

**EVOLUCION DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN AVES  
RAPACES DIURNAS (ACCIPITRIDAE)**



**María Fernanda Gómez Ahumada**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**Facultad de Ciencias**

**Departamento de Biología**

**2009**

**EVOLUCION DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN AVES  
RAPACES DIURNAS (ACCIPITRIDAE)**

**MARÍA FERNANDA GÓMEZ AHUMADA**

**APROBADO:**

---

**Manuel Ruiz García, Biólogo Phd.  
Director**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

---

**Jurado**

**EVOLUCION DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN AVES  
RAPACES DIURNAS (ACCIPITRIDAE)**

**MARÍA FERNANDA GÓMEZ AHUMADA**

**APROBADO:**

---

Decana Académica Facultad

---

Director de postgrado

**Artículo 23 de la Resolución N°13 de julio de 1996: "La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado".**

## **Agradecimientos**

Quiero dar un agradecimiento muy especial y sincero al Doctor Manuel Ruiz-García, gran maestro no solo en el ámbito de las ciencias sino también maestro de vida y quién gracias a su dedicación y paciencia permitieron el desarrollo de este trabajo. A la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca CAR, la cual aportó parte de los recursos económicos con los que se llevo a cabo este proyecto. Igualmente quiero dar un especial agradecimiento a la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana así como a mis compañeros de laboratorio, la Doctora Diana Álvarez, Pablo Escobar, María Martínez, María Ignacia Castillo y Magda Gaviria. Igualmente quiero agradecer a Francisco Yemail y Stella Ahumada que con su amor, amistad y sabiduría, se convirtieron en personas claves para el presente estudio.



## TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 Registro fósil, reloj molecular y tiempos de divergencia.....	11
2.2 Recuento histórico de la filogenia del grupo.....	14
2.3 Marcadores microsatélites.....	17
2.3.1 Mutación en los microsatélites.....	19
2.3.2 Amplificación de microsatélites.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo General.....	25
5.2 Objetivos Específicos.....	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
6.1 Especies de estudio y muestras.....	25
6.2 Marcadores utilizados.....	27
6.3 Cálculo de la distancia genética $\delta\mu^2$ y tasas de mutación.....	28
6.4 Relaciones dentro del grupo.....	29
6.5 Cálculo de tiempos de divergencia.....	29
6.6 Cálculo de las tasas de mutación para microsatélites.....	32
6.7 Análisis de constricción de los microsatélites: Garza et al. 1995.....	32
7. RESULTADOS.....	35
7.1 Descripción de los marcadores.....	35
7.2 Constricciones en los microsatélites (Garza et al. 1995).....	37
7.3 Relaciones dentro de Accipitridae a partir de marcadores microsatélites y comparación con respecto al <i>citocromo b</i> .....	42
7.4 Tiempos de divergencia a partir de las secuencias del gen <i>citocromo b</i> .....	45
8. DISCUSIÓN.....	51
8.1 Descripción de los marcadores.....	51
8.2 Constricciones en los microsatélites (Garza et al. 1995).....	54
8.3 Relaciones dentro de los Accipitridae a partir de marcadores microsatélites y comparación con las secuencias del <i>citocromo b</i> .....	58
8.4 Tiempos de divergencia.....	62
9. CONCLUSIONES.....	64
10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	65
11. REFERENCIAS.....	66
ANEXO A: Protocolos de extracción de ADN.....	76
ANEXO B: Protocolo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	77

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Subfamilias de Accipitridae.....	10
Tabla 2. Aparición de las aves rapaces a lo largo de las eras geológicas.....	13
Tabla 3. Aves rapaces amenazadas de Colombia .....	23
Tabla 4. Información de los individuos que fueron utilizados en los análisis .....	26
Tabla 5. Descripción de los ocho marcadores microsatélites utilizados .....	28
Tabla 6. Número de accesión en GenBank para el <i>citocromo b</i> .....	29
Tabla 7.1 Caracterización de los marcadores en las 21 especies analizadas.....	36
Tabla 7.2 Amplificación cruzada de los ocho marcadores analizados.....	36
Tabla 8. Presencia o no de amplificación y número de alelos por loci.....	37
Tabla 9. Valores de $\Delta$ por pares de especies.....	39
Tabla 10. Valores de $2N\beta$ por pares de especies.....	41
Tabla 11. Porcentaje de divergencia y tiempo de separación entre pares de especies de aves rapaces para el gen <i>citocromo b</i> .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cálculo de los tiempos de divergencia por pares de especies.....	30
Figura 2. Árbol consenso con la distancia genética de Cavalli-Sforza y el método de agrupamiento de NJ.....	43
Figura 3. Árbol consenso Cavalli-Sforza con UPGMA.....	44
Figura 4. Árbol consenso Cavalli-Sforza con NJ (con grupo externo).....	45
Figura 5. Reconstrucción de la filogenia de Accipitridae.....	50

## Resumen

Se analizaron representantes de subfamilias de accipítridos neotropicales disponibles en los zoológicos colombianos, incluyendo en su gran mayoría especies pertenecientes al grupo de los "buteoninos" y los "sub-buteos" (especies que no pertenecen al género *Buteo*) con ocho marcadores microsátélites heterólogos y se documentaron características de la evolución de dichos marcadores, con el fin de proveer entendimiento sobre sus tasas de mutación, posibles constricciones o sesgos y modelos evolutivos asociados a ellas. En términos generales se encontró que la estructura básica de los marcadores trabajados es altamente conservada y que los cambios en números de repeticiones evolucionan más lentamente que en otros grandes clados como los mamíferos, probablemente debido en parte, a sesgos o constricciones en el tamaño de los alelos. Una aproximación a las relaciones entre las especies del grupo reveló que aunque es posible diferenciar las grandes subfamilias, análisis más detallados son poco confiables, debido a la poca resolución de los marcadores microsátélites. Los tiempos de divergencia calculados en este trabajo, resultaron comparativamente menores a los reportados en otros estudios realizados en algunos miembros del grupo, como es el caso de *Buteo/Falco*.

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Accipitridae comprende 64 géneros y aproximadamente 237 especies de rapaces diurnas distribuidas por todo el mundo con excepción de la Antártida (Raposo do Amaral *et al.* 2006; Lerner & Mindell 2005), y con la mayor diversidad concentrada en el Neotrópico.

En el contexto nacional, Colombia es uno de los países con mayor diversidad de aves rapaces diurnas (Falconiformes) en el mundo, con 77 especies, ocho de las cuales se encuentran en algún grado de amenaza de acuerdo con Renjifo *et al.* (2002), pero aún la investigación y literatura existente sobre las aves rapaces de Colombia es muy poca, y existen aun grandes vacíos de información básica sobre su biología, ecología y genética. Es por ello, que este trabajo, intenta ser un incentivo para que muchos más investigadores, conservacionistas y/o tomadores de decisiones, conozcan y se interesen por el estudio de este grupo de aves.

La diversidad morfológica de los Accipitridae ha sido comúnmente representada en subgrupos de especies supuestamente muy cercanamente relacionadas, y que en su mayoría coinciden con las subfamilias propuestas tradicionalmente (Thiollay 1994); ver tabla 1. La familia Buteoninae está representada por el gran género cosmopolita de los *Buteo*, y muchos géneros relacionados, denominados subbuteoninos por Brown y Amadon (1968), los cuales incluyen predominantemente grupos Neotropicales: *Buteogallus*, *Parabuteo*, *Asturina*, *Leucopternis*, *Busarellus* y *Geranoaetus* (Raposo do Amaral *et al.* 2006). Sin embargo, una división formal de Accipitridae ha sido siempre problemática debido a la falta de conocimiento de la historia evolutiva de la familia (Raposo do Amaral *et al.* 2006).

Tabla 7. Subfamilias de Accipitridae en el Neotropico (según Lerner y Mindell 2005).

Subfamilia	Géneros neotropicales	Géneros utilizados en este trabajo
<b>Elaninae</b>	<i>Elanus</i> , <i>Gampsonyx</i>	<i>Elanus</i>
<b>Polyboroidinae</b>	<i>Geranospiza</i>	-
<b>Aquilinae</b>	<i>Spizaetus</i> , <i>Spizastur</i> , <i>Oroaetus</i> , <i>Aquila</i> *	<i>Spizaetus</i> , <i>Oroaetus</i>
<b>Accipitrinae</b>	<i>Accipiter</i> , <i>Heterospizias</i>	<i>Accipiter</i> , <i>Heterospizias</i>
<b>Circinae</b>	<i>Circus</i>	-
<b>Buteoninae</b>	<i>Buteo</i> , <i>Geranoaetus</i> , <i>Parabuteo</i> , <i>Buteogallus</i> , <i>Busarellus</i> , <i>Leucopternis</i> , <i>Asturina</i>	<i>Buteo</i> , <i>Buteogallus</i> , <i>Geranoaetus</i> , <i>Parabuteo</i> , <i>Asturina</i> (de nuevo dentro de <i>Buteo</i> )
<b>Harpiinae</b>	<i>Harpia</i> , <i>Morphnus</i> , <i>Harpyhaliaetus</i>	<i>Harpia</i>

\*Se menciona a pesar de no ser un género Neotropical, porque los marcadores heterólogos que se usaron en este estudio fueron diseñados para dicha especie.

Por su lado, los microsatélites son una poderosa herramienta para el estudio de la diversidad, estructura poblacional y sistemática de poblaciones de organismos (Nesje et al. 2002; Ellegren 1995). Dichos marcadores son selectivamente neutros, altamente polimórficos, codominantes (Hoelzel *et al.* 1998) y además se asume comúnmente que las diferencias entre los alelos de los loci microsatélites son debidas enteramente a cambios en el número de tándems de repetición (Garza et al. 1995). Sin embargo los procesos por los cuales los microsatélites mutan y por tanto evolucionan, no son claros y hasta hace relativamente poco se están empezando a estudiar en el grupo de las aves (Primmer & Ellegren 1998).

Teniendo como precedente la importancia del grupo mencionado y por otro lado el poder de los marcadores con repeticiones de secuencias simples (SSRs o microsatélites), este trabajo tiene como objetivo principal evaluar ocho marcadores heterólogos para hacer una revisión de algunos aspectos de la dinámica evolutiva de dichos marcadores.

Hasta ahora la información de los microsatélites, desde una perspectiva evolutiva, se ha obtenido a partir de estudios intraespecíficos o de especies intimamente relacionadas. Por tal motivo se hace necesario hacer estudios de este tipo a una escala más amplia (hablando en un contexto filogenético). En este trabajo se toma ventaja de la presunta conservación de los microsatélites escogidos para realizar un primer acercamiento hacia la evolución de tales marcadores en uno de los grupos más extensos de las rapaces diurnas (Accipitridae). Adicionalmente y aunque el objetivo central de este trabajo no es dilucidar las relaciones filogenéticas de las diferentes subfamilias de Accipitridae, se pretende también hacer una revisión de las relaciones dentro de la familia a partir de los resultados obtenidos con los marcadores microsatélites utilizados y compararlos con los resultados de filogenias realizadas a partir de otros marcadores nucleares y mitocondriales (Helbig *et al.* 2005; Lerner y Mindell 2005).

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Registro fósil, reloj molecular y tiempos de divergencia**

El tiempo de origen y diversificación de la aves modernas (Neornithes) ha sido calculado a partir de diferentes fuentes, como son los registros fósiles, datos biogeográficos y relojes moleculares (van Tuinen & Hedges, 2004). Algunos estudios basados en registros fósiles, sugieren que los órdenes de las aves modernas surgieron en el Terciario temprano (Feduccia 1995, 1999). Sin embargo, otros han planteado que la diversificación, al menos de los linajes basales, se dio en el Cretáceo, junto con la separación de los continentes (Cracraft, 2001). Los estudios moleculares han indicado también que los linajes a nivel de Orden o Superorden, se originaron en el Cretáceo (van Tuinen & Hedges, 2004).

Las aves rapaces son probablemente tan antiguas como las familias de aves más “primitivas” (ver figura 1), siendo el fósil más antiguo, un pequeño halcón de las islas británicas, que data del Eoceno temprano, hace unos 55 millones de años (Raposo *et al.* 2006).

Hay numerosos fósiles asignados al grupo de los falconiformes que incluyen especímenes del Eoceno medio, provenientes de Norte América y Europa. Tal es el caso de restos postcraniales incompletos del bajo Eoceno, encontrados en Reino Unido (Dyke & van Tuinen, 2004), y que fueron ubicados dentro del taxón *Parvigyps praececox*. Sin embargo, no existen análisis cladísticos que incluyan fósiles ni miembros recientes de los Falconiformes (Dyke & van Tuinen, 2004), ni hay indicios aún del origen geográfico del orden.

Hallazgos muy bien documentados, entre 30 y 50 millones de años de antigüedad son todos de Europa, solamente con hallazgos en el Nuevo Mundo a partir del Mioceno, hace aproximadamente 23 millones de años (Raposo *et al.* 2006). Los fósiles de aves de Suramérica son mucho menos significativos que los de Norteamérica o Europa, no solo debido a los pocos estudios en el área, sino porque las condiciones generales de humedad en el subcontinente pueden afectar el proceso de fosilización (Fabio Raposo com. pers.).

Una aparente incongruencia entre el grueso de los registros fósiles y la información genética disponible, ha causado un intenso debate sobre la utilidad de los datos de cada uno de estos estudios (Dyke & van Tuinen, 2004). Los fósiles más viejos pertenecen a formas no relacionadas con especies modernas, aunque el águila pescadora (*Pandion haliaetus*) ha estado presente hace más de 10 millones de años; la mayoría de los otros fósiles no son suficientemente confiables para ubicarlos dentro de géneros o para el uso de tiempos de divergencia (Heather Lerner com. pers.).

Cracraft J. (1969), menciona dos registros fósiles de accipítridos del Eoceno temprano y del Oligoceno tardío en Norteamérica. El primero representa el segundo registro más viejo de los Falconiformes y el más antiguo para los Accipitridae (una especie similar al actual *Rostrhamus sociabilis*). El último corresponde al parecer a una especie no identificada del género *Buteo* pero aproximadamente del mismo tamaño de *B. platypterus*.

Los accipítridos más antiguos son *Palaeocircus cuvieri*, *Aquilavus hypogaeus* y *A. corroyi*, todos de depósitos en Francia del Eoceno temprano (Cracraft J. 1969).

Debido a que el registro fósil de Accipitridae es bastante pobre, los datos de tiempos de divergencia han tenido que basarse en aproximaciones moleculares (Haring *et al.* 2001). Algunos datos moleculares están disponibles, aunque no necesariamente en particular, para el taxón bajo estudio.

Los falcónidos han sido reportados en 55 millones de años (del Hoyo *et al.* 1994) y 48 millones de años (Mayr 2006) de antigüedad, pero a partir de fósiles muy

fragmentados. Sin embargo, el primer fósil de falcónido bien documentado, fue descrito para el Eo-Oligoceno en Francia e Inglaterra (Mayr 2006).

Wink *et al.* (2004), analizó las diferencias genéticas entre 3 subespecies de águilas pescadoras (*Pandion haliaetus*), asumiendo un reloj molecular de 2% = 1 millón de años de divergencias (Tarr & Fleischer 1993; Wilson *et al.* 1987 en Wink *et al.* 2004); a partir de estos datos, se calcula que las subespecies divergieron hace 1 a 2 millones de años.

Haring *et al.* (2001) por su parte, indicaron que hubo una separación temprana entre Accipitridae y Falconidae, la cual de acuerdo con datos moleculares de tiempos de divergencia de otras aves, se asume que tuvo lugar en el Cretáceo tardío hace 65-83 millones de años.

MESOZOICO			CENOZOICO				
Triásico	Jurásico	Cretáceo	Terciario				Cuaternario
			Eoceno	Oligoceno	Mioceno	Plioceno	Pleistoceno
	Archeopteryx		Secretario	—————			
		Subfamilia	Buteoninae	—————			
			Gavilanes culebreros	—————			
			Águilas de Bosque	—————			
		Familia	Cathartidae	—————			
			Mejo Mundo	Nuevo Mundo	—————		
			Buitres del Mejo Mundo	—————			
			Genero Aquila	—————			
			Genero Buteo	—————			
			Genero Haliaetus	—————			
						Harpagomis	—————
						Teratomis meriani	—————

Fuente: <http://www.humboldt.org.co/chmcolombia/servicios/jsp/redes/rapaces/evolucion.htm>

Tabla 2. Aparición de los diferentes grupos de aves rapaces a lo largo de las eras geológicas

Los relojes moleculares pueden proporcionar elementos para definir el “calendario evolutivo” de grupos con registros fósiles sesgados o altamente fragmentados, como es el caso de las aves (Ericson *et al.* 2006).

En las aves modernas las probabilidades de encontrar registros fósiles completos o en buen estado son bastante bajas, debido a la ausencia de dientes, huesos

huecos, esqueleto frágil y los hábitats donde viven (van Tuinen & Hedge 2004). La mayoría de los fósiles usados para calibración de relojes moleculares de aves, tienen muchos vacíos filogenéticos, lo que puede conducir a tiempos de divergencia más antiguos de los reales (van Tuinen & Hedge 2004).

Considerando el estado actual del registro fósil de la Clase Aves, usar calibraciones muy internas para estudios moleculares, puede ser problemático y en algunos casos hay subestimaciones substanciales (van Tuinen & Hedge 2004).

Es por ello, que en estos casos es bastante ventajoso establecer “puntos de anclaje” internos, usando la mejor calibración fósil externa. De esta forma estos puntos de anclaje pueden ser usados para hacer calibraciones de tiempos de divergencia, más detalladas, dentro del grupo de estudio. Este método también evita sacar conclusiones sobre la evolución de un grupo, basados en datos de registros fósiles muy pobres (van Tuinen & Hedge 2004). A pesar del dilema de cómo calibrar relojes moleculares a partir de registros fósiles, muchas calibraciones internas han sido aplicadas en trabajos moleculares, especialmente para los órdenes Anseriformes y Galliformes (van Tuinen & Hedge 2001), sin embargo, ningún trabajo similar se ha realizado para el grupo de las rapaces diurnas (Falconiformes).

Por otro lado, las calibraciones externas proporcionan una alternativa razonable, ya que no están basadas en el registro fósil del grupo en cuestión, pero pueden acarrear también errores intrínsecos por la gran extrapolación (van Tuinen & Hedge 2004).

## **2.2 Recuento histórico de la filogenia del grupo**

Las rapaces diurnas evolucionaron temprano en la historia de las aves y hoy están representadas por varios grupos bien diferenciados. Estos grupos comparten muchas características pero también exhiben marcadas diferencias, generando la posibilidad de que la convergencia esté contando para al menos algunas de estas similitudes (Dyke & van Tuinen 2004).

Las relaciones filogenéticas entre el grupo de las aves rapaces (incluyendo búhos, halcones y águilas, buitres y gallinazos del viejo y el nuevo mundo y el “pájaro secretario”) ha sido bastante controversial. Por ello, los biólogos se han basado en la morfología, la citología, el registro fósil y las técnicas de biología molecular para dilucidar las relaciones entre estos grupos. Gracias a estas técnicas, se está revisando en los últimos años toda la sistemática de los vertebrados propuesta clásicamente a partir de caracteres morfológicos, estableciendo así, a partir del análisis de secuencias de ADN, árboles filogenéticos mucho más precisos. Por ejemplo, se ha revisado la filogenia de los falcónidos (Griffiths *et al.* 2004), toda la filogenia de las rapaces mediterráneas (Wink & Seibold, 1996), de las rapaces africanas (Wink & Sauer-Gurth, 2000), e incluso se realizó una revisión del 62% de todas las especies de rapaces diurnas (en su gran mayoría del Viejo Mundo) empleando ADN mitocondrial (Wink & Sauer-Gurth, 2004).

Sin embargo, la clasificación más utilizada por los ornitólogos hasta fechas relativamente recientes fue la propuesta por Alexander Wetmore (1960), quien durante muchas décadas de trabajo fue capaz de recopilar la información existente sobre anatomía, fisiología, ecología y distribución, además de aportar muchos datos producto de su propio trabajo con aves fósiles. Para Wetmore (1960), todas las rapaces diurnas se agrupaban en 5 familias de un solo orden (Falconiformes): Accipitridae, Pandionidae, Falconidae, Sagittariidae y Cathartidae.

Luego vinieron otros estudios como el de Brown y Amadon (1968) o Cracraft (1981), quienes siguiendo con la clasificación morfológica tradicional, agruparon de nuevo a los accipítridos y falcónidos dentro del Orden Falconiformes. Esta clasificación ha sido más o menos modificada como producto de investigaciones recientes, el uso de nuevos caracteres en el reconocimiento de grupos naturales y la aplicación de nuevos métodos de análisis de clasificación. Basado en estudios morfológicos más detallados, Jollie (1976,1977) concluyó, que el Orden Falconiformes es polifilético con respecto a la inclusión de los gallinazos del Nuevo Mundo (Cathartidae).

Cracraft (1981) por su lado, considera que los órdenes y familias actualmente más reconocidos de aves son probablemente monofiléticos; su innovación principal parece ser la segregación de la clase Aves en nueve categorías importantes, que él llama "Divisiones" y de hecho se toma como el aspecto más importante de su clasificación. Dentro de la "División 3", Cracraft (1981) incluye a los Ciconiformes y a los Falconiformes, el último incluyendo a los Strigiformes, los búhos. La ubicación de estos órdenes tan dispares en la misma división parece injustificable y, obviamente, no hay evidencia clara para ello. Su ubicación en la División 3 es tentativa e hipotética (Olson 1982). En este trabajo no se menciona ninguna sinapomorfia, y por tanto no se presenta ninguna evidencia que esta taxonomía sea monofilética. No es muy claro el por qué Cracraft (1981) cita a Ligon (1967) como apoyo para su visión de que los Ciconiiformes y Falconiformes tienen un vínculo estrecho. Ligon discutió una relación cercana solamente para los Ciconiidae y los Cathartidae, que él colocó en su propio orden (Ciconiiformes) aparte de las garzas (Ardeiformes) y las águilas (Accipitriiformes). Esto es totalmente contrario a lo que sugiere Cracraft, quien asegura que Ciconiiformes y Falconiformes son un grupo monofilético (Olson 1982).

Cuando los estudios basados en ADN, ARN y proteínas se esclarecieron y volvieron más populares, se hizo evidente que estas moléculas contienen información evolutiva potencial. Una nueva clasificación del grupo de las aves fue propuesta por Sibley y Ahlquist (1990) basados en análisis moleculares. Sibley y Ahlquist sorprendieron al mundo ornitológico cuando hicieron saber que sus estudios mediante hibridación de ADN indicaban que los catártidos y los buitres del Viejo Mundo son en realidad asombrosas formas convergentes, de linajes muy divergentes. Esta hipótesis está sustentada por varios estudios moleculares (Seibold & Helbig 1995; Wink *et al.* 1998). Pero fueron Sibley & Ahlquist (1990), quienes estimaron la similaridad genómica por medio de hibridaciones ADN-ADN, y propusieron una nueva clasificación de la Clase Aves, en la cual los gallinazos

del Nuevo Mundo aparecían cercanamente relacionados con las cigüeñas (Ciconiidae). De hecho, el estudio molecular más grande e importante realizado sobre cualquier grupo de vertebrados, fue aquel de Sibley y Ahlquist (1990) con aproximadamente 1700 especies de aves, representando todos los órdenes existentes; y este estudio formó una base para clasificación de las aves. Sin embargo, la aparentemente rápida y antigua diversificación de la mayoría de los órdenes de aves, complica la resolución de sus relaciones filogenéticas, al usar marcadores moleculares.

En su clasificación, los Falconiformes están ubicados dentro del Orden “expandido” de los Ciconiiformes, en el cual están incluidos los Infraordenes Falconides (familias Falconidae y Accipitridae) y Ciconiides (que incluye la Familia Ciconiidae con las subfamilias Cathartinae y Ciconiinae). Y aunque hay evidencia molecular que los gallinazos del mundo nuevo (Cathartidae) se desarrollaron del linaje de las cigüeñas, los Ciconiiformes (Sibley & Ahlquist 1990), también existen estudios bioquímicos y morfológicos que contradicen esta hipótesis (Griffiths 1994).

Análisis de secuencia del gen del *citocromo b* (Seibold y Helbig 1995; Wink *et al.* 1998), apoyan esta posición taxonómica para los gallinazos del Nuevo Mundo, pero las relaciones de los Ciconiidae con respecto a Accipitridae o Falconidae en general, no ha sido resuelta sin ambigüedades. Hasta ahora, ningún otro trabajo (ya sea con marcadores nucleares o mitocondriales) ha sido capaz de elucidar completamente las relaciones filogenéticas de estas familias (Haring *et al.* 2001).

De hecho la Unión Americana de Ornitólogos (AOU 1998, por sus siglas en inglés) reintegró recientemente a los gallinazos del nuevo mundo (familia Cathartidae) dentro de los Falconiformes en el 2007, yendo en contra de la tan apoyada taxonomía de Sibley-Ahlquist, y más a favor de los estudios morfológicos.

La familia Accipitridae representa un gran grupo de aves rapaces diurnas de distribución amplísima a lo largo del globo, aunque la mayoría de sus especies se encuentran en el Neotrópico. A pesar de su gran diversidad a nivel morfológico y ecológico, las relaciones evolutivas dentro de esta familia han sido pobremente estudiadas. La mayoría de estos estudios están basados en clasificaciones a partir de semejanzas morfológicas o ecológicas entre los taxa. Es por ello que la clasificación actual es de algún modo provisional para la mayoría de los grupos dentro de la familia y muchas veces no reflejan relaciones filogenéticas (Raposo *et al.* 2006).

Mindell y colaboradores presentaron en 1997 un análisis enfocado en las relaciones de la familia Accipitridae, con *Sagittarius* y *Falco* como grupos externos, usando los genes COI y 12S rADN. El resultado de los análisis fue bastante consistente con los estudios morfológicos previos (Brown & Amadon 1968; Olson 1982; Griffiths 1994), en cuanto a la ubicación de las diferentes especies, pero sorpresivamente encontraron que el águila pescadora, siempre considerada como una familia aparte (Pandionidae), se presentaba como el grupo hermano del género *Pernis*, una rapaz del viejo mundo.

Recientemente surgieron dos análisis filogenéticos de la mayoría de los géneros de Accipitridae, basados en secuencias de ADN de un único gen mitocondrial (Wink *et al.* 2004) y un segundo, basado en secuencias mitocondriales así como en secuencias de ADN nuclear (Lerner & Mindell 2005); las filogenias resultantes fueron substancialmente diferentes en cuanto a la composición y patrones de las ramas basales de los diferentes clados, razón por la cual se hace necesario realizar más análisis y confirmación.

Mindell y Lerner (2005), determinaron las relaciones filogenéticas dentro de las 14 subfamilias de Accipitridae, enfocados principalmente en las subfamilias del Viejo Mundo, usando secuencias de dos marcadores mitocondriales y uno nuclear. Aunque los datos difieren en muchos casos de las relaciones planteadas por los estudios tradicionales, se propuso este trabajo como modelo de las relaciones filogenéticas dentro de la familia y para calcular los tiempos de divergencia entre las especies, por ser el estudio más amplio y más reciente del grupo (ver figura 2, sección 6).

Dentro de los accipítridos, la filogenia de la subfamilia Buteoninae ha sido explorada parcialmente en los últimos años, usando tanto datos moleculares como morfológicos, sin embargo las especies neotropicales han estado subrepresentadas (Raposo *et al.* 2006) y aún se presentan muchas inconsistencias especialmente en la posición taxonómica de las especies *B. magnirostris*, *A. nitida*, y *G. melanoleucus* (Riesing *et al.* 2003)

El búho *Pulsatrix perspicillata* (Orden Strigiformes), fue utilizado como taxón externo en este trabajo. Es necesario aclarar que los Falconiformes no forman el grupo hermano de los Strigiformes, como había sido concluido a partir de los análisis cladísticos (Cracraft 1981). Al parecer los búhos se encuentran más cercanamente relacionados con los caprimúlidos, Orden Caprimulgiformes (Mindell *et al.* 1997). Dentro de los Strigiformes, la familia Strigidae incluye dos grandes clados, la subfamilia Tytoninae, que incluye 2 géneros y 10 especies, y la subfamilia Striginae, que comprende todo el resto de búhos y lechuzas conocidos (Mindell *et al.* 1997). La posición filogenética del género *Pulsatrix* dentro del orden no ha sido resuelta con claridad, sin embargo, se sabe que hace parte de la familia Strigidae, subfamilia Striginae.

### **2.3 Marcadores microsatélites**

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencias simples (SSRs) o repeticiones de tándems cortos (STRs), son repeticiones en tándem de unidades de secuencia generalmente de menos de 5 pb de longitud y cuyos alelos se pueden distinguir por su tamaño o longitud (Nauta & Weissing 1996). En estos alelos la mutación puede alterar el tamaño de los alelos, adicionando o eliminando una o más de las repeticiones (Nauta & Weissing 1996).

Los microsatélites poseen características sumamente ventajosas al ser selectivamente neutros, hipervariables y poseer alelos codominantes (Hoelzel *et al.* 1998). De igual manera, se ha podido determinar que cuando las secuencias flanqueantes del microsatélite se han mantenido sin cambios drásticos, los iniciadores (o primers) para un microsatélite sirven para los taxones cercanos (Hoelzel *et al.* 1998).

Otro rasgo muy conveniente de la utilización de microsatélites es que se pueden extraer muestras a partir de huesos, pelos y heces fecales, lo cual no es posible con otros métodos que existen, ya que el ADN resultante de la extracción no suele ser de muy alta calidad. Ruíz-García (2005), encontró que con la utilización de los microsatélites se puede encontrar una elevadísima cantidad de polimorfismo y de diversidad génica en estos marcadores.

Al utilizar microsatélites encontramos un alto número de polimorfismos, cualidad que permite cuantificar a partir de una docena o menos de loci microsatélites diferentes, las diferencias tanto dentro como entre las poblaciones que se analicen, o estudiar el grado de parentesco entre los individuos que se analizan dentro de cada grupo social (Wayne en Avise & Hamrick 1996).

La información de los microsatélites es propia de la especie y no tiene limitación de herencia por género como la tiene el ADN mitocondrial (mtADN). “El ADN nuclear es más sincero que el mtADN”, Ruíz-García (2005). El ADN nuclear no exagera los resultados obtenidos para efectos fundadores y cuellos de botella. Además estos marcadores pueden ofrecer estimaciones de números efectivos mucho mejores que las alozimas y permiten discriminar mucho mejor la cantidad de variabilidad genética perdida comparativamente entre dos o varias poblaciones, o especies (Ruíz-García 2005).

Desde el surgimiento de técnicas con marcadores genéticos basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los microsatélites se han convertido en la herramienta molecular de mayor elección en una amplia selección de estudios de diversidad genética (Primmer & Ellegren 1998). Sin embargo los esfuerzos para determinar los procesos por los cuales los microsatélites mutan y por tanto evolucionan, no son muy claros aún y hasta hace poco se están empezando a estudiar (Primmer & Ellegren 1998). Uno de los interrogantes centrales en esta área de investigación se refiere a si el proceso de mutación está mejor caracterizado por el modelo de los alelos infinitos (Nei 1973), el modelo de los k-alelos (Slatkin 1991) o el modelo de mutación stepwise (Slatkin 1995). Por ello, el desarrollo de modelos mutacionales apropiados es esencial para maximizar la información que se puede obtener a partir de datos de microsatélites (Primmer & Ellegren 1998).

Se ha sugerido que los microsatélites pueden ser usados para estudiar relaciones evolutivas entre grupos que han evolucionado independientemente por varios millones de años (Goldstein *et al.* 1995a). Sin embargo, estos marcadores poseen atributos que pueden limitar su utilidad en esta área; por ejemplo que el rango de

tamaño alélico dentro de un loci microsatélite puede ser angosto (Garza *et al.* 1995) y como consecuencia el potencial de divergencia genética es limitado (Richard & Thorpe 2001). A pesar de ello, los microsatélites han sido usados para reconstruir filogenias de especies y poblaciones en insectos y vertebrados (Richard & Thorpe 2001).

Recientemente ha surgido un gran interés en usar los datos de microsatélites para deducir relaciones filogenéticas. La mayoría de los estudios que con tales fines trabajaron a partir de datos de microsatélites lo han realizado por debajo del nivel de especie (Goldstein *et al.* 1999) o con especies recientemente diversificadas (Paetkau *et al.* 1997; Petren *et al.* 1999). En 1998 Streebman *et al.*, infirieron la filogenia de cíclidos basado en la secuencia de las regiones flanqueantes de marcadores microsatélites. En este caso, la secuencia repetitiva dinucleotídica, estaba embebida dentro de un intrón de un gen codificante de una proteína muy conservada. Sin embargo, la alta incidencia de homoplasia, que incrementa con la distancia evolutiva, reduce la confiabilidad de las hipótesis filogenéticas inferidas, comprometiendo la exactitud y la profundidad de las inferencias filogenéticas (Jarne & Lagoda 1996).

Es por ello que se hace necesario llevar a cabo más evaluaciones de datos microsatelitales para corroborar su utilidad, ya que las actuales relaciones filogenéticas están predominantemente reconstruidas a partir de datos de ADN mitocondrial (mtADN), y aunque en general, resuelven muy bien los árboles de genes, todo el mtADN corresponde a un mismo grupo de ligamiento (Richard & Thorpe 2001).

### **2.3.1 Mutación en los microsatélites**

Numerosos estudios que han calculado la tasa de mutación de los microsatélites en animales, han demostrado que esta tasa varía ampliamente entre especies, desde  $5 \times 10^{-6}$  en *Drosophila* hasta del orden de  $10^{-3}$  en humanos (Schug *et al.* 1997; Weber & Wong 1993; Schlotterer *et al.* 1998). Paralelamente estos estudios sugieren que las tasas de mutación también varían entre loci, dentro de la misma especie (di Rienzo *et al.* 1998) y que se incrementan con la longitud del loci (Primmer *et al.* 1996).

La tasa de mutación para los microsatélites es sin duda varios órdenes de magnitud más alta que para la substitución de nucleótidos en otras regiones de ADN no codificantes (Primmer & Ellegren 1998).

El mecanismo más aceptado de mutación de los microsatélites es el modelo de des-apareamiento de cadenas que se deslizan, "slipped-strand misparing", en el cual el reparamiento desalineado de las cadenas de ADN durante la replicación, debido al deslizamiento de la ADN polimerasa, resulta en la inserción o delección de una o más unidades de repetición (Beck *et al.* 2003).

Los estudios que se han realizado a partir de la observación de estos marcadores han planteado una serie de supuestos: que la ganancia de repeticiones es mayor que la pérdida, que la mayoría de las mutaciones son uni-step, aunque también puede ocurrir cambios de dos, tres y hasta cinco repeticiones, que la tasa de mutación puede variar entre sexos (Weber & Wong, 1993; Primmer *et al.* 2005) y que la tasa de mutación esta positivamente relacionada con el número de repeticiones (Primmer *et al.* 2005).

Los investigadores han propuesto muchas funciones para los loci microsatélites; por ejemplo, que pueden facilitar la recombinación, aumentar la actividad transcripcional de los genes o contribuir a la estructura del cromosoma a través de la condensación y empaquetamiento del ADN (Neef & Gross, 2001).

Algunos reportes indican que los microsatélites están asociados con genes reguladores, por ejemplo los microsatélites con motivo de repetición (CT)<sub>n</sub> en la región 5' UTR de ciertos genes de *Arabidopsis thaliana*, juegan un papel en la transcripción antisentido (Oliveira *et al.* 2006). Otros autores por su parte, han sugerido otras funciones para los microsatélites y han mostrado como repeticiones dinucleotídicas pueden actuar como puntos calientes de recombinación (Oliveira *et al.* 2006).

Una alternativa para el estudio de la evolución de los microsatélites, es analizar los resultados de mutaciones pasadas (Primmer & Ellegren 1998) mediante el análisis de los alelos dentro y entre especies, examinando detalladamente que cambios han surgido en el pasado. Esto permite análisis a nivel de polimorfismos intraespecíficos y también la observación de cómo la estructura de los cambios ha evolucionado a lo largo de la escala temporal (Primmer & Ellegren 1998). Estudios de este tipo (Garza & Freimer 1996; Jin *et al.* 1996) han confirmado que los cambios en la longitud de los alelos son debidos en su mayoría a alteraciones en las regiones de repetición; además que interrupciones en las secuencias repetidas reducen el polimorfismo y que la homoplasia es bastante común.

