunta en explicar la historia evolutiva de la especie, aunque probablemente la magnitud de estos efectos es distinta a lo largo de la distribución.

Implicaciones para la conservación

Estudios como el presente nos permite determinar cómo se encuentra estructurada la variación genética y fenotípica de una especie a diferentes escalas geográficas. Esto es

importante ya que permite determinar la presencia de linajes que están evolucionando de manera independiente a una escala geográfica amplia o local. También permite evaluar los niveles de diversidad genética a diferentes escalas, lo cual es importante para determinar si hay grupos genéticos o zonas donde la diversidad genética es menor y que potencialmente podría ser los más vulnerables. Adicionalmente el conocimiento de los factores que explican la estructura y diversidad genética de las especies, podrían utilizarse como herramientas para la conservación.

El estudio genético a escala del paisaje permitió determinar los elementos de un paisaje que limitan la conectividad genética para una especie abundante como lo es *Thryophilus sinaloa*. Es de esperar que los efectos de la transformación y fragmentación en la conectividad de los paisajes afecte aún más a especies raras. Programas gubernamentales que apoyen a agricultores y ganaderos para incrementar o conservar elementos del paisaje que promuevan la conectividad genética entre parches aislados del BTC, podría ser un esfuerzo prometedor para incrementar la conectividad entre áreas naturales protegidas y su entorno (Gil-Tena et al. 2014). También, con estos estudios se pueden priorizar áreas para la conservación en zonas donde la diversidad genética es alta pero también se pueden detectar áreas donde la diversidad se está perdiendo y debería conectarse con el resto para evitar extinciones locales. En este tipo de estudios sería importante incluir diferentes especies de distintos taxa con diferentes capacidades de dispersión, gremios, grados de especialización, etc, ya que cada especie puede ser afectada de manera distinta a la modificación del hábitat (e.g Amos et al. 2012). Los estudios comparativos, por lo tanto, pueden ayudar a identificar respuestas únicas o compartidas a la modificación del paisaje y brinda elementos para tomar

decisiones que promuevan la conservación integral del ecosistema y no de especies individuales.

De manera particular, en la zona de estudio, los resultados genéticos sugieren que la Reserva de la Biósfera de Chamela-Cuixmala está de cierta forma conectada con localidades situadas dentro de zonas fragmentadas de BTC al norte de la reserva. Sin embargo, dichas zonas están compuestas de bosque secundario, el cual se encuentra degradado y rodeado de pastizales para el ganado, por lo tanto, están en riesgo de desaparecer pronto. También, la RBCC está completamente desconectada de la Selva de Melaque, un área que aún alberga fragmentos continuos de BTC con una extensión considerable, pero que no se encuentran protegidos. Por lo tanto, sería importante aumentar la conectividad de entre la reserva, los fragmentos de BTC y la selva de Melaque mediante corredores biológicos. La vegetación riparia podría servir como corredores entre áreas aisladas (e.g. Gillies & Clair 2008; Burg & Adams 2016), sin embargo, se necesitan más estudios para diseñar dichos corredores.

A un nivel geográfico mayor, los resultados de estudios genéticos nos ayudan a identificar poblaciones genéticamente diferenciadas o linajes evolutivamente independientes, lo cual podría ser importante al momento de diseñar estrategias de conservación que permitan mantener la mayor diversidad genética de una especie (Funk et al. 2012). A mayor diversidad genética, las especies tienen mayor probabilidad de sobrevivir a cambios ambientales. Bajo un escenario futuro, se ha sugerido que los BTCs ocuparán áreas por arriba de su nivel altitudinal actual (Prieto-Torres et al. 2016) donde probablemente las condiciones ambientales serán distintas. Para que las poblaciones puedan adaptarse a las nuevas condiciones, serán necesarios niveles adecuados de variación genética. Por otro lado, las fluctuaciones de temperatura y precipitación pueden exceder los límites fisiológicos de

los organismos (Somero 2010; Parmesan 2006), lo cual puede llevar a disminución de poblaciones o la extinción (Urban 2015). La identificación de loci potencialmente adaptativos asociados al clima puede ayudar a predecir las repuestas de las especies a condiciones futuras (Bay et al. 2018) y ayudar a los esfuerzos de mitigación del cambio climático. Este estudio representa un primer paso para entender primero los factores que promueven la gran diversidad y endemismos de los BTCs del Pacífico mexicano, un ecosistema que ha sido poco estudiado y que hasta donde tengo conocimiento, es el primer estudio que aporta evidencia de la diferenciación genética y fenotípica desde una perspectiva neutral y selectiva del proceso evolutivo. Sin embargo, hace falta estudiar la relación de los loci outliers (potencialmente bajo selección) con las variables ambientales relevantes para la especie. Lo anterior podría ayudar a determinar cuáles poblaciones poseen variación genética con mayor probabilidad o capacidad de adaptarse a entornos que cambian rápidamente.

Los BTCs están altamente amenazados por actividades humanas (Miles et al. 2006), y por el cambio climático (Prieto-Torres et al. 2016), además de que poseen baja protección en áreas naturales protegidas (Sanchez-Azofeifa et al. 2013). Por lo tanto es de vital importancia poder hacer esfuerzos informados para ayudar a mitigar los efectos negativos y ayudar así a su conservación a largo plazo.

