



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Acción de la selección natural en la diversificación biológica: un estudio genómico y fenotípico de aves chaqueñas y andinas

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires, área Ciencias Biológicas

Licenciada María José Rodríguez Cajarville

Director de Tesis: Dr. Gustavo Sebastián Cabanne

Consejero/a de Estudios: Dr. Pablo L. Tubaro

Lugar de trabajo: Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”

Fecha de presentación: Buenos Aires, 07/06/2024

AGRADECIMIENTOS

Me voy a limitar en estas líneas a agradecer a aquellas personas que tuvieron relación directa con el desarrollo de la tesis.

Primero que nada, agradecer al Dr. Sebastián Cabanne, director de esta tesis, por la confianza y la paciencia todos estos años.

Al Dr. Tubaro por permitirme trabajar en el Museo Argentino de Ciencias Naturales, que fue la segunda casa.

A los coautores de los dos papers publicados basados en esta tesis o que colaboraron con la realización del capítulo que aún no se ha publicado (en orden alfabético): Ana S. Barreira, Luciano Calderón, Leonardo Campagna, Martín Carboni, Natalia García, Cássia Alves Lima-Rezende, Pablo L. Tubaro y Gustavo S. Cabanne.

A los técnicos y curadores de las colecciones de historia natural, quienes facilitaron el acceso a los ejemplares o muestras utilizadas en esta tesis. Por el Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia” (Argentina) el Dr. Tubaro, Lic. Laura Barone y Yolanda Davies. Por la Colección Boliviana de Fauna (Bolivia), MSc. Paola Velázquez Noriega y Dra. Adriana Rico. Por el Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado (Bolivia), Dra. Kathia Rivero y Dr. Miguel Aponte. Por el Museu de Ciências e Tecnologia (Brasil), Dr. Carlos de Lucena y Amilton J. Iaruchewski. Por la Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (Brasil) : Glayson Ariel Bencke. Por el Museo Nacional de Historia Natural de Montevideo (Uruguay), Dr. Washington Jones. Y a los curadores y técnicos de las siguientes colecciones: Colección de Ornitología del Instituto Argentino de Investigaciones de Zonas Áridas, Louisiana State University Museum of Natural Science, Museum of Natural History, Cornell Lab of Ornithology, y la Ornithology Collection of the University of Washington Burke.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca Interna Doctoral con países Latinoamericanos, a la que tuve la suerte de acceder.

Contenido

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
El contexto geográfico de la especiación y el rol de la selección natural	3
Herramientas analíticas para diferenciar procesos de diversificación en organismos no modelo.....	6
Área y modelo de estudio	10
Objetivos de la tesis y aproximación metodológica general.....	13
Organización de la tesis.....	14
BIBLIOGRAFÍA	15
CAPÍTULO 2.....	23
RESUMEN.....	24
INTRODUCCIÓN	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
Obtención de datos fenotípicos	29
Obtención de datos genéticos.....	30
Análisis de los datos fenotípicos.....	31
Análisis de datos genéticos	32
Análisis P_{ST} - F_{ST}	33
RESULTADOS.....	35
Análisis morfológico	35
Estructura filogenética y poblacional	37
Comparaciones P_{ST} - F_{ST}	40
DISCUSIÓN	41
Unidades morfológicas de <i>P. rutila</i>	41
Estructura genética poblacional poco profunda y migración asimétrica en <i>P. rutila</i>	42
Comparación P_{ST} - F_{ST} y posible adaptación local en <i>P. rutila</i>	45
BIBLIOGRAFÍA	47
CAPÍTULO 3.....	54
RESUMEN.....	55
INTRODUCCIÓN	56
MATERIALES Y METODOS.....	61
Obtención de datos genéticos.....	61
Obtención de datos fenotípicos	62
Análisis de datos genéticos	63
Pruebas de modelos alternativos de divergencia.	64
Prueba de selección natural en rasgos cuantitativos.....	65

Pruebas de modelos alternativos de divergencia.	68
RESULTADOS.....	68
Estructura filogeográfica y variación genética.	68
Aislamiento por distancia, flujo génico y tiempo de divergencia.	70
Divergencia de rasgos adaptativos.....	72
Pruebas de divergencia relativa y absoluta.....	66
DISCUSIÓN.....	66
Estructura filogeográfica de <i>P. rutila</i> a lo largo del cinturón del bosque seco Chaco-Andes.	67
El papel de la selección natural en la evolución de las subespecies de <i>P. rutila</i>	68
Alopatría versus divergencia con flujo génico y la importancia del cinturón de bosque seco del Chaco-Andes.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	72
CAPÍTULO 4.....	76
RESUMEN.....	77
INTRODUCCION	79
MATERIALES Y MÉTODOS.....	86
Obtención de datos fenotípicos	86
Variación geográfica y predictores ambientales de los rasgos fenotípicos	89
Datos genómicos: muestreo y genotipificación.	90
Estructura y parámetros poblacionales.....	91
Predictores de la variabilidad genética	92
Estimación de la tasa de migración	94
Detección de loci no neutrales	94
Test de selección sobre rasgos cuantitativos	95
Modelos alternativos de divergencia	97
RESULTADOS.....	97
Variación geográfica de los rasgos fenotípicos	97
Predictores ambientales de la variación fenotípica.	98
Estructura y parámetros genómicos poblacionales	100
Predictores ambientales de la divergencia genética.....	100
Pruebas de selección natural sobre el fenotipo	102
Tiempo de divergencia y flujo genético	103
Modelos alternativos de divergencia	104
DISCUSIÓN.....	108
¿Cuáles son los patrones geográficos de variación fenotípica y con qué variables ambientales están correlacionados?	108