El surgimiento de los marcadores microsatélites proporcionó tanto ventajas, como riesgos; por ejemplo, a medida que el número y porcentaje de caracteres homoplásicos aumenta, así mismo se incrementa la probabilidad de error en los árboles fenéticos y filogenéticos resultantes.

Adicionalmente, a pesar del gran incremento en el uso de estos marcadores en diferentes áreas de la biología, es aún poco lo que se sabe de los procesos mutacionales (Garza *et al.* 1995). Los trabajos de Valdes *et al.* (1993), y Shriver *et al.* (1993) por ejemplo, fueron consistentes con el modelo de mutación stepwise, introducido por Ohta y Kimura (1973), en el cual hay un incremento (o decremento) en el tamaño de los microsatélites, debido a la ganancia (o pérdida) en un tándem de repetición (Garza *et al.* 1995). Luego Di Rienzo *et al.* (1994) mostraron como sus datos se ajustaban más a un modelo en el que la mayoría de mutaciones cambiaban el tamaño de los alelos por cambios en varias unidades de repetición (modelo de las 2 fases). Estos modelos asumen que no existe constricción en el

tamaño de los alelos y como consecuencia, la diferencia en el número promedio de tándems de repetición, en poblaciones o especies reproductivamente aisladas, tiende a incrementar sin límites en una tasa que es proporcional a su tiempo de separación (Garza *et al.* 1995; Goldstein *et al.* 1995; Slatkin 1995), pero siempre surgen los interrogantes sobre los mecanismos que controlan los límites en el tamaño de los alelos de los microsatélites.

### 2.3.2 Amplificación de microsatélites

Una de las limitantes más fuertes del trabajo con microsatélites, es la inexistencia de primers universales que puedan amplificar exitosamente loci en un amplio rango de especies (Primmer *et al.* 2005). Pero aunque estos primers no se pueden usar universalmente, un cierto nivel de amplificación entre especies cercanamente relacionadas es posible (Primmer *et al.* 2005), de hecho, esta amplificación cruzada de especies ha tenido tan buenos resultados, que ha sido usada en diversos estudios de genética evolutiva (Nesje & Roed 2000; Topinka & May 2004; Busch *et al.* 2005).

Mutaciones en las regiones de anillamiento de uno o de los dos primers microsatelitales puede inhibir el anillamiento de los mismos y puede resultar en la reducción o pérdida del producto de PCR (Callen *et al.* 1993). Los alelos nulos pueden manifestarse como un menor porcentaje de heterocigotos que lo esperado si la población tiene apareamiento al azar y por la aparición de “carriles vacíos” en el gel (Morgante *et al.* 1998). El uso de primers heterólogos hace más probable que incremente la incidencia de alelos nulos. En estudios con primers heterólogos es más probable que a medida que la distancia entre los taxa aumente, también así la aparición de alelos nulos (Morgante *et al.* 1998).

Alternativamente, los microsatélites pueden ser usados en grupos congénéricos de aves para determinar las relaciones entre especies. Los datos de microsatélites pueden proveer evidencia muy útil a la hora de toma de decisiones para la conservación, a nivel de especies o incluso por encima de este nivel (Mindell *et al.* 1997).

Otros estudios han determinado amplificación de microsatélites con primers heterólogos, aunque la mayoría de los estudios con microsatélites se han centrado en un solo taxón, aquel para el cual el primer ha sido diseñado. La razón para ello parece ser la percepción de la inhabilidad de los primer microsatelitales para amplificar en otras especies diferentes a aquella para la cual fueron tipificados. Sin embargo, algunos estudios han indicado que los primers microsatelitales pueden amplificar la misma región microsatelital en taxones altamente emparentados (Robinson y Harris 1999); tal es el caso de Topinka y May (2004) quienes trabajaron con amplificación cruzada de microsatélites diseñados para *Accipiter gentilis*, en diferentes especies de rapaces; así como el trabajo de Busch *et al.* (2005) con microsatélites aplicados en los géneros del Viejo Mundo *Aquila* y *Haliaeetus*.

El grado de amplificaciones cruzadas de especies parece estar correlacionado con la distancia taxonómica y el conocimiento de que algunos loci amplifican con primers heterólogos ha estimulado algunos estudios filogenéticos (Robinson y Harris 1999).

La naturaleza de la evolución de los microsatélites es dependiente de las escalas temporales y taxonómicas, y alguna variación se conserva a través de los diferentes niveles taxonomicos a pesar de las altas tasas de mutación que presentan estos loci (Ross *et al.* 2003).

Dada la importancia biológica de estos loci, las fuerzas de selección pueden también afectar los tamaños alélicos. Ya que este proceso puede ser de importancia considerable en los organismos, se puede esperar que especies cercanamente relacionadas exhiban patrones similares de variación en los microsatélites (Ross *et al.* 2003).

La variación en el tamaño de los alelos dentro y entre especies puede tener importantes implicaciones. El tamaño de los alelos puede ser influenciado por las tasas de slippage de la polimerasa, tamaño efectivo de la población (Slatkin 1995), estructura y tamaño del genoma (Hancock 1996) y selección por tamaño como tal (Garza *et al.* 1995; Ross *et al.* 2003).

Las diferencias en el tamaño de los alelos microsatelitales entre los grupos taxonómicos más altos pueden ser explicadas por varios procesos. Los patrones microsatelitales pueden evolucionar muy lenta y constantemente a través del tiempo de modo que la mayoría o todas la especies dentro de un grupo taxonómico en particular pueden poseer patrones similares (Ross *et al.* 2003).

La selección purificadora predice una correlación positiva entre la tasa de mutación y los niveles de variación genética, aún en marcadores con altas tasas de mutación como los microsatélites (Payseur y Nachman 2000). Sin embargo, los resultados obtenidos por Payseur y Nachman (2000) demostraron que la variación en las tasas de recombinación no está fuertemente asociada con la variación en los polimorfismos de los loci microsatélites en humanos.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Entender los procesos mutacionales de los marcadores moleculares es esencial cuando se trabaja con variación genética, distancias genéticas o estructuras poblacionales. La utilidad de los tándems de repetición en los microsatélites para hacer inferencias sobre los procesos mutacionales de los mismos repercute además en un mayor entendimiento de la diversidad genética de las especies.

Aunque la variación en los microsátélites ha sido bien caracterizada dentro de especies y entre taxa altas, ha habido muy pocos estudios comparativos de los patrones de variación de los microsátélites en especies estrechamente relacionadas. Tales aproximaciones proveerían conocimiento sobre la estabilidad de los procesos mutacionales y/o selectivos, que actúan sobre los genomas en periodos de tiempo relativamente cortos. Recientemente, se ha generado muchísimo interés en entender y mejorar el conocimiento que se tiene sobre los procesos evolutivos de los microsátélites. Hasta ahora la mayoría de la información generada sobre la dinámica de la evolución de los microsátélites proviene de estudios intraespecíficos o de especies cercanamente relacionadas, pero se podría obtener una perspectiva más amplia, a partir de trabajos con contextos filogenéticos a una escala mayor (Zhu *et al.* 2000).

Es por eso que en este trabajo se parte de la hipótesis de que los sitios de anillaje de los microsátélites seleccionados son lo suficientemente conservados como para observar la evolución de estos marcadores a través de todo el grupo Accipitridae, la familia más amplia dentro de los Falconiformes y representada en este estudio por 21 especies.

Otro aspecto importante que sustenta el trabajar con este grupo de aves es su actual condición de amenazas y riesgos. Estudios previos sugieren que el 90% de todas las especies de rapaces se encuentran total o parcialmente en los trópicos (Kennedy 1986; Bildstein *et al.* 1998). Sin embargo, la mayoría de las rapaces tropicales, especialmente aquellas especies de interior de bosque, son muy difíciles de estudiar y más aún de muestrear. Además la distribución, estado de conservación (Kennedy 1986; Thiollay 1994; Bildstein *et al.* 1998) y filogenia de la mayoría de las especies es poco conocida. De hecho cuatro especies águilas, incluida la harpía, se encuentran listadas como especies de alta prioridad (Lerner y Mindell 2005).

La mayor amenaza para las rapaces tropicales es la destrucción de hábitat (Thiollay 1994), la contaminación ambiental o la cacería y casi la mitad de las rapaces neotropicales están amenazadas por pérdida de su hábitat o por una combinación de los factores mencionados (Bildstein *et al.* 1998). En Colombia hay al menos seis de esas especies (ver tabla 2).

Tabla 3. Aves rapaces amenazadas de Colombia

Especie	Status de conservación	Ecosistemas donde se encuentra
<b>Orden ACCIPITRIDAE</b>		
<b><i>Accipiter collaris</i></b>	<b>NT</b>	<b>Bosque subtropical o de niebla</b>
<i>Leucopternis plumbea</i>	NT	Bosques húmedos
<i>Harpyhaliaetus solitarius</i>	EN	Bosques de niebla
<b><i>Spizaetus isidori</i></b>	<b>EN</b>	<b>Piedemontes y bosques de niebla</b>
<i>Morphnus guianensis</i>	NT	Bosques húmedos
<b><i>Harpia harpyja</i></b>	<b>NT</b>	<b>Bosques húmedos</b>

**EN:** En peligro, según Renjifo *et al.* 2002

**NT:** Casi amenazada (BirdLife-International 2000, Renjifo *et al.* 2002 y Collar *et al.* 1994)

Recientemente muchos biólogos conservacionistas han sugerido que cuando se deban tomar decisiones sobre qué especies proteger, los esfuerzos deben estar dirigidos hacia las especies que tengan la mayor “diversidad filogenética” (Bildstein *et al.* 1998).

Adicionalmente, el principal objetivo en un programa de conservación de animales en centros de atención y valoración, centros de rehabilitación o incluso en zoológicos, es el “mantenimiento de la máxima cantidad de diversidad genética con el mínimo incremento posible de consanguinidad por generación” (Aranguren-Méndez *et al.* 2001). Para ello, una de las primeras etapas de un programa de este estilo consiste en la evaluación de su variabilidad genética y la distribución de ésta entre sus poblaciones, así como la posible detección de alelos raros que nos indiquen la presencia de variantes genéticas únicas, claro está, teniendo en cuenta la proveniencia de los ejemplares y su distribución geográfica.

Todo aquello se puede lograr a partir de la caracterización del perfil genético de los animales muestreados, y dadas las cualidades ya mencionadas de los microsatélites, éstos pueden ser un buen ejemplo del marcador de elección para tales estudios. Este trabajo puede ser un preámbulo de futuros programas de conservación ya que presenta una metodología fácil y eficaz para caracterizar marcadores microsatélites, que luego servirán para determinar el grado de diversidad genética de poblaciones de este grupo taxonómico, ya sea para apareamiento en cautiverio o para animales que estén en proceso de reintroducción a su hábitat natural.

#### **4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

¿Existe sesgo o restricción del tamaño de los alelos en los microsatélites analizados?

¿Existe correspondencia entre las tasas de divergencia calculadas a partir de marcadores moleculares de diferente naturaleza?

**¿Cuáles son las tasas de mutación de los microsatélites analizados y como se comportan en relación con otros grupos de vertebrados?**

¿Corresponden los fenogramas generados a partir de microsatélites con los análisis filogenéticos a partir de marcadores mitocondriales?

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Analizar características de la evolución de microsatélites heterólogos en algunas especies de aves rapaces diurnas (Accipitridae) con el fin de ampliar el conocimiento sobre la historia evolutiva de los marcadores en estas aves.

### 5.2. Objetivos Específicos

1. Recalcular los tiempos de divergencia de algunas de las especies en estudio, a partir tanto de marcadores microsatélites como de *citocromo b* (según datos de Lerner y Mindell 2005), estimando las tasas de mutación de los microsatélites analizados.
2. Comparar las topografías de los árboles obtenidos por Lerner y Mindell 2005, con aquellas obtenidas a partir de la distancia genética  $\delta\mu^2$  (a partir de la metodología de Goldstein *et al.* 1995)
3. Determinar si existe constricción del tamaño de los alelos hacia un tamaño “target” en los microsatélites analizados
4. Estimar el grado de sesgo existente en las tasas de mutación de los microsatélites analizados.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Especies de estudio y muestras

Se analizaron un total de 66 muestras provenientes de diferentes zoológicos, museos y colecciones privadas<sup>1-2</sup> del país. Las muestras obtenidas fueron de tejido muscular (mantenido en alcohol al 90%), manchas de sangre y/o sangre total, transportados el mismo día de la colecta y mantenidos en refrigeración a 4 grados centígrados. No se obtuvieron datos de localidades ya que en la gran mayoría de las muestras provienen de individuos decomisados.

Los detalles de las extracciones de ADN y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se encuentran en los Anexos A y B.

Los individuos muestreados fueron proporcionados por: Zoológico de Piscilago (Caja de Compensación Colsubsidio), Zoológico de Matecaña (Pereira), Zoológico de Cali, Bioparque Los Ocarros (Villavicencio), Zoológico Santa Fe (Medellín), Zoológico de Barranquilla y Zoológico de Santa Cruz; el Centro de Rehabilitación de Aves Rapaces de Villeta (César Márquez)<sup>1</sup>; Centro de Rehabilitación de Aves Rapaces “San Isidro” en Pereira (Alex Ospina<sup>2</sup>); la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) de la Universidad Nacional de

Colombia y la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca, CAR (Represa del Neusa).

El total de las especies analizadas, números muestrales, tipo de muestras, código de identificación de la entidad y procedencia se encuentran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 4. Información de los individuos que fueron utilizados para los análisis

<b>Código</b>	<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>Muestra</b>	<b>Origen de la muestra</b>
Pa009	<i>Accipiter sp.</i> **	Accipitridae	Sangre	Zoo. Piscilago
ACZ792	<i>Asturina nitida (B. nitidus)</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Matecaña
AO-1	<i>Buteo albicaudatus</i>	Accipitridae	Sangre	Alex Ospina
AO-2	<i>Buteo albicaudatus</i>	Accipitridae	Sangre	Alex Ospina
AO-5	<i>Buteo brachyurus</i>	Accipitridae	Sangre	Alex Ospina
AO-7	<i>Buteo brachyurus</i>	Accipitridae	Sangre	Alex Ospina
Oc09	<i>Buteo sp.</i> ***	Accipitridae	Sangre	Zoo. Ocarros
ACZ6	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Cali
ACZ7	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Cali
ACZ8	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Cali
Oc15	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Ocarros
SC26	<i>Buteo magnirostris</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Sta. Cruz
ACZ004	<i>Buteo platypterus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ007	<i>Buteo platypterus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Cali
SC25	<i>Buteo platypterus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Sta. Cruz
ACZ005	<i>Buteo swainsonii</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Cali
ACZ734	<i>Buteogallus anthracinus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ009	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Cali
ACZ646	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ885	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Matecaña
CAR76	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	CAR
CAR77	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	CAR
Pg001	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Piscilago
Pg002	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Piscilago
Pg003	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Piscilago
SC21	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Sta. Cruz
SC22	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Sta. Cruz
SC23	<i>Geranoaetus melanoleucus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Sta. Cruz
ICN81	<i>Harpia harpyja</i>	Accipitridae	Músculo	ICN
SF03	<i>Harpia harpyja</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Sta. Fé
ACZ1010	<i>Heterospizias meridionalis</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Matecaña
Oc08	<i>Heterospizias meridionalis</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Ocarros
Oc13	<i>Spizaetus isidori</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Ocarros
U20	<i>Spizaetus isidori</i>	Accipitridae	Sangre	URRAS
ICN78	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Accipitridae	Sangre	URRAS
CM15-o	<i>Spizaetus ornatus</i>	Accipitridae	Sangre	César Márquez
CM15-v	<i>Spizaetus ornatus</i>	Accipitridae	Sangre	César Márquez
B001	<i>Spizaetus ornatus</i>	Accipitridae	Sangre	Zoo. Barranquilla
U30	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Accipitridae	Sangre	URRAS

AO-3	<i>Parabuteo unicinctus</i>	Accipitridae	Sangre	Alex Ospina
U32	<i>Elanus leucurus</i>	Accipitridae	Sangre	URRAS
U28	<i>Pandion haliaetus</i>	Pandionidae	Músculo	URRAS
U29	<i>Pandion haliaetus</i>	Pandionidae	Músculo	URRAS
ACZ006	<i>Pandion haliaetus</i>	Pandionidae	Sangre	Zoo. Cali
ACZ1494	<i>Milvago chimachima</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ314	<i>Milvago chimachima</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Matecaña
CM8m	<i>Falco femoralis</i>	Falconidae	Sangre	César Márquez
CM8h	<i>Falco femoralis</i>	Falconidae	Sangre	César Márquez
ACZ008	<i>Falco peregrinus</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Cali
ACZ60	<i>Falco peregrinus</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Matecaña
AO-6	<i>Falco peregrinus</i>	Falconidae	Sangre	Alex Ospina
SF02*	<i>Falco sparverius</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Sta. Fé
ACZ1015*	<i>Polyborus plancus</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ1047*	<i>Polyborus plancus</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Matecaña
SF06*	<i>Polyborus plancus</i>	Falconidae	Sangre	Zoo. Sta. Fé
ACZ66	<i>Sarcoramphus papa</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Matecaña
Oc03	<i>Sarcoramphus papa</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Ocarros
ACZ1*	<i>Coragyps atratus</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ2*	<i>Coragyps atratus</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ001*	<i>Vultur gryphus</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Cali
ACZ002*	<i>Vultur gryphus</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Matecaña
ACZ003*	<i>Vultur gryphus</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Matecaña
SF04*	<i>Vultur gryphus</i>	Cathartidae	Sangre	Zoo. Sta. Fé
ACZ671	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	Strigidae	Sangre	Zoo. Matecaña

\*Muestras que no amplificaron y que fueron descartadas de los análisis

\*\* Especie no identificada; se presume *Accipiter bicolor*

\*\*\* Especie no identificada con precisión; se presume *Buteo brachyurus*

## 6.2. Marcadores utilizados

Cuando se diseñan nuevos marcadores, siempre se genera una fuerte selección hacia la escogencias de los más polimórficos. En nuestro caso, se hizo lo propio para los microsatélites más polimórficos de la especie para la cual fueron diseñados los marcadores (especie focal).

Las muestras de las 21 especies se analizaron con ocho marcadores microsatélites (SSRs) de ADN nuclear (Aa02, Aa04, Aa12, Aa15, Aa36, Aa50, Aa53 y Aa56) que fueron desarrollados para la especie focal *Aquila adalberti* en el trabajo doctoral de Martínez-Cruz *et al.* 2002; las características de tales marcadores dieloneotídicos, sus motivos de repetición y secuencias de anillamiento pueden observarse en la Tabla 4.

Tabla 5. Descripción de los ocho marcadores microsatélites utilizados en este trabajo

Marcador	Motivo de repetición	Primer adelante	Primer atrás
Aa02	(GT)19	5'-CTGCAGATTTACCTGTTCTG-3'	5'-CTTCCAGGTCTTGCAAGTTTACC-3'
Aa04	(GT)12	5'-TGCAGCTCAAAGCAAAGG-3'	5'-CAACCCCAACTCTCACACCT-3'
Aa12	(GT)12	5'-TCATCAACCTGACCCTTTCC-3'	5'-TGCACTGAAGTTTCTCGGC-3'
Aa15	(CA)13	5'-TCACTGACCTGCCCTCTACA-3'	5'-CCAACCCTCTAGTCGTCCAC-3'
Aa36	(AC)16	5'-ACAGGCCAGCACCAAGAG-3'	5'-TTTGGAGCCATTGTTACCGT-3'
Aa50	(TG)11	5'-AACATGGCAATGTGTTTCGA-3'	5'-ATTGACGCTGCAAACAGATG-3'
Aa53	(CA)12	5'-ATCGCTTCCATGAGCTGATT-3'	5'-GAGTGCGGAGAGCTCTGC-3'
Aa56	(GT)14	5'-GGGGTGAAACACAGATGCTT-3'	5'-CAAGCAACTGGCAACTTGAA-3'

Se determinaron las frecuencias alélicas para todos los marcadores en todas las especies y se realizó una descripción de cada uno de los loci según número de especies en las que se encontraba presente, número de alelos por marcador y por especie, promedio de alelos por marcador y rango de tamaños del marcador.

### 6.3. Cálculo de la distancia genética $\delta\mu^2$ y tasas de mutación

Según la formula de Goldstein *et al.* (1995):  $E(\delta\mu^2) = 2\mu\tau$ , donde  $\mu$  es la tasa de mutación por generación para un modelo mutacional Unistep y  $\tau$  es el número de generaciones (la proporción en millones de años) de separación entre las dos especies analizadas.

A su vez,  $E(\delta\mu^2) = (\alpha_A - \alpha_B)^2$ , donde  $\alpha_A$ , es la media del número de tándems de repetición en la especie **A**, y  $\alpha_B$  es la media del número de tándems de repetición en la especie **B** (ver sección 6.5). Este análisis solo es posible por pares de taxa y además es necesario asumir que el proceso mutacional de estos marcadores en estas especies sea de un único paso (Unistep).

Las tasas de mutación  $\mu$ , se pueden calcular también a partir de esta distancia, pero para ello es indispensable conocer  $\tau$ , el cual se puede calcular a partir de los tiempos de divergencias entre los dos taxones analizados. Aunque en este caso, no contamos ni con valores de tiempos de divergencia ni con los de  $\tau$  en la sección 6.6. se explica cómo se resolvió este inconveniente.

#### 6.4. Relaciones dentro del grupo

Toda la información sobre la filogenia del grupo se basó en el trabajo de Lerner y Mindell (2005). Recientemente dichos autores publicaron un estudio filogenético basado en secuencias nucleares y mitocondriales, representando todas las subfamilias de accipítridos. Aunque sujeta a bastante controversia, esta filogenia ha sido aceptada ampliamente. Asociado con este estudio, ellos depositaron en GenBank las secuencias del *citocromo b* (1047 pb de ND2), para las especies analizadas en su estudio. Por tal razón, este trabajo de 2005, se usó como modelo de comparación de las relaciones filogenéticas de los accipítridos, y como de insumo para hallar los tiempos de divergencia entre las diferentes especies.

Para realizar los análisis y representar las relaciones entre las especies de accipítridos estudiados se construyeron fenogramas, a partir de las distancias genéticas de Nei (1978) y Cavalli-Sforza (1967). A su vez, se usaron dos métodos de agrupamiento: Neighbor Joining (Saitou & Nei 1987) y UPGMA (Sokal & Michener 1958). Las dos distancias genéticas y sus correspondientes árboles fueron estimados con el programa NTSYS (Rohlf 1987) a partir de las frecuencias alélicas de los marcadores microsatélites. Los árboles fueron comparados visualmente para elucidar la congruencia en las principales divisiones filogenéticas, con el trabajo original de Lerner y Mindell 2005.

#### 6.5. Cálculo de tiempos de divergencia

Debido a la gran dificultad para encontrar trabajos que reportaran datos de porcentajes de divergencia en rapaces y/o para encontrar registros fósiles de otros grupos apropiados para la calibración externa del reloj molecular (ver sección 2.1), se calcularon *de novo* en este trabajo, tiempos de divergencia a partir de las secuencias extraídas de GenBank (*cyt b*).

Por medio del programa MEGA 3.1. se reconstruyó un árbol -que representaba un buen porcentaje de las especies muestreadas- calculando las distancias genéticas con el modelo de los *dos parámetros de Kimura* (1980), las secuencias de *citocromo b* y utilizando el método de agrupación de Neighbor Joining (Tabla 5). Este programa, además de los árboles, genera una matriz de distancias a partir de la cual se calcularon las divergencias entre pares de especies (ver figura 2, sección 6). Desafortunadamente, no todas las especies de rapaces neotropicales están representadas en el GenBank con secuencias de ese gen en particular, por ello no fue posible calcular los tiempos de divergencia para cada una de las 21 especies usadas en el presente trabajo (Tabla 5); aunque se calcularon los tiempos de divergencia para al menos un miembro de cada género.

Tabla 6. Número de accesión en GenBank del *citocromo b* para algunas de las especies analizadas.

<b>Especie</b>	<b>Número de accesión</b>
<i>S. isidori</i>	<a href="#">AY987279</a>
<i>S. ornatus</i>	<a href="#">AY987278</a>

<i>B. swainsonii</i>	*
<i>B. brachyurus</i>	*
<i>B. platypterus</i>	*
<i>A. nitida</i>	*
<i>B. albicaudus</i>	*
<i>G. melanoleucus</i>	<a href="#">AY987332</a>
<i>B. magnirostris</i>	<a href="#">AY987330</a>
<i>P. uncinctus</i>	<a href="#">AY987331</a>
<i>B. anthracinus</i>	<a href="#">AY987327</a>
<i>Accipiter sp. (A. bicolor)</i>	<a href="#">AY987307</a>
<i>H. meridionalis</i>	*
<i>H. harpyja</i>	<a href="#">AY987270</a>
<i>E. leucurus</i>	<a href="#">AY987233</a>
<i>P. haliaetus</i>	<a href="#">AY987232</a>
<i>F. peregrinus</i>	*
<i>F. femoralis</i>	*
<i>S. papa</i>	*
<i>P. perspicillata</i>	*

\* No hay datos de secuencia para *cyt b*

Cada valor obtenido de la matriz de distancia corresponde al porcentaje de divergencia entre cada par de especies seleccionada. Con estos valores se calculó entonces los millones de años (MYA) desde la separación de estas especies, a partir del trabajo de Helbig *et al.* (2005) también con *citocromo b* en Aquilinae, quien obtuvo una tasa de divergencia de 1,6% por cada millón de años, asumiendo el registro fósil de un Buteoninae de hace 17 millones de años.

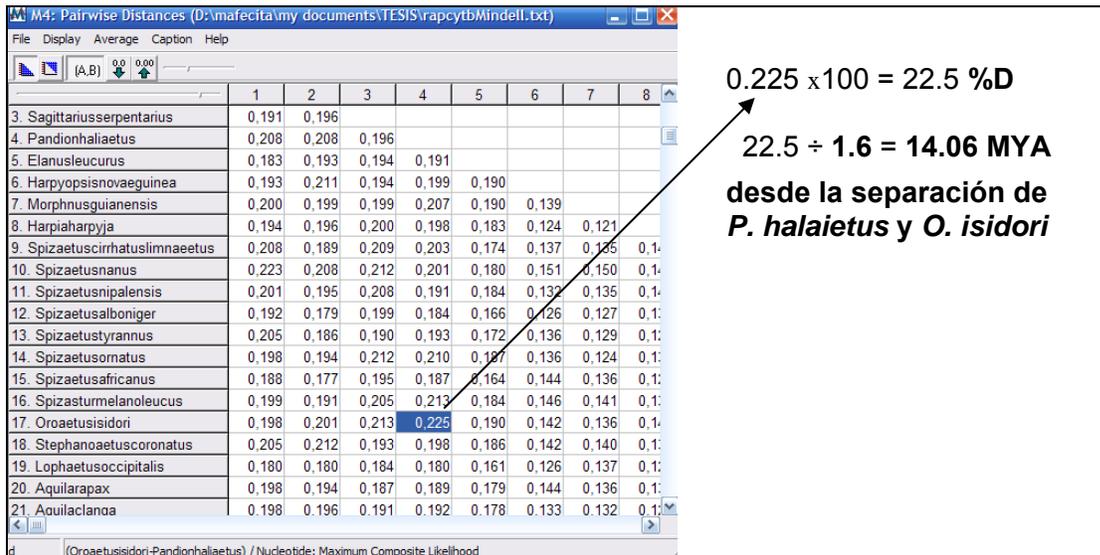


Figura 1. Cálculo de los tiempos de divergencia por pares de especies

Es importante tener en consideración las posibles desviaciones de los datos obtenidos, como causa del uso de una calibración muy interna.

Adicionalmente y de forma complementaria, se incluyeron cálculos de tiempos de divergencia a partir de los ocho microsatélites, para compararlos con los resultados del marcador mitocondrial (*cyt b*). Para este análisis se escogieron solo aquellas especies con el mayor número de marcadores microsatélites amplificados; tales especies son: *Geranoaetus melanoleucus*, *Buteo magnirostris*, *Parabuteo unicinctus*, *Spizaetus isidori*, *S. ornatus*, *Accipiter sp.* y *Pandion haliaetus*.

Como ya se obtuvieron los valores de  $E(\delta\mu^2)$ , se utilizó de nuevo la fórmula de Goldstein *et al.* (1995) para calcular  $\tau$ . Se tomaron entonces las tasas mutacionales de porcinos ( $7 \times 10^{-5}$ , Ellegren 1995) y del mono neotropical *Ateles sp.* ( $1 \times 10^{-6}$ , Ruíz-García *et al.* 2006c) debido a que tienen tasas mutacionales relativamente bajas y probablemente más acordes a las tasas de microsatélites en aves; se despejó entonces de la ecuación el número de generaciones desde que cada par de especies se separó ( $\tau$ ), para cada microsatélite (que a su vez se convirtió en un tiempo de divergencia en MYA), como se muestra a continuación para el marcador Aa56 y el par de especies *G. melanoleucus*- *B. magnirostris*:

***G. melanoleucus***

Nombre del alelo	237	239	241	245	249	255	Total	
# alelos amplificados			10				10	—
# tándems	8	9	11	13	16	19		$\bar{a} \text{ G.mel} = 11$
alelos* # tandems	0	0	110	0	0	0	110	

***B. magnirostris***

Nombre del alelo	237	239	241	245	249	255	Total	
# alelos amplificados		1					1	—
# tandems	8	9	11	13	16	19		$\bar{a} \text{ B.mag} = 9$
alelos* # tandems	0	9	0	0	0	0	9	

$(\bar{a} \text{ G.mel} - \bar{a} \text{ B.mag})^2 = 4$ , Nota:  $\bar{a}$  hace referencia al promedio de tándems de repetición para la especie dada (ver sección 6.3)

$$\tau = E(\delta\mu^2) \div 2(\mu)$$

$$\tau = 4 \div 2(7 \times 10^{-5}), \text{ para este ejemplo se tomó la tasa de mutación de Ellegren 1995}$$

$$\tau = 28571,4$$

Ahora para calcular T, se debe multiplicar  $\tau$  por el promedio de años que dura una generación en el grupo de las rapaces.

$$T = 28571,4 \times \underline{3}$$

$T = 85714,3$  años (ó expresado en millones de años 0,085 MYA), es el tiempo de divergencia entre *B. magnirostris* y *G. melanoleucus* para dicho marcador y dicha tasa de mutación.

Con el propósito de obtener el promedio generacional del grupo se hizo una revisión bibliográfica de diferentes miembros del orden Falconiformes. Se encontró por ejemplo que la especie *Accipiter gentilis* comienza su edad reproductiva al año de edad (Krüger O. 2005). La madurez sexual en *Buteo platypterus* se alcanza a los 1 ó 2 años; en *Falco peregrinus* el pico reproductivo más alto se produce entre los 1-5 años y en *Accipiter nissus* a los 1-4 años (Lieske D. J. *et al.* 1997; Ivory A. & Kirschbaum K. 1999; Dewey, T. & Potter M. 2002; Newton & Rothery 2002). Se decidió tomar entonces un promedio de 3 años como el tiempo generacional para este grupo de aves. Es difícil sin embargo, calcular un número exacto, debido primero a la diversidad de especies trabajadas y segundo porque en la mayoría de las aves, las generaciones se solapan y los cálculos demográficos se dificultan (Akçakaya *et al.* 1999).

## 6.6 Cálculo de las tasas de mutación para microsatélites

De manera complementaria y realizando el proceso inverso a los cálculos de divergencia de la sección anterior, se prosiguió a calcular esta vez las tasas mutacionales ( $\mu$ ) de los microsatélites, despejando una vez más de la fórmula:  $E(\delta\mu^2) = 2\mu\tau$ , con el fin de realizar algunas comparaciones.

Para este caso, se tomaron los valores de tiempos de divergencia (de *cyt b*) obtenidos de la matriz de distancias del programa MEGA 3.1. (ver sección 6.5) y se dividieron por el promedio de años que dura una generación en el grupo (3 años) para obtener  $\tau$ . Este valor se insertó en la ecuación  $E(\delta\mu^2) = 2\mu\tau$ , y se despejó la tasa mutacional de cada microsatélite para cada par de especies.

## 6.7. Análisis de constricción de los microsatélites: Garza *et al.* 1995

Para determinar si los microsatélites utilizados presentaban algún grado de constricción en el tamaño de sus alelos, y para distinguir entre las dos posibilidades: tasas de mutación relativamente bajas y/o constricciones mutacionales o selectivas, se analizaron todos los alelos de los ocho marcadores según los estadísticos de Garza *et al.* (1995) por pares de especies. Si el flujo genético es ancestral en el proceso de especiación y es el único factor homogenizante del promedio de tamaño de los alelos en estos marcadores, se esperaba que el promedio en el número de repeticiones sea bastante diferente para cada par de especies.

En la sección 6.3 se mencionó que todos los alelos de todos los marcadores que amplifican para cada especie se pueden poner en términos del número de tándems de repetición y así calcular el valor de  $E(\delta\mu^2)$ . Como se mencionó también, se

sabe que:  $E[(\bar{a}_1 - \bar{a}_2)^2] \approx 2\mu\tau$ , donde  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son equivalentes a  $\alpha_A$  y  $\alpha_B$  respectivamente (de la sección 6.3).

Por otro lado, según Garza *et al.* 1995:  $E[(\bar{a}_1 - \bar{a}_2)^2] = E[D] - E[\sigma_1^2] - E[\sigma_2^2]$ .

Siendo  $E[D] = 2\mu\bar{l}_{12}\sigma_m^2$ ; aunque parece ser una simplificación poco útil de la expresión general, ya que si  $\beta\tau \gg 1$ , entonces:

$$E[(\bar{a}_1 - \bar{a}_2)^2] \approx \frac{E[\sigma_a^2]}{2N\beta},$$

donde el parámetro  $\beta$  denota la magnitud del sesgo y  $\sigma^2$  es la varianza del tamaño de los alelos.

Como ya se conocen los valores de las diferencias al cuadrado de los promedios de los tamaños de los alelos para cada microsatélite, es posible calcular la varianza de los alelos en conjunto para cada marcador ( $\sigma_a^2$ ), en cada par de especies; solo queda entonces reemplazar en la fórmula y despejar el valor de  $2N\beta$  como se ilustra a continuación para *O. isidori* y *P. haliaetus* en el marcador Aa12:

***O. isidori***

Nombre del alelo	123	127	129	131	133	135	139	Total	
# alelos amplificados					1			1	—
# tandems	6	8	9	10	11	12	14		$\alpha$ <i>O. isid</i> = 11
alelos* # tandems	0	0	0	0	11	0	0	11	

***P. haliaetus***

Nombre del alelo	123	127	129	131	133	135	139	Total	
# alelos amplificados	1							1	—
# tandems	6	8	9	10	11	12	14		$\alpha$ <i>P. hal</i> = 6
alelos* # tandems	6	0	0	0	0	0	0	6	

$$(\alpha_{O.isid} - \alpha_{P.hal})^2 = 25 \quad \text{y} \quad \sigma_a^2 = 12.5$$

$$2N\beta = \sigma_a^2 \div E(\delta\mu^2)$$

$$2N\beta = 12.5 \div 25$$

$$2N\beta = 0.5$$

A pesar de que el valor de  $N$ , que corresponde al tamaño poblacional de las especies no se conoce, obtener un valor pequeño de  $2N\beta$  significa necesariamente que  $\beta$  es pequeño, lo que a su vez implica que el sesgo mutacional de un microsatélite dado, también es muy bajo. Lo contrario sucede con valores altos de  $2N\beta$ .

Como un complemento al análisis de constricciones se decidió ejecutar también un análisis que indicara cómo se están comportando las tasas mutacionales en estos microsatélites; para ello se usó el estadístico  $\Delta$ , también de Garza *et al.* (1995).

Los valores de tasas mutacionales en microsatélites para humanos varían entre  $1.2 \times 10^{-3}$  y  $5.6 \times 10^{-4}$  (Weber y Wong 1993) y estos fueron los valores críticos que se usaron para evaluar como están evolucionando los marcadores utilizados en aves rapaces, debido a que son los rangos típicos de tasas mutacionales para microsatélites en general; es decir, si los valores encontrados son significativamente menores que las tasas mutacionales usualmente reportadas para mamíferos.