REFERENCIAS GENERALES

- Adams, R. V., & Burg, T. M. (2015a). Gene Flow of a Forest-Dependent Bird across a Fragmented Landscape. *Plos One*, 10(11), e0140938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140938>
- Adams, R. V., & Burg, T. M. (2015b). Influence of ecological and geological features on rangewide patterns of genetic structure in a widespread passerine. *Heredity*, 114(2), 143-154. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.64>
- Alda, F., Sastre, P., De La Cruz-Cardiel, P. J., & Doadrio, I. (2011). Population genetics of the endangered Cantabrian capercaillie in northern Spain. *Animal Conservation*, 14(3), 249-260. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2010.00425.x>
- Amos, J. N., Bennett, A. F., Mac Nally, R., Newell, G., Pavlova, A., Radford, J. Q., Sunnucks, P. (2012). Predicting Landscape-Genetic Consequences of Habitat Loss, Fragmentation and Mobility for Multiple Species of Woodland Birds. *Plos One*, 7(2), e30888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030888>
- Arbeláez-Cortés, E., Milá, B., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2014a). Multilocus analysis of intraspecific differentiation in three endemic bird species from the northern Neotropical dry forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 362-377. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.006>
- Arbeláez-Cortés, E., Roldán-Piña, D., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2014b). Multilocus phylogeography and morphology give insights into the recent evolution of a Mexican endemic songbird: *Vireo hypochryseus*. *Journal of Avian Biology*, 45(3), 253-263. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2013.00335.x>
- Arnoux, E., Eraud, C., Navarro, N., Tougard, C., Thomas, A., Cavallo, F., Garnier, S. (2014). Morphology and genetics reveal an intriguing pattern of differentiation at a very small geographic scale in a bird species, the forest thrush *Turdus lherminieri*. *Heredity*, 113(6), 514-525. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.56>
- Baird, S.F. (1864). Review of American birds, in the Museum of the Smithsonian Institution. Washington, Smithsonian Institution. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.7509>
- Bay, R. A., Harrigan, R. J., Le Underwood, V., Gibbs, H. L., Smith, T. B., & Ruegg, K. (2018). Genomic signals of selection predict climate-driven population declines in a migratory bird. *Science*, 359(6371), 83-86. <https://doi.org/10.1126/science.aan4380>

- Becerra, J. X. (2005). Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 10919-10923. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409127102>
- Berkman, L. K., Nielsen, C. K., Roy, C. L., & Heist, E. J. (2013). Population genetic structure among bobwhite in an agriculturally modified landscape. *Journal of Wildlife Management*, 77(7), 1472-1481. <https://doi.org/10.1002/jwmg.597>
- Bertrand, J. A. M., Bourgeois, Y. X. C., Delahaie, B., Duval, T., García-Jiménez, R., Cornuault, J., Thebaud, C. (2014). Extremely reduced dispersal and gene flow in an island bird. *Heredity*, 112(2), 190-196. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.91>
- Bradburd, G. S., Ralph, P. L., & Coop, G. M. (2013). Disentangling the effects of geographic and ecological isolation on genetic differentiation. *Evolution*, 67(11), 3258-3273. <https://doi.org/10.1111/evo.12193>
- Brewster, W (1889). Descriptions of supposed new birds from western North America and Mexico. *The Auk*, 1889(6): 85–98. <https://doi.org/10.2307/4067024>
- Bryson, R. W., de Oca, A. N. M., & Velasco, J. R. (2008). Phylogenetic position of *Porthidium hespere* (Viperidae: Crotalinae) and phylogeography of arid-adapted hognosed pitvipers based on mitochondrial DNA. *Copeia*(1), 172-178. <https://doi.org/10.1643/ch-07-043>
- Burri, R., Nater, A., Kawakami, T., Mugal, C. F., Olason, P. I., Smeds, L., Ellegren, H. (2015). Linked selection and recombination rate variation drive the evolution of the genomic landscape of differentiation across the speciation continuum of *Ficedula* flycatchers. *Genome Research*, 25(11), 1656-1665. <https://doi.org/10.1101/gr.196485.115>
- Cabanne, G. S., Trujillo-Arias, N., Calderon, L., d'Horta, F. M., & Miyaki, C. Y. (2014). Phenotypic evolution of an Atlantic Forest passerine (*Xiphorhynchus fuscus*): biogeographic and systematic implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(4), 1047-1066. <https://doi.org/10.1111/bij.12362>
- Ceballos, G., Martínez, L., García, A., Espinoza, E., & Bezaury, J. (2010). Áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico mexicano. *Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico de México*, 387-392.

- Chavarría-Pizarro, T., Gomez, J. P., Ungvari-Martin, J., Bay, R., Miyamoto, M. M., & Kimball, R. (2019). Strong phenotypic divergence in spite of low genetic structure in the endemic Mangrove Warbler subspecies (*Setophaga petechia xanthotera*) of Costa Rica. *Ecology and Evolution*, 9(24), 13902-13918. <https://doi.org/10.1002/ece3.5826>
- Cicero, C., & Koo, M. S. (2012). The role of niche divergence and phenotypic adaptation in promoting lineage diversification in the Sage Sparrow (*Artemisiospiza belli*, Aves: Emberizidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 107(2), 332-354. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01942.x>
- Colombelli-Negrel, D. (2016). Both natural selection and isolation by distance explain phenotypic divergence in bill size and body mass between South Australian little penguin colonies. *Ecology and Evolution*, 6(22), 7965-7975. <https://doi.org/10.1002/ece3.2516>
- Coop, G., Witonsky, D., Di Rienzo, A., & Pritchard, J. K. (2010). Using Environmental Correlations to Identify Loci Underlying Local Adaptation. *Genetics*, 185(4), 1411-1423. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.114819>
- Dickinson, E.C. (2003). The Howard & Moore complete checklist of the birds of the world. 3rd Edition. Princeton University Press, New Jersey.
- Devitt, T. J. (2006). Phylogeography of the Western Lyresnake (*Trimorphodon biscutatus*): testing aridland biogeographical hypotheses across the Nearctic-Neotropical transition. *Molecular Ecology*, 15(14), 4387-4407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03015.x>
- Doebeli, M., & Dieckmann, U. (2003). Speciation along environmental gradients. *Nature*, 421(6920), 259-264. <https://doi.org/10.1038/nature01274>
- Dyer, R. J. (2015). Is there such a thing as landscape genetics? *Molecular Ecology*, 24(14), 3518-3528. <https://doi.org/10.1111/mec.13249>
- Endler, J. A. (1993). The color of light in forests and its implications. *Ecological Monographs*, 63(1), 1-27. <https://doi.org/10.2307/2937121>
- Endler, J.A. (1977). Geographic variation, speciation and clines. *Monographs in Population Biology*, No. 10.