Bajo el supuesto que  $\tau$  es mucho mayor que  $2N$ ,  $\bar{a}_1 - \bar{a}_2$  tiene una distribución aproximadamente normal con una media de cero y una varianza dada por:

$$E[(\bar{a}_1 - \bar{a}_2)^2] \approx 2\mu\tau\sigma_m^2[1 + O(N/\tau)]$$

En tal caso, la probabilidad de que  $\bar{a}_1 - \bar{a}_2$  difiera en valor absoluto en una cantidad menor que  $\Delta$  es:

$$\Pr(|\bar{a}_1 - \bar{a}_2| < \Delta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \int_{-\Delta}^{\Delta} \exp\left[-\frac{x^2}{2\sigma^2}\right] dx = \text{erf}\left(\frac{\Delta}{\sqrt{2\sigma^2}}\right)$$

Donde,  $\sigma^2 = 2\mu\tau\sigma_m^2$  y  $\text{erf}(\cdot)$  es el error de la función. Aunque no se conoce el valor de  $\mu\sigma_m^2$ , se puede asumir que  $\sigma_m^2 = 1$ , lo que considera resultados para diferentes tasas de mutación. Adicionalmente, se puede usar el hecho que  $\text{erf}(x) < 0.05$  si  $x < 0.0222$ , es decir que valores de  $\Delta < 0.0444\mu\tau^2$ , serían significativamente muy pequeños.

Siguiendo con el ejemplo de la sección 6.5, sabemos que el valor de divergencia entre las especies *O. isidori* y *P. haliaetus* es  $T = 14.06$  MYA, y por tanto  $\tau = 4686666,6$  generaciones. Reemplazando:

$$\Delta = 0.0444 (\mu\tau)^{-2}$$

$$\Delta = 0.0444 (5.6 \times 10^{-4} \times 4686666,6)^{-2}$$

$\Delta = 2.27$  (es valor crítico para una tasa mutacional de  $5.6 \times 10^{-4}$ ).

Si el valor absoluto de  $\bar{a}_1 - \bar{a}_2$  en un microsatélite dado es menor o igual a  $\Delta$ , la tasa mutacional entre esas dos especies para ese marcador es significativamente menor que  $5.6 \times 10^{-4}$  (nivel de significancia del 5%).

Tales análisis solo se realizaron para en siete de las 21 especies, aquellas que amplificaron el mayor número de marcadores: *G. melanoleucus*, *B. magnirostris*, *P. unicintus*, *O. isidori*, *S. ornatus*, *Accipiter sp.* y *P. haliaetus*.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Descripción de los marcadores

Una vez realizados los PCRs y la lectura de los geles se contruyeron histogramas de las frecuencias alélicas para cada uno de los loci que amplificaron en cada especie (esquematizados en el Anexo1).

En general, la mayoría de las especies presentaron marcadores con alelos del mismo tamaño, pero con diferencias significativas en sus frecuencias alélicas (Anexo 1). Los histogramas de frecuencias alélicas revelaron distintos patrones de polimorfismo entre loci y entre especies, evidenciando claramente una alta presencia de loci monomórficos en algunas especies. A su vez todos los marcadores produjeron productos de amplificación y todas las especies, con excepción del grupo externo, presentaron una alta proporción de amplificaciones (alrededor de 6 loci microsatélites por especie, ver tabla 7).

En el presente estudio, el número promedio de alelos por loci microsatélite resultó ser menor que los valores descritos por Martínez *et al.* (2002) para las tres especies de *Aquila*; de hecho, tales promedios fueron considerablemente más bajos, especialmente si se compara con el número de alelos por marcador para la especie focal *Aquila adalberti* (ver tablas 6.1 y 6.2). Tal es el caso del marcador Aa56, muy polimórfico en *A. adalberti*, y sin embargo, con el número más bajo de alelos en este trabajo. Este fenómeno también se observa en el trabajo de Martínez-Cruz *et al.* (2002), quienes a pesar de trabajar con otras dos especies de águilas del Viejo Mundo (también del género *Aquila*), no presentaron el mismo nivel de polimorfismo que la especie focal (tabla 6.2).

Tabla 7.1 Caracterización de los 8 marcadores en las 21 especies analizadas.

Marcador	Nº especies en las que está presente	Nº de alelos totales presentes	Promedio de alelos por especie	Rango de tamaño (repeticiones)	Rango de tamaño (pb)
Aa02	17	14	2	9-38	129-187
Aa04	11	4	1.08	7-14	120-134
Aa12	15	7	1.2	6-14	123-139
Aa15	15	11	1.73	7-28	185-227
Aa36	15	9	1.71	12-20	111-127
Aa50	15	6	1.6	10-17	217-231
Aa53	18	5	1.38	7-12	123-133
Aa56	9	6	1.1	7-16	237-255

Tabla 7.2 Amplificación cruzada de los 8 marcadores en la especie focal\* y otras especies de rapaces del Viejo Mundo (Martínez-Cruz *et al.* 2002).

Marcador	<i>Aquila adalberti*</i>		<i>A. heliaca</i>		<i>A. chrysaetos</i>	
	Alelos	Rango (pb)	Alelos	Rango (pb)	Alelos	Rango (pb)
Aa02	4	141-155	-	-	4	133-147
Aa04	3	126-130	4	124-136	2	125-131
Aa12	2	133-135	3	138-150	1	124
Aa15	3	197-203	4	196-206	4	198-204
Aa36	5	109-119	6	107-127	-	-
Aa50	4	209-219	1	215	1	208
Aa53	5	123-133	6	127-137	4	125-135
Aa56	6	249-263	4	237-255	1	243

Tal vez lo más evidente de los resultados es la ausencia total de polimorfismo para el panel de microsatélites en varias de las especies trabajadas (con asterisco\* en la tabla 7), indicando ya sea un sesgo de muestreo, tasas de mutación extremadamente bajas o algún tipo de constricción en el tamaño de los marcadores. En la tabla 8 también se observan los marcadores que amplificaron en cada especie, y el Anexo 2 presenta en más detalle cada uno de los alelos que amplificaron en cada una de las especies, para todos los marcadores.

Los tres loci que resultaron menos informativos en cuanto a promedio de alelos por especie fueron A04, Aa12 y Aa56. El loci Aa04 presenta el mismo alelo fijado (122 pb) en casi todas las especies, con excepción de *A. nitida*, *B. swansonii*, *B. albicaudatus* y *S. ornatus* (Anexo 2). Lo mismo sucede con Aa12, cuyo alelo predominante (133 pb) se encuentra presente en prácticamente todas las especies en las que amplifica el marcador (excluyendo *B. anthracinus*, *E. leucurus*, *B. swansonii* y *S. papa*); lo anterior, sumado con el monomorfismo observado en algunas especies, indica que en general, los microsatélites tienen rangos de alelos muy limitados.

A pesar de ser poco polimórficos intraespecíficamente, estos loci resultaron de gran valor ya que presentaron diferentes alelos fijados en diferentes especies. Esta condición permite considerarlos como marcadores de cierto “valor taxonómico”. Tal

es el caso del alelo de 134 pb del loci Aa04, presente únicamente en *B. swainsonii*, mientras que, como se mencionó anteriormente, el grueso de las especies tenían prácticamente fijado el mismo alelo. Lo mismo sucede en Aa12, donde seis de los ocho alelos están presentes, cada uno en una especie diferente. Algo similar se observa en Aa56, donde tres de sus alelos están presentes excluyentemente en dos especies diferentes (245 pb en *O. isidori*, 249 pb y 255 pb en *S. ornatus*), aunque también es cierto que este marcador solamente amplificó en diez de las especies trabajadas.

Tabla 8. Presencia o no de amplificación y número de alelos por loci para cada una de las especies analizadas.

	Aa02	Aa04	Aa15	Aa12	Aa36	Aa50	Aa53	Aa56
<i>O. isidori</i>	4	--	1	1	2	2	2	1
<i>S. ornatus</i>	5	1	2	2	2	2	1	2
<i>Buteo sp. *</i>	--	1	--	1	1	1	--	--
<i>B. swainsonii *</i>	1	1	1	1	--	1	1	--
<i>B. brachyurus</i>	2	2	2	1	2	2	1	1
<i>B. platypterus</i>	2	--	1	--	2	1	1	1
<i>A. nitida*</i>	1	1	1	--	1	1	--	--
<i>B. albicaudus</i>	--	1	2	1	1	1	1	--
<i>G. melanoleucus</i>	3	1	3	1	3	3	4	1
<i>B. magnirostris</i>	3	1	5	2	1	2	1	1
<i>P. uncinatus</i>	2	2	3	2	1	3	2	1
<i>B. anthracinus*</i>	1	--	1	1	--	1	1	--
<i>Accipiter sp. *</i>	--	1	1	1	1	1	1	1
<i>H. meridionalis</i>	2	1	--	--	2	2	2	--
<i>H. harpyja</i>	1	2	--	1	2	--	1	1
<i>E. leucurus</i>	--	--	1	1	2	--	--	--
<i>P. haliaetus</i>	2	--	1	1	1	1	1	1
<i>F. femoralis</i>	2	--	1	--	--	--	2	--
<i>F. peregrinus*</i>	1	--	--	--	--	--	1	--
<i>S. papa*</i>	1	--	--	1	--	--	1	--
<i>P. perspicillata*</i>	1	--	--	--	--	--	1	--

--No amplificación del marcador. \*Especies con todos los marcadores monomórficos.

## 7.2. Constricciones en los microsatélites (Garza *et al.* 1995)

En esta sección se pretende evaluar los valores significativos por marcador, con el objeto de dilucidar si algunos de estos loci tienen tasas de mutación menores que las descritas para los mamíferos. A pesar de que se ha realizado numerosos estudios para examinar las tasas de mutación de los microsatélites *in vitro* en varios organismos incluyendo bacterias, levaduras y mamíferos, hasta el momento hay estudios donde se hayan realizados cálculos de tasas de mutación para aves,

razón por la cual, se deben hacer las extrapolaciones desde la información que se tiene para mamíferos (Talbot *et al.* 1995).

Al detallar la tabla 8 por columnas, se destaca que todos los marcadores –ya sea en una especie u otra- tienen tasas de mutación más bajas que las reportadas típicamente para mamíferos. El ejemplo más claro es tal vez Aa53 y en menor grado Aa12, quienes presentan una gran cantidad de valores significativos a lo largo de todos los taxa (un asterisco\* hace referencia a que el valor es significativo para una tasa de  $1.2 \times 10^{-3}$  y dos asteriscos\*\* a una tasa de  $5.6 \times 10^{-4}$ ). En el locus Aa04, por su parte, todos los valores son significativamente menores que las dos tasas de mutación que se usaron como parámetro, indicando que esos microsátélites tienen tasas de evolución particularmente bajas. Por el contrario, Aa15 y Aa02 presenta el menor número de valores significativos, y los marcadores restantes presentan proporciones similares de  $\Delta$  (delta) significativos y no significativos.

Por otra parte, si se observa la tabla 8 por pares de especies (filas), no se detecta ningún marcador que se caracterice por tener más valores significativos que el resto. A grandes rasgos el águila de páramo (*G. melanoleucus*) y el gavián pollero, *B. magirostris* son las especies con mayor cantidad de valores significativos, a lo largo de todos los marcadores. Sin embargo, es difícil hacer cualquier tipo de comparación ya que no todos los loci amplificaron en todas las especies.

Así mismo, hay que resaltar que para todas las posibles parejas de especies tanto con el águila pescadora como con el águila de páramo, se encontraron valores significativos en el marcador Aa53. Lo que implicaría que este locus en estas especies tiene tasas de mutación recurrentemente bajas.

Tabla 9. Valores de  $\Delta$  por pares de especies

$\Delta$	Aa02	Aa04	Aa12	Aa15	Aa36	Aa50	Aa53	Aa56
<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	15,3	--	1*	2,5	2,5	1*	1,5	3,5
<i>O. isidori</i> - <i>G. melanoleucus</i>	18,5	--	0*	3	3,167	4,167	0.25*	2**
<i>O. isidori</i> - <i>B. magnirostris</i>	19,17	--	0.5*	3,6	5	2**	1.5*	3
<i>O. isidori</i> - <i>P. unicinctus</i>	19,5	--	1.5*	2.33**	2.5**	2.167**	0*	3
<i>O. isidori</i> - <i>B. anthracinus</i>	20,5	--	2**	6	--	0.5*	1.5*	--
<i>O. isidori</i> - <i>A. bicolor</i>	--	--	0*	9	3,5	2.5**	1.5*	4
<i>O. isidori</i> - <i>H. harpyja</i>	19,5	--	0*	--	6	--	0.5*	2**
<i>O. isidori</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	1*	4	1*	--	--	--
<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	17	--	5	6	3,5	1.5*	0.5*	3
<i>S. ornatus</i> - <i>G. melanoleucus</i>	3,2	1*	1*	0.5*	0.667*	3,667	1.25*	5,5
<i>S. ornatus</i> - <i>B. magnirostris</i>	3,867	1*	0.5*	1.1*	0*	1.5*	3	6,5
<i>S. ornatus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,2	1.5*	0.5*	0.167*	0*	0.167*	1.5*	6,5
<i>S. ornatus</i> - <i>B. anthracinus</i>	5,2	--	1*	7	--	0*	3	--
<i>S. ornatus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	1*	1*	6,5	0*	4	3	--
<i>S. ornatus</i> - <i>H. harpyja</i>	4,2	1.5*	1*	--	3,5	--	2*	5,5
<i>S. ornatus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	2*	1.5*	1.5*	--	--	--
<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	1.7*	--	4	3,5	1*	1*	1*	6,5
<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0.667*	0*	0.5*	0.6*	0.667*	2,167	1.75**	1*
<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	1*	0.5*	1.5**	0.667*	0.667*	2	1.75**	1*
<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. anthracinus</i>	2	--	2	3	--	3,667	1.75**	--
<i>G. melanoleucus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	0*	0*	6	0.667*	0.34*	1.75**	2
<i>G. melanoleucus</i> - <i>H. harpyja</i>	1*	0.5*	0*	--	2,833	--	0.75*	0*
<i>G. melanoleucus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	1*	1*	2.167**	--	--	--
<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	1.5*	--	5	3	0.34*	2,667	0.25*	1*
<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	--	--	--	2,4	1*	1*	2	0*
<i>B. magnirostris</i> - <i>B. anthracinus</i>	1.33*	--	1.5**	2,4	--	1.5**	0*	--
<i>B. magnirostris</i> - <i>A. bicolor</i>	--	0*	1.5*	5,4	0*	2,5	0*	1*
<i>B. magnirostris</i> - <i>H. harpyja</i>	0.34*	0.5*	0.5*	3,5	--	--	1*	1*
<i>B. magnirostris</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	1.5*	0.4*	1.5*	--	--	--
<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	2.167**	--	4,5	2.4**	1*	1*	2*	0*
<i>P. unicinctus</i> - <i>B. anthracinus</i>	1*	--	1.5**	3,667	--	1.67**	2,5	--
<i>P. unicinctus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	0.5*	0.5*	6,667	0*	2,333	2,5	--
<i>P. unicinctus</i> - <i>H. harpyja</i>	0*	0*	0.5*	--	3,5	--	1.5*	1*
<i>P. unicinctus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	1.5*	1.6*7	1.5*	--	--	--
<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	2.5**	--	4,5	3,667	1*	0.67*	0.5*	0*
<i>B. anthracinus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	--	2**	3	--	4	0*	--
<i>B. anthracinus</i> - <i>H. harpyja</i>	1*	--	2**	--	--	--	1*	--
<i>B. anthracinus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	3	2**	--	--	--	--
<i>B. anthracinus</i> - <i>P. haliaetus</i>	3,5	--	3	0*	--	1*	2*	--
<i>A. bicolor</i> - <i>H. harpyja</i>	--	0.5*	0*	--	3,5	--	1*	2**
<i>A. bicolor</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	2**	4	1.5*	--	--	--
<i>A. bicolor</i> - <i>P. haliaetus</i>	--	--	5	3	1*	3	2*	1*
<i>H. harpyja</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	1*	--	5	--	--	--
<i>H. harpyja</i> - <i>P. haliaetus</i>	2.5**	--	5	--	2.5**	--	1*	1*
<i>E. leucurus</i> - <i>P. haliaetus</i>	--	--	6	2*	2.5**	--	--	--

\*Valores significativamente menores que una tasa mutación de  $1 \times 10^{-3}$  (confianza del 5%)

\*\*Valores menores que una tasa mutación de  $5.6 \times 10^{-4}$  (nivel de confianza del 5%)

-- NO amplificación del marcador

De forma complementaria, la tabla 9 refleja los resultados del análisis para el valor  $2N\beta$  (despejado de la fórmula de Garza *et al.* 1995). Para este caso, valores altos para  $2N\beta$  implican que el sesgo en el tamaño de los alelos en estos microsatélites (en términos de número de tándems de repetición) también es alto, indicando que en estos marcadores existe un fuerte sesgo constrictivo, ya sea por fenómenos selectivos o mutacionales.

Contrastando con el análisis anterior, en este caso no se encuentran tantos valores significativos, lo que significa en una primera instancia que no hay una constrictión de tamaños alélicas muy evidente; pero de nuevo, al no haber un patrón definido en los datos, es difícil formular una hipótesis contundente con respecto al comportamiento de los marcadores.

Adicionalmente y de forma contradictoria con los valores de  $\Delta$ , son ahora Aa02 y Aa15 los loci más altamente significativos, seguidos por Aa50, Aa53y Aa12. Extrañamente el marcador Aa04, el cual tiene una tasa de evolución significativamente más baja que aquellas usadas como parámetro según los valores críticos ( $\Delta$ ), presenta en promedio los valores más bajos de  $2N\beta$ . Esto resulta interesante, si se tiene en cuanto que su rango alélico es limitado entre 120 y 134 pb, es decir que se esperaría que este marcador fuera altamente significativo para  $2N\beta$ ; pero también es cierto que Aa04 no tuvo una alta representatividad en las amplificaciones.

Al igual que en la tabla 8, la variación de los valores de  $2N\beta$  a lo largo de los pares de especies no refleja ningún patrón característico. De nuevo, los números más altos para este estadístico se encuentran concentrados alrededor de *G. melanoleucus* y *B. magnirostris*.

Tabla 10. Valores de 2N $\beta$  por pares de especies

2NB	Aa02	Aa04	Aa12	Aa15	Aa36	Aa50	Aa53	Aa56
<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0,323	--	1,333	0,693	1,32	2	0,444	0,517
<i>O. isidori</i> - <i>G. melanoleucus</i>	0,315	--	0	0,081	0,529	0,432	29,87	0,5
<i>O. isidori</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,319	--	1,333	0,71	0,093	0,75	0,444	0,5
<i>O. isidori</i> - <i>P. uncinctus</i>	0,296	--	1,333	2,25	0,373	0,788	0	0,5
<i>O. isidori</i> - <i>B. anthracinus</i>	0,232	--	0,5	0,5	--	9,333	0,444	--
<i>O. isidori</i> - <i>A. bicolor</i>	--	--	0	0,5	0,19	0,444	0,444	0,5
<i>O. isidori</i> - <i>H. harpyja</i>	0,235	--	0	--	0,343	--	1,333	0,5
<i>O. isidori</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	0,5	0,5	4,667	--	--	--
<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,304	--	0,5	0,5	0,354	1,333	1,333	0,5
<i>S. ornatus</i> - <i>G. melanoleucus</i>	0,809	0,5	1,333	6,8	15,3	0,32	1,6	0,408
<i>S. ornatus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,76	0,5	3,667	0,758	0	0,296	0,5	0,387
<i>S. ornatus</i> - <i>P. uncinctus</i>	0,548	0,444	9	334,8	0	0,612	1,333	0,387
<i>S. ornatus</i> - <i>B. anthracinus</i>	0,394	--	1,333	0,129	--	0	0,5	--
<i>S. ornatus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	0,5	1,333	0,387	0	0,271	0,5	0,373
<i>S. ornatus</i> - <i>H. harpyja</i>	0,516	0,444	1,333	--	0,837	--	0,5	0,408
<i>S. ornatus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	0,583	1,333	4,852	--	--	--
<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	2,043	--	0,396	0,517	9,333	0,333	0,5	0,387
<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	13,2	0	1,333	7,407	6,75	0,575	0,914	0,5
<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. uncinctus</i>	2,8	1,333	1,333	15,9	6,75	0,767	4,741	0,5
<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. anthracinus</i>	0,917	--	0,5	0,324	--	0,366	0,914	--
<i>G. melanoleucus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	0	0	0,269	6,75	14,25	0,914	0,5
<i>G. melanoleucus</i> - <i>H. harpyja</i>	2,917	1,333	0	--	0,585	--	4,089	0
<i>G. melanoleucus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	0,5	0,917	1,427	--	--	--
<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	1,244	--	0,5	0,324	26,25	0,244	35,2	0,5
<i>B. magnirostris</i> - <i>P. uncinctus</i>	51,3	1,333	2	6,311	0	46,8	1,333	0
<i>B. magnirostris</i> - <i>B. anthracinus</i>	4,125	--	0,444	1,389	--	0,444	0	--
<i>B. magnirostris</i> - <i>A. bicolor</i>	--	0	0,148	0,408	0	0,373	0	0,5
<i>B. magnirostris</i> - <i>H. harpyja</i>	62,25	1,333	1,333	--	0,354	--	0,5	0,5
<i>B. magnirostris</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	0,444	44,17	3,111	--	--	--
<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	1,427	--	0,346	1,389	0,012	0,333	0,5	0
<i>P. uncinctus</i> - <i>B. anthracinus</i>	1,333	--	1,037	1,06	--	0,81	0,48	--
<i>P. uncinctus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	1,333	12	0,495	0	0,536	0,48	0,5
<i>P. uncinctus</i> - <i>H. harpyja</i>	0	0	12	--	0,354	--	1,037	0,5
<i>P. uncinctus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	1,926	4,17	3,111	--	--	--
<i>P. uncinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,467	--	0,313	1,06	0,5	3,75	9,333	0
<i>B. anthracinus</i> - <i>A. bicolor</i>	--	--	0,5	0,5	--	0,5	0	--
<i>B. anthracinus</i> - <i>H. harpyja</i>	0,5	--	0,5	--	--	--	0,5	--
<i>B. anthracinus</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	0,5	0,5	--	--	--	--
<i>B. anthracinus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,354	--	0,5	0	--	0,5	0,5	--
<i>A. bicolor</i> - <i>H. harpyja</i>	--	1,333	0	--	0,354	--	0,5	0,5
<i>A. bicolor</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	0,125	0,781	3,111	--	--	--
<i>A. bicolor</i> - <i>P. haliaetus</i>	--	--	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>H. harpyja</i> - <i>E. leucurus</i>	--	--	0,5	--	0,653	--	--	--
<i>H. harpyja</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,373	--	0,5	--	0,373	--	0,5	0,5
<i>E. leucurus</i> - <i>P. haliaetus</i>	--	--	0,5	0,5	1,333	--	--	--

### 7.3. Relaciones dentro de Accipitridae a partir de marcadores microsatélites y comparación con respecto al *citocromo b*

En este trabajo se presenta un análisis general de las relaciones dentro de la familia Accipitridae con el uso de marcadores microsatélites y tomando al águila pescadora (*Pandion haliaetus*, Pandionidae) como grupo externo. En algunos de los análisis se incluyeron a dos representantes del género *Falco*, al rey de los gallinazos (*Sarcoramphus papa*, Cathartidae) y al búho *Pulsatrix perspicillata* (Strigidae), con el fin de ayudar a reducir ramas largas entre los accipítridos (grupo interno “ingroup”, ver figura 6). La razón principal para comparar los árboles con y sin grupo externo es poder observar como se comportan las topologías y como se reagrupan los taxones. Se trabajaron además dos distancias genéticas (Nei y Cavalli-Sforza) y dos métodos de agrupamiento: UPGMA y Neighbor Joining (NJ), con el fin de determinar si es posible encontrar alguna diferencia sustancial en las diferentes metodologías y así corroborar la ubicación de las especies trabajadas en un filograma modelo (Lerner & Mindell 2005, ver figura 6). Desafortunadamente, los análisis usando la distancia de Nei fueron muy poco consistentes (datos no publicados), razón por la cual se decidió no considerarlos en este estudio.

Como se ilustra en las siguientes figuras (3, 4 y 5), las topologías de los árboles obtenidos con los dos métodos de agrupamiento (ya sea incluyendo o no el outgroup) son similares en muchos aspectos. En general, todos los árboles apoyan la agrupación del clado más interno (*G. melanoleucus*, *P. uncinatus*, *B. brachyurys*, *B. albicaudatus* y *B. magnirostris*). Tal grupo corresponde a algunas especies de los denominados “Sub-buteoninae” e incluye taxones con el mayor número de muestras en este trabajo (como es el caso de *B. magnirostris* y *G. melanoleucus*).

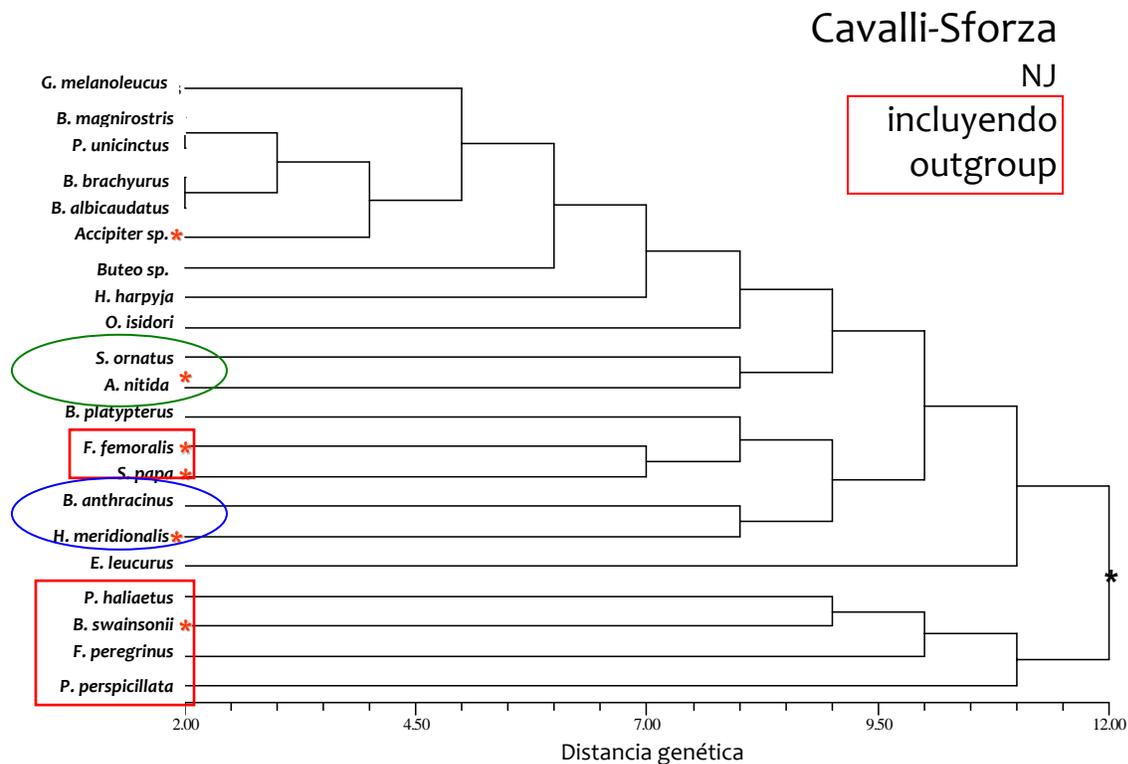
Uno de los cambios más evidentes entre los dos métodos de agrupamiento (figuras 3 y 4) es referente al cluster que forman *B. anthracinus* y *H. meridionalis*, el cual se encuentra ubicado en diferentes nodos tanto para los árboles con grupos externos, como para el árbol que no los incluyen (el árbol de UPGMA sin grupos externos no se publicó en este trabajo). A pesar de que esta agrupación no es relevante filogenéticamente, sirve para evidenciar el cambio en la posición de los nodos, sin embargo, no es muy claro cual de los dos métodos (UPGMA o NJ) tiene mejor resolución. Vale la pena resaltar que los árboles generados a partir del análisis con UPGMA, presentaron distancias genéticas más grandes que los árboles generados a partir de NJ.

Tal como se esperaba, las especies designadas como “externas” (Falconidae, Cathartidae y Strigidae) se comportaron como el grupo hermano de toda la familia Accipitridae, aunque la resolución no fue tan alta como para discriminar a *B. swainsonii* y *F. femoralis* correctamente (figuras 3 y 4). Los resultados de los análisis con la distancia de Cavalli-Sforza y método de agrupamiento de NJ, fueron moderadamente más consistente que con la distancia de Nei (datos no publicados), pero aún son muy disímiles de aquellos basado en el *citocromo b* del

trabajo de Lerner y Mindel (2005), e incluso de cualquier filogenia propuesta anteriormente.

A pesar de ello, las topologías obtenidas mostraron claramente identificados los grandes clados correspondientes a las familias Accipitridae, Pandionidae y Falconidae; la monofilia de estos clados también fue recuperada a partir de los análisis de Lerner y Mindell (2005).

Observando con más detalle dentro de la Familia Accipitridae, pareciera ser que ninguna de las subfamilias tradicionales de accipítridos -descritas por Brown y Amadon 1968- fuera monofilética (figuras 3, 4 y 5). En general, la resolución dentro de la familia no es buena. Para evidenciar lo anterior, se señala con un asterisco en los siguientes árboles las especies que generan mayor conflicto: *A. nitida*, *Accipiter sp.*, *Buteo swainsonii* y *H. meridionalis*.



En los recuadros rojos se destacan las especies que pertenecen al grupo externo

Figura 2. Árbol consenso de todas la especies con la distancia genética de Cavalli-Sforza y el método de agrupamiento de Neighbor Joining (incluye grupo externo).

Al remitirse al Anexo 2, puede observarse que el representante del género *Accipiter*, agrupado con los sub-buteoninae en todas las topologías, solo presentó un alelo exclusivo en uno de sus loci (Aa15); el resto de microsátelites compartieron su único alelo con un gran número de especies, muchas de ellas pertenecientes a los subbuteoninae.

Por su lado, el águililla gris (*Asturina nitida*) comparte varios alelos (4) con *S. ornatus* en cuatro de sus cinco loci, especie con la que se encuentra íntimamente relacionado según los árboles de las figuras 3, 4 y 5.

Otra de las especies con mayor conflicto en dichas topografías, *B. swainsonii*, amplificó productos específicos en dos de sus loci monomórficos, mientras que los alelos de los otros marcadores se presentaron en otras especies (entre ellas el águila pescadora, especie con la que se encuentra recurrentemente agrupado). Así mismo, *Buteo platypterus* compartió alelos con más de la mitad de las especies estudiadas (Anexo 2).

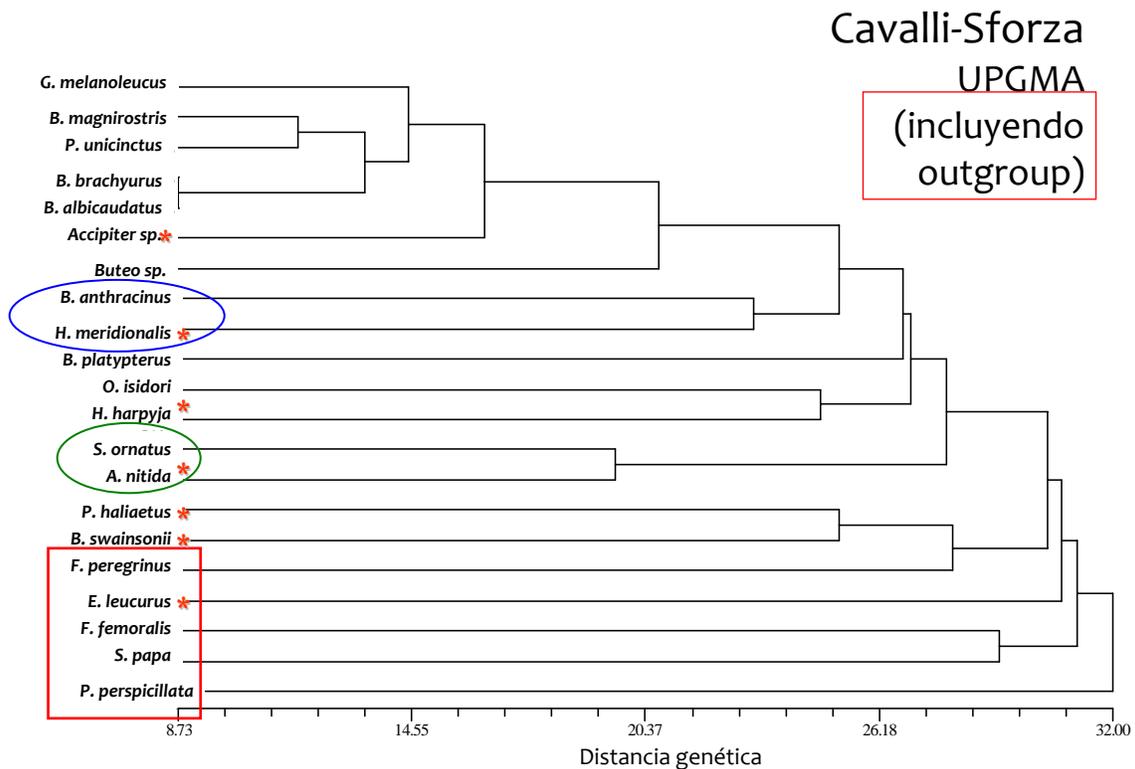


Figura 3. Árbol consenso Cavalli-Sforza con UPGMA (incluyendo al grupo externo).

Al hacer referencia a dos de las especies del grupo externo en estos análisis, *S. papa* y *F. femoralis*, se observa que los dos únicos alelos de dos de los marcadores amplificados en la primera especie (*Aa 02* y *Aa53*) son compartidos entre otros con *B. platypterus*, mientras que el alelo del tercer locus monomórfico (*Aa12*) es único para este catártido. El halcón perdicero (*F. femoralis*) por su parte, también comparte alelos con *B. platypterus*, especie con la que se encuentra medianamente relacionado según el fenograma de la figura 3; este halcón presenta además dos alelos exclusivos en sus marcadores: *Aa02* y *Aa15*. Lo extraño en este caso es que tanto *S. papa* como *F. femoralis*, no comparten más que un alelo (de 131 pb en *Aa53*), de los dos únicos loci que amplificaron en común (*Aa02* y *Aa53*; ver Anexo 2). Ya que esta topología solo aplica al árbol

generado con NJ, se puede deducir que simplemente sea un artefacto del método de agrupamiento elegido o del reducido número de microsatélites amplificados en estas especies.

La topografía del árbol en la figura 5, cambia un poco con respecto al árbol de la figura 3, en cuanto a la agrupación de algunas especies (ver la ubicación de los clados en los círculos azul y verde), pero especialmente en lo concerniente a la longitud de las ramas, debido a las diferencias en los valores de distancia genética. El nodo más externo en el árbol de la figura 5 tiene un valor menor que el nodo correspondiente en la figura 3. La ubicación de los taxones más “externos” es prácticamente igual, es decir que se mantiene en los dos árboles, una relación cercana entre *P. haliaetus* (el taxón más externo para el caso del árbol en la figura 5), *E. leucurus* y *B. swainsonii*.

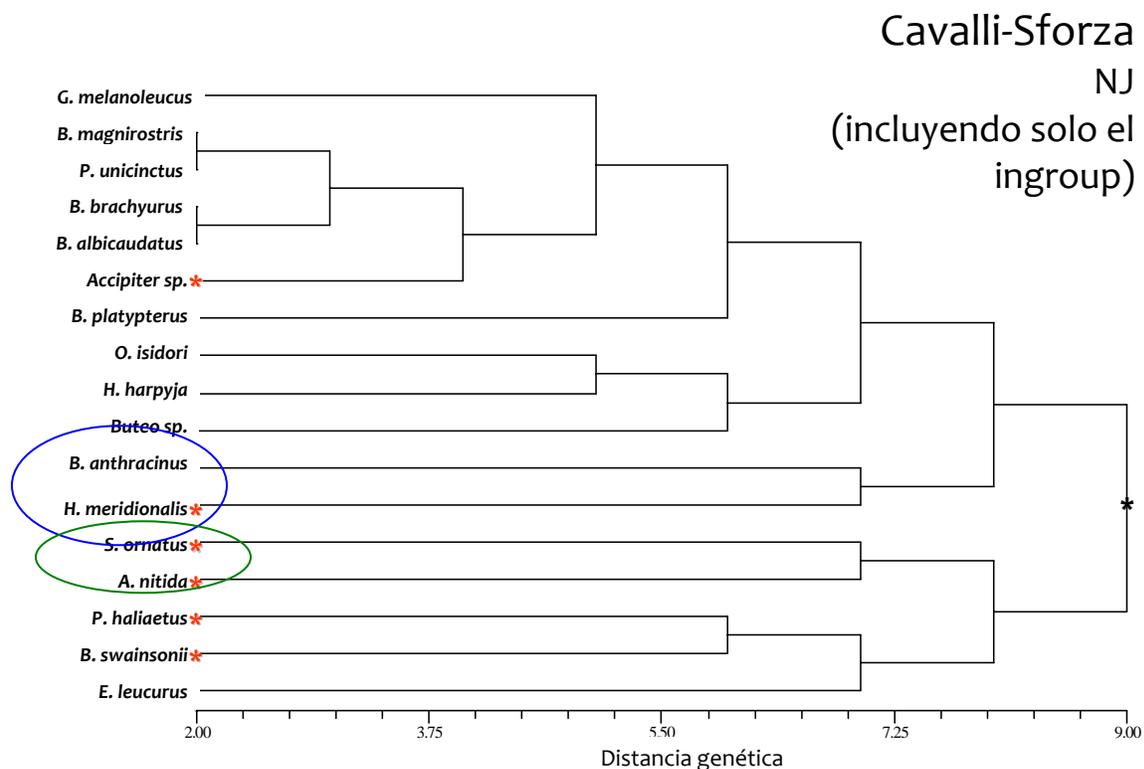


Figura 4. Árbol consenso Cavalli-Sforza con NJ (incluyendo solamente al Águila Pescadora como grupo externo).

#### 7.4. Tiempos de divergencia y tasas mutacionales

Aunque estos datos en principio, simplemente son insumo para desarrollar los estadísticos de la metodología de Garza *et al.* (1995), lo cierto es que se pueden hacer varios comentarios sobre estos resultados. Una de las grandes ventajas de este tipo de análisis, es que se puede responder a la pregunta de cual es el grado

de divergencia entre al menos, algunas de las especies de accipítridos neotropicales y si a partir de estos datos se puede estimar los tiempos de divergencia aproximados de otras aves en la filogenia de ese grupo.

En la tabla 10 se presentan los valores de divergencia para cada par de especies, calculados a partir de los datos Lerner y Mindell (2005), con una tasa de divergencia de 1,6 % por un millón de años (Helbig *et al.* 2005). En la figura 5 a su vez, se ilustra la filogenia que se estimó en este estudio a partir de los datos de secuencia de Lerner y Mindell (2005) con *citocromo b*, y la cual fue usada también para recalculer los valores del porcentaje de divergencia entre los diferentes pares de especies. En este caso no se utilizó todo el pool de especies (231 spp.) que trabajaron estos autores, pero se incluyeron aquellas que podrían ser más relevantes para el presente estudio por ser taxones neotropicales. Los valores de soporte (Bootstrap) se muestran sobre los nodos y en recuadros se resaltan las especies de interés para este trabajo (ver figura 6), ya sea porque se muestreó la especie como tal o porque pertenece a alguno de los géneros en este estudio.

Cabe aclarar que debido a que *Accipiter spp.* no fue identificada hasta el nivel de especie se tomó para este caso los datos de secuencia de otro representante del género (*Accipiter bicolor*; ver tabla 5) para poder inferir el porcentaje de divergencia.

De otra parte, ante la ausencia de tasas de mutación típicas para aves se hicieron cálculos de divergencia (con microsatélites) utilizando dos de las tasas encontradas en mamíferos ( $7 \times 10^{-5}$ , Ellegren 1995 y  $1 \times 10^{-6}$ , Ruíz-García *et al.* 2006c), por ser los vertebrados más cercanos. Se debe hacer explícito también, el hecho de que para estos cálculos de divergencia se utilizaron tasa mutacionales diferentes (Ellegren 1995; Ruíz-García *et al.* 2005g) a las usadas para los análisis de restricción (sección 6.7, tasas mutacionales de microsatélites en humanos según Weber y Wong 1993). La razón principal, es que se prevía el hecho de que se obtendrían tasas muy bajas para los microsatélites en la aves rapaces y por tanto para obtener los tiempos de divergencia, era necesario tomar tasas mutacionales más cercanas a estas. Las tasas de microsatélites en humanos son muy altas ( $1.2 \times 10^{-3}$  y  $5.6 \times 10^{-4}$ ) y posiblemente se obtendrían valores muy alejados de la realidad.

Tabla 11. Porcentaje de divergencia (%D) y tiempo de separación (T) en millones de años (MYA) entre pares de especies de aves rapaces para el gen *citocromo b*.

PARES DE ESPECIES ANALIZADAS	% D	T (MYA)
<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0.051	<b>3.1875</b>
<i>O. isidori</i> - <i>G. melanoleucus</i>	0.151	9.4375
<i>O. isidori</i> - <i>B. magnirostris</i>	0.146	9.125
<i>O. isidori</i> - <i>P. unicinctus</i>	0.154	9.625
<i>O. isidori</i> - <i>B. anthracinus</i>	0.140	8.75
<i>O. isidori</i> - <i>A. bicolor</i>	0.171	10.69*
<i>O. isidori</i> - <i>H. harpyja</i>	0.146	9.125

<i>O. isidori</i> - <i>E. leucurus</i>	0.182	11.375
<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.213	13.3125
<i>S. ornatus</i> - <i>G. melanoleucus</i>	0.147	9.1875
<i>S. ornatus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0.146	9.125
<i>S. ornatus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0.149	9.3125
<i>S. ornatus</i> - <i>B. anthracinus</i>	0.132	8.25
<i>S. ornatus</i> - <i>A. bicolor</i>	0.171	10.69*
<i>S. ornatus</i> - <i>H. harpyja</i>	0.139	8.6875
<i>S. ornatus</i> - <i>E. leucurus</i>	0.178	11.125
<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.198	12.375
<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0.075	4.6875
<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0.076	4.75
<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. anthracinus</i>	0.077	4.8125
<i>G. melanoleucus</i> - <i>A. bicolor</i>	0.110	6.875
<i>G. melanoleucus</i> - <i>H. harpyja</i>	0.136	8.5
<i>G. melanoleucus</i> - <i>E. leucurus</i>	0.166	10.375*
<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.165	10.3125
<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0.084	5.25
<i>B. magnirostris</i> - <i>B. anthracinus</i>	0.085	5.3125
<i>B. magnirostris</i> - <i>A. bicolor</i>	0.112	7.0
<i>B. magnirostris</i> - <i>H. harpyja</i>	0.147	9.1875
<i>B. magnirostris</i> - <i>E. leucurus</i>	0.170	10.625
<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.179	11.1875
<i>P. unicinctus</i> - <i>B. anthracinus</i>	0.093	5.8125
<i>P. unicinctus</i> - <i>A. bicolor</i>	0.128	8.0
<i>P. unicinctus</i> - <i>H. harpyja</i>	0.136	8.5
<i>P. unicinctus</i> - <i>E. leucurus</i>	0.176	11.0
<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.184	11.5
<i>B. anthracinus</i> - <i>A. bicolor</i>	0.122	7.625
<i>B. anthracinus</i> - <i>H. harpyja</i>	0.153	9.5625
<i>B. anthracinus</i> - <i>E. leucurus</i>	0.165	10.3125
<i>B. anthracinus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.175	10.9375
<i>A. bicolor</i> - <i>H. harpyja</i>	0.162	10.125
<i>A. bicolor</i> - <i>E. leucurus</i>	0.173	10.8125
<i>A. bicolor</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.178	11.125
<i>H. harpyja</i> - <i>E. leucurus</i>	0.176	11.0
<i>H. harpyja</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.189	11.8125
<i>E. leucurus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0.179	11.1875

Los datos en la tabla 10 están organizados de tal forma que los primeros pares de especies que aparecen en la tabla, corresponden a las especies más cercanamente relacionadas y los últimos pares, a aquellas especies que se separan primero del grupo según la filogenia de Lerner y Mindell (2005).

Al detallar estos resultados, salta a la vista que existe una alta correspondencia entre los valores de divergencia encontrados y los que se esperarían según la filogenia de Lerner y Mindell (2005, datos no publicados). Es decir, se puede observar como el porcentaje de divergencia va en aumento a medida que se analizan parejas de especies filogenéticamente más alejadas (comparar los porcentajes de divergencia de *O. isidori* - *S. ornatus* vs *O. isidori* - *P. haliaetus*, por ejemplo).

Sin embargo, en algunos pocos pares de especies, los datos no concuerdan con lo que se esperaba según su grado de relación filogenética. Tal es el caso de *Oroaetus isidori* y *Accipiter bicolor*, que a pesar de no ser especies tan cercanas y que no pertenecen a subfamilias hermanas, presentan una divergencia demasiado profunda; casi la correspondiente a subfamilias tan alejadas como Aquilinae y Elaninae. Algo muy semejante sucede para *Spizaetus ornatus* y *A. bicolor* (con asterisco en la tabla 10).

En el caso de *G. melanoleucus* también se observa una pequeña inconsistencia entre los tiempos de divergencia de esta especie con *E. leucurus* y con *P. haliaetus*. Se esperaría un valor mucho mayor de divergencia entre *Geranoaetus melanoleucus* y el águila pescadora (por pertenecer a supuestas diferentes familias), que entre este y el *Elanus*. Pero lo cierto también es que con respecto al águila pescadora todos los valores de divergencia fueron bastante bajos, oscilando entre 10.3 y 13.3 MYA.

En la tabla del Anexo 3, se observan de nuevo los cálculos de tiempos de divergencia a partir del *citocromo b* esta vez contrastados con los cálculos a partir de microsatélites con dos diferentes tasas mutacionales. Esto con el fin de observar si hay una diferencia muy notable entre los cálculos de tiempos de divergencia para los dos tipos de marcadores.

En la gran mayoría de los casos los cálculos de tiempos de divergencia a partir de microsatélites (independientemente de la tasa de mutación elegida), se encuentran por debajo de las estimaciones realizadas a partir de *citocromo b*. Tal diferencia entre ambos tipos de cálculos fue hasta 1000 veces menor para las divergencias obtenidas con los marcadores nucleares.

Para casi todos los marcadores (con excepción de Aa02 y Aa04, en los cuales la tendencia no es muy clara), la tasa mutacional que proporcionó estimas de tiempos de divergencia más cercanas a las calculadas a partir de *citocromo b*, fue  $\mu = 1 \times 10^{-6}$  (ver Anexo 3); sin embargo siguen siendo valores no equivalentes.

Los cálculos de divergencia con microsatélites para aquellos pares de especies que presentaron valores atípicos de divergencia en la tabla 11 (con asterisco), en algunos casos no fueron posibles porque no hubo amplificación de determinado marcador (Aa04 y Aa12 en *Accipiter*); incluso se excluyó a *E. leucurus* de dicho análisis por no presentar suficientes marcadores. En los casos de *S. ornatus*-*Accipiter sp.* y *O. isidori*-*Accipiter sp.*, no se observó un especial sesgo a lo largo

de los diferentes microsátélites hacia valores más altos de los esperados, como si sucedió para dichas especies en las divergencias a partir de *citocromo b*.

Los resultados del ejercicio inverso, donde se calcularon valores de  $\mu$  para algunos pares de especies, se pueden ver en el Anexo 4. De manera general se encontraron valores muy pequeños para  $\mu$  en la gran mayoría de los pares de especies analizadas (hasta del orden de  $1 \times 10^{-9}$ ) corroborando lo anteriormente mencionado con respecto a un posible enlentecimiento de las tasas mutacionales de estos marcadores en las aves rapaces.

En concordancia con lo que se señaló en la sección 6.2., los valores más pequeños de  $\mu$  en promedio se observaron en la especie *G. melanoleucus*. En cuanto a los marcadores en particular, aquellos con los valores promedios más bajos en sus tasas mutacionales fueron sin duda Aa04 y Aa53; mientras que los valores más altos en promedio, fueron para Aa02, Aa12 y Aa15.

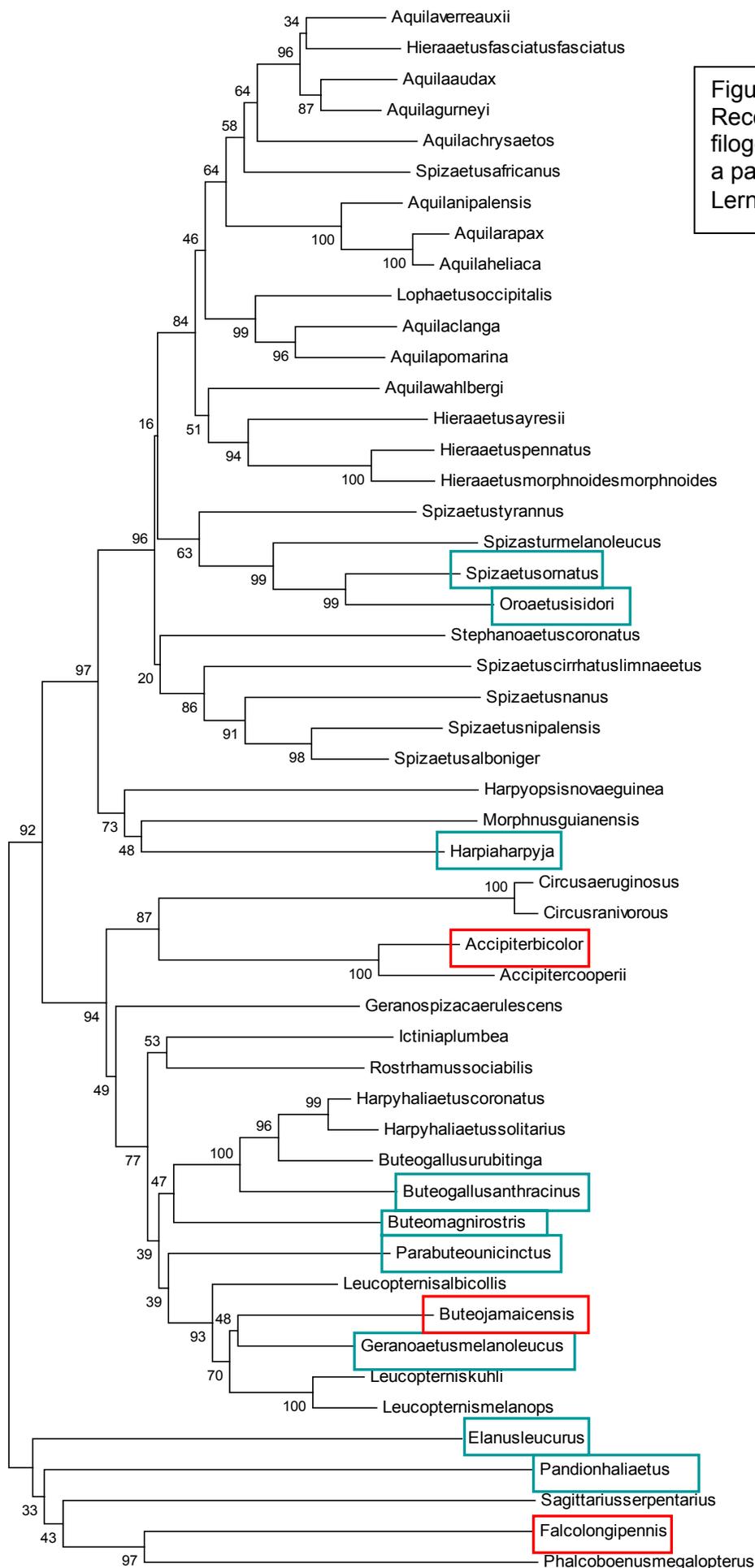


Figura 5.  
Reconstrucción de la filogenia de Accipitridae a partir de los datos de Lerner y Mindell (2005).

**AQUILINAE**

**HARPIINAE**

**CIRCINAE**

**ACCIPITRINAE**

**BUTEONINAE**

**ELANINAE**

**PANDIONIDAE**

**SAGITTARIDA**

**FALCONIDAE**

## 8. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente estudio son pioneros y contribuyen a un mayor entendimiento de la evolución de marcadores moleculares para el grupo de organismos analizados y se convierten en una herramienta útil para futuros investigadores. Debido a que no existe información previa de otros autores referente a la evolución de estos marcadores en el grupo de especies de rapaces estudiadas en este trabajo, algunos datos serán comparados con aquellos obtenidos para otras especies de aves rapaces (*Aquila adalberti*, *A. heliaca* y *A. chrysaetos* en Martínez-Cruz *et al.* 2002).

### 8.1. Descripción de los marcadores

El trabajo con marcadores microsatélites provee una gran cantidad de oportunidades, pero también de precauciones. Para este caso sorprende el relativamente alto nivel de conservación de los loci microsatélites analizados (y en consecuencia sus regiones flanqueantes). Ya sea en una especie u otra, todos los marcadores amplificaron para uno o más productos, lo cual confirma que el panel de iniciadores diseñado a partir de las regiones flanqueantes -de *Aquila adalberti*- son altamente conservadas a pesar del heterogéneo origen de la muestra. Es sabido que la mayoría de los microsatélites se supone que están asociados a ADN no codificante y están sujetos a selección neutral (Goldstein y Schlotterer 1999); es por ello que se espera que la divergencia en las secuencias donde anillan los “primers” o iniciadores, disminuya la probabilidad de amplificación por PCR de las secuencias homólogas en taxa que no están tan cercanamente relacionados. Algunas comparaciones empíricas de microsatélites apoyan la relación inversa entre distancia genética y el éxito de amplificación en especies no focales (Primmer *et al.* 2005), pero otros estudios demuestran una alta conservación de los microsatélites a lo largo de tiempos evolutivos extensos. De hecho, un gran número de estudios (entre ellos Rico *et al.* 1996) han mostrado que los microsatélites pueden conservarse entre especies de peces, no tan cercanamente relacionadas, cuyo último ancestro común data de hace 450 millones de años (Jordan *et al.* 2002).

Las tablas del Anexo 2 son muy interesantes porque revelan a grandes rasgos como están distribuidos los alelos por marcador y por especie. Mientras que en algunos casos como en el marcador Aa02, los alelos están distribuidos aleatoriamente a lo largo de todas las especies, en otros casos (por ejemplo en Aa12, Aa36 y Aa53) casi todas las especies tienen fijado el mismo marcador y/o tienen rangos de tamaños alélicos muy estrechos. Estos alelos tan “constantes” en todas las especies, pueden ser simplemente un artefacto de los tamaños alélicos tan pequeños (como en Aa04). También se presentó el caso de Aa56 en que a pesar de que el marcador no tiene muchos alelos, no hay ninguno que esté aparentemente fijado en alguna especie.

Generalmente la efectividad de los primers microsatélites y el nivel de polimorfismo de los loci amplificados, decrece con el incremento de la distancia filogenética

desde la especie para la cual los primers fueron diseñados (Primmer *et al.* 2005). Por tanto, los microsatélites tienden a ser subóptimos para otras especies y a menudo resultan en rangos alélicos muy cortos, monomorfismo o alelos nulos (Primmer *et al.* 2005). Este fenómeno se observó claramente en los grupos externos, Falconidae, Cathartidae y Strigiformes (ver tabla 7); de hecho las otras especies de catártidos (*Vultur gryphus* y *Coragyps atratus*) no amplificaron para ninguno de los marcadores heterólogos.

Se obtuvo en contraste, una alta correspondencia en la amplificación de los microsatélites en las especies más cercanamente relacionadas a *A. adalberti*: *Spizaetus ornatus*, *Oroaetus Isidori* (miembros de la misma subfamilia de *A. adalberti*) y *Accipiter sp.* (grupo hermano de los Aquilinae) quienes compartieron casi la totalidad de marcadores con la especie focal. Sin embargo, no se observó un patrón muy definido en las otras especies dentro de la familia, ya que no necesariamente compartieron más o menos marcadores con la especie focal independiente de su cercanía filogenética con aquella (ver tabla 7). Sorprendentemente el águila pescadora (*P. haliaetus*) amplificó muy bien para siete de los ocho marcadores a pesar de pertenecer a otra familia.

Con respecto a lo anterior, el criterio de selección de los microsatélites que se usaron fue principalmente su grado de polimorfismo; sin embargo, algunos de los alelos más polimórficos en la especie focal no amplificaron. Es por ello que algunos de los loci escogidos no corresponden a aquellos con el mayor número de alelos en *A. adalberti*, como en el caso de Aa12, Aa04 y Aa15. Curiosamente este último resultó ser más polimórfico no solo en *A. heliaca* y *A. chrysaetos* (Martínez-Cruz *et al.* 2002) sino también en *B. magnirostris*, siendo junto con Aa02 (cinco alelos en *S. ornatus*) los dos marcadores con mayor número de alelos encontrados (ver tablas 6.2 y 7) y potencialmente los más útiles en futuros estudios de aves rapaces neotropicales.

Aunque el proceso mutacional de los microsatélites es bastante conservado, puede variar entre especies (Goldstein & Shlötterer 1999 en McConnell *et al.* 2007). El nivel de polimorfismo también varía mucho entre loci microsatélites y de hecho hay varios factores estructurales, además de la variación en las tasas de mutación, que pueden explicar tal fenómeno (Goldstein & Shlötterer 1999).

Vale la pena resaltar que algunos estudios en aves han demostrado que el grado del polimorfismo de los microsatélites no es transferible (Primmer *et al.* 2005). Es decir que los altos niveles del polimorfismo detectados en una especie pueden no encontrarse en el locus correspondiente de otra especie al usar primers heterólogos (Oliveira *et al.* 2006). Sin embargo, es muy claro y ventajoso el uso de microsatélites heterólogos, ya que hay una muy baja frecuencia de estos marcadores en los genomas aviares (Neef & Gross 2001), además que su desarrollo y diseño puede ser dispendioso y costoso.

Con respecto al bajo nivel de polimorfismo observado, es posible que se este presentando lo que se denomina “sesgo por escogencia” o *ascertainment bias*,

fenómeno descrito por Vowles y Amos (2006). Este tipo de sesgo se produce en el momento de seleccionar los microsatélites en la especie focal, ya que siempre hay una fuerte tendencia a escoger los microsatélites más largos y/o más polimórficos, aunque estos pueden no ser los más apropiados para trabajos con especies relacionadas. De hecho en este caso el método que se usó para el aislamiento de los microsatélites, involucró una revisión de los polimorfismos en la especie focal (*A. adalberti*); los loci que presentaron el nivel de polimorfismo más alto fueron escogidos y los otros loci se descartaron.

El “sesgo por escogencia” ha sido reportado para longitud y heterocigocidad (Vowles & Amos, 2006) pero el hecho de que un marcador en particular sea altamente polimórfico en la especie focal no significa que lo será en otras especies. Lo anterior podría explicar en parte los bajos niveles de polimorfismo encontrados, pero también es obvio que los tamaños muestrales tan pequeños en la mayoría de las especies estudiadas, afectan considerablemente los datos. Se podría decir que se está produciendo una clase de “efecto fundador” donde solo algunos de los alelos, del gran pool de alelos presentes en la naturaleza, están siendo observados; muy probablemente aquellos con las frecuencias alélicas más elevadas.

El rango de tamaños de los marcadores de las especies analizadas en este estudio con respecto a las especies trabajadas por Martínez-Cruz *et al.* (2002), es bastante similar, con excepción de los loci Aa02 y Aa15 que presentan un rango de tamaños más amplio que el observado para las águilas de Viejo Mundo (ver tablas 6.1 y 6.2). Este es un resultado obvio, teniendo en cuenta el número y diversidad de especies trabajadas; es además interesante si se tiene en cuenta el nivel de polimorfismo de los marcadores analizados (heterocigocidad esperada entre 0.34 y 0.66) en la especie focal (Martínez-Cruz *et al.* 2002). En contraste, los alelos de los marcadores utilizados son más pequeños en promedio (entre 9 y 20 unidades de repeticiones) comparado con otras familias de aves. Brohede *et al.* (2002) por ejemplo, reportó microsatélites inusualmente largos (alrededor de 30 tándems de repetición promedio por marcador) en la golondrina de granero *Hirundo rustica*, quién a su vez, produjo heterocigocidades de 0.97. Es posible entonces que exista una relación entre el grado de polimorfismo, la heterocigocidad y el tamaño de los microsatélites.

Hay evidencia de que los loci microsatélites tienden a ser más largos en aquellas especies que han sufrido una expansión dramática en sus poblaciones. Tal es el caso de estudios realizados en microsatélites humanos, comparados con su contraparte en chimpancés, donde se encontró que en efecto en humanos los tamaños de los loci son considerablemente más largos (Goldstein & Shlötterer 2000); y como se mencionó anteriormente, los microsatélites de una especie tan abundante como la golondrina de granero, son consistentemente más largos que sus homólogos en otras especies relacionadas (Goldstein & Shlötterer 2000). Sin embargo, al no poseer datos de tamaños poblacionales en el grupo de rapaces estudiadas, no es mucho lo que se puede inferir al respecto. Se sabe que entre las especies más abundantes de las estudiadas en este trabajo, se encuentra el

gavilán pollero *Buteo magnirostris*, quién es a su vez el gavilán más común en Colombia (C. Márquez com.pers.); tanto así que fue junto con el águila de páramo, una de las especies mejor representada en este estudio (ver tabla 3). Pero de nuevo, no hay información suficiente para hacer ninguna clase de inferencia con respecto a la posible relación entre especies con expansiones poblacionales y la longitud de los loci microsatélites.

Adicionalmente en la especie focal *A. adalberti* Martínez- Cruz *et al.* (2002) observaron que la mitad de los marcadores se ajustan a los valores esperados por Hardy y Weinberg. Estos autores también encontraron desequilibrio de ligamiento en algunos de los pares de loci de *A. adalberti* (aunque no para su especie hermana *A. heliaca*). Además del desequilibrio de ligamiento, otros factores demográficos como cuellos de botella recientes o “admixture”, pueden llevar a ligamiento entre loci (Hailer *et al.* 2005). Para este caso, como la muestra es tan pequeña y hay representados tan pocos alelos, en realidad no se puede deducir mucho al respecto. Se podría haber realizado un análisis de desequilibrio de ligamiento al menos para las especies que cuentan con una muestra más grande (*G. melanoleucus* y *B. magnirostris*), pero como la variabilidad es tan baja, muy probablemente los resultados indicarían ligamiento entre algunos pares de loci por esta misma razón y no necesariamente como reflejo real de la segregación alélica. Mucha de la variación de los polimorfismos de los loci microsatélites entre especies, se pueda atribuir a diferencias en la biología de las poblaciones, a diferencias debidas a selección natural y en un menor grado a loci ligados (Neef & Gross 2001). En este trabajo en particular la baja diversidad genética podría ser atribuida a loci sometidos a selección homogeneizante o a algún tipo de constricción mutacional.

En cuanto a las frecuencias alélicas, el presente trabajo muestra muy marcadas diferencias para cada marcador y no es posible encontrar un patrón claro aún tomando especies con cercanía filogenética. Retomando lo ya mencionado, es altamente probable que los resultados sean un artefacto del número muestral y de la heterogeneidad del mismo en las diferentes especies (ver tabla 3). Con respecto a la frecuencia de algunos alelos en particular, aunque no se puede hablar como tal de “alelos raros”, ya que los resultados obtenidos reflejan simplemente un sesgo que sería eliminado al aumentar el tamaño de la muestra, si se puede mencionar la presencia, bastante común, de alelos al parecer fijados en una especie pero no presentes en otras. Este fenómeno está especialmente evidenciado en las especies externas, las cuales prácticamente no comparten alelos con el resto de especies de accipítridos; aquello tampoco sorprende si se tiene en cuenta la lejanía filogenética entre las diferentes familias.

## **8.2. Constricciones en los microsatélites (Garza *et al.* 1995)**

Como se ha mencionado en varias ocasiones, los microsatélites son una poderosa herramienta para el análisis de estructuras poblacionales e incluso pueden ser usados como marcadores filogenéticos. A pesar de ello, algunos de estos

marcadores se consideran poco útiles ya que pueden estar siendo afectados por selección natural o por constricciones mutacionales (Ruíz-García *et al.* 2004).

Garza *et al.* (1995) estudiaron la mutación y evolución de los microsatélites, comparando el rango de variabilidad del mismo loci en humanos y chimpancés (Dermitzakis *et al.* 1998, citado en Garza *et al.* 1995). Ellos concluyeron que deben existir constricciones en estas secuencias, ya que las diferencias en el promedio del tamaño de los alelos entre las dos especies son muy pequeñas para su distancia evolutiva, dado la alta tasa de mutación de los microsatélites. Propusieron entonces que las posibles explicaciones para estos resultados, eran un proceso de sesgo mutacional o selección natural (Dermitzakis *et al.* 1998).

En este trabajo se encontró, de forma generalizada, que las diferencias en el número promedio de repeticiones en la mayoría de los loci de los pares de especies estudiadas, son menores que lo que se esperaría si estos loci estuvieran sujetos a un proceso de mutación estrictamente neutral, en función de los tiempos de divergencia obtenidos con las secuencias de *citocromo b* (ver sección 7.4). Es decir, que si el aislamiento reproductivo propio de especies diferentes fuera el único mecanismo actuando sobre el proceso evolutivo, se esperaría que estos microsatélites presentaran números promedios de tándems de repetición muy diferentes de una especie a otra; en este estudio ese no es el caso.

Es posible también atribuir la homogenización en los tamaños de los marcadores a una restricción en la longitud de los mismos, dada ya sea por selección o por mutaciones “sesgadas”, como se menciona en Garza *et al.* (1995). De igual forma como afirman Nauta y Weissing (1996) los microsatélites debido a sus características mutacionales, pueden presentar rangos alélicos muy estrechos. Consecuentemente, aquello influiría directamente en el cálculo de los tiempos de divergencia a partir de estos marcadores, ya que como se verá más adelante, las divergencias obtenidas partir de estos microsatélites, resultaron menores que las calculadas con otros marcadores moleculares.

Así mismo, estas observaciones sugieren que en algunos de los marcadores trabajados (específicamente en Aa04, Aa12 y Aa53) se manifiesta tal fuerza selectiva/constrictiva, que probablemente limita los procesos de mutación. Y a pesar de que no se encontró nada muy claro en los restantes marcadores con respecto a los valores de  $\Delta$ , más de la mitad de las tasas mutacionales calculadas fueron menores a las propuestas para humanos ( $1 \times 10^{-3}$  y  $5.6 \times 10^{-4}$ ). Es importante aclarar que por aplicarse un método indirecto para el cálculo de las tasas mutacionales de estos microsatélites, no es posible más que inferir que estos marcadores tienen valores menores a los reportados para otras especies.

Correspondientemente y retomando los resultados de la tabla 6.1., el locus Aa04 es el marcador con menor número de alelos seguido por Aa53, ambos con rangos de tamaños muy limitados. El marcador Aa12 por su lado, aunque no presenta características tan extremas como los dos anteriores, amplificó muy pocos alelos tanto en la especie focal como en sus especies hermanas (ver tabla 6.2.).

Es posible que los microsatélites puedan no estar en un balance mutación–deriva y altamente probable, que la selección favorezca ciertas variantes alélicas en estos loci (Garza *et al.* 1997; Neef & Gross, 2001). Se sabe por ejemplo, que en poblaciones aisladas ó muy pequeñas, tasas de mutación altas son descartadas por la fuerza relativa de la deriva genética (Bollmer *et al.* 2005). Sin embargo, esto no se puede comprobar ya que no se tienen valores de tamaños poblacionales en las especies trabajadas, sumado a que la forma como se ha intentado acercarse a un valor de  $\mu$  en los microsatélites de las rapaces es un método indirecto.

Las tasas de mutación de los microsatélites para humanos, ratas y cerdos, se han estimado dentro del orden de  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  (Schug *et al.* 1997), Sin embargo, otros estudios entre ellos el de Garza *et al.* (1995), sugieren que la tasa de variación de estos marcadores varía considerablemente de un grupo a otro. Aunque en este trabajo no se midieron directamente las tasas mutacionales de los microsatélites, se asume que tienen tasas relativamente más bajas que la reportada para varios mamíferos. Schug *et al.* (1997), quienes calcularon las tasas de mutación de *Drosophila melanogaster*, proponen que quizás la tasa mutacional comparativamente tan baja que encontraron ( $6.3 \times 10^{-5}$  promedio por locus) es básicamente una función de las cortas longitudes de los microsatélites en el genoma de *D. melanogaster*. Sería interesante indagar si lo mismo está sucediendo en las aves rapaces. Es probable también que la tasa mutacional de los Accipitridae puede ser simplemente una manifestación de una tasa globalmente baja para todo el genoma de las aves.

Desde el punto de vista de las especies y en el caso particular del águila pescadora, los resultados demuestran que en al menos tres marcadores Aa36, Aa56 y especialmente en Aa53, las tasas mutacionales son efectivamente menores a  $1 \times 10^{-3}$  (tabla 8). Este resultado es interesante porque -como se verá más adelante- explica en parte, el hecho de que los valores de divergencia del águila pescadora con respecto al resto de especies de la familia Accipitridae, son mucho menores que las obtenido con las secuencias de *citocromo b* y datos paleontológicos. Aunque los resultados no son concluyentes, surge la idea de que quizás el águila pescadora no hace parte de una familia única dentro de los Falconiformes como sugieren la mayoría de los autores clásicos (Wetmore 1960; Brown y Amadon 1968; Cracraft 1981), sino que haría parte de los accípitridos como la subfamilia Pandioninae (Griffiths *et al.* 2007).

En general, para todas las especies, se aprecia un considerable número de valores significativos para el valor crítico de  $\Delta$ , destacándose *G. melanoleucus*, *B. magnirostris* y *P. haliaetus* de nuevo. Esto se debe sin ir más allá, a que son estas las especies mejor representadas en cuanto a número de muestras y de marcadores amplificados. Lo contrario sucede con *B. anthracinus* y *E. leucurus*, quienes no presentaron muchos valores significativos en proporción; claro está, que la primera especie es monomórfica para todos los marcadores y la segunda solo amplificó para tres marcadores, dos de los cuales también son monomórficos.

Los resultados que se observaron, para el análisis de sesgo de tamaño, mediante el estadístico  $2N\beta$ , fueron algo inesperados. Por un lado, Aa02 y Aa15 son los loci con el rango de tamaños más amplio (tabla 6.1) y por otro son los que presentaron los valores más altamente significativos para el sesgo en el tamaño alélico (tabla 9), lo que implicaría que la mayoría de los alelos se encuentran dentro de un rango limitado de tándems de repetición. Lo anterior tendría sentido, si se considera que los microsatélites más largos tienden a alcanzar más probablemente un límite superior cuando superan cierto tamaño que otros marcadores más cortos (Vowles & Amos, 2006). Pero contradictoriamente, Aa02 y Aa15 tienen a su vez el promedio más alto de alelos por especie. Por tanto es posible también que a pesar de que el sesgo es grande, las tasas evolutivas son lo suficientemente altas (teniendo en cuenta que no son tasas altas en el sentido estricto, ver Anexo 4) como para producir un número considerable de alelos con tamaños muy diferentes. Muchos estudios en humanos, *Drosophila*, levaduras y aves han demostrado que existe una correlación positiva entre el tamaño de los microsatélites y las tasas de mutación (Ellegren 2000; Schlötterer 2000). De hecho, las tasas de mutación en los microsatélites pueden verse afectadas por la ubicación en el genoma, la tasa de recombinación, el tipo y número de las repeticiones, la tasa de “slippage” y la misma selección constrictiva (Schlötterer 2000); es probable que esto suceda en estos dos marcadores en particular.

En el locus Aa04 sucede exactamente lo contrario, ya que presenta valores relativamente bajos para  $2N\beta$  y un rango muy estrecho de tamaños alélicos (120-134). La razón más probable para explicar dicho suceso es la poca representación del Aa04 en las especies analizadas (once de las veintiuna especies de aves rapaces). Es además conocido el hecho de que en algunos grupos los microsatélites exhiben gran variación en la composición del tamaño de los alelos, pero también es cierto que estos marcadores muestran una considerable conservación, como en este caso, dentro de muchos grupos taxonómicos mayores (Ross *et al.* 2003). Esta variación puede ser explicada por evolución muy lenta de los microsatélites, es decir tasas de mutación bajas (ver Anexo 4) como en Aa04, de tal forma que todas las especies -que amplificaron para este marcador- dentro del grupo tengan patrones de variación similar.

Por otro parte, si se consideran todos estos resultados desde el punto de vista de las parejas de especies (observando las tablas 8 y 9 por filas), se puede determinar que tales constricciones y sesgos en el tamaño de los microsatélites varían de modo específico; confirmando que es muy poco lo que se sabe de la naturaleza de esas constricciones y por que varían o no entre especies (Dermitzakis *et al.* 1998). Sin embargo, dado el supuesto que los patrones de variación de los microsatélites reflejan un balance entre procesos mutacionales dentro de las especies (Ross *et al.* 2003), es sorprendente que este proceso no difiera demasiado entre especies que han estado separadas por millones de años. Desafortunadamente, la comparación de los marcadores microsatélites a lo largo de un amplio rango de especies, puede ser algo problemático cuando se usan como en este trabajo, marcadores heterólogos.