- Feder, J. L., Egan, S. P., & Nosil, P. (2012). The genomics of speciation-with-gene-flow. *Trends in Genetics*, 28(7), 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.009>
- Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126(2), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>
- Friis, G., Fandos, G., Zellmer, A. J., McCormack, J. E., Faircloth, B. C., & Milá, B. (2018). Genome-wide signals of drift and local adaptation during rapid lineage divergence in a songbird. *Molecular Ecology*, 27(24), 5137-5153. <https://doi.org/10.1111/mec.14946>
- Funk, W. C., McKay, J. K., Hohenlohe, P. A., Allendorf, F. W. (2012). Harnessing genomics for delineating conservation units. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(9), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.05.012>
- Galván, I., Jorge, A., Pacheco, C., Spencer, D., Halley, D. J., Itty, C., Negro, J. J. (2018). Solar and terrestrial radiations explain continental-scale variation in bird pigmentation. *Oecologia*, 188(3), 683-693. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4238-8>
- García-Marmolejo, G., Escalante, T., & Morrone, J. J. (2008). Establecimiento de prioridades para la conservación de mamíferos terrestres neotropicales de México. *Mastozoología neotropical*, 15(1), 41-65.
- González, C., Ornelas, J. F., & Gutiérrez-Rodríguez, C. (2011). Selection and geographic isolation influence hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evolutionary Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-38>
- Gordon, C. E., & Ornelas, J. F. (2000). Comparing endemism and habitat restriction in Mesoamerican tropical deciduous forest birds: implications for biodiversity conservation planning. *Bird Conservation International*, 10(4), 289-303. <https://doi.org/10.1017/s0959270900000241>
- Graham, B. A., Heath, D. D., Pulgarin, P. C., Walter, R. P., Mark, M., & Mennill, D. J. (2022). Habitat connectivity, gene flow, and population genetic structure in a Neotropical understory insectivore, the Rufous-and-white Wren. *Ornithology*, 139(4). <https://doi.org/10.1093/ornithology/ukac030>

- Grant, P. (1966). The coexistence of two wren species of the genus *Thryothorus*. *The Wilson Bulletin*, 266-278.
- Gruber, K., Schoning, C., Otte, M., Kinuthia, W., & Hasselmann, M. (2013). Distinct subspecies or phenotypic plasticity? Genetic and morphological differentiation of mountain honey bees in East Africa. *Ecology and Evolution*, 3(10), 3204-3218. <https://doi.org/10.1002/ece3.711>
- Haffer J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds: Most species probably originated in forest refuges during dry climate periods. *Science*, 165(3889): 131–137. <https://doi.org/10.1126/science.165.3889.131>
- Hansen, M. C., Stehman, S. V., & Potapov, P. V. (2010). Quantification of global gross forest cover loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19), 8650-8655. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912668107>
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913. <https://doi.org/10.1038/35016000>
- Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58(3), 247-276. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x>
- Holderegger, R., & Wagner, H. H. (2006). A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), 793-796. <https://doi.org/10.1007/s10980-005-6058-6>
- Jahner, J. P., Gibson, D., Weitzman, C. L., Blomberg, E. J., Sedinger, J. S., & Parchman, T. L. (2016). Fine-scale genetic structure among greater sage-grouse leks in central Nevada. *BMC Evolutionary Biology*, 16, 127. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0702-4>
- Khimoun, A., Eraud, C., Ollivier, A., Arnoux, E., Rocheteau, V., Bely, M., Garnier, S. (2016). Habitat specialization predicts genetic response to fragmentation in tropical birds. *Molecular Ecology*, 25(16), 3831-3844. <https://doi.org/10.1111/mec.13733>
- Khimoun, A., Peterman, W., Eraud, C., Faivre, B., Navarro, N., & Garnier, S. (2017). Landscape genetic analyses reveal fine-scale effects of forest fragmentation in an insular tropical bird. *Molecular Ecology*, 26(19), 4906-4919. <https://doi.org/10.1111/mec.14233>

- Kozakiewicz, C. P., Carver, S., & Burridge, C. P. (2018). Under-representation of avian studies in landscape genetics. *Ibis*, *160*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/ibi.12532>
- Landmann, A., & Winding, N. (1993). Niche segregation in high-altitude himalayan chats (aves, turdidae) - does morphology match ecology. *Oecologia*, *95*(4), 506-519. <https://doi.org/10.1007/bf00317435>
- Le Corre, V., & Kremer, A. (2012). The genetic differentiation at quantitative trait loci under local adaptation. *Molecular Ecology*, *21*(7), 1548-1566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05479.x>
- Licona-Vera, Y., Ornelas, J. F., Wethington, S., & Bryan, K. B. (2018). Pleistocene range expansions promote divergence with gene flow between migratory and sedentary populations of *Calothorax* hummingbirds. *Biological Journal of the Linnean Society*, *124*(4), 645-667. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/bly084>
- Lindsay, D. L., Barr, K. R., Lance, R. F., Tweddale, S. A., Hayden, T. J., & Leberg, P. L. (2008). Habitat fragmentation and genetic diversity of an endangered, migratory songbird, the golden-cheeked warbler (*Dendroica chrysoparia*). *Molecular Ecology*, *17*(9), 2122-2133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03673.x>
- Malpica, A., & Ornelas, J. F. (2014). Postglacial northward expansion and genetic differentiation between migratory and sedentary populations of the broad-tailed hummingbird (*Selasphorus platycercus*). *Molecular Ecology*, *23*(2), 435-452. <https://doi.org/10.1111/mec.12614>
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, *18*(4), 189-197. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(03\)00008-9](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(03)00008-9)
- Maybury, W. J., & Rayner, J. M. V. (2001). The avian tail reduces body parasite drag by controlling flow separation and vortex shedding. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, *268*(1474), 1405-1410. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1635>
- Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of species. New York, Columbia University Press.
- McRae, B. H. (2006). Isolation by resistance. *Evolution*, *60*(8), 1551-1561. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb00500.x>