La conservación de los loci microsatélites a lo largo de grandes periodos de tiempo no es un evento sin precedentes (Rico *et al.* 1996; Streelman *et al.* 1998) y puede ser explicada por selección purificadora o por tasas de mutación reducidas como sucede en este caso. En estudios realizados por Streelman *et al.* (1998) se explicó la conservación de las secuencias microsatélites, debido a que se encontraban embebidas en el intrón de un gen codificante para una proteína. Esta observación abre la posibilidad que las secuencias repetitivas pueden estar asociadas a una secuencia funcional y que la selección natural preserva activamente el motivo de repetición. Y aunque hasta el momento, no se ha encontrado evidencia directa para un rol específico de los loci microsatélites en los genomas eucariotas, varios tipos de funciones asociadas con secuencias repetitivas simples se han reportado en la literatura (Goldstein & Shlötterer 2000; Rico *et al.* 1996), sugiriendo que existen fuerzas de selección constrictiva que pueden estar actuando directamente en la evolución de al menos, algunos loci en particular. Para este caso, no se tiene información de que estos marcadores se encuentren en regiones con alguna función biológica; pero también es cierto que estos microsatélites fueron desarrollados con el fin de realizar estudios de genética poblacional (Martínez-Cruz *et al.* 2004) y estudios de parentesco, paternidad e identificación de individuos, por tanto esta es la primera vez que estos marcadores microsatélites son sujetos a un estudio donde se indaga sobre el proceso evolutivo de los mismos.

Los resultados confirman que los procesos mutacionales de los marcadores microsatélites parecen ser más complicados que lo descrito previamente por algunos autores como Tautz (1989) ó Weber y May (1989) (citados en Garza *et al.* 1995) y que la diferencia entre los alelos a nivel interespecífico, no siempre es resultado de simples cambios en el número de tándems de repetición.

### **8.3. Relaciones dentro de los Accipitridae a partir de marcadores microsatélites y comparación con las secuencias del *citocromo b***

Aunque las relaciones filogenéticas dentro de la familia Accipitridae no están completamente establecidas, son de particular interés por ser éste el grupo más grandes de Falconiformes y porque incluye varias especies de interés en conservación. Los análisis de Raposo *et al.* (2006) proveen un ejemplo sobre la falta de correspondencia entre la taxonomía clásica de Accipitridae y las filogenias moleculares. Los resultados obtenidos a partir de diferentes técnicas (morfología, hibridación ADN-ADN y secuenciación de genomas mitocondriales) son bastantes conflictivos y poco contundentes (Hackett *et al.* 2008). Los estudios filogenéticos se han basado históricamente en genes mitocondriales, sin la corroboración con unidades de segregación independiente como los genes nucleares (Mindel *et al.* 1997; Raposo *et al.* 2006, entre otros).

Adicionalmente, existen muy pocos estudios filogenéticos que han usado marcadores microsatélites (Robinson & Stephen 1999) y hasta el presente ninguno en aves rapaces.

Las mutaciones en los microsatélites pueden ser un factor homogenizante (conduciendo a la aparición de alelos ya existentes) debido a la homoplasia por tamaño (Richard & Thorpe 2001). Por ello, las medidas de diversidad genética que usan datos de microsatélites, alcanzan rápidamente un “plateau” o meseta (Richard & Thorpe 2001; Garza *et al.* 1995). Teniendo en cuenta lo anterior y debido a que se encontraron tasas de mutación relativamente bajas (ver sección 8.2), se decidió probar estos marcadores para determinar si se podría apreciar alelos suficientemente divergentes para permitir una evaluación confiable de ortología.

Lo primero que salta a la vista, es que las tres topologías presentadas (figuras 3, 4 y 5), difieren considerablemente de aquellas de Lerner y Mindell en su artículo del 2005. Tales diferencias se deben en parte a que en este caso no se modeló el árbol con todas las 231 especies utilizadas por ellos (se excluyeron todos los buitres y la mayoría de las especies de águilas exclusivas del Viejo Mundo) y en parte también a que no se utilizaron ni los mismos modelos evolutivos y distancias, ni el mismo tipo de marcadores genéticos (Lerner y Mindell 2005 usaron la distancia genética de Tamura-Nei en loci mitocondriales). A pesar de ello, el filograma de Lerner y Mindell (2005) se puede comparar con el fenograma obtenido a partir de los datos de microsatélites, con el simple propósito de observar las diferencias entre las topografías y resaltar las virtudes y carencias de este tipo de análisis con marcadores nucleares tipo microsatélites. Claro está, que aunque se usó dicho trabajo como modelo, los árboles filogenéticos basados en secuencias mitocondriales no son necesariamente inequívocos y correctos. De hecho, si el set de datos de estos genes mitocondriales no es muy completo y no contiene todos los taxa relacionados para una comparación, se pueden generar errores debido a lo que se conoce como atracción de ramas largas o “long branch attraction” (Wink & Heidrich 2000).

Las especies que generaron mayor conflicto en los árboles obtenidos fueron *Falco femoralis*, *Accipiter sp.*, *A. nitida*, y *B. swainsonii*, claramente reflejando inconsistencias en las ramas donde están ubicadas y muy probablemente debido a la forma como se comportan los loci microsatélites en estos taxa (ver capítulo 7). También el denominado grupo externo presenta problemas, ya que tanto *S. papa* como *F. femoralis* forman a su vez un cluster dentro del “ingroup”. En general, ninguna de las subfamilias de accipítridos reconocidas se comporta como un grupo discreto. Una de las razones más probables, es el hecho de que muchas de las especies solo amplificaron para un número reducido de marcadores (ver tabla 7), lo que conduce a una subestimación de la divergencia genética de esas especies. También es posible que debido a constricciones propias de los microsatélites y a sus tasas de mutación características, los alelos de los diferentes marcadores no se desvíen demasiado de un tamaño promedio, lo que conlleva a una muy mala agrupación de las especies dentro de la familia, independientemente de sus relaciones filogenéticas reales.

Analizando en detalle las características de los alelos en dichas ramas más conflictivas (especies con asteriscos en las figuras 3, 4 y 5), se encontró que *Falco*

*femoralis* al igual que *Sarcoramphus papa* amplificaron solamente tres marcadores, y este último con un solo alelo por loci; *Accipiter sp.*, *Buteo swainsonii* y *Asturina nitida* aunque amplificaron respectivamente siete, seis y cinco marcadores, todos fueron monomórficos (ver tabla 7). *Buteo platypterus* por su parte amplificó para la mayoría de los loci estudiados y con buena representación alélica; Sin embargo, esta especie se encuentra en al menos los árboles de las figuras 3 y 4, bastante lejos del cluster de los sub-buteoninae. Bien es cierto también, que Lerner y Mindell (2005) se encontraron que el género *Buteo* es polifilético y en un trabajo reciente de Lerner (2007) se comenta que la posición de *Asturina nitida* (= *Buteo nitidus*), no ha sido bien resuelta o al menos suficientemente soportada; agregando razones para justificar los resultados tan dispares con respecto a otras filogenias (Brown & Amadon 1968; AOU 1998; Wink *et al.* 2004). La especie *Elanus leucurus* por otra parte, se mantiene en el presente estudio como uno de los taxones más basales (internos) dentro de los accipítridos, en concordancia con la mayoría de las filogenias propuestas.

En cuanto a las diferencias de los análisis con y sin grupos externo, a pesar de que los árboles de la figuras 3 y 4, tienen problemas con la conformación de su “outgrupo”, y que incluso incluyen a *B. swainsonii* (en el árbol generado con NJ) o *E. leucurus* (en el caso del árbol UPGMA), son más consistentes e informativos que aquel árbol en el cual no se incluyeron las especies del grupo externo (figura 5). Contrario a lo que se proponía desde el principio, la incorporación de los grupos externos en los análisis no produjo árboles con ramas más cortas corrigiendo de alguna forma la atracción de ramas (“long branch attraction”). Aquello seguramente debido a que este fenómeno es común de los análisis filogenéticos que emplean la Máxima Parsimonia (Maximum Parsimony) con datos de secuencias. Pero muy probablemente si se eliminaran aquellas especies que fueron monomórficas para todos los marcadores (como *B. swainsonii*, *S. papa*, *A. nitida* y *Accipiter sp.*), se obtendría una topografía más acorde con lo propuesto en la literatura.

Smith (1994) demostró que los análisis de parsimonia arrojan árboles más óptimos cuando se usan múltiples taxones que pertenezcan a un solo grupo hermano (con ramas relativamente largas), que cuando se usan grupos externos de linajes muy distantes. Queda por tanto la duda de que pasaría si se eliminan tanto a *Pulsatrix* (Strigiformes) por pertenecer a un grupo no hermano de los Falconiformes, como a los catártidos (familia conflictiva y de la cuál aún no hay certeza si pertenece o no a este Orden) y se escogen otros taxones con una relación más clara con respecto al grupo en estudio; valdría la pena incluir a algún miembro del Orden Ciconiiformes.

Por la naturaleza de los marcadores (y de los análisis realizados) podemos asegurar que los árboles obtenidos corresponden a “árboles de genes” que no reflejan las relaciones filogenéticas del grupo de aves rapaces que se trabajaron, pero en cambio pueden ser muy útiles para entender un poco sobre los mecanismos evolutivos y mutacionales que han sufrido estos marcadores en las rapaces Neotropicales.

Tal y como se observa en el Anexo 2 y teniendo en cuenta todo lo descrito en el capítulo anterior, es posible concluir que la información obtenida a partir de estos marcadores microsátélites, al menos en estas especies, es bastante pobre y que por el contrario están generando agrupaciones poco consistentes desde el punto de vista filogenético (especialmente en aquellas especies que comparten alelos en algunos loci). Evidentemente el hecho de que estos marcadores se encuentran aparentemente constreñidos (ver sección 8.2), influye directamente en las desviaciones que se encontraron, con respecto a las filogenias de este grupo propuestas a partir del *citocromo b*.

Se recalca entonces el hecho de que la reconstrucción de las relaciones entre especies está siendo limitada por el número de alelos por loci y/o la relativamente baja tasa de evolución de los marcadores con un también limitado poder para resolver los internodos, como en *B. magnirostris* – *P. uncinatus* y en *B. brachyurus* – *B. albicaudatus* (ver figuras 3, 4 y 5).

Alternativamente, se observa para estos marcadores que los grandes grupos de rapaces tienen alelos suficientemente diferenciados como para identificar agrupaciones filogenéticas mayores (a nivel de familias por ejemplo), como en el caso del Águila Pescadora (*Pandionidae*); los alelos que ha heredado *Pandion* con respecto a otras águilas (*Accipitridae*) son al parecer suficientemente diferenciados y se han diversificado a lo largo del tiempo (ver Anexo 2). Es posible que lo mismo suceda con los falcónidos y catártidos, quienes también presentaron alelos particulares, pero desafortunadamente son tan pocos los marcadores que amplificaron para estas familias que es difícil hacer comparaciones informativas.

Es casi un consenso generalizado que los microsátélites no son considerados buenos marcadores para este tipo de estudios. Un problema obvio con el uso de los microsátélites en filogenias es que el desarrollo de primers para un taxón, puede no funcionar bien en otros taxa para los cuales se requieran datos. Aunque la amplificación-cruzada entre especies en este estudio fue bastante buena, es posible que se haya perdido bastante información por alelos nulos o porque perdieron su habilidad para amplificar en taxa divergentes. A pesar de ello, dentro del marco de este trabajo es importante hacer este tipo de análisis para comprobar la hipótesis que los marcadores trabajados no se están comportando neutralmente.

De otro lado, este estudio sugiere que aún un número reducido de microsátélites, en un número representativo de muestras por especie, puede ser útil para corroborar *divisiones profundas* dentro de un grupo particular. Pero de nuevo, una de las mayores desventajas de los microsátélites que se utilizaron es su limitado rango de tamaños alélicas; como consecuencia, el potencial para la divergencia genética es muy pobre y por ende la información genética específica de algunos taxa en particular se pudo perder fácilmente. Tal es el caso de las especies *Buteo swainsonii*, *B. anthracinus*, *Sarcoramphus papa*, *Falco femoralis*, *Asturina nitida* y *Accipiter sp.*

Es factible que se pueda observar la diferenciación genética en estos marcadores en una perspectiva a mediana escala filogenéticamente hablando (tal vez tomando solamente un Orden en particular o miembros de varias Familias), pero siempre a partir de un grupo de especies suficientemente bien muestreado, alrededor de 10 individuos por especie. Más allá de este contexto los datos obtenidos a partir de microsatélites deben ser tratados con cuidado para evitar errores por mala interpretación (Nauta & Weissing 1996). Adicionalmente estos análisis son meramente cualitativos ya que no hay soporte estadístico (Bootstrap, Máxima Verosimilitud o Máxima Parsimonia) para los nodos.

#### **8.4. Tiempos de divergencia**

Una razón muy importante que justifica no solo el establecimiento de una “adecuada” aproximación a la filogenia de un grupo, sino también la estimación de los tiempos de divergencia entre las especies, es que estos son fundamentales para probar los modelos evolutivos. En otras palabras, es posible usar los árboles “fechados” con tiempos de divergencia, para inferir procesos evolutivos (Harris *et al.* 2004).

En esta sección se asume un reloj molecular (Helbig *et al.* 2005), es decir que la tasa de evolución es constante a lo largo de los linajes y del tiempo, pero no es posible estar cien por ciento seguro que este comportamiento se este presentando en todos los linajes. A pesar de ello, los porcentajes de divergencia que se calcularon son bastante coherentes con lo que se esperaría, teniendo en cuenta la distribución de los linajes a lo largo del filograma de Lerner y Mindell (2005).

Quizás el resultado más sobresaliente es con respecto al águila pescadora ya que la diferencia en los porcentajes de divergencia entre *Pandion haliaetus* y las otras especies de accipítridos, no es tan grande como se esperaba para especies de supuestas familias diferentes (ver sección anterior). En el estudio de Griffiths *et al.* (2007) se propone al águila pescadora, no como una familia aparte del resto de accipítridos, sino como una subfamilia (Pandioninae) dentro de la familia Accipitridae, lo que sugeriría una mayor cercanía filogenética, que probablemente correspondería a su vez, a un menor tiempo desde que estos clados se separaron. Por otro lado, Seibold y Helbig (1995) estimaron que la divergencia entre las familias Pandionidae y Accipitridae ocurrió hace 24 a 30 millones de años, un tiempo mucho mayor del que se obtuvo en este trabajo. Según Heather Lerner (com. pers. 2007) el águila pescadora se separó entre hace 20 a 40 millones de años del resto de accipítridos.

Así mismo, se pueden encontrar variaciones en los relojes moleculares calculados a partir de diferentes moléculas, diferentes regiones dentro de una misma molécula, diferentes regiones en el genoma etc. (Kimura y Ohta 1973); por lo cual siempre se hace necesario evaluar el reloj molecular. Claramente esto último no es el objetivo de este estudio, pero quizás las inconsistencias encontradas en los porcentajes de divergencia de algunos de los pares de especies evaluadas puedan estar más influenciadas por variaciones del reloj molecular como tal.

Helbig *et al.* (2005), por su lado, calcularon también tiempos de divergencia con *citocromo b* para especies dentro de la Tribu Aquilini y del grupo con respecto a toda la Familia; obtuvieron un valor de alrededor de 12-15 millones de años para el grupo en general, mientras que el clado neotropical por su parte, se separaría hace 8-11 millones de años. Estos datos están mucho más acordes con lo obtenido en este estudio, donde los tiempos de divergencia de *S. ornatus* y *O. isidori* (miembros de la misma Tribu), con respecto a las restantes especies de accipitrídeos, oscilan entre 8.25 y 11.3 millones de años.

A su vez, otros análisis filogenéticos a partir de datos moleculares (Haring *et al.* 2001) indican una separación muy temprana entre Accipitridae y Falconidae; se asume que esta separación (*Buteo/Falco*) pudo haber sucedido en el Cretaceo tardío hace 65–83 MYA. Partiendo de ese punto de referencia los valores obtenidos en el presente trabajo estarían subestimados con respecto a los calculados por Haring *et al.* 2001; pero también es cierto que en este trabajo esa comparación en particular no fue considerada ya que no se obtuvieron datos de secuencia para el gen del *citocromo b* ni en *Falco femoralis* ni en *Falco peregrinus*. Lo cierto es que los datos acá presentados (tabla 10) muestran en general tiempos de divergencia un poco bajos, similar a lo presentado por Garza *et al.* (1995) para humanos y chimpancés ó para primates neotropicales (Ruíz-García *et al.* 2004).

De otra parte, es importante resaltar las diferencias no solo entre los re-cálculos de tiempos de divergencia a partir de *citocromo b* (con datos de Lerner y Mindell 2005) con respecto a otros estudios, sino también entre los cálculos de divergencia a partir de microsatélites y de *cyt b*. Para la gran mayoría de los pares de especies, los cálculos de tiempos de divergencia obtenidos a partir de microsatélites (independientemente de la tasa de mutación elegida) fueron muy inferiores a las estimaciones realizadas a partir de *citocromo b* (ver Anexo 3). De nuevo confirmando que dichos marcadores microsatélites NO están evolucionando neutralmente.

En algunos pocos casos, los tiempos de divergencia a partir de los dos tipos de marcadores fueron muy similares, razón por la cual no se debería generalizar que determinado marcador microsatélite se pueda comportar como uno mitocondrial (Anexo 3). Cuando se realizaron los cálculos con una tasa mutacional del orden de  $10^{-6}$  la mayoría de los microsatélites se comportaron como el *cyt b* en ciertos pares de especies (por ejemplo *B. magnirostris*–*O. isidori*, *P. unicinctus*–*O. isidori* y *P. unicinctus*–*Accipiter sp.*). Es por tanto clave obtener estimas de tasas mutacionales confiables, especialmente cuando se decide medir tiempos evolutivos (Crawford & Cuthbertson 1996). Desafortunadamente, las tasas de mutación en los microsatélites son difíciles de obtener porque en las aves estos son eventos raros y difíciles de confirmar, entre otras cosas porque no son tan abundantes dentro del genoma de este grupo.

Adicionalmente, los resultados indican que si bien la evolución de los microsatélites se ha enlentecido durante la evolución de este grupo, o que existen constricciones

mutacionales o selectivas en ellos, más procesos de homoplasias que impiden obtener adecuadas estimas temporales de divergencia, especialmente, entre clados que divergieron muy ancestralmente; es posible también que los niveles de homoplasia sean muy elevados debido al modelo mutacional step-wise que siguen.

El registro fósil tampoco es de gran ayuda para corroborar ó falsificar los datos obtenidos. Por un lado, los reportes realizados por diferentes autores (Feduccia 1995, 1999; Houde & Haubold 1987) no son concluyentes; y por otro, como ya se mencionó, el registro fósil de los Accipitridae es muy pobre. Para mejorar la precisión de este tipo de análisis es importante tener puntos de calibración interna cuando se quieren calcular tiempos de divergencia

Una última consideración a tener en cuenta, es que la distancia  $\delta\mu^2$  asume poblaciones constantes, sin flujo génico y con equilibrio mutación-deriva. Zhivotovsky (2001) señala como dicha distancia subestima fuertemente los tiempos de divergencia en poblaciones en crecimiento y /o están conectadas. Tal puede ser el caso de algunas de las especies que se están trabajando, en los cuales el tamaño de la población puede estar en crecimiento o con cierto grado de flujo genético. Pero como se ha mencionado varias veces, en este trabajo se carece de información demográfica. Lo que si se asume es que  $\delta\mu^2$  es una función lineal con el tiempo de divergencia, razón por la que quizás los datos presentados sugieren en general, subdivisiones muy recientes entre todas las especies de Accipitridae (Tabla 10).

## 9. CONCLUSIONES

- Los resultados indican que la diversidad genética promedio de microsatélites fue mucho menor que la descrita por otros autores (Martínez *et al.* 2005) utilizando los mismos marcadores.
- Los marcadores con mayor potencial y quizás más informativos para futuros estudios son sin duda Aa02, Aa15 y Aa50, aunque este último no tenga tantas alelos amplificados en el grupo de las rapaces.
- En general se presenta una fuerte conservación de los microsatélites estudiados en las aves rapaces y por tanto el potencial de divergencia genética es limitado.
- Es muy probable que la conservación de las secuencias de las regiones flanqueantes de los loci microsatélites estudiados se deba a una tasa muy baja de substitución (Fitzsimmons *et al.* 1995) en el ADN nuclear de las aves en general.
- El uso de microsatélites para análisis filogenéticos, en la mayoría de los casos, es injustificada. Problemas como la homoplasia, el bajo número de alelos por loci y la falta de un método riguroso de análisis de los resultados dificulta su uso en estudios sobre sistemática. Sin embargo, esto no vuelve obsoleto los análisis con microsatelites, sino por el contrario, es un buen

complemento ya que los interrogantes solo se pueden responder si se tiene una visión amplia de todo el genoma.

- Permanece el interrogante sobre la causas de la variación de las tasas de mutación entre loci y entre especies. El nivel general de conocimiento sobre el proceso de mutación de estos marcadores es insuficiente para permitir una representación adecuada del proceso mutacional o de selección que pueden estar sufriendo.
- Los patrones en los microsatélites utilizados pueden estar siendo sujetos a constricciones mutacionales o selectivas que mantienen la variación en estos patrones dentro de ciertos límites, lo cual genera tiempos de divergencia menores a los reportados en otros estudios.

## 10. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

Los análisis llevados a cabo muestran la realidad histórica de una mínima parte del genoma de este grupo; por tanto sería interesante complementar estos resultados con análisis hechos a partir de otros marcadores nucleares, por ejemplo con genes ribosomales, los cuales nos pueden dar información sobre otra parte de la historia evolutiva del genoma. Es importante ser bastante conservador con los datos aquí presentados debido a las razones mencionadas reiterativamente: relativamente bajo número de marcadores analizados, no correspondencia en el número de muestras por marcador, número muestral pequeño en algunas especies.

Hasta la fecha las pocas observaciones sobre loci microsatélites muy conservados a través de extensos periodos de tiempo evolutivo (Rico *et al.* 1996), permiten una perspectiva limitada sobre que proporción de loci muestran tal conservación. Por ello, sería deseable acceder a un estudio donde el desarrollo de marcadores microsatélites comprendiera un mayor número de especies y de individuos por especie, para poder evaluar más fácilmente estos marcadores en términos de la diversidad evolutiva de un grupo de especies en particular. Adicionalmente la persistencia de microsatélites homólogos a lo largo de un grupo de taxa debería ser confirmado por secuenciación directa de cada uno de los loci.

A futuro la tendencia será entonces obtener muestras más representativa de las rapaces en Colombia (y que preferiblemente posean localidades). Estos resultados son por tanto insumo para que mas adelante sea posible proponer hipótesis más sólidas no solo sobre la evolución de los marcadores microsatélites sino para realizar analisis geneticopoblacionales a partir de los microsatélites más informativos (Aa02, Aa15 y Aa50); así como determinar con la ayuda de otros marcadores nucleares si la conservación de las secuencias de las regiones flanqueantes de los loci microsatélites estudiados se deba a una tasa muy baja de substitución (Fitzsimmons *et al.* 1995) en el ADN nuclear en general de éstas aves.

## 11. REFERENCIAS

Akcakaya H. R., Burgman M. A. and Ginzburg L. R. 1999. Applied Population Ecology. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

American Ornithologists' Union, AOU. 1998. Checklist of North American Birds. 7<sup>o</sup> ed. American Ornithologists' Union, Washington, D.C.

Aranguren-Méndez J., Jordana J. y Gómez M. 2001. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genet. Sel. Evol.* 33(4):243-252.

Beck N. R., Double M. C. and Cockburn A. 2003. Microsatellite evolution at two hypervariable loci revealed by extensive avian pedigrees. *Mol. Biol. Evol.* 20: 54–61.

Bildstein K. L., Schelsky W. and Zalles J. 1998. Conservation status of tropical raptors. *Journal of Raptor Research.* 32 (1):3-18.

BirdLife-International. 2000. Threatened birds of the world. Lynx Edicions and BirdLife-International. Barcelona, España y Cambridge, U.K.

Bollmer J., Whiteman N. K., Cannon M. D. and Bednarz J. C. 2005. Population genetics of the galápagos hawk (*Buteo galapagoensis*): genetic monomorphism within isolated populations. *Auk.* 122(4): 1-15.

Brohede J., Primmer C. R., Anders Møller A. and Ellegren H. 2002. Heterogeneity in the rate and pattern of germline mutation at individual microsatellite loci. *Nucleic Acids Res.* 30(9): 1997–2003.

Brown L. H. and Amadon D. 1968. Eagles, hawks and falcons of the world. McGraw-Hill, New York.

Busch J. D., Katzner T. E., Bragin E. and Keims P. 2005. Tetranucleotide microsatellites for *Aquila* and *Haliaeetus* eagles. *Molecular Ecology Notes.* 5: 39–41.

Callen D.F., Thompson A.D., Shen Y., Phillips H.A, Richards R.I., Mulley J.C., Sutherland G.R. 1993. Incidence and origin of "Null" alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* 52: 922-927.

Cavalli-Sforza L.L. and Edwards A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics.* 19:233-257

Collar N. J., Crosby M. J. and Stattersfield A. J. 1994. Birds to watch 2, The world list of threatened birds. BirdLife Conservation Series No. 4. Cambridge, U.K.

Cracraft J. 1969. Notes of fossil hawks. *Auk.* 86:353-354.

Cracraft J. 1981. Toward a phylogenetic classification of birds of the world (class Aves). *Auk*. 98: 681-714

Cracraft J. 2001. Avian evolution, Gondwana biogeography and the Cretaceous-Tertiary mass extinction event. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B*. 268:459-469.

Crawford A. M. and Cuthbertson R. P. 1996. Mutations in Sheep Microsatellites. *Genome Research*. 6:876-879

Crother B.I. 1990. Is "some better than none" or do allele frequencies contain phylogenetically useful information? *Cladistics* 6: 277-281.

del Hoyo J., Elliot A. and Sargutal J. 1994. Handbook of the Birds of the World, New World Vultures to Guinea fowl. Volume 2. Barcelona: Lynx Edicions

Dermitzakis E.T., Clark A.G., Batargias C., Magoulas A. and Zouros E. 1998. Negative covariance suggests mutation bias in a two-locus microsatellite system in fish *Sparus aurata*. *Genetics*. 150: 1567–1575.

Dewey T. and Potter M. 2002. "*Falco peregrinus*" (On-line), Animal Diversity Web. Accessed April 14, 2009 at [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Falco\\_peregrinus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Falco_peregrinus.html)

Di Rienzo A., Donnelly P., Toomajian C., Sisk B., Hill A., Petzl-Erler M. L., Haines G. K., and Barch D. H. 1998. Heterogeneity of microsatellite mutations within and between loci, and implications for human demographic histories. *Genetics*. 148:1269-1284

Dyke G. and van Tuinen M. 2004. The evolutionary radiation of modern birds (Neornithes): reconciling molecules, morphology and the fossil record. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 141, 153-177.

Ellegren H. 1995. Mutation rates at porcine microsatellite loci. *Mammalian Genome*. 6: 376-377.

Ellegren H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications or evolutionary inference. *Trends Genet.* 16: 551–558.

Ericson P. G., Anderson C. L., Britton T., Elzanowski A., Johansson U. S., Källersjö M., Ohlson J. I., Parsons T. J., Zuccon, D. and Mayr G. 2006. Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. *Biol.Let.* 4: 543-547.

Feduccia, A. 1995. Explosive evolution in Tertiary birds and mammals. *Science*. 267: 637-638.

- Feduccia A. 1999. The origin and evolution of birds. Yale University Press, New Haven.
- Garza J.C., Slatkin M. and Freimer N.B. 1995. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Mol Biol Evol.* 12: 594–630
- Garza J.C. and Freimer N.B. 1996. Homoplasmy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Research.* 6: 211-217.
- Goldstein, D.B., Ruiz Linares A., Cavalli-Sforza L. L. and Feldman M. W. 1995a. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics* 139:463-471.
- Goldstein D., Roemer G., Smith D., Reich D., Bergman A. and Wayne R. 1999. The use of microsatellite variation to infer population structure and demographic history in a natural model system. *Genetics.* 151: 797-801.
- Goldstein D. B. and Schlotterer C. 1999. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, London.
- Griffiths C. 1994. Phylogeny of the Falconidae inferred from molecular and morphological data. *Auk.* 116 (1): 116-130.
- Griffiths C., Barrowclough G. F., Groth J. G. and Mertz L. 2004. Phylogeny of the Falconidae (Aves): a comparison of the efficacy of morphological, mitochondrial, and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 32(1): 101–109.
- Hackett S. J., Kimball R. T., Reddy S., Bowie R., Braun E. L., Braun M. J., Chojnowski J. L., Cox W. A., Han K., Harshman J., Huddleston C. J., Marks B. D., Miglia K. J., Moore W. S., Sheldon F. H., Steadman D. W., Witt C. and Yuri T. 2008. A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science* 320, 1763-1768.
- Hailer F., Gautschi B. and Helander B. 2005. Development and PCR amplification of novel microsatellite markers in the White-tailed Sea Eagle, *Haliaeetus albicilla* (Aves: Falconiformes, Accipitridae). *Molecular Ecology Notes.* 5, 938-940.
- Hancock J. M. 1996. Simple sequences and the expanding genome. *Bioessays.* 18: 421–425
- Haring E., Kruckenhauser L., Gamauf A., Riesing M. J. and Pinsker W. 2001. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Buteo buteo* (Aves, Accipitridae) indicates an early split in the phylogeny of raptors. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1892-1904.

Harrison G. L., McLenachan A., Phillips M. J., Slack K. E., Cooper A. and Penny D. 2004. Four new avian mitochondrial genomes help to get basic evolutionary questions in the Late Cretaceous. *Mol. Biol. Evol.* 21(6): 974-983.

Helbig A. J., Kocum A., Sibold I. and Braun M. J. 2005. A multi-gene phylogeny of aquiline eagles (Aves: Accipitriformes) reveals extensive paraphyly at the genus level. *Molec. Phyl. Evol.* 35: 147-164.

Hoelzel, A. R., M. Dahlheim, and S. J. Stern. 1998. Low genetic variation among killer whales (*Orcinus orca*) in the Eastern North Pacific and genetic differentiation between foraging specialists. *The Journal of Heredity.* 89: 121-128.

Houde P. and Haubold H. 1987. *Palaeotis weigelti* restudied: a small Middle Eocene ostrich (Aves: Struthioniformes). *Palaeovertebrata* 17, 27-42.

Ivory A. and Kirschbaum K. 1999. "*Buteo platypterus*" (on-line), Animal Diversity Web. Accessed April 14, 2009 at: [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Buteo\\_platypterus.html](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Buteo_platypterus.html)

Jarne P. and Lagoda P. J. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree.* 11: 424-429.

Jin L., Macaubas C., Hallmayer J., Kimura A. and Mignot E. 1996. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: phylogenetic evidence. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:15285-15288.

Jollie M. 1976-1977. A contribution to the morphology and phylogeny of Falconiformes. *Evol. Theory* 1: 285-298; 2: 115-208; 2: 209-300; 3: 1-141.

Jordan P. W., Goodman A. and Donnellan S. 2002. Microsatellite primers for Australian and New Guinean pythons isolated with an efficient marker development method for related species. *Molecular Ecology Notes.* 2: 78-82

Kennedy R. S. 1986. Raptors in the tropic - the next 50 years. *Raptor Res Rep.* 5: 17-25

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution.* 16:111-120.

Kimura M. and Ohta T. 1973. Eukaryotes-prokaryotes divergence estimated by 5S ribosomal RNA sequences. *Nature New Biol.* 243:199-200.

Krüger O. 2005. Age at first breeding and fitness in goshawk *Accipiter gentilis*. *Journal of Animal Ecology.* 74 (2):266-273.

- Lerner H. and Mindell D. P. 2005. Phylogeny of eagles, Old World vultures, and other Accipitridae based on nuclear and mitochondrial DNA. *Molec. Phyl. Evol.* 37: 327-346.
- Lieske D. J., Oliphant L. W., James P. C., Warkentin I. G. and Richard H. M. Espie. 1997. Age of first breeding in Merlins (*Falco columbarius*). *The Auk.* 114(2):288-290.
- Ligon J. D. 1967. Relationships of the cathartid vultures. *Occas. Pap. Mus. Zool. Univ. Mich.* No. 651
- Martínez-Cruz B., David V. A., Godoy J. A., Negro J. J., O'Brien S. J. and Johnson W. E. 2002. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes.* 2(3): 323-326.
- Mayr G. 2006. A new raptorial bird from the Middle Eocene of Messel, Germany. *Historical Biology.* 18(2): 95–102
- McConnell R., Middlemist S., Scala C., Strassmann J. E. and Queller D. C. 2007. An unusually low microsatellite mutation rate in *Dictyostelium discoideum*, an organism with unusually abundant microsatellites. *Genetics.* 177: 1499-1507.
- Mindell D., Sorenson M., Huddleston C., Miranda, H., Knight A., Sawchuk S. and Yuri T. 1997. Phylogenetic relationships among and within select avian orders based on mitochondrial DNA. In: Avian molecular evolution and systematics. Mindell D. (ed.). Academic Press: San Diego.
- Morgante M., Pfeiffer A., Jurman I., Paglia G., Olivieri A.M. 1998. Isolation of microsatellite markers in plants. In: Molecular Tools for Screening Biodiversity. Karp A., Isaac P. G., Ingram D.S. (eds.). Chapman and Hall: London.
- Nauta M. J. and Weissing F. J. 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci: Implication for genetic differentiation. *Genetics.* 143: 1021-1032.
- Neef B. D. and Gross M. R. 2001. Microsatellite evolution in vertebrates: Inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution.* 55 (9): 1717-1733.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70:3321-3323.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nesje M. and Roed K. H. 2002. Microsatellite DNA markers from the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and their use in other raptors species. *Molec. Ecol.* 9: 1438-1440.

Newton I. and Rothery P. 2002. Age-related trends in different aspects of the breeding performance of individual female Eurasian Sparrowhawks (*Accipiter nissus*). *The Auk*. 119(3): 735-748.

Ohta T. and Kimura M. 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a genetic population. *Genet. Res.* 22: 201-204.

Oliveira E. J., Gomes J., Zucchi M. I., Vencovsky R. and Vieira M. L. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 29 (2): 294-307.

Olson S. L. 1982. A critique of Cracraft's classification of birds. *Auk*. 99: 733-739.

Paetkau D., Waits L. P., Clarkson P. L., Craighead L. and Strobeck C. 1997. An empirical evaluation of genetics distance statistics using microsatellite data from bear (*Ursidae*) populations. *Genetics*. 147: 1943-1957.

Payseur B. A., and Nachman M. W. 2000. Microsatellite variation and recombination rate in the human genome. *Genetics*. 156: 1285-1298.

Petren K., Grant B. R. and Grant P. R. 1999. A phylogeny of Darwin's finches based on microsatellite DNA length variation. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B.* 266: 321-329.

Primmer C. R., Ellegren H., Saino N., and Moller A. P. 1996. Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nat. Genet.* 13:391-393

Primmer C.R. and Ellegren H. 1998. Patterns of molecular evolution at avian microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*. 15: 997-1008.

Primmer C. M., Painter J. N., Koshinen M. T., Palo J. U. and Merila J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *Journal of Avian Biology*. 36: 348-360.

Raposo do Amaral F. S., Miller M. J., Silveira L. F., Bermingham E. and Wajntal A. 2006. Polyphyly of the hawk genera *Leucopternis* and *Buteogallus* (Aves, Accipitridae): multiple habitat shifts during the Neotropical buteonine diversification. *BMC Evol Biol.* 6: 10.

Renjifo L. M., Franco-Maya A. M., Amaya-Espinel J. D., Kattan G. H. y López-Lanús B. 2002. Libro rojo aves de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia.

Richard M. and Thorpe R. S. 2001. Can microsatellites be used to infer phylogenies? Evidence from population affinities of the Western Canary Island lizard (*Gallotia galloti*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20 (3): 351-360.

Rico C., Rico I. and Hewitt G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. Roy. Acad. Lond.* 263: 549-557.

Riesing M. J., Kruckenhauser L., Gamauf A. and Haring E. 2003. Molecular phylogeny of the genus *Buteo* (Aves: Accipitridae) based on mitochondrial markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 27: 328-342.

Robinson J. P. and Harris S. A. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective. In: Which DNA Marker for Which Purpose? Gillet, E. M. (ed). Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme Molecular Tools for Biodiversity.

Rohlf F.J. 1987. NTSYS-pc: Microcomputer Programs for Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis. *The American Statistician*. 41 (4): 330.

Ross C. L., Dyer K. A., Erez T., Miller S. J., Jaenike J. and Markow T. A. 2003. Rapid divergence of microsatellite abundance among species of *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 20 (7): 1143-1157.

Ruíz-García M., Castillo M. I. and Álvarez D. 2004. Evolutionary trends of Neotropical Primates according to the AP68 and AP40 microsatellites. En: *A Primatologia no Brasil-volumen 8*: 65-100 (S. L. Mendes & A. G. Chiarello, Eds.). Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil.

Ruíz-García M. 2005. The use of several microsatellite loci applied to eight neotropical primates revealed a strong recent bottleneck event in the Wolly Monkey (*Lagothrix lagotricha*) in Colombia. *Primate Report*. 71: 27-55

Ruíz-García M., Parra A., Romero-Alean N., Escobar-Armel P. and Shostell J. 2006c. Genetic Characterization and phylogenetic relationships between *Ateles* species (Atelidae, Primates) by means of DNA microsatellite markers and craniometric data. *Primate Report*. 73: 3-47

Saitou, N. and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Schlötterer C., Ritter R., Harr B. and Brem G. 1998 High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates *Mol. Biol. Evol* 15:1269-1274.

- Schlotterer C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 109: 365–371.
- Schug M. D., Mackay T. F. and Aquadro C. F. 1997 Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster* Nat. Genet 15:99-102.
- Seibold I. and Helbig A. J. 1995. Systematic position of the osprey *Pandion haliaetus* according to mitochondrial DNA sequences. *Vogelwelt*. 116: 209-217
- Shiver M. D., Jin L., Chakraborty R. and Boerwinkle E. 1993. VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: A computer simulation approach. *Genetics*. 134: 983-993.
- Sibley C.G. and Ahlquist J. E. 1990. Phylogeny and classification of birds: a study in molecular evolution. Yale University Press, New Haven, Connecticut, USA.
- Slatkin M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res.* 58: 165-175.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457-462.
- Smith, A. B. 1994. Rooting molecular trees, problems and strategies. *Bio.l J. Linn. Soc.* 5: 279-292.
- Sokal R. R. and Michener C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*. 38:1409–1438.
- Streelman J. T., Zardoya R., Meyer A. and Karl S. A. 1998. Multilocus phylogeny of cichlids fishes (Pisces: Perciformes): Evolutionary comparison of microsatellite and single-copy nuclear loci. *Mol. Biol. Evol.* 15: 798-808.
- Tarr C. L. and Fleischer R. C. 1993. Mitochondrial DNA variation and evolutionary relationships in the amakihi complex. *Auk*. 110: 825-831.
- Thiollay J. M. 1994. Family Accipitridae (Hawks and Eagles). In: Handbook of the birds of the world New World Vultures to Guineafowl. Vol. 2. del Hoyo J., Elliott A, Sargatal J. (eds.). Barcelona: Lynx Edicions.
- Topinka J. R. and May B. 2004. Development of polymorphic microsatellite loci in the northern goshawk (*Accipiter gentilis*) and cross-amplification in other raptor species. *Conservation Genetics*. 5: 861–864.
- Valdes A. M., Slatkin M. and Freimer N. B. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: The stepwise mutation model revisited. *Genetics*. 133: 737-749.

van Tuinen M. and Hedge B. 2001. Calibration of avian molecular clocks. *Molec. Biol. Evol.* 18: 206-213.

van Tuinen M. and Hedge B. 2004. The effect of external and internal fossil calibrations on the avian evolutionary timescale. *J. Paleont.* 78 (1): 45-50.

van Tuinen M., Stidham T. A. and Hadly E. A. 2006. Tempo and mode of modern bird evolution observed with large-scale taxonomic sampling. *Historical Biology.* 18 (2): 205-221.

Vogouroux Y., Jaqueth J. S., atsuka Y., Smith . S., Beavis W. D., Smith J. S. and Doebley J. 2001. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maiza. *Mol. Biol. Evol.* 19 (8): 1251-1260

Wayne, R. K. 1996. Conservation genetics in the canidae. Pp. 75–118 in Conservation genetics: case histories from nature (J. C. Avise and J. L. Hamrick, eds.). Chapman and Hall, New York.

Weber J. L. and Wong C. 1993. Mutation of human short tandem repeat. *Hum. Mol. Genet.* 2 (8): 1123-1128

Wetmore A. 1960. A classification for the birds of the world. *Smithsonian Miscellaneous Collections* 139: 1-37.

Wilson A. C., Ochman H. and Prager E. M. 1987. Molecular time scale for evolution. *Trends. Genetics.* 3:241-247.

Wink M. and I. Seibold I. 1996. Molecular phylogeny of Mediterranean raptors (Families Accipitridae and Falconidae). In: Biology and Conservation of Mediterranean raptors. Muntaner, J. and J. Mayol (eds.). SEO/ BirdLife.

Wink, M., Sauer-Gürth, H., Martinez, F., Doval, G., Blanco, G. and O. Hatzofe. 1998. Use of GACA-PCR for molecular sexing of Old World vultures (Aves: Accipitridae). *Molecular Ecology.* 7: 779-782.

Wink M. and Heidrich P. 2000. Molecular Systematics of Owls (*Strigiformes*) based on DNA-sequences of the mitochondrial cytochrome b gene. In Chacellor R.D. & B.U. Meyburg eds. Raptor at Risk. WWGBP / Hancock house

Wink M. and Sauer-Gurth H. 2000. Advances in the molecular systematics of African raptors. In: Raptor at risk. Chancellor R. D. and Meyburg B. U. (eds.). WWGBP/Hancock House.

Wink M. and Sauer-Gurth H. and Witt H. 2004. Phylogenetic relationship in diurnal raptors based on nucleotide sequences of mitochondrial and nuclear marker genes. In: Raptors Worldwide. Chancellor R. D. and Meyburg B. U. (eds.). WWGBP/MME.

Wink M., Sauer-Gurth H and Witt H.. 2004. Phylogenetic differentiation of the osprey *Pandion haliaetus* inferred from nucleotide sequence s of the mitochondrial cytochrome b gene. In: Raptors Worldwide. Chancellor R. D. and Meyburg B. U. (eds.). WWGBP/MME.

Zhivotovsky L. A. 2001. Estimating Divergence Time with the Use of Microsatellite Genetic Distances: Impacts of Population Growth and Gene Flow. *Molecular Biology and Evolution*. 18:700-709.

Zhu Y., Queller D.C. and Strassmann J. E. 2000. A phylogenetic perspective on sequence evolution in microsatellite loci. *J. Mol. Evol.* 50:324–338.

## ANEXO A: PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN

Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo a partir de sangre total:

1. Agregar un volumen igual a la muestra de Fenol y mezclar por inversión.
2. Cetrigugar a 13.000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
3. Agregar al sobrenadante medio volumen de fenol y medio volumen de cloroformo. Mezclar por inversión.
4. Cetrigugar a 13.000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
5. Agregar al sobrenadante un volumen de cloroformo isoamílico. Mezclar por inversión.
6. Cetrigugar a 13.000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
7. Precipitar en frío (-20°C) la fase acuso con un volumen y medio de etanol absoluto por al menos 3 horas.
8. Cetrigugar a 13.000 rpm por 15 minutos.
9. Descartar todo el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 70%.
10. Cetrigugar a 13.000 rpm por 15 minutos.
11. Eliminar todo el etanol y dejar secar muy bien el pellet.
12. Resuspender el ADN con agua MiliQ (20-200 µl).

Extracción de ADN con Fenol-Cloroformo a partir de músculo:

1. Agregar 200 µl de tamón de digestión (Tris HCl 10mM, EDTA 10mM, SDS 2% y NaCl 50mM) a una muestra de tejido (5mm x 5mm aproximadamente)
2. Incubar en un baño termoregulado a 56 °C por 24 horas.
3. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
4. Agregar un volumen igual a la muestra de Fenol y mezclar por inversión.
5. Cetrigugar a 13.000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
6. Agregar al sobrenadante medio volumen de fenol y medio volumen de cloroformo. Mezclar por inversión.
7. Cetrigugar a 13.000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
8. Agregar al sobrenadante un volumen de cloroformo isoamílico. Mezclar por inversión.
9. Cetrigugar a 13.000 rpm por 10 minutos y tomar el sobrenadante.
10. Precipitar en frío (-20°C) la fase acuso con un volumen y medio de etanol absoluto por al menos 3 horas.
11. Cetrigugar a 13.000 rpm por 15 minutos.
12. Descartar todo el sobrenadante y lavar el pellet con etanol al 70%.
13. Cetrigugar a 13.000 rpm por 15 minutos.
14. Eliminar todo el etanol y dejar secar muy bien el pellet.
15. Resuspender el ADN con agua MiliQ (20-100 µl).

Las muestras de sangre y músculo fueron almacenados en tubos Eppendorff y Falcon respectivamente; las muestras de músculo, se mantuvieron en alcohol al 90%.

## ANEXO B: PROTOCOLO DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Perfil térmico de la reacción (modificado de Martínez-Cruz et al 2002):

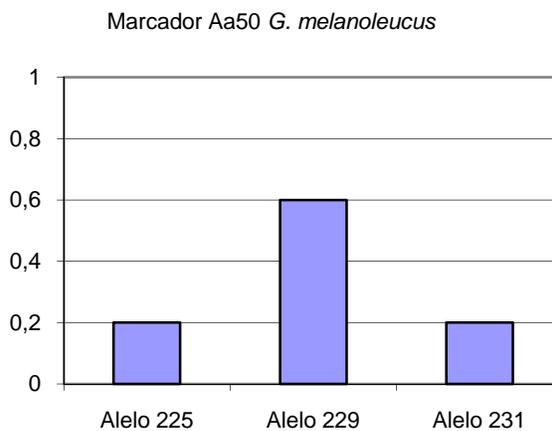
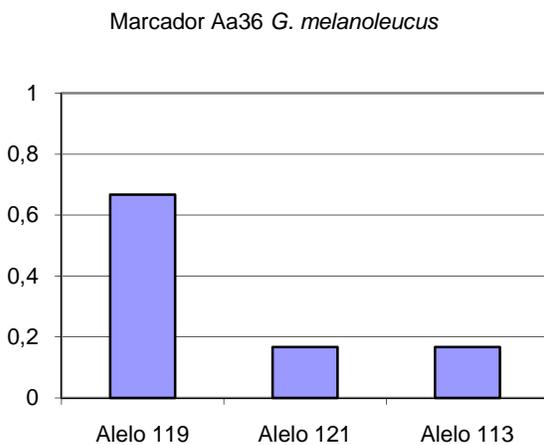
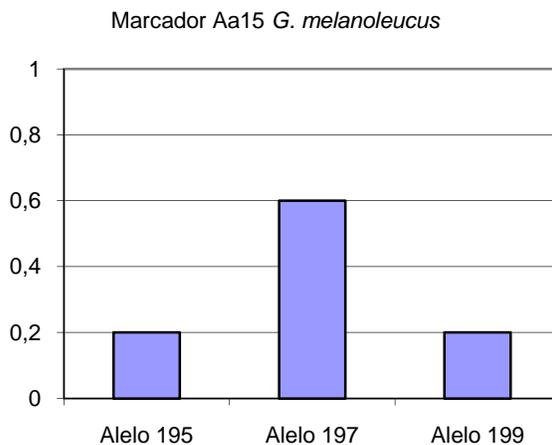
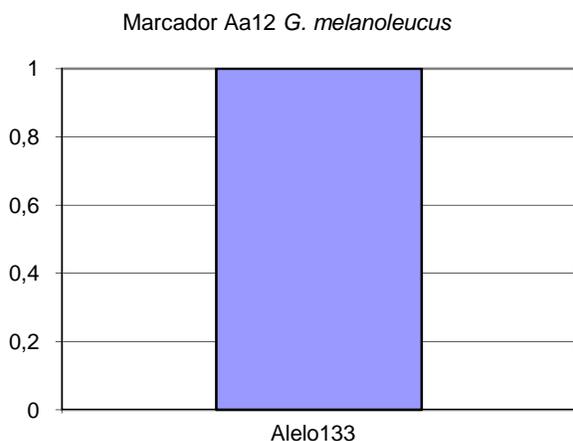
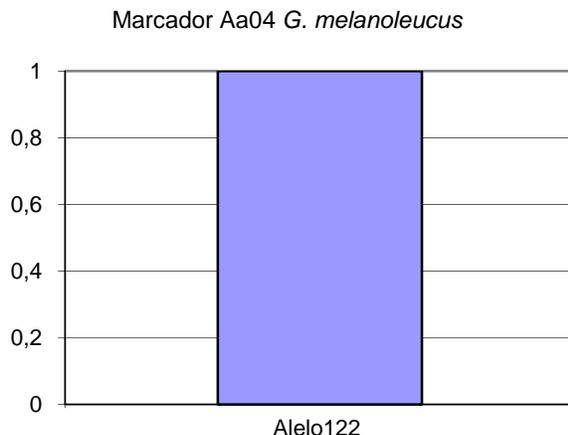
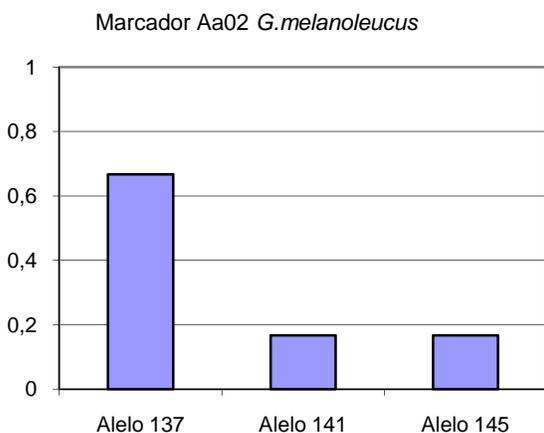
- 94°C, por 5 minutos
- 17 ciclos: 92°C, por 1 minuto  
**60°C, por 1 minuto**  
72°C, por 1 minuto
- 19 ciclos: 92°C, por 1 minuto  
**50°C, por 1 minuto**  
72°C, por 1 minuto
- 72°C, por 5 minutos

Las reacciones de amplificación (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research, conteniendo:

(NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> 16mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5mM, 0.25 mM de cada dNTP, 0.5 U Tucan Taq polimerasa, 0.25 mM de cada primer y 2 µl de ADN (según Martínez-Cruz et al 2002).

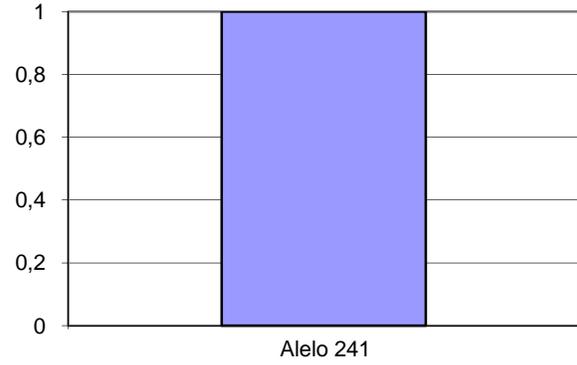
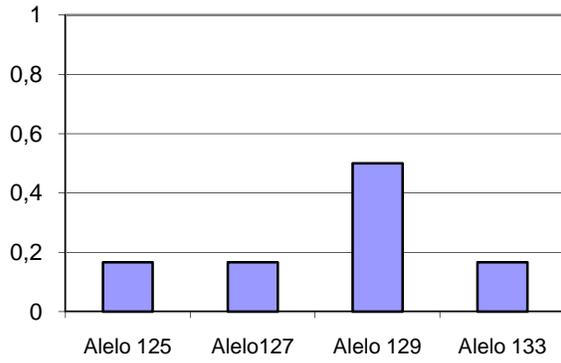
# ANEXO 1: Frecuencias alélicas de todos los marcadores en todas las especies

Histogramas de frecuencias alélicas de *Geranoaetus melanoleucus* para los 8 loci analizados (n=11)

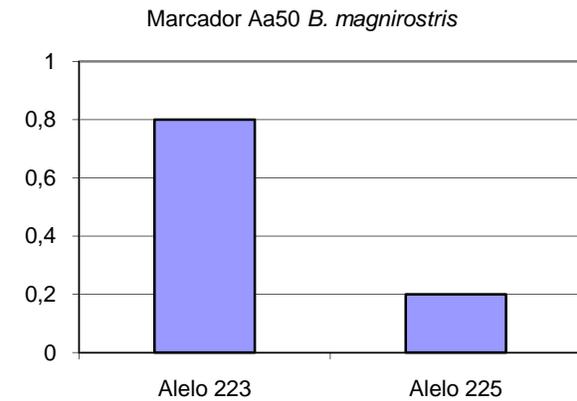
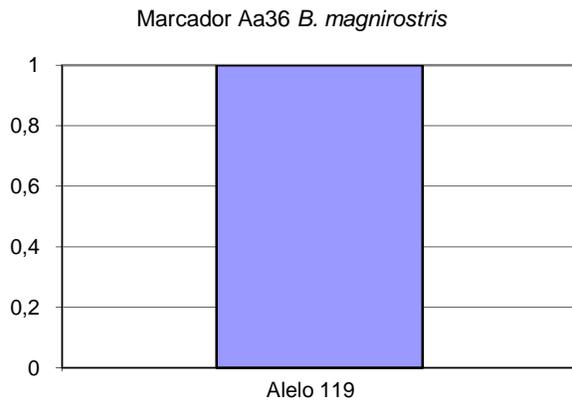
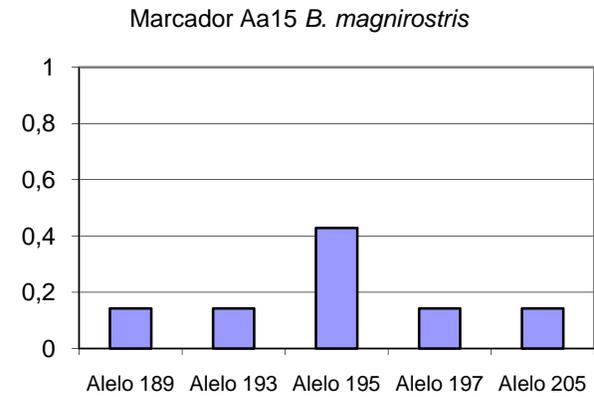
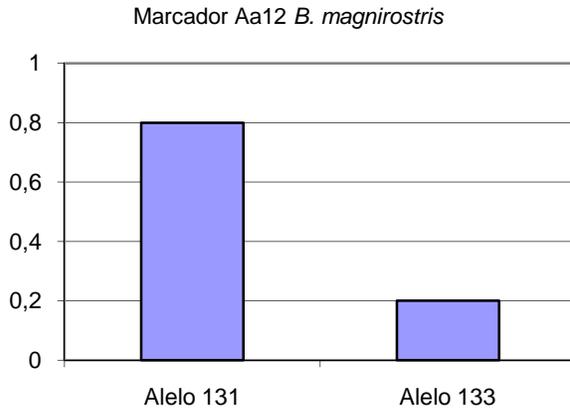
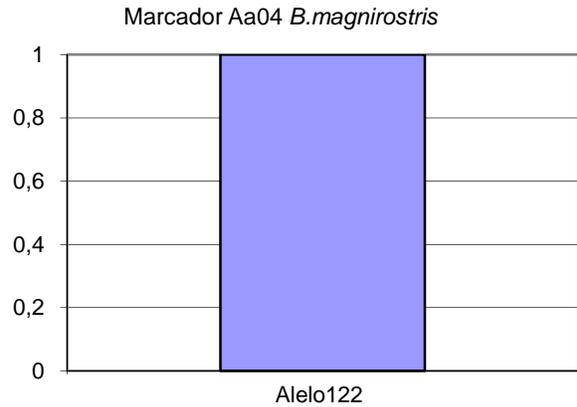
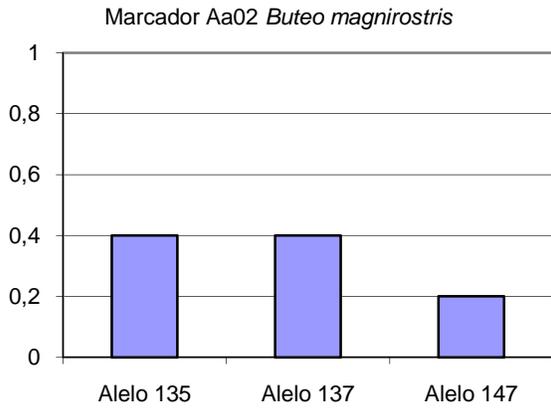


Marcador Aa53 *G. melanoleucus*

Marcador Aa56 *G. melanoleucus*

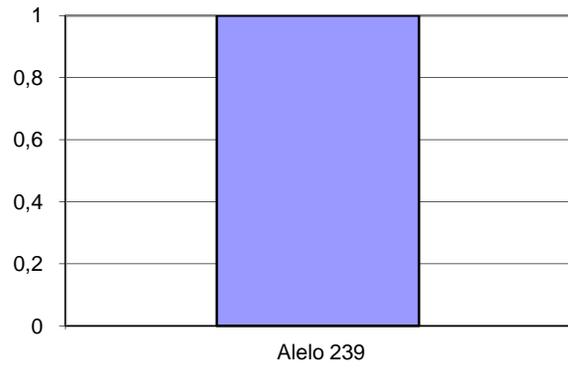
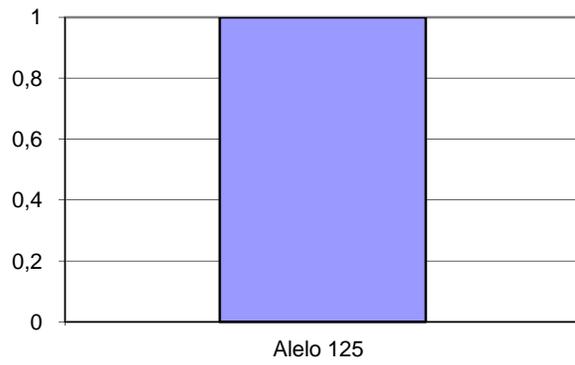


Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteo magnirostris* para los 8 loci analizados (n=5)



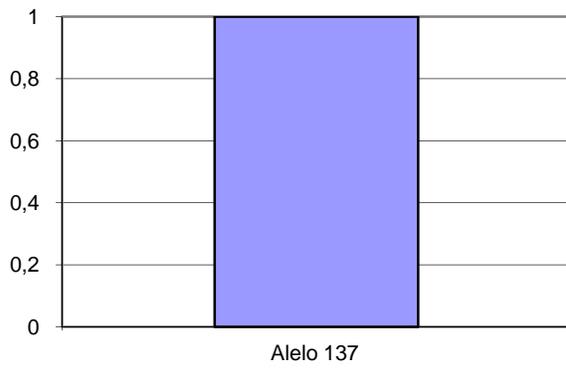
Marcador Aa53 *B. magnirostris*

Marcador Aa56 *B. magnirostris*

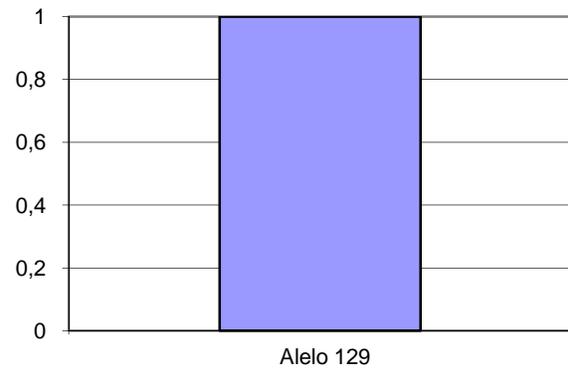


Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteogallus anthracinus* (n=1)

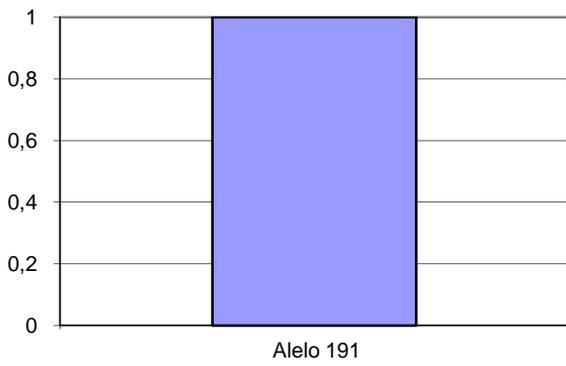
Marcador Aa02 *B.anthracinus*



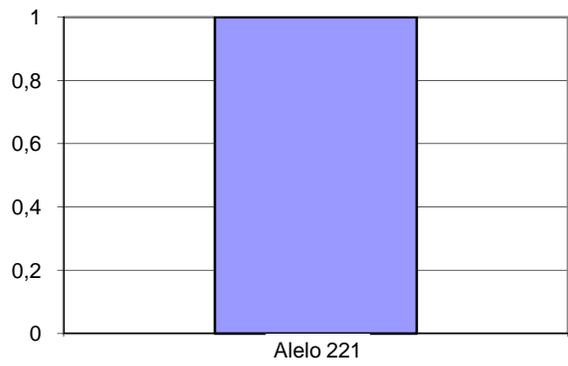
Marcador Aa12 *B.anthracinus*



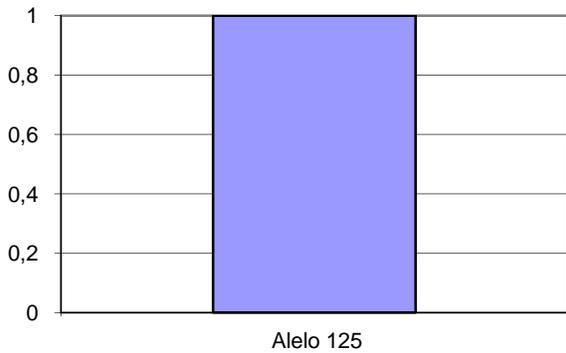
Marcador Aa15 *B.anthracinus*



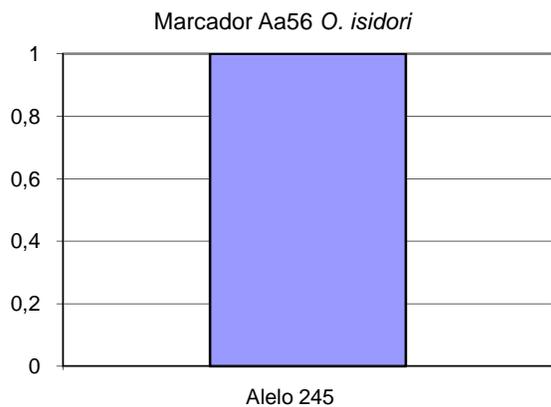
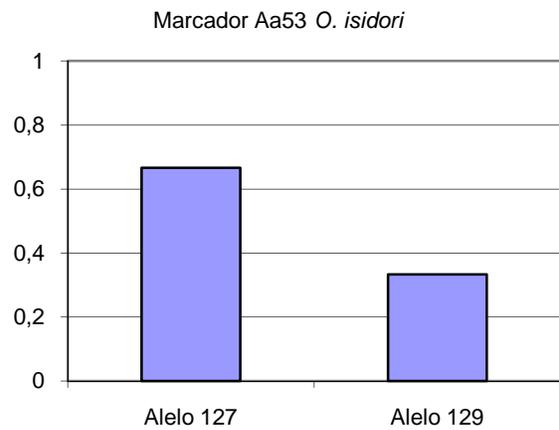
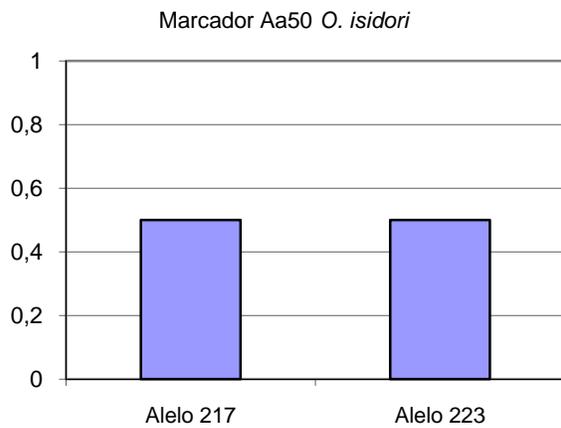
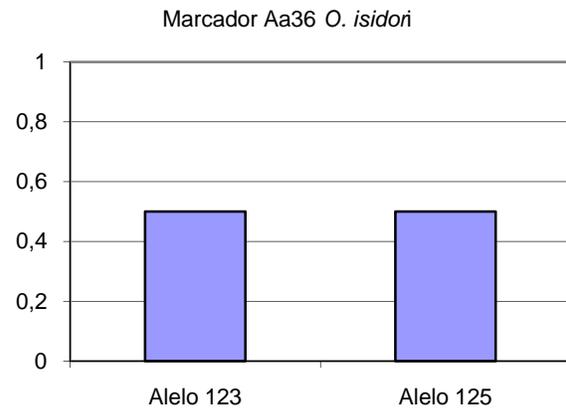
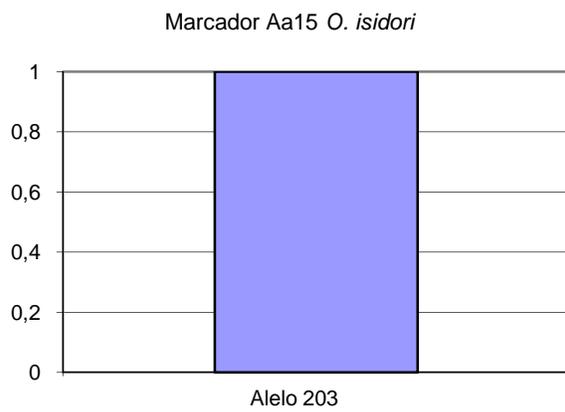
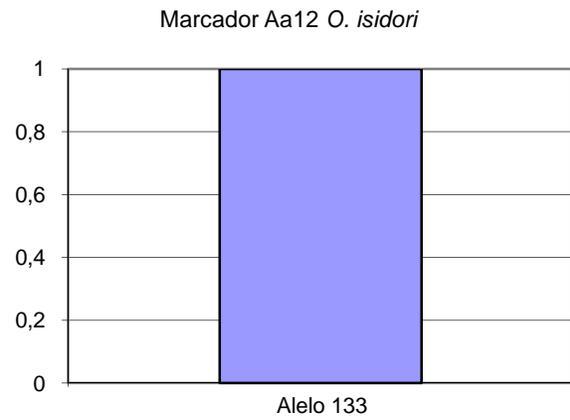
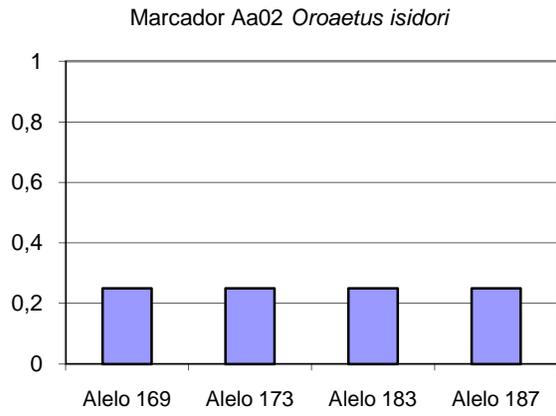
Marcador Aa50 *B.anthracinus*



Marcador Aa53 *B.anthracinus*



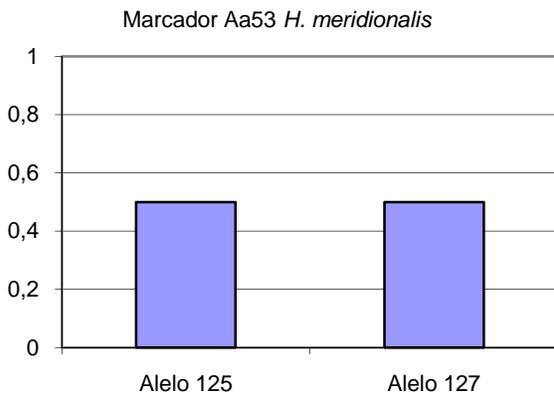
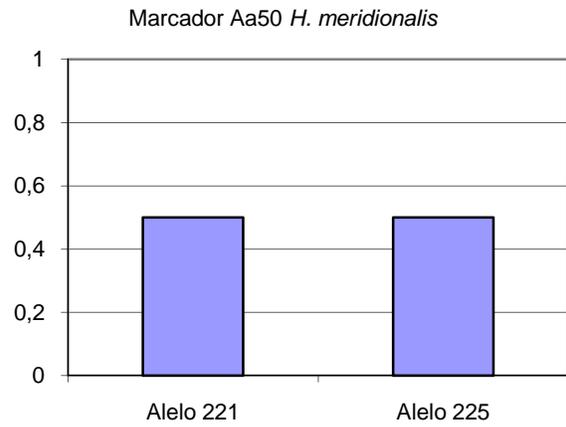
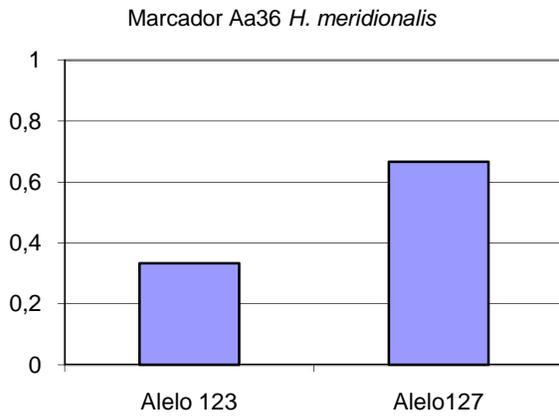
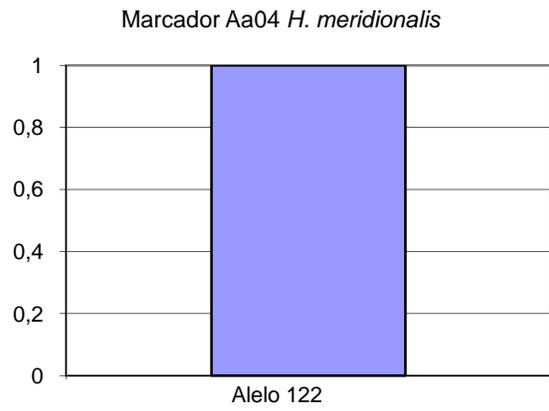
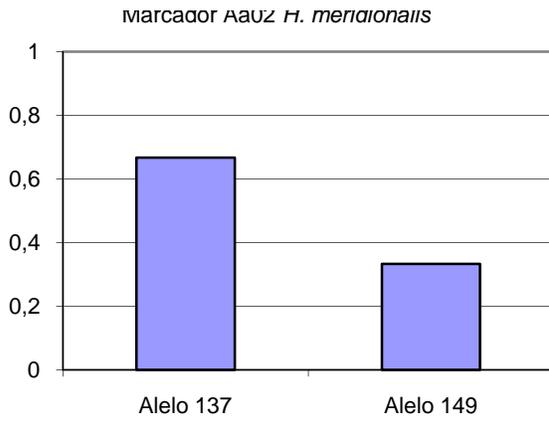
Histogramas de frecuencias alélicas de *Oroaetus isidori* (n=2)



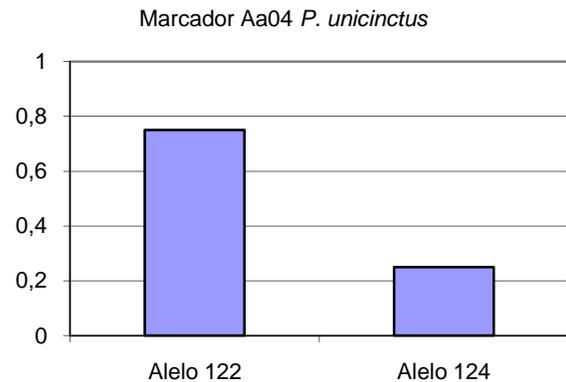
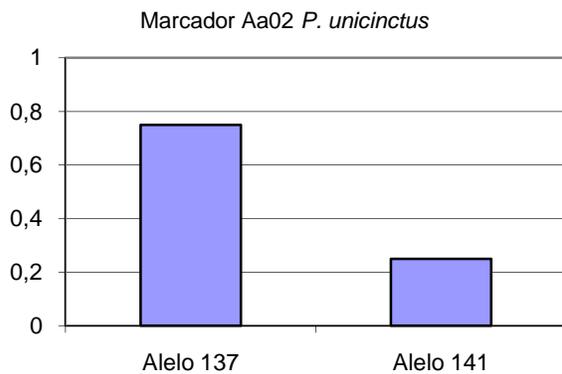
Histogramas de frecuencias alélicas de *Heterospizias meridionalis* (n=4)