- Milá, B., Smith, T. B., & Wayne, R. K. (2006). Postglacial population expansion drives the evolution of long-distance migration in a songbird. *Evolution*, 60(11), 2403-2409.
- Miles, L., Newton, A. C., DeFries, R. S., Ravilious, C., May, I., Blyth, S., Gordon, J. E. (2006). A global overview of the conservation status of tropical dry forests. *Journal of Biogeography*, 33(3), 491-505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01424.x>
- Mitchell-Olds, T., Willis, J. H., & Goldstein, D. B. (2007). Which evolutionary processes influence natural genetic variation for phenotypic traits? *Nature Reviews Genetics*, 8(11), 845-856. <https://doi.org/10.1038/nrg2207>
- Morán-Zenteno, D. J., Martiny, B., Tolson, G., Solís-Pichardo, G., Alba-Aldave, L., Hernández-Bernal, M. D. S., Macías-Romo, C., Martínez-Serrano, R. E., Schaaf, P. and Silva Romo, G. (2000). Geocronología y características geoquímicas de las rocas magmáticas terciarias de la Sierra Madre del Sur. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 53: 27–58.
- Moreira, L. R., Hernandez-Baños, B. E., & Smith, B. T. (2020). Spatial predictors of genomic and phenotypic variation differ in a lowland Middle American bird (*Icterus gularis*). *Molecular Ecology*, 29(16), 3085-3102. <https://doi.org/10.1111/mec.15536>
- Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K., & Grp, S. N. P. W. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(4), 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>
- Murphy, P.G., & Lugo, A.E. (1986). Ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 117: 67–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.17.110186.00043568>
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A. & Kent, j. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Nelson, E.W. (1903). Descriptions of new birds from southern Mexico. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 16, 151–160.
- Núñez-Zapata, J., Benites, P., Gutiérrez-Arellano, C., Ortíz-Ramírez, M. F., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2018). Local adaptation versus historical isolation as sources of

- melanin-based coloration in the white-throated thrush *Turdus assimilis*. *Journal of Avian Biology*, 49(9), UNSP e01790. <https://doi.org/10.1111/jav.01790>
- Orr, M. R., & Smith, T. B. (1998). Ecology and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(12), 502-506. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(98\)01511-0](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(98)01511-0)
- Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 37, 637-669. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110100>
- Pennington, R. T., Prado, D. E., & Pendry, C. A. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27(2), 261-273.
- Pfennig, D. W., Wund, M. A., Snell-Rood, E. C., Cruickshank, T., Schlichting, C. D., & Moczek, A. P. (2010). Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(8), 459-467. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.05.006>
- Phillips, A.R. (1986). The known birds of North and Middle America. Part I. Privately published, Denver Colorado.
- Pinsky, M. L., Worm, B., Fogarty, M. J., Sarmiento, J. L., & Levin, S. A. (2013). Marine Taxa Track Local Climate Velocities. *Science*, 341(6151), 1239-1242. <https://doi.org/10.1126/science.1239352>
- Portillo-Quintero, C. A., & Sánchez-Azofeifa, G. A. (2010). Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biological Conservation*, 143(1), 144-155. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.09.020>
- Prieto-Torres, D. A., Navarro-Sigüenza, A. G., Santiago-Alarcón, D., & Rojas-Soto, O. R. (2016). Response of the endangered tropical dry forests to climate change and the role of Mexican Protected Areas for their conservation. *Global Change Biology*, 22(1), 364-379. <https://doi.org/10.1111/gcb.13090>
- Prieto-Torres, D. A., Rojas-Soto, O. R., Santiago-Alarcón, D., Bonaccorso, E., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2019). Diversity, endemism, species turnover and relationships among avifauna of neotropical seasonally dry forests. *Ardeola-International Journal of Ornithology*, 66(2), 257-277. <https://doi.org/10.13157/arla.66.2.2019.ra1>

- Rausher, M. D., & Delph, L. F. (2015). Commentary: When does understanding phenotypic evolution require identification of the underlying genes? *Evolution*, *69*(7), 1655-1664. <https://doi.org/10.1111/evo.12687>
- Rayner, J. M. (1988). Form and function in avian flight. In *Current ornithology* (pp. 1-66). Springer.
- Rheindt, F. E., Szekely, T., Edwards, S. V., Lee, P. L. M., Burke, T., Kennerley, P. R., Kupper, C. (2011). Conflict between Genetic and Phenotypic Differentiation: The Evolutionary History of a 'Lost and Rediscovered' Shorebird. *Plos One*, *6*(11), e26995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026995>
- Ríos-Muñoz, C. A., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2012). Patterns of species richness and biogeographic regionalization of the avifaunas of the seasonally dry tropical forest in Mesoamerica. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, *47*(3), 171-182. <https://doi.org/10.1080/01650521.2012.734175>
- Rundle, H. D., & Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, *8*(3), 336-352. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x>
- Ridgway, R. (1904). The Birds of North and Middle America, Part III. Bulletin of the United States National Museum 50. Government Printing Office.
- Rzedowski, J. (2006) Vegetación de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, 504 pp.
- Samuk, K., Owens, G. L., Delmore, K. E., Miller, S. E., Rennison, D. J., & Schluter, D. (2017). Gene flow and selection interact to promote adaptive divergence in regions of low recombination. *Molecular Ecology*, *26*(17), 4378-4390. <https://doi.org/10.1111/mec.14226>
- Sánchez-Azofeifa, A., Powers, J. S., Fernandes, G. W., & Quesada, M. (2013). *Tropical dry forests in the Americas: ecology, conservation, and management*. CRC Press.
- Savolainen, O., Lascoux, M., & Merila, J. (2013). Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics*, *14*(11), 807-820. <https://doi.org/10.1038/nrg3522>
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(7), 372-380. [https://doi.org/10.1016/s0169-5347\(01\)02198-x](https://doi.org/10.1016/s0169-5347(01)02198-x)