Marcador Aa02 *H. meridionalis*

Marcador Aa04 *H. meridionalis*

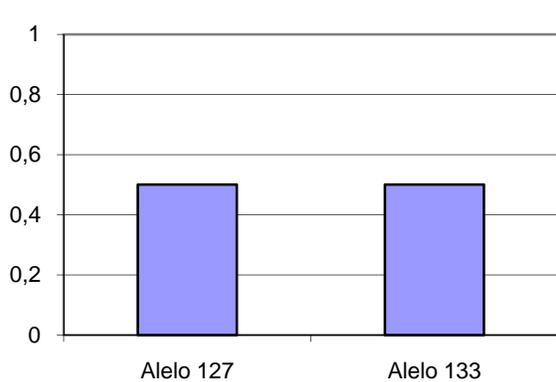


Histogramas de frecuencias alélicas de *Parabuteo unicinctus* para los 8 loci analizados (n=3)

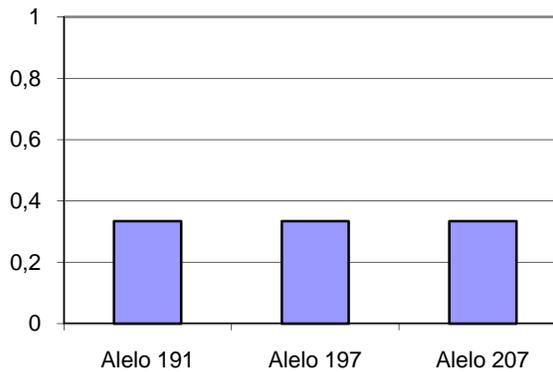


Marcador Aa12 *P. unicinctus*

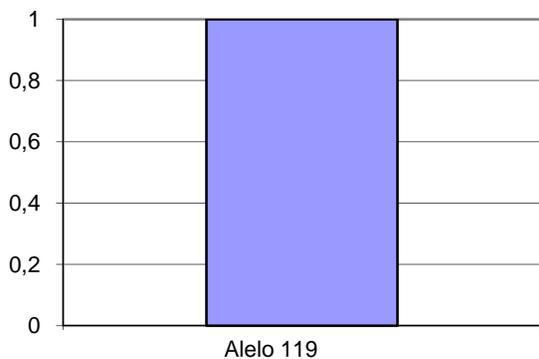
Marcador Aa15 *P. unicinctus*



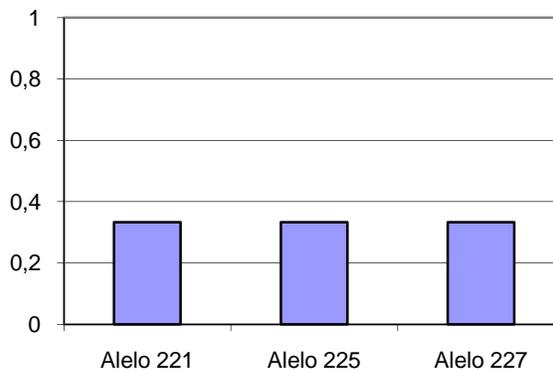
Marcador Aa36 *P. uncinctus*



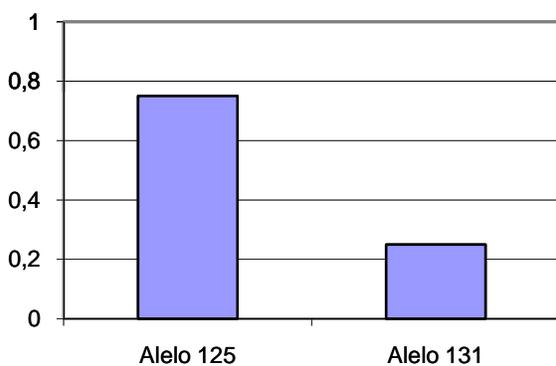
Marcador Aa50 *P. uncinctus*



Marcador Aa53 *P. uncinctus*

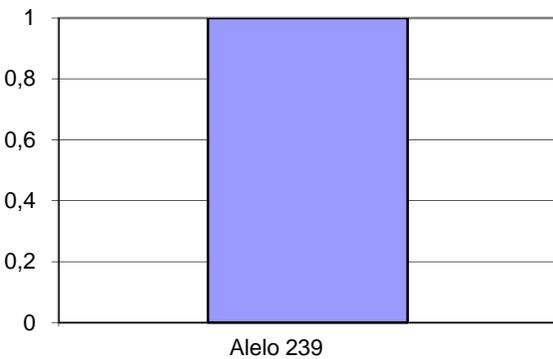


Marcador Aa56 *P. uncinctus*



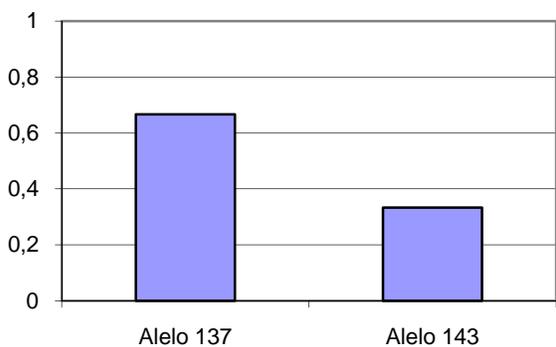
Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteo brachyurus* para los 8 loci analizados (n=2)

Marcador Aa02 *B. brachyurus*

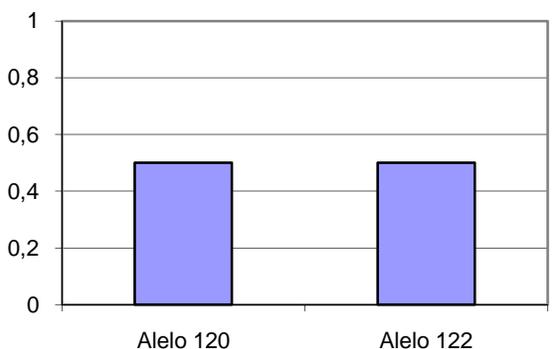


Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteo brachyurus* para los 8 loci analizados (n=2)

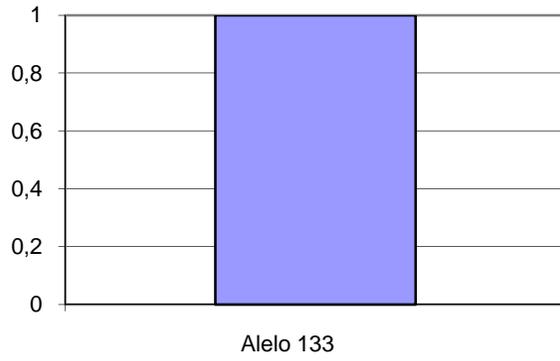
Marcador Aa04 *B. brachyurus*



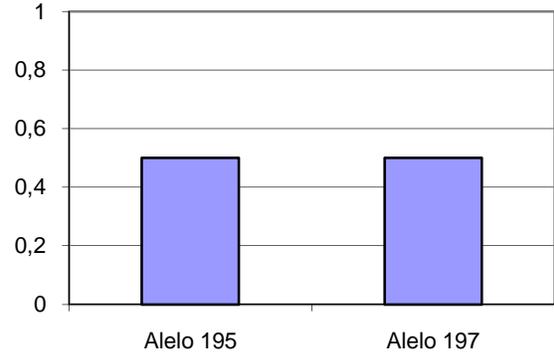
Marcador Aa12 *B. brachyurus*



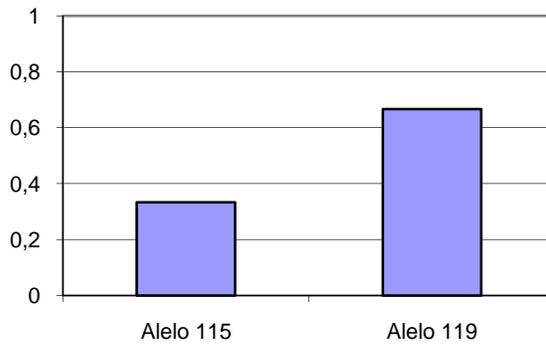
Marcador Aa15 *B. brachyurus*



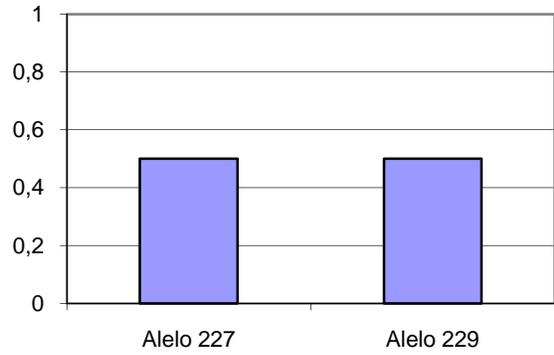
Marcador Aa36 *B. brachyurus*



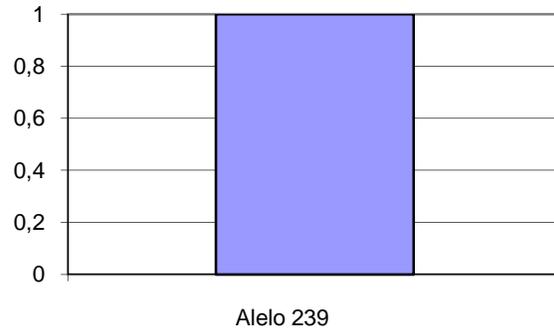
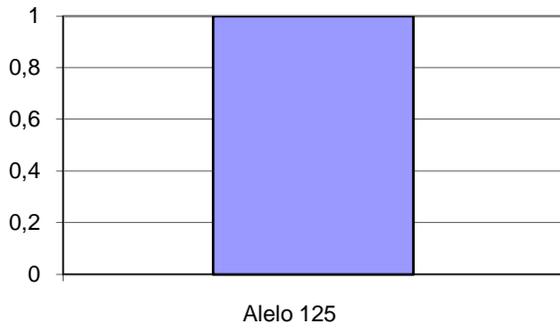
Marcador Aa50 *B. brachyurus*



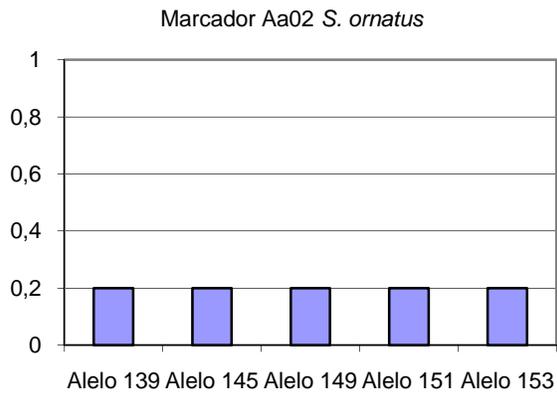
Marcador Aa53 *B. brachyurus*



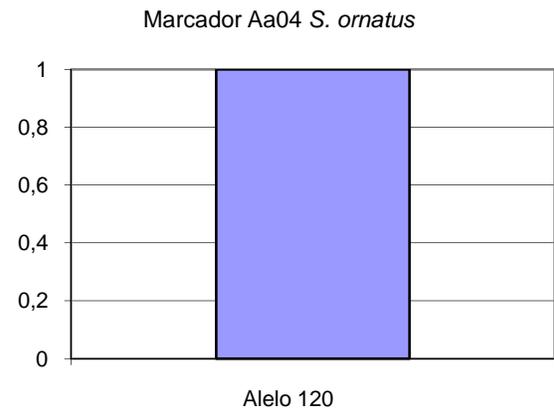
Marcador Aa56 *B. brachyurus*



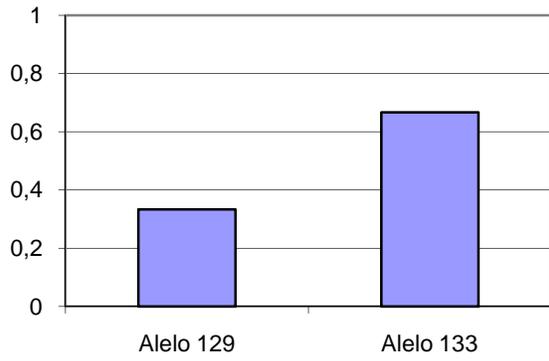
Histogramas de frecuencias alélicas de *Spizaetus ornatus* para los 8 loci analizados (n=3)



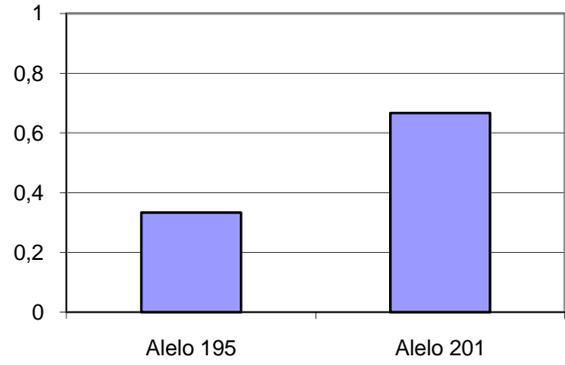
Marcador Aa12 *S. ornatus*



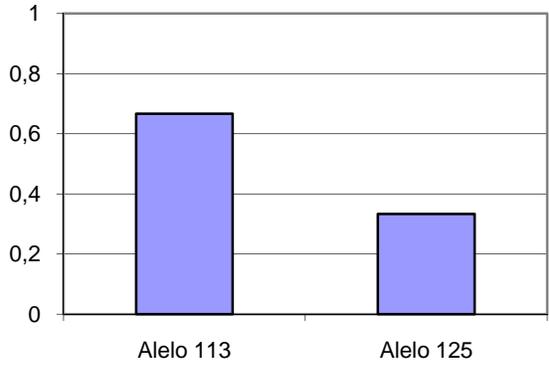
Marcador Aa15 *S. ornatus*



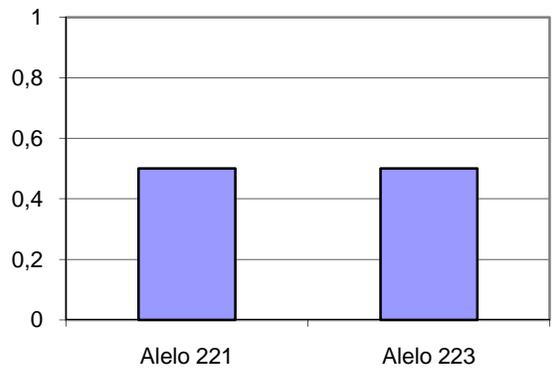
Marcador Aa36 *S. ornatus*



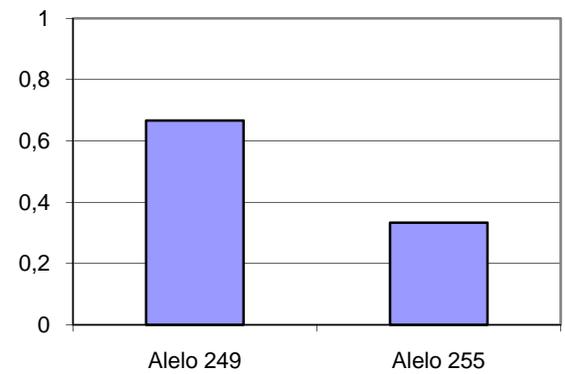
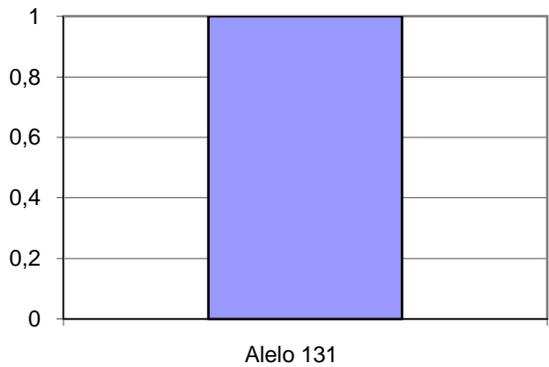
Marcador Aa50 *S. ornatus*



Marcador Aa53 *S. ornatus*

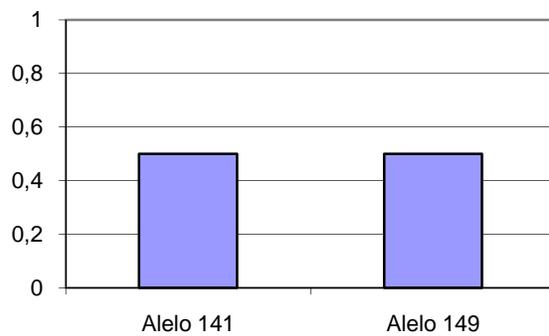


Marcador Aa56 *S. ornatus*

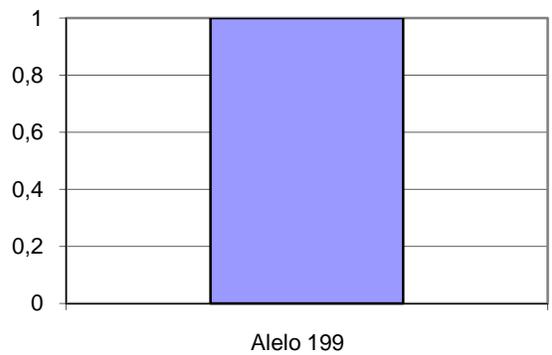


Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteo platypterus* (n=3),

Marcador Aa02 *B. platypterus*

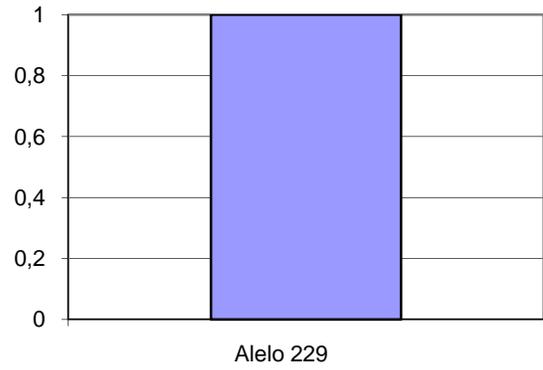
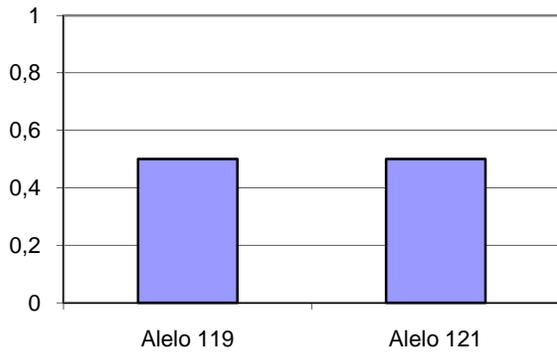


Marcador Aa15 *B. platypterus*



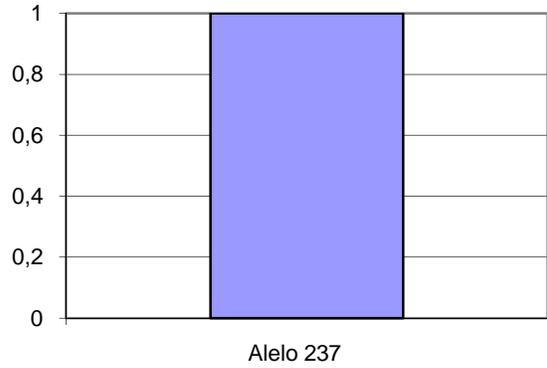
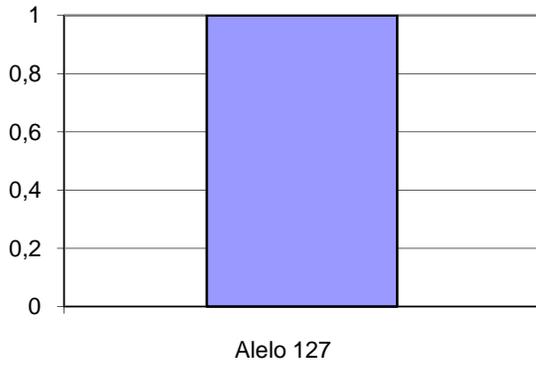
Marcador Aa36 *B. platypterus*

Marcador Aa50 *B. platypterus*



Marcador Aa53 *B. platyterus*

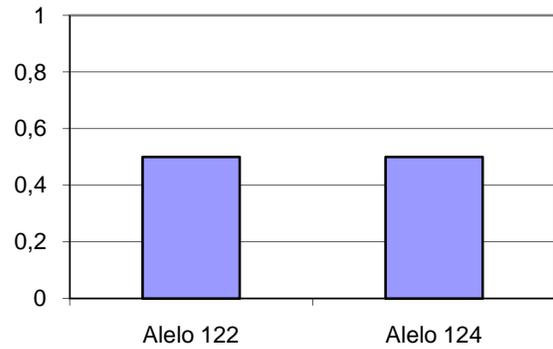
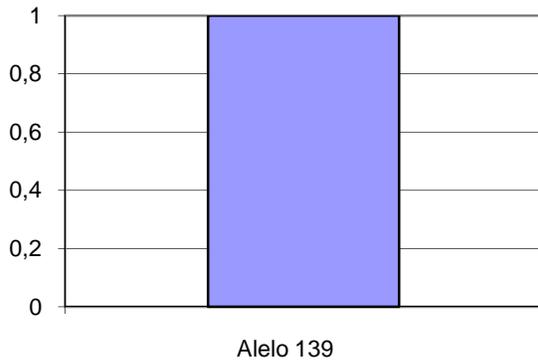
Marcador Aa56 *B. platyterus*



Histogramas de frecuencias alélicas de *Harpia harpyja* (n=2)

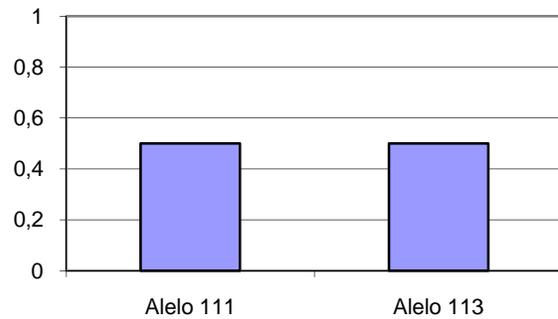
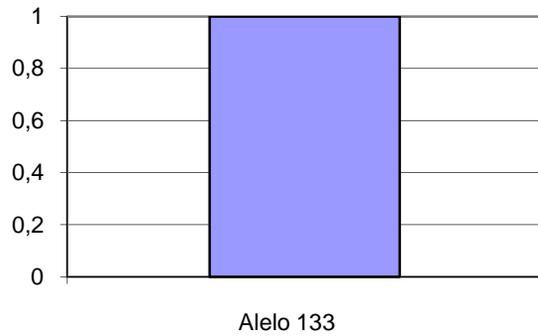
Marcador Aa02 *H. harpyja*

Marcador Aa04 *H. harpyja*



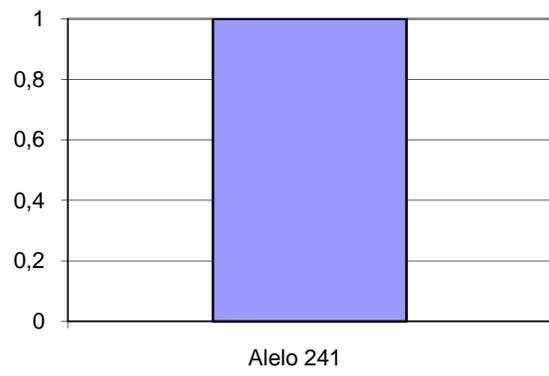
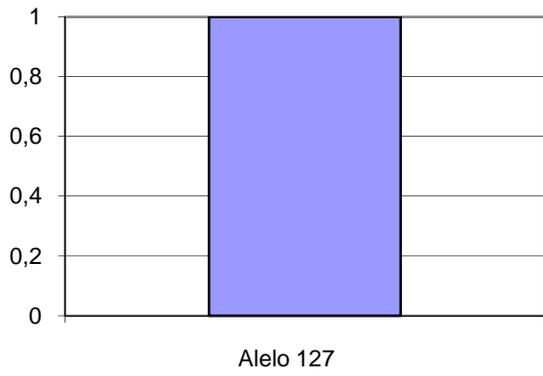
Marcador Aa12 *H. harpyja*

Marcador Aa36 *H. harpyja*

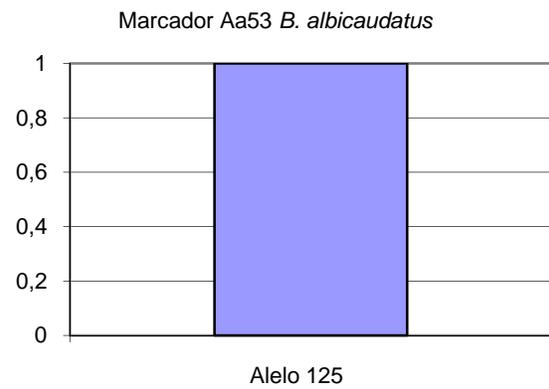
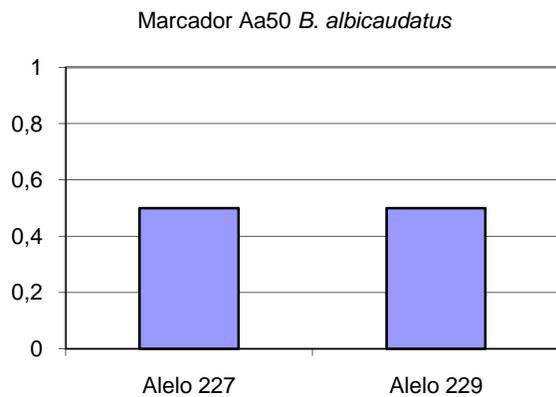
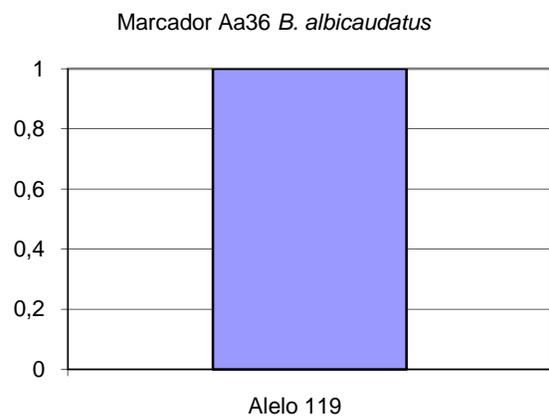
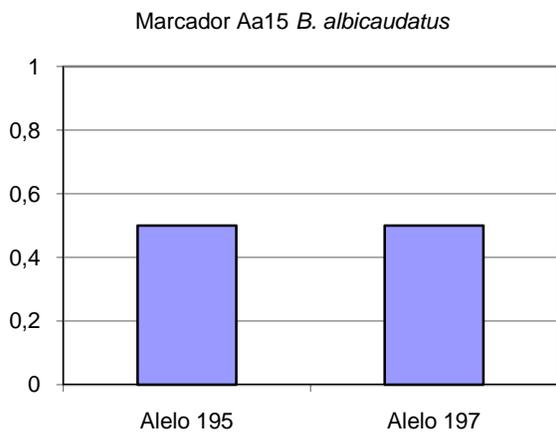
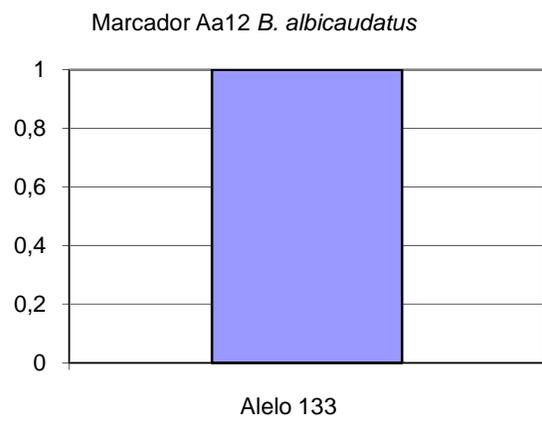
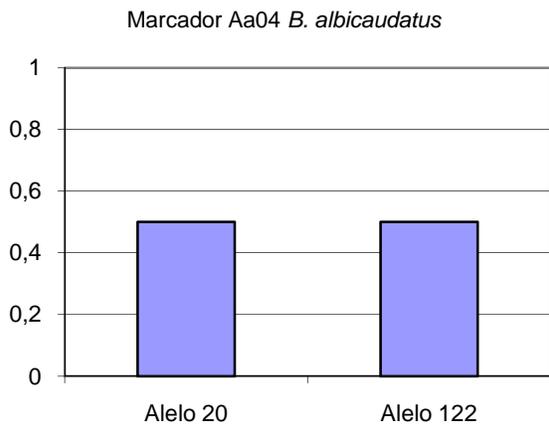


Marcador Aa53 *H. harpyja*

Marcador Aa56 *H. harpyja*

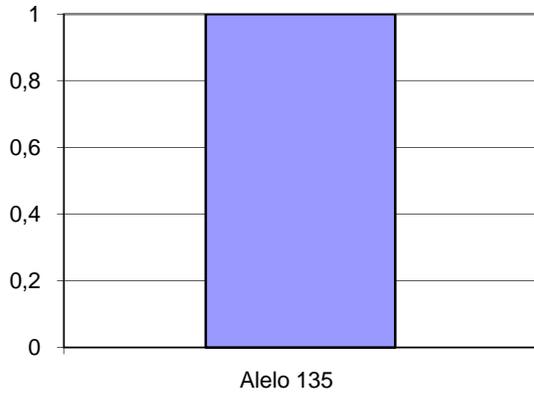


Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteo albicaudatus* (n=2)

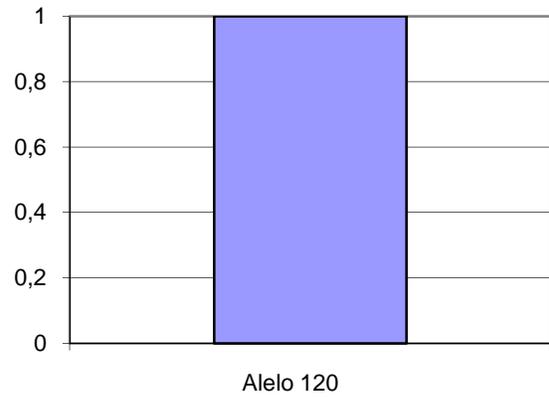


Histogramas de frecuencias alélicas de *Asturina nitida* (n=1)

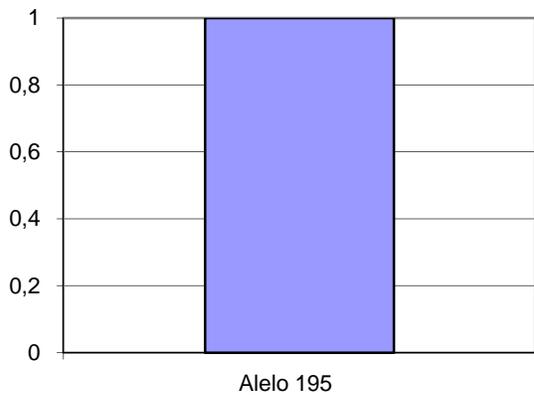
Marcador Aa02 *A. nitida*



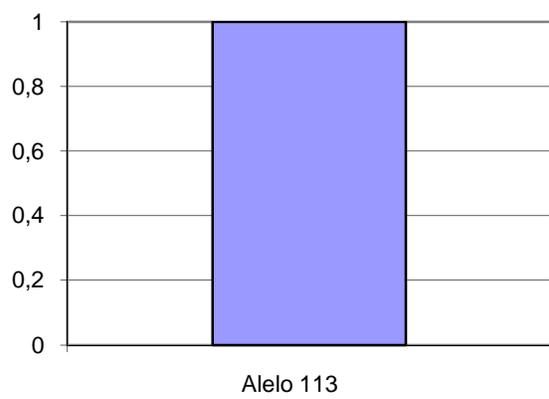
Marcador Aa04 *A. nitida*



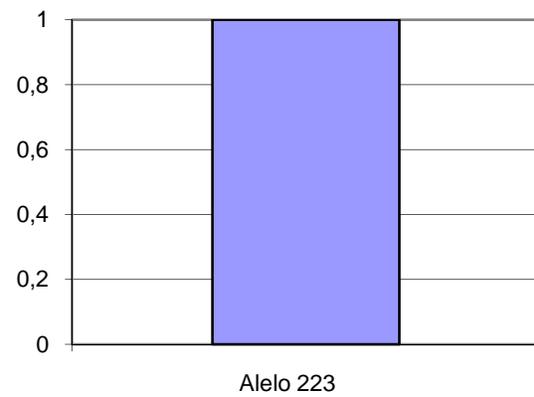
Marcador Aa15 *A. nitida*



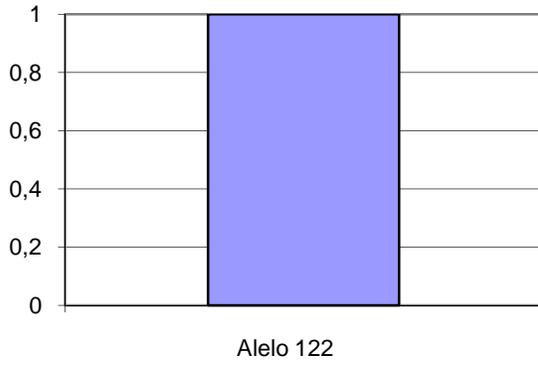
Marcador Aa36 *A. nitida*



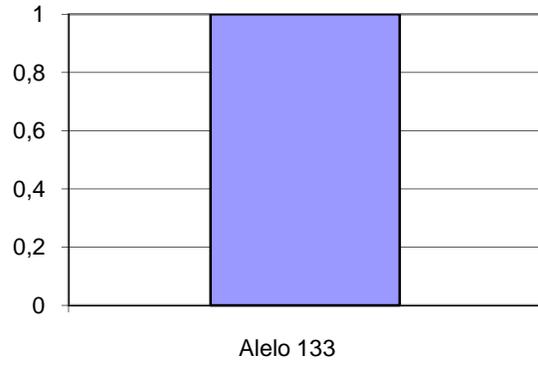
Marcador Aa50 *A. nitida*



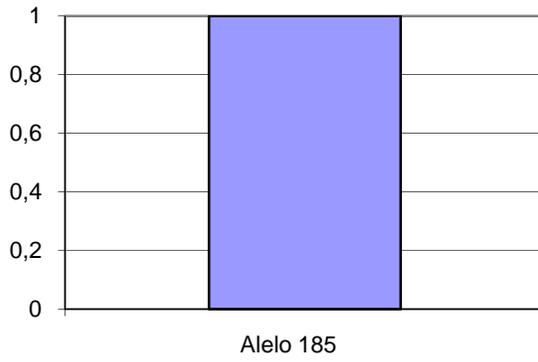
Marcador Aa04 *Accipiter sp.*



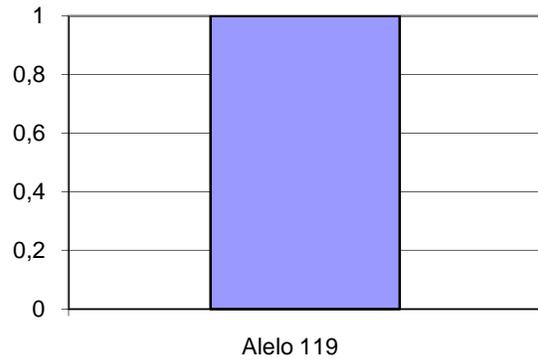
Marcador Aa12 *Accipiter sp.*



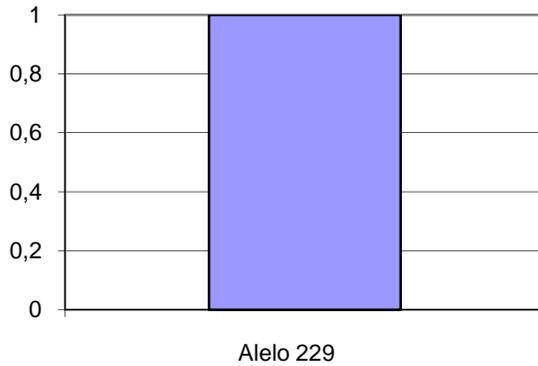
Marcador Aa15 *Accipiter sp.*



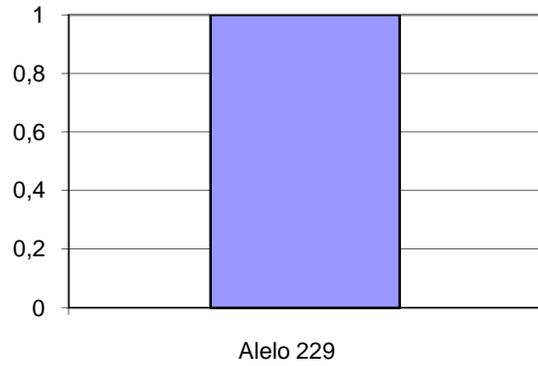
Marcador Aa36 *Accipiter sp.*



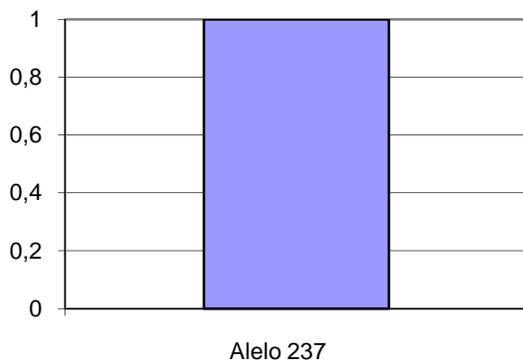
Marcador Aa50 *Accipiter sp.*



Marcador Aa53 *Accipiter sp.*

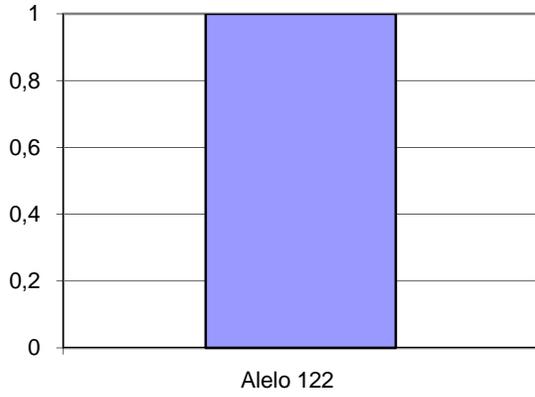


Marcador Aa56 *Accipiter sp.*

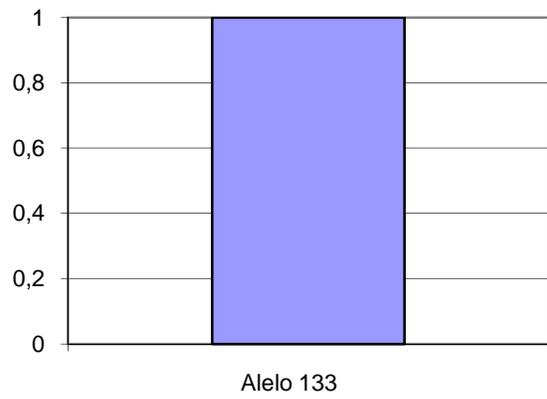


Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteo sp.* (n=1)

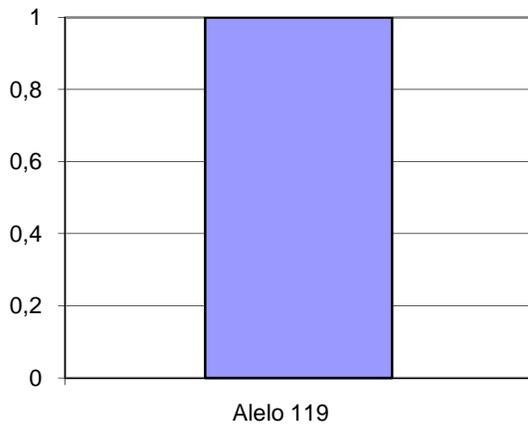
Marcador Aa04 *Buteo sp.*



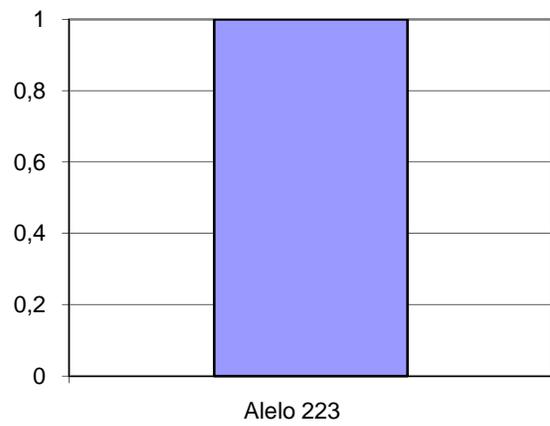
Marcador Aa12 *Buteo sp.*



Marcador Aa36 *Buteo sp.*

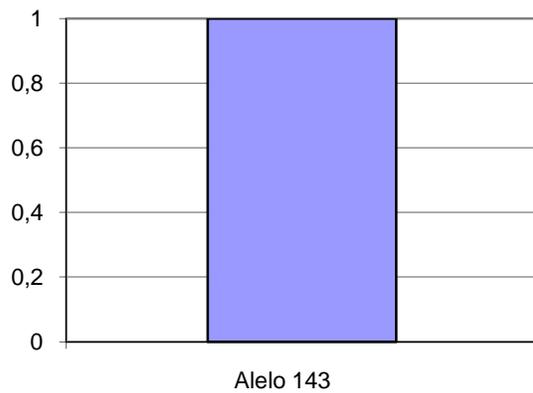


Marcador Aa50 *Buteo sp.*

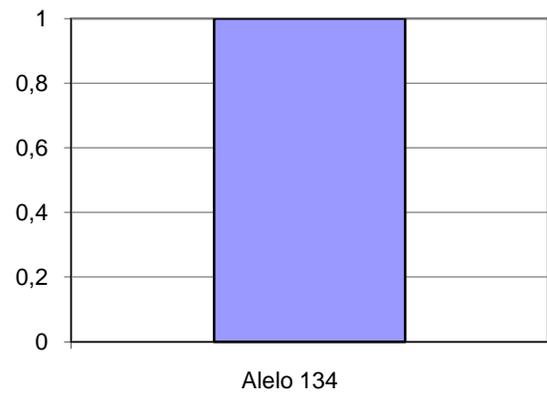


Histogramas de frecuencias alélicas de *Buteo swainsonii* (n=1)

Marcador Aa02 *B. swainsonii*

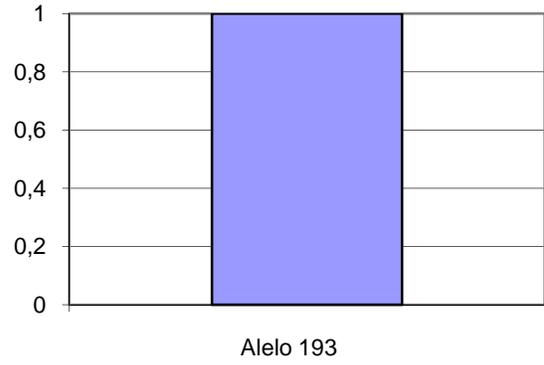
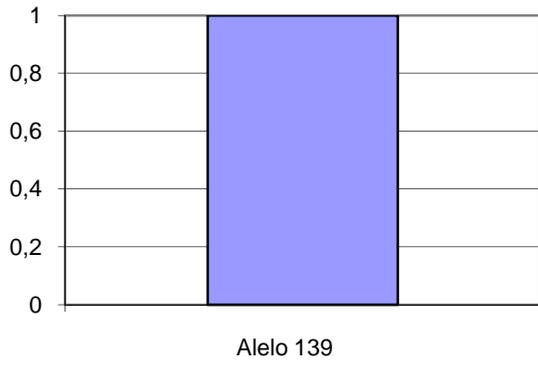


Marcador Aa04 *B. swainsonii*

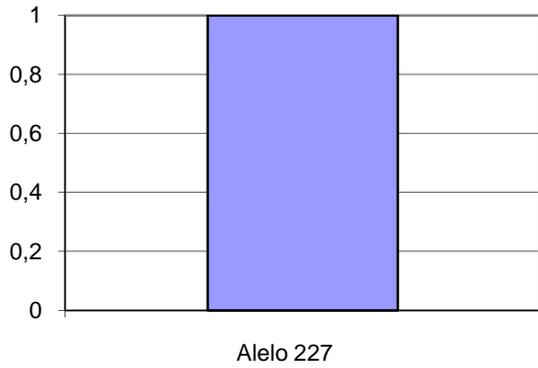


Marcador Aa12 *B. swainsonii*

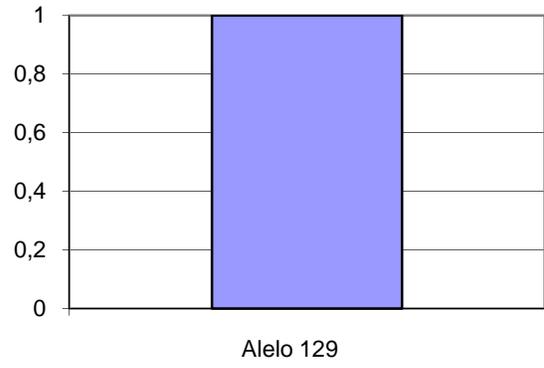
Marcador Aa15 *B. swainsonii*



Marcador Aa50 *B. swainsonii*

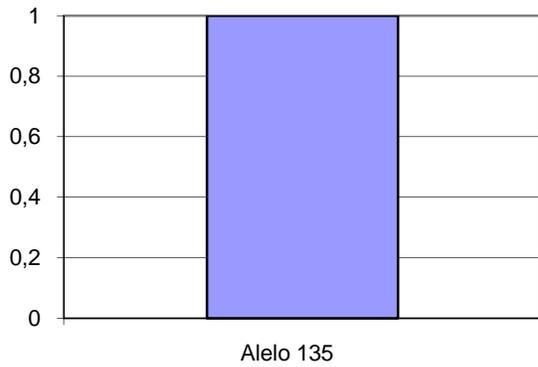


Marcador Aa53 *B. swainsonii*

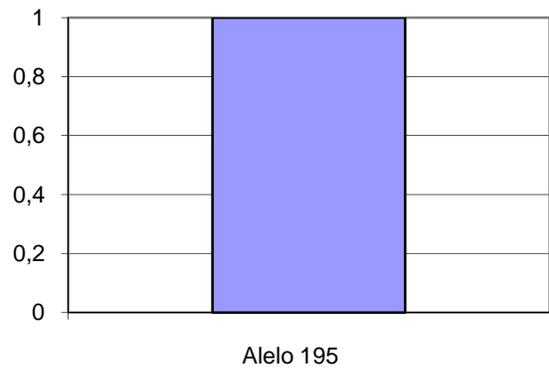


Histogramas de frecuencias alélicas de *Elanus leucurus* (n=1)

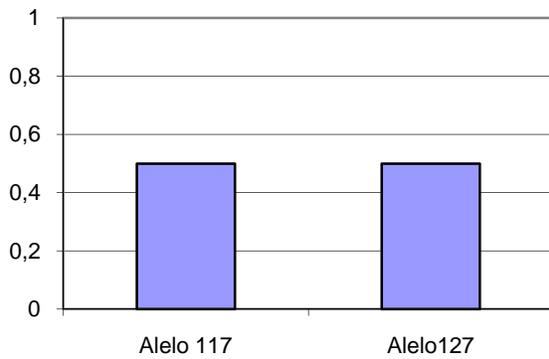
Marcador Aa12 *E. leucurus*



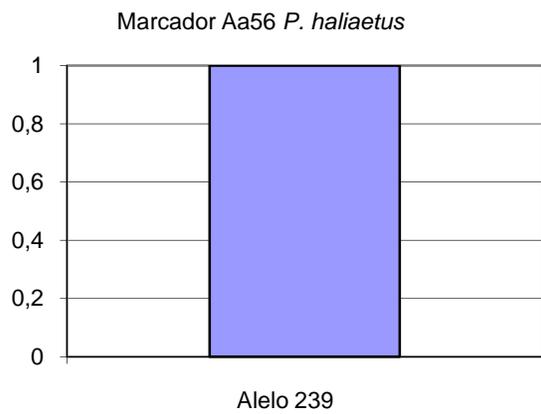
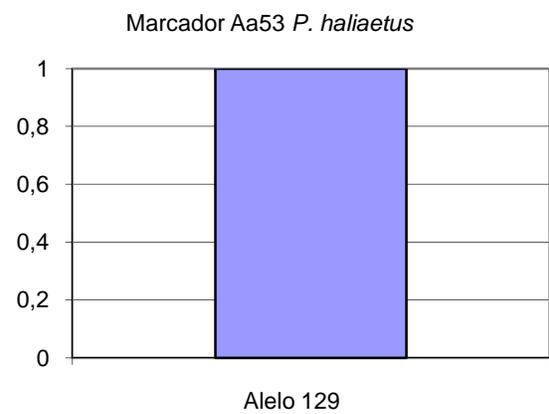
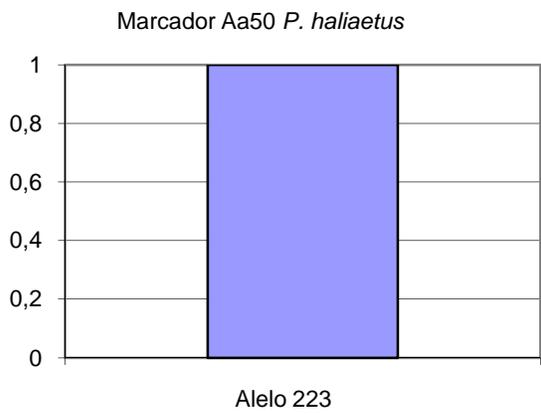
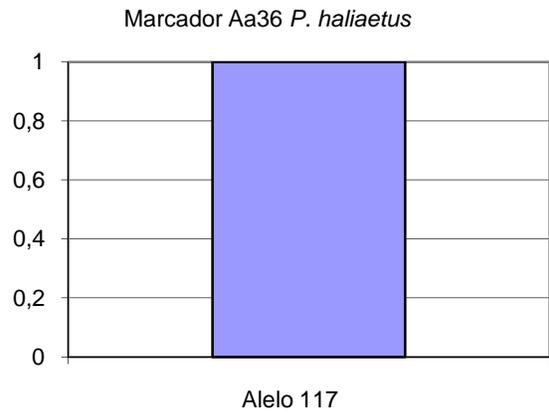
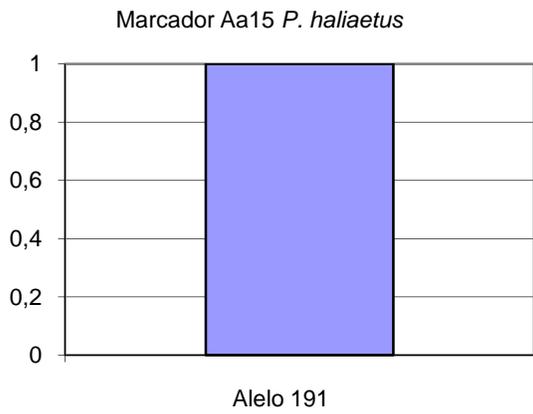
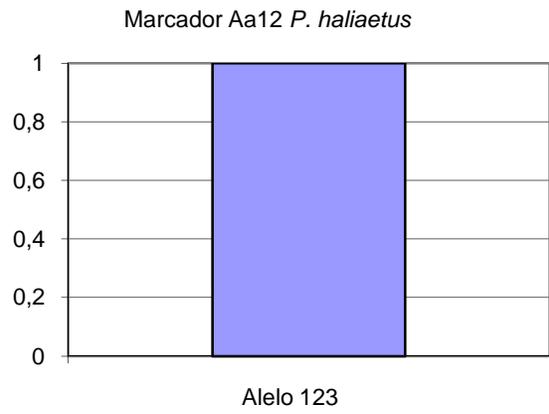
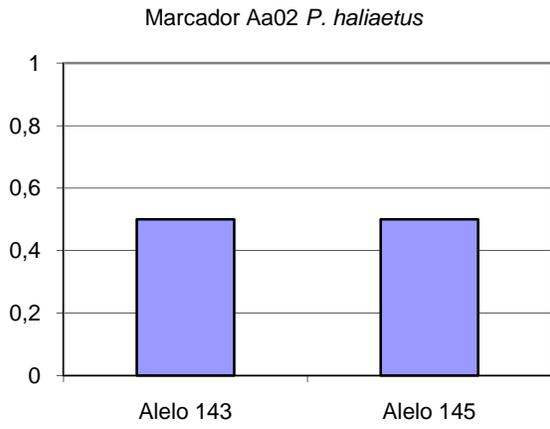
Marcador Aa15 *E. leucurus*



Marcador Aa36 *E. leucurus*

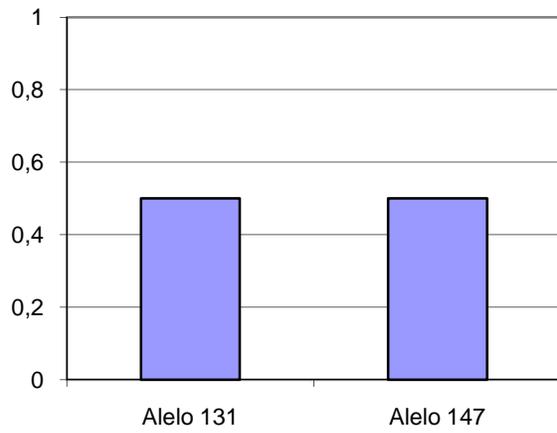


Histogramas de frecuencias alélicas de *Pandion haliaetus* (n=3)

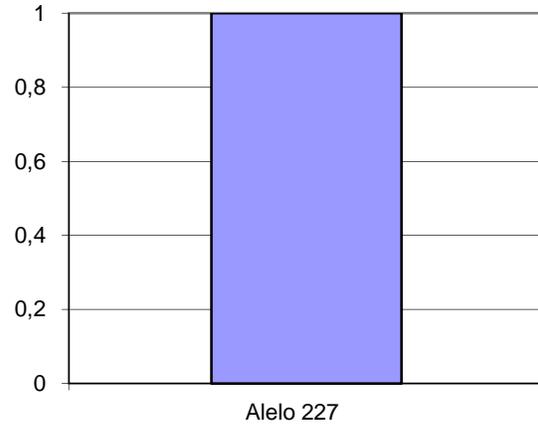


Histogramas de frecuencias alélicas de *Falco femoralis* (n=2)

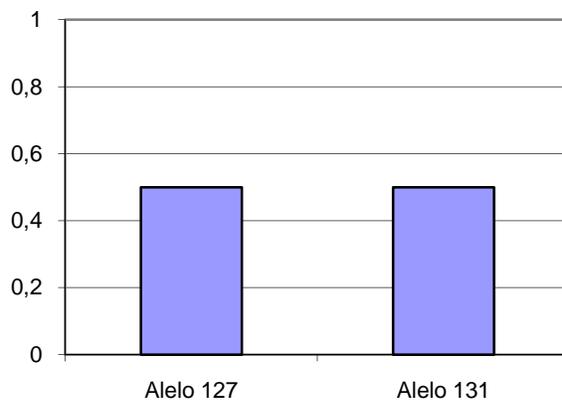
Marcador Aa02 *F. femoralis*



Marcador Aa15 *F. femoralis*

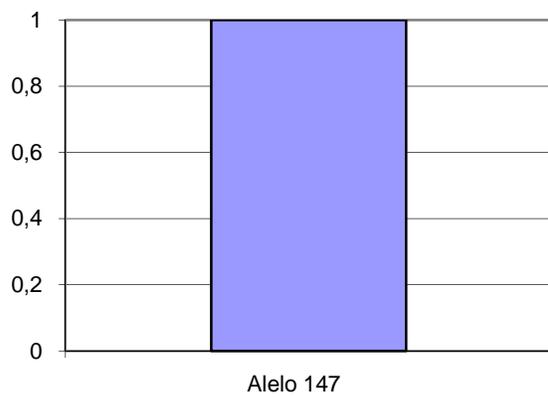


Marcador Aa53 *F. femoralis*

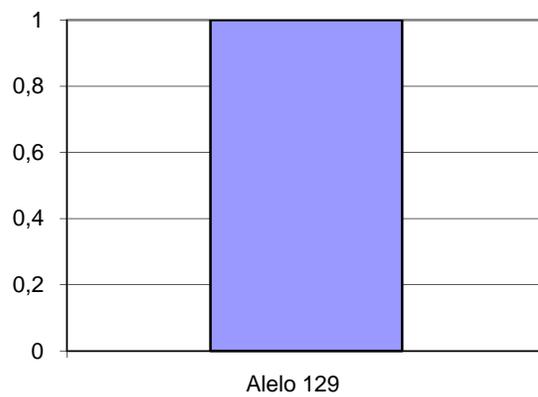


Histogramas de frecuencias alélicas de *Falco peregrinus* (n=3)

Marcador Aa02 *F. peregrinus*

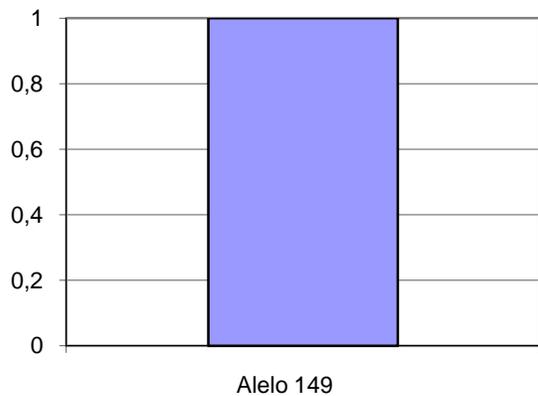


Marcador Aa53 *F. peregrinus*

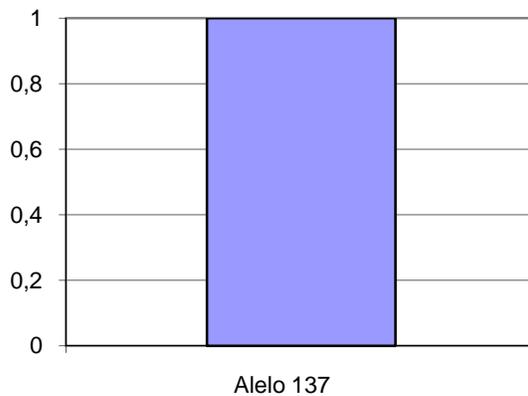


Histogramas de frecuencias alélicas de *Sarcoramphus papa* (n=2)

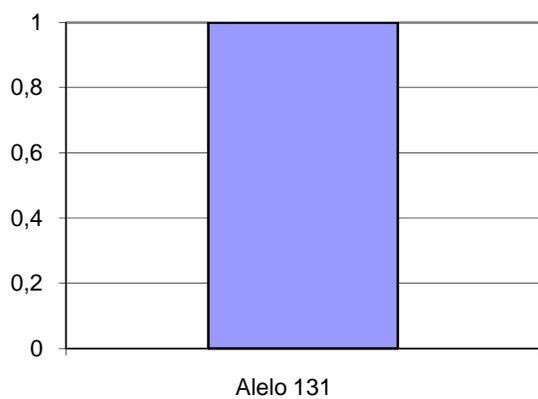
Marcador Aa02 *S. papa*



Marcador Aa12 *S. papa*

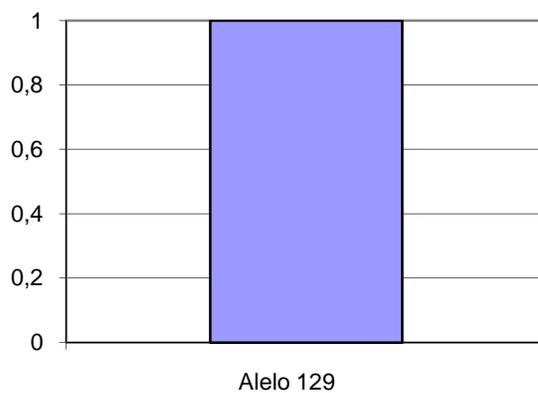


Marcador Aa53 *S. papa*

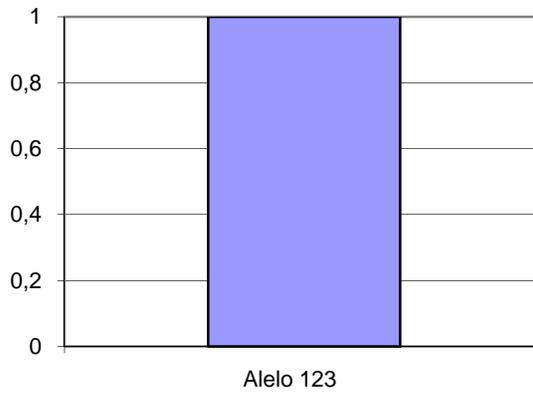


Histogramas de frecuencias alélicas de *Pulsatrix perspicillata* (n=1)

Marcador Aa02 *P. perspicillata*



Marcador Aa53 *P. perspicillata*































**ANEXO 4: Cálculo de tasas mutacionales despejando de la fórmula  $E(\delta\mu^2) = 2\mu\tau$ , y usando el valor de  $\tau$  calculado a partir de *cyt b***

<b>Marcador</b>	<b>Par de especies</b>	<b><math>\tau</math> (<i>cyt b</i>)</b>	<b><math>\mu</math></b>
Aa02	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	5,12E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	7,89E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	9,44	6,04E-05
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	2,88E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	10,31	9,09E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	2,86E-09
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	9,13	6,51E-05
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	3,48E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,19	1,13E-06
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	9,63	6,23E-05
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	3,56E-06
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,5	1,17E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	3,19	1E-04
<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	13,31	3,26E-05	
<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	12,38	3,75E-06	
Aa04	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	0
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	1,97E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	1,63E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	6,88	2,18E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	1,79E-08
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	1,64E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	7	2,14E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	2,52E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	8	2,93E-07
<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	0	
Aa12	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	2,05E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	7,11E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	9,44	0
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	7,26E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	6,88	0
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	10,31	3,64E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	1,4E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	9,13	1,05E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	2,92E-09
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	7	1,37E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,19	2,37E-06
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	9,63	3,51E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	1,12E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	8	4,22E-07
<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,5	1,6E-06	

Aa12	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	3,19	2,09E-07
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	0
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	13,31	6,2E-06
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	6,24E-08
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	12,38	2,28E-06
	<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,13	3,37E-06

Marcador	Par de especies	cyt b	$\mu$
Aa15	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	1,63E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	1,4E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	9,44	1,43E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	1,63E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	6,88	7,85E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	10,31	1,31E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	5,45E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	9,13	2,27E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	4,83E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	7	5,99E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,19	7E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	9,63	8,48E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	1,79E-08
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	8	8,33E-06
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,5	1,75E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	3,19	1,88E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	1,14E-05
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	13,31	4,06E-06
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	6,88E-06
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	12,38	1,94E-06
<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,13	1,21E-06	
Aa36	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	3,56E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	3,51E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	9,44	1,28E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	7,26E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	6,88	2,42E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	10,31	6,46E-08
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	0
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	9,13	1,03E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	1,64E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	7	0
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,19	1,34E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	9,63	9,74E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	1,61E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	8	0
<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,5	1,3E-07	

Aa36	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	3,19	5,76E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	8,77E-07
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	13,31	1,38E-06
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	1,4E-07
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	12,38	0
	<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,13	1,35E-07

Marcador	Par de especies	cyt b	$\mu$
Aa50	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	2,16E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	1,44E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	9,44	7,23E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	1,78E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	6,88	8,73E-09
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	10,31	1,14E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	6,22E-08
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	9,13	4,75E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	8,05E-08
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	7	1,68E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,19	5,36E-09
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	9,63	7,32E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	2,19E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	8	1,02E-06
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,5	5,8E-08
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	3,19	4,71E-07
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	2,84E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	13,31	2,54E-07
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	1,72E-06
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	12,38	3,03E-08
<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,13	1,21E-06	
Aa53	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	1,08E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	3,71E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	9,44	3,97E-08
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	2,22E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	6,88	7,33E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	10,31	4,04E-09
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	1,61E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	9,13	2,92E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	1,48E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	7	0
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,19	5,36E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	9,63	5,3E-08
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	8,15E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	8	1,05E-07
<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,5	2,04E-07	

Aa53	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	3,19	1,31E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	2,5E-07
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	13,31	5,01E-08
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	1,26E-06
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	12,38	1,21E-07
	<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,13	5,39E-07

<b>Marcador</b>	<b>Par de especies</b>	<b>cyt b</b>	<b>μ</b>
Aa56	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	4,69	1,28E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	4,75	1,26E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	9,44	6,36E-07
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,19	5,88E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	6,88	1,96E-06
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	10,31	5,82E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	5,25	0
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	9,13	2,63E-06
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	9,13	1,05E-05
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	7	2,14E-07
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,19	0
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	9,63	2,49E-06
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	9,31	1,03E-05
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	8	1,88E-07
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,5	0
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	3,19	7,53E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	3,51E-06
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	13,31	1,8E-06
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	10,69	1,14E-05
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	12,38	7,76E-06
<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	11,13	1,35E-07	

**ANEXO 3: Cálculo de tiempos de divergencia a partir de marcadores microsatélites y del marcador nuclear citocromo b**

Marcador	Par de especies	Tiempo de divergencia (MYA)		
		$\mu = 7 \times 10^{-5}^*$	$\mu = 1 \times 10^{-6}^*$	cyt b
Aa02	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,003	0,24	4,69
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,005	0,38	4,75
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	<b>8,15</b>	570,38	<b>9,44</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,38	26,46	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,13	<b>9,38</b>	<b>10,31</b>
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,0002	0,015	5,25
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	<b>8,49</b>	594,02	<b>9,13</b>
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	0,45	31,74	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,18	<b>12,62</b>	<b>11,19</b>
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	<b>8,57</b>	600	<b>9,63</b>
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,47	33,14	9,31
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,19	<b>13,5</b>	<b>11,5</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	<b>5,016</b>	351,14	<b>3,19</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	6,19	433,5	13,31
<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,66	46,41	12,38	
Aa04	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0	0	4,69
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,0013	0,09	4,75
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,021	1,5	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,021	1,5	6,88
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,0013	0,09	5,25
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	0,021	1,5	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,021	1,5	7
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,033	2,34	9,31
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,033	2,34	8
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10,69*</b>
Aa12	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,014	0,96	4,69
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,048	<b>3,38</b>	<b>4,75</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	0	0	9,44
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,0095	0,67	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0	0	6,88
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,54	37,5	10,31
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,011	0,73	5,25
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	0,014	0,96	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	0,0004	0,027	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,014	0,96	7
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,378	26,46	11,19
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	0,048	3,38	9,63
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,015	1,04	9,31
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,048	3,38	8
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,26	18,38	11,5
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0,0095	0,67	3,19
<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>10,69*</b>	

Aa12	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	1,18	82,5	13,31
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,0095	0,67	<b>10,69*</b>
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,402	28,17	12,38
	<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,54	37,5	11,13
<b>Tiempo de divergencia (MYA)</b>				
<b>Marcador</b>	<b>Par de especies</b>	<b><math>\mu = 7 \times 10^{-5}^*</math></b>	<b><math>\mu = 1 \times 10^{-6}^*</math></b>	<b>cyt b</b>
Aa15	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,0109	0,77	4,69
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,0095	0,67	4,75
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	0,19	13,5	9,44
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,02	1,5	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,77	54	6,88
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,19	<b>13,5</b>	<b>10,31</b>
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,041	<b>2,86</b>	<b>5,25</b>
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	0,296	20,69	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	0,063	4,41	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,60	41,91	7
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,11	7,84	11,19
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	0,12	<b>8,17</b>	<b>9,63</b>
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,002	0,17	9,31
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,95	66,67	8
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,29	20,17	11,5
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0,086	6	3,19
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	1,74	121,5	<b>10,69*</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,77	54	13,31
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	1,05	73,5	<b>10,69*</b>
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,34	24	12,38
<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,19	<b>13,5</b>	<b>11,13</b>	
Aa36	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,0024	0,17	4,69
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,0024	0,17	4,75
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	0,172	<b>12,04</b>	<b>9,44</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,0095	0,67	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,0024	0,17	6,88
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,0095	0,67	10,31
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0	0	5,25
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	0,13	<b>9,38</b>	<b>9,13</b>
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	0,02	1,5	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0	0	7
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,02	1,5	11,19
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	0,13	<b>9,38</b>	<b>9,63</b>
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,02	1,5	9,31
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0	0	8
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,02	1,5	11,5
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0,26	18,38	3,19
<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,13	<b>9,38</b>	<b>10,69*</b>	
<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,26	18,38	13,31	

Aa36	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,02	1,5	<b>10,69*</b>
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0	0	12,38
	<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,02	1,5	11,13
<b>Tiempo de divergencia (MYA)</b>				
<b>Marcador</b>	<b>Par de especies</b>	<b><math>\mu = 7 \times 10^{-5}</math>*</b>	<b><math>\mu = 1 \times 10^{-6}</math>*</b>	<b>cyt b</b>
Aa50	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,14	10,14	4,69
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,098	<b>6,83</b>	<b>4,75</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	0,098	<b>6,83</b>	<b>9,44</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,23	16,34	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,0009	0,06	6,88
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,17	<b>11,76</b>	<b>10,31</b>
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,0047	0,33	5,25
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	0,06	4,34	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	0,0105	0,73	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,17	11,76	7
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,0009	0,06	11,19
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	0,1006	<b>7,04</b>	<b>9,63</b>
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,03	2,04	9,31
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,12	<b>8,17</b>	<b>8</b>
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,010	0,67	11,5
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0,02	<b>1,5</b>	<b>3,19</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,43	30,38	<b>10,69*</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,05	3,38	13,31
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,26	18,38	<b>10,69*</b>
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,005	0,38	12,38
	<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,19	<b>13,5</b>	<b>11,13</b>
Aa53	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,07	<b>5,04</b>	<b>4,69</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,03	1,76	4,75
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	0,005	0,38	9,44
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,03	2,04	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,07	<b>5,04</b>	<b>6,88</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,0006	0,04	10,31
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,01	0,84	5,25
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	0,04	2,67	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	0,19	13,5	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0	0	7
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,09	6	11,19
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	0,007	0,51	9,63
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,11	<b>7,59</b>	<b>9,31</b>
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,01	0,84	8
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,03	2,34	11,5
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0,06	<b>4,17</b>	<b>3,19</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,04	2,67	<b>10,69*</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,0095	0,67	13,31
<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,19	<b>13,5</b>	<b>10,69*</b>	

Aa53	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,02	1,5	12,38
	<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,09	6	11,13
<b>Tiempo de divergencia (MYA)</b>				
<b>Marcador</b>	<b>Par de especies</b>	<b><math>\mu = 7 \times 10^{-5}^*</math></b>	<b><math>\mu = 1 \times 10^{-6}^*</math></b>	<b><i>cyt b</i></b>
Aa56	<i>G. melanoleucus</i> - <i>B. magnirostris</i>	0,09	<b>6</b>	<b>4,69</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. unicinctus</i>	0,09	<b>6</b>	<b>4,75</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>O. isidori</i>	0,09	<b>6</b>	<b>9,44</b>
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>S. ornatus</i>	0,77	54	9,19
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,19	13,5	6,88
	<i>G. melanoleucus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,09	6	10,31
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. unicinctus</i>	0	0	5,25
	<i>B. magnirostris</i> - <i>O. isidori</i>	0,34	24	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>S. ornatus</i>	1,37	96	9,13
	<i>B. magnirostris</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,02	1,5	7
	<i>B. magnirostris</i> - <i>P. haliaetus</i>	0	0	11,19
	<i>P. unicinctus</i> - <i>O. isidori</i>	0,34	24	9,63
	<i>P. unicinctus</i> - <i>S. ornatus</i>	1,37	96	9,31
	<i>P. unicinctus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,02	1,5	8
	<i>P. unicinctus</i> - <i>P. haliaetus</i>	0	0	11,5
	<i>O. isidori</i> - <i>S. ornatus</i>	0,34	24	3,19
	<i>O. isidori</i> - <i>Accipiter sp.</i>	0,54	37,5	<b>10,69*</b>
	<i>O. isidori</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,34	24	13,31
	<i>S. ornatus</i> - <i>Accipiter sp.</i>	1,74	121,5	<b>10,69*</b>
	<i>S. ornatus</i> - <i>P. haliaetus</i>	1,37	96	12,38
<i>Accipiter sp.</i> - <i>P. haliaetus</i>	0,02	1,5	11,13	

\*Tasas mutacionales usadas para calcular tiempos de divergencia a partir de microsatélites

Nota: solo se incluyeron aquellas especies que amplificaron al menos siete marcadores microsatélites