- Schluter, D. (2009). Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science*, 323(5915), 737-741. <https://doi.org/10.1126/science.1160006>
- Schneider, C. J., Smith, T. B., Larison, B., & Moritz, C. (1999). A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: Ecological gradients vs. rainforest refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13869-13873. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13869>
- Sobel, J. M., Chen, G. F., Watt, L. R., & Schemske, D. W. (2010). The Biology of Speciation. *Evolution*, 64(2), 295-315. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00877.x>
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 912-920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Storfer, A., Murphy, M.A., Evans, J.S., Goldberg, C.S., Robinson, S., Spear, S.F., Dezzani, R., Demelle, E., Vierling, L., & Waits, L.P. (2007). Putting the “landscape” in landscape genetics. *Heredity*, 98(3), 128–142. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800917>
- Tan, D. J. X., Chattopadhyay, B., Garg, K. M., Cros, E., Ericson, P. G. P., Irestedt, M., & Rheindt, F. E. (2018). Novel genome and genome-wide SNPs reveal early fragmentation effects in an edge-tolerant songbird population across an urbanized tropical metropolis. *Scientific Reports*, 8, 12804. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31074-5>
- Thatte, P., Joshi, A., Vaidyanathan, S., Landguth, E., & Ramakrishnan, U. (2018). Maintaining tiger connectivity and minimizing extinction into the next century: Insights from landscape genetics and spatially-explicit simulations. *Biological Conservation*, 218, 181-191. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.12.022>
- Trejo, V. I. (1999). El clima de la selva baja caducifolia en México. *Investigaciones geográficas*. 40–52.
- Trejo, I., & Dirzo, R. (2000). Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation*, 94(2), 133-142. [https://doi.org/10.1016/s0006-3207\(99\)00188-3](https://doi.org/10.1016/s0006-3207(99)00188-3)

- Trejo, I., & Dirzo, R. (2002). Floristic diversity of Mexican seasonally dry tropical forests. *Biodiversity and Conservation*, 11(11), 2063-2084. <https://doi.org/10.1023/a:1020876316013>
- Toledo, V. M. (2005). Repensar la conservación: ¿áreas naturales protegidas o estrategia bioregional?. *Gaceta Ecológica*, 77, 67-83.
- Urban, M. C. (2015). Accelerating extinction risk from climate change. *Science*, 348(6234), 571-573. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4984>
- van Rees, C. B., Reed, J. M., Wilson, R. E., Underwood, J. G., & Sonsthagen, S. A. (2018). Landscape genetics identifies streams and drainage infrastructure as dispersal corridors for an endangered wetland bird. *Ecology and Evolution*, 8(16), 8328-8343. <https://doi.org/10.1002/ece3.4296>
- Vasconcellos, M. M., Colli, G. R., Weber, J. N., Ortíz, E. M., Rodrigues, M. T., & Cannatella, D. C. (2019). Isolation by instability: Historical climate change shapes population structure and genomic divergence of treefrogs in the Neotropical Cerrado savanna. *Molecular Ecology*, 28(7), 1748-1764. <https://doi.org/10.1111/mec.15045>
- Vogler, A. P. (2001). The genic view: a useful model of the process of speciation? Commentary. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(6), 876-877. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00360.x>
- Wang, I. J., & Bradburd, G. S. (2014). Isolation by environment. *Molecular Ecology*, 23(23), 5649-5662. <https://doi.org/10.1111/mec.12938>
- Weber, J. N., Bradburd, G. S., Stuart, Y. E., Stutz, W. E., & Bolnick, D. I. (2018). Partitioning the effects of isolation by distance, environment, and physical barriers on genomic divergence between parapatric threespine stickleback. *Evolution*, 72(8), 1736-1736. <https://doi.org/10.1111/evo.13545>
- Wright, S. (1943). Isolation by Distance. *Genetics*. 28, 114-138. <https://doi.org/10.1093/genetics/28.2.114>
- Zamudio, K. R., Bell, R. C., & Mason, N. A. (2016). Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8041-8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602237113>

- Zamudio-Beltrán, L. E., Ornelas, J. F., Malpica, A., & Hernandez-Baños, B. E. (2020). Genetic and morphological differentiation among populations of the Rivoli's Hummingbird (*Eugenes fulgens*) species complex (Aves: Trochilidae). *Auk*, *137*(4), ukaa032. <https://doi.org/10.1093/auk/ukaa032>
- Zink, R. M., & Remsen, J. V. (1986). Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. *Current Ornithology*, *4*, 1-69.

ANEXO

Artículo de divulgación

**¿Cómo surge una nueva especie?
El caso de las aves**

Publicado en: *Elementos* (2020) 19:24

¿Cómo surge una nueva especie?

El caso de las aves

Andreia Malpica
Clementina González

Las aves por siglos han fascinado al hombre, ya sea por sus hermosos cantos, sus colores llamativos, sus bailes de cortejo o por los increíbles viajes migratorios que realizan. Las aves han sido motivo de contemplación, admiración e intensa investigación científica. El estudio de las aves ha ayudado a desarrollar conceptos y teorías fundamentales en la biología, tales como la formación de nuevas especies durante el curso de la evolución (i.e., especiación).

Charles Darwin sentó las bases de la teoría evolutiva. Las observaciones que hizo durante uno de sus viajes, sobre el tamaño y forma del pico de los pinzones del archipiélago de las Galápagos, le ayudaron a entender mejor cuáles eran los factores que promovían la formación de nuevas especies. Darwin definió “evolución” como “descendencia con modificación”, proceso en que las poblaciones y las especies cambian a lo largo del tiempo y dan origen a nuevas especies, las cuales comparten un ancestro en común. El mecanismo que Darwin propuso para explicar este cambio es la selección natural. La idea básica de la selección natural es que los organismos que poseen rasgos que les ayudan a sobrevivir y, por lo tanto, reproducirse en un ambiente particular, dejarán más descendientes (los cuales heredarán a su vez los rasgos ventajosos a su descendencia) que los organismos que carecen de dichas características.

Se ha estimado que en el mundo hay alrededor de 10,800 especies de aves. La forma clásica de estimar el número de especies se ha basado en las diferencias de los patrones geográficos de rasgos morfológicos como el tamaño y la coloración del plumaje. Pero en sí, ¿qué es una especie? A lo largo del tiempo se han propuesto diferentes conceptos de especie como, por ejemplo, el biológico, el morfológico, el filogenético, el ecológico y el evolutivo, entre otros. Aunque cada concepto tiene una característica particular, todos ellos se refieren a las especies como linajes que evolucionan de manera independiente de otros. Hoy en día, la taxonomía integradora ofrece una visión completa para definir a las especies con múltiples tipos de evidencia como la morfología, la genética, la distribución y el comportamiento (Dayrat, 2005).

Al observar la diversidad de especies de aves en el mundo han surgido preguntas fundamentales como, por ejemplo: ¿por qué hay tantas especies?, ¿cómo se formaron?, ¿qué factores promueven la especiación? La especiación es un proceso fascinante y estudiarlo resulta complejo, ya que puede ser resultado de diferentes mecanismos que pueden interactuar en el tiempo y en el espacio. Por lo tanto, entender el papel que tiene cada mecanismo en el proceso de especiación es un campo de investigación muy activo. Particularmente en aves, los mecanismos que promueven la especiación mayormente estudiados son la presencia de barreras geográficas y cambios climáticos históricos, así como mecanismos biológicos como la divergencia ecológica (impulsada por la selección natural) y la selección sexual.

MODELOS DE ESPECIACIÓN

Se han propuesto diferentes modelos de especiación de acuerdo con la distribución geográfica de las poblaciones que conforman las especies. Los más importantes son: especiación alopátrica, parapátrica y simpátrica. Se ha sugerido que, en aves, la especiación alopátrica es la más común

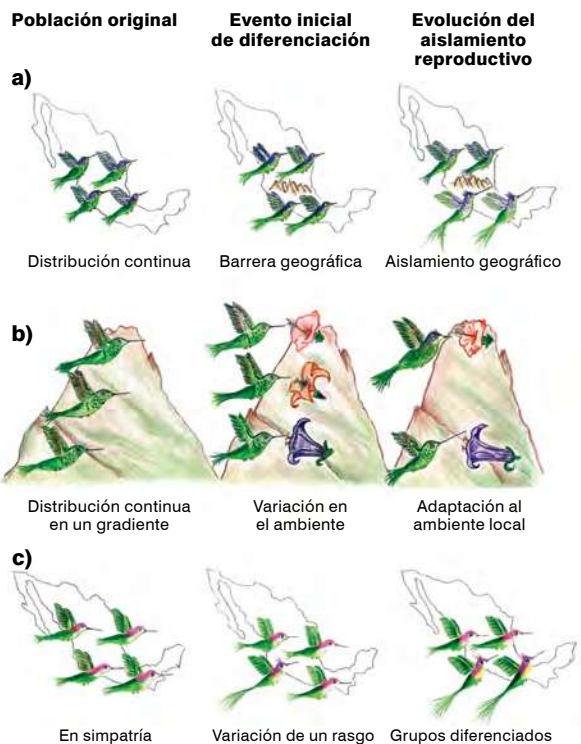


Figura 1. Modelos de especiación de acuerdo con la distribución geográfica de las especies: a) especiación alopátrica, b) especiación parapátrica, c) especiación simpátrica. Dibujos hechos por Martha Elena Mejía.

y la simpátrica la más rara (alrededor del 5 % de las especies estudiadas).

En la especiación alopátrica, la distribución originalmente continua de las poblaciones de una especie se fragmenta por distintos eventos como el surgimiento de una barrera geográfica (Figura 1a). Como consecuencia, las poblaciones se aíslan entre sí reduciéndose el flujo genético entre ellas y favoreciendo la acumulación de nuevas mutaciones genéticas. Con el paso del tiempo (miles o millones de años), se pueden acumular suficientes diferencias a nivel genético, morfológico (por ejemplo, el color del plumaje) y de comportamiento (por ejemplo, diferencias en los cantos) entre las poblaciones, que pueden promover la especiación.

La especiación parapátrica ocurre en poblaciones que tienen una distribución continua, pero con distintas condiciones ambientales (Figura 1b). Esto puede dar lugar a una “clina”, que es una variación gradual de los rasgos morfológicos en las poblaciones, debida a las adaptaciones a sus entornos

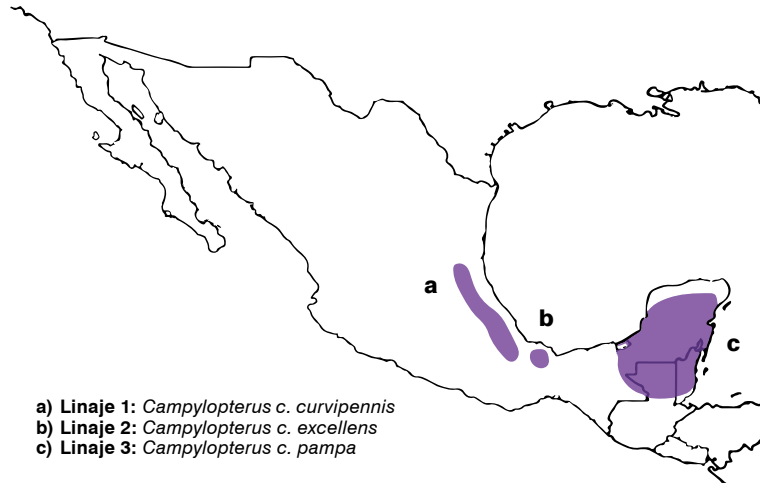


Figura 2. El papel de las barreras geográficas en promover la formación de nuevas especies. Se ilustra el caso del colibrí *Campylopterus curvipennis*, para el cual las barreras geográficas han promovido la diferenciación genética, morfológica y vocal entre linajes. Fotografía de Nataly Cruz.

particulares. Aunque hipotéticamente es posible que cualquier miembro de la especie se aparee con otro, en este caso los individuos tienden a aparearse con los de su propia área. Comparada con la especiación alopátrica, la especiación parapátrica ocurre en presencia de flujo genético entre las poblaciones. Sin embargo, la diferenciación y, finalmente, la especiación, ocurre si el efecto de la selección natural es más fuerte que el efecto del flujo genético de las poblaciones.

Finalmente, la especiación simpátrica (Figura 1c) ocurre en ausencia de barreras geográficas que impidan el apareamiento entre miembros de una especie y donde todos los individuos están en proximidad con otros. Se ha propuesto que lo que facilita la diferenciación entre los individuos, en este caso, es la especialización ecológica. Es decir, cuando en una población hay diferentes presiones que promueven que una población se adapte a dos características distintas, por ejemplo, a consumir semillas de distintos tamaños (ejemplo: individuos con picos grandes que pueden consumir semillas grandes e individuos de picos pequeños que pueden consumir semillas pequeñas), promoviendo gradualmente la diferenciación y finalmente la especiación. Este modelo de especiación ha sido debatido por décadas y se postula que unos pocos casos han ocurrido en las aves.

EL PAPEL DE LAS BARRERAS GEOGRÁFICAS

Las barreras geográficas, tales como montañas, ríos y valles juegan un papel muy importante en promover la formación de nuevas especies de aves a través de un modelo de especiación alopátrico. Un ejemplo es el caso del colibrí fandanguero (*Campylopterus curvipennis*), del que hay tres grandes poblaciones aisladas entre sí, las cuales se encuentran en la Sierra Madre Oriental, en la región de los Tuxtlas y en la Península de Yucatán (Figura 2). Mediante estudios genéticos, morfológicos y vocales, se ha documentado que estas tres poblaciones corresponden a distintos linajes genéticos separados por barreras geográficas (el Istmo de Tehuantepec y la planicie costera del Golfo de México), que se diferencian en morfología y cantos (González y cols., 2011). Los linajes de la Sierra Madre Oriental y los Tuxtlas están menos diferenciados entre sí que con respecto al de Yucatán. Mediante experimentos de reconocimiento vocal entre machos de los tres linajes, se encontró que los linajes menos diferenciados responden con mayor intensidad a sus cantos que con respecto al linaje más diferenciado, al que pueden no reconocer ya como un competidor potencial (Cruz-Yepez y cols., 2020). Esto sugiere que

estos linajes se encuentran en etapas tempranas del proceso de especiación.

EL PAPEL DE LOS CAMBIOS CLIMÁTICOS HISTÓRICOS

Otro mecanismo de especiación que ha sido ampliamente estudiado es el efecto de las glaciaciones climáticas del Pleistoceno. Durante el Pleistoceno hubo diferentes periodos glaciales (llamados también eras de hielo) e interglaciares (como el que estamos viviendo actualmente), que han tenido el efecto de aislar y reconectar a las poblaciones de muchos organismos. Por ejemplo, en Norteamérica, durante los periodos glaciales del Pleistoceno, algunas poblaciones de distintas especies se extinguieron, otras migraron hacia el sur, pero otras sobrevivieron en refugios aislados. El aislamiento restringió el flujo genético entre poblaciones de algunas especies promoviendo la diferenciación o incluso la especiación. Un estudio genético que estimó el tiempo en el que ocurrieron diferentes eventos de divergencia en especies de aves de bosques boreales, sub-boreales (de Estados Unidos y tierras altas del noreste de México) y tierras bajas del Neotrópico (desde el sureste de México al sureste de Bolivia), sugiere que el hábitat se fragmentó hace aproximadamente 1.2 a 0.6 millones de años como resultado de la glaciación del Pleistoceno. Esto promovió la especiación de una gran parte de las aves del Nuevo Mundo (Weir y Schluter, 2004).

DIVERGENCIA ECOLÓGICA IMPULSADA POR LA SELECCIÓN NATURAL

Se ha estudiado también el papel que tiene el ambiente en la formación de nuevas especies a través de la divergencia ecológica, que consiste en el aislamiento reproductivo entre poblaciones que habitan ambientes distintos. Adaptarse a ambientes distintos puede cambiar algunos rasgos de los individuos (morfológicos, conductuales, fisiológicos, etc.). Estos cambios pueden influir en qué tan

exitosos son los individuos para sobrevivir y reproducirse en su ambiente particular. Aquellos que no logran adaptarse a su ambiente, simplemente tienen menos probabilidades de sobrevivir y reproducirse. Un ejemplo de divergencia ecológica que sigue un modelo parapátrico es el caso del trepatroncos picocuña (*Glyphorynchus spirurus*; Figura 3), una especie que pertenece a un grupo de aves que, al igual que los carpinteros, se alimentan principalmente de insectos que cazan en los troncos de los árboles. Al estudiar las poblaciones de esta especie a lo largo de un gradiente altitudinal en los Andes ecuatorianos, se documentó que existía una relación entre el hábitat y algunas características de la especie (Milá y cols., 2009). Encontraron que a mayor altitud había mayor cantidad de musgo en la corteza de los árboles en comparación con altitudes menores; además, a ambos lados de la cordillera, el número de árboles difería. Las aves que habitaban altitudes mayores tenían patas más



Figura 3. *Glyphorynchus spirurus*, un ejemplo de divergencia ecológica impulsada por la selección natural. Fotografía de Borja Milá.

largas para poderse sostener del musgo más abundante de la corteza de los árboles y de esta manera ser más efectivas en la búsqueda de alimento. Las que habitaban en lugares donde la densidad de árboles era más abundante, tenían las alas más cortas, para poder maniobrar de manera más efectiva en ese ambiente. Sus análisis revelaron que las poblaciones no solo eran diferentes morfológicamente, sino también genéticamente, lo que sugiere estados tempranos de especiación.

EL PAPEL DE LA SELECCIÓN SEXUAL EN LA ESPECIACIÓN

La selección sexual explica la evolución de caracteres sexuales secundarios en los machos (que no están directamente relacionados con la reproducción), como los ornamentos en el plumaje, el color de las plumas, así como los cortejos y cantos elaborados. Algunos ejemplos impresionantes en que la selección sexual ha sido muy importante son las aves del paraíso, los manakins y los gallitos de las rocas. Los machos de estas especies han desarrollado complejos y llamativos bailes de cortejo, así como exuberantes y dramáticos plumajes que les sirven para atraer a las hembras (Figura 4), que a su vez seleccionan al macho con las características más llamativas como un reflejo de su calidad. Pero, ¿cuál es la relación entre la selección sexual y la formación de nuevas especies?

Si en una población surge un macho con un rasgo diferente al resto, que además es más atractivo para las hembras, a través de las generaciones ese rasgo podrá volverse más común en la población, hasta llegar a ser dominante. Con el tiempo, las poblaciones con machos de rasgos diferentes pueden diferenciarse genéticamente y, eventualmente, formar especies distintas, ya que las hembras se reproducirán con los machos de su propia población. Esto mismo podría ocurrir también dentro de una misma población (especiación simpátrica).

Un ejemplo clásico del papel de la selección sexual en la especiación simpátrica es el caso de las aves del género *Vidua*, que se distribuye en África, comúnmente llamados “viudas” (Sorenson y cols., 2003). Estas aves ponen sus huevos (parasitan) en los nidos de diferentes especies de aves (hospederos) y los polluelos son criados por los padres hospederos como si fueran suyos. Los machos jóvenes aprenden el canto de su padre hospedero y lo incorporan a su repertorio vocal. Las hembras usan, al menos en parte, estas señales para elegir parejas (selección sexual) e, incluso, el nido que van a parasitar (Balakrishnan y Sorenson, 2006). Si bien el aprendizaje e imitación de los cantos les ha permitido seleccionar hospederos particulares, también promueve el rápido aislamiento entre poblaciones. Aunque es raro, algunas veces las hembras ponen sus huevos



Figura 4. *Ceratopira mentalis* (a y b), comúnmente llamados manakins, ejemplo en que la selección sexual ha promovido la formación de nuevas especies. Fotografías de Clementina González (a) y Juan F. Escobar-Ibáñez (b).

en una nueva especie de hospedero y esto trae consecuencias interesantes. Si los polluelos sobreviven, los machos aprenderán el canto de la nueva especie y las hembras preferirán aparearse con los machos que imitan el canto de esta nueva especie. En una sola generación estarán reproductivamente aislados, promoviendo así la diferenciación entre individuos de una misma población que coinciden geográficamente.

En cualquier modelo de especiación es muy importante la evolución del aislamiento reproductivo. En aves, la divergencia en caracteres involucrados en la elección de pareja, tales como el canto o el plumaje, puede jugar un papel muy importante como barrera precopulatoria. Como consecuencia de la divergencia de estos caracteres, los individuos de distintas poblaciones pueden encontrarse, pero no reconocerse como parejas o competidores potenciales, lo cual puede conducir al aislamiento reproductivo y eventualmente a la especiación.

CONCLUSIÓN

Actualmente nos enfrentamos a un escenario de pérdida acelerada de biodiversidad. Estudiar y entender los diferentes factores que han promovido la especiación en aves y en cualquier otro grupo biológico es importante, ya que nos permite entender cómo se origina y mantiene la biodiversidad para proponer estrategias para conservarla. Es de particular interés entender de qué manera las presiones del ambiente afectan a las especies. En el caso de los trepatroncos, los científicos han podido detectar aquellos rasgos biológicos que han permitido la flexibilidad de adaptarse a condiciones ambientales distintas en un tiempo evolutivo relativamente corto. Algunas especies serán capaces de adaptarse a dichos cambios de manera exitosa, pero otras, menos afortunadas, se extinguirán rápidamente. Quizás estos estudios nos puedan dar pistas de lo que puede ocurrir en un futuro cambiante.

REFERENCIAS

- Balakrishnan CN and Sorenson MD (2006). Song discrimination suggests premating reproductive isolation among sympatric indigobirds species and host races. *Behav Ecol* 17(3):473-478.
- Cruz-Yepez N, González C and Ornelas JF (2020). Vocal recognition suggests premating isolation between lineages of lekking hummingbird. *Behav Ecol* 31(4):1046-1053.
- Dayrat B (2005). Towards integrative taxonomy. *Biol J Linn Soc* 85(3):407-415.
- González C, Ornelas JF and Gutiérrez-Rodríguez C (2011). Selection and geographical isolation influences hummingbird speciation: genetic, acoustic and morphological divergence in the wedge-tailed sabrewing (*Campylopterus curvipennis*). *BMC Evol Biol* 11:38.
- Milá B, Wayne RK and Smith TB (2009). Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorhynchus spirurus*, a Neotropical rainforest bird. *Mol Ecol* 18(14):2979-2995.
- Sorenson MD, Sefc KM and Payne RB (2003). Speciation by host switch in brood parasitic indigobirds. *Nature* 424(6951):928-931.
- Weir JT and Schluter D (2004). Ice sheets promote speciation in boreal birds. *Proc Roy Soc of London B* 271(1551):1881-1887.

Andreia Malpica
Clementina González
Instituto de Investigaciones sobre
los Recursos Naturales
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
andrea.malpica@gmail.com
clementina.gonzalez@umich.mx



© Enrique Soto. Museo Sarmiento de la Historia de la Medicina, Budapest, 2008.