El aislamiento por distancia geográfica y la altitud explican la variación genética en <i>Cranioleuca pyrrhophia</i>	112
¿Es la diferenciación fenotípica entre las poblaciones de <i>Cranioleuca pyrrhophia</i> producto de selección natural en presencia de flujo genético?	114
Divergencia con flujo génico a lo largo del gradiente Chaco Andes	116
BIBLIOGRAFÍA	117
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES GENERALES	127
BIBLIOGRAFÍA	129
ANEXO 1 (A1)	132
Bibliografía Anexo 1	135
ANEXO 2 (A2)	136
ANEXO 3 (A3)	142

RESUMEN GENERAL DE LA TESIS

Múltiples especies poseen poblaciones que muestran variación espacial en rasgos ecológicamente relevantes a lo largo de gradientes ambientales. Esta heterogeneidad espacial en los rasgos fenotípicos se genera y mantiene por procesos aleatorios y/o determinísticos. Está consensuado que, en cuanto al escenario geográfico, es necesario un evento de alopatría (aunque sea temporal) para lograr divergencia poblacional y especiación. No obstante, numerosos estudios dan cuenta de casos que desafían ese patrón general, donde las poblaciones divergen incluso bajo el efecto homogeneizador del flujo genético, gracias al efecto de una fuerte selección natural divergente sobre esos caracteres ecológicamente relevantes. El objetivo de la tesis fue probar el modelo de divergencia con flujo génico a lo largo de un gradiente ambiental en dos especies de aves habitantes de los bosques secos Chaqueños y Andinos. El estudio se llevó a cabo en la región de la Cordillera de los Andes centrales y la región del Gran Chaco. Para distinguir la divergencia en alopatría de la divergencia con flujo génico, comparamos la divergencia de rasgos fenotípicos con la variación genómica neutral, utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación para obtener loci genómicos (ddRADseq). Los resultados en ambas especies estudiadas apoyan que el mecanismo detrás de la diversificación morfológica y genómica a lo largo del cinturón del bosque seco Chaco-Andes es la divergencia con flujo génico. La diversificación en América del Sur ocurre por un conjunto de procesos, como el flujo génico entre las poblaciones, la selección natural a lo largo de gradientes ambientales y también la vicarianza. Esta combinación compleja contrasta con la idea tradicional de que la especiación en aves ocurrió principalmente en la alopatría.

ABSTRACT

Natural Selection's Role in Biological Diversification: A Genomic and Phenotypic Study of Chaco and Andean Birds

Multiple species have populations that exhibit spatial variation in ecologically relevant traits along environmental gradients. This spatial heterogeneity in phenotypic traits is generated and maintained by random and/or deterministic processes. It is generally agreed that in the geographic context, an event of allopatry (even if temporary) is necessary to achieve population divergence and speciation. However, numerous studies report cases that challenge this general pattern, where populations diverge even under the homogenizing effect of gene flow, due to the impact of strong divergent natural selection on these ecologically relevant traits. The aim of the thesis was to test the model of divergence with gene flow along an environmental gradient in two species of birds inhabiting the dry forests of the Chaco and Andean regions. The study was conducted in the central Andes and Gran Chaco regions. To distinguish divergence in allopatry from divergence with gene flow, we compared the divergence in phenotypic traits with neutral genomic variation using next-generation sequencing techniques to obtain genomic loci (ddRADseq). The results in both studied species support that the mechanism behind the morphological and genomic diversification along the Chaco-Andes dry forest belt is divergence with gene flow. Diversification in South America occurs through a combination of processes, such as gene flow between populations, natural selection along environmental gradients, and also vicariance. This complex combination contrasts with the traditional view that speciation in birds occurred primarily in allopatry.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

El contexto geográfico de la especiación y el rol de la selección natural

El contexto geográfico y ecológico en el cual surgen las nuevas especies ha sido, históricamente, sujeto de controversia en biología evolutiva. Los principales modelos de especiación pueden clasificarse según la disposición geográfica de las poblaciones que divergen, con foco en la importancia de los efectos inhibitorios del flujo genético de las barreras geográficas en la evolución del aislamiento reproductivo (Schluter, 2001). El modelo alopátrico históricamente ha recibido mayor soporte en la literatura (por ejemplo, Cadena y Céspedes, 2020; Mayr, 1963; Patton y Smith, 1994; Tobias et al., 2020), y es a menudo considerado modelo nulo en estudios evolutivos. El modelo considera que las poblaciones requieren un período de aislamiento geográfico, con un corte completo del flujo genético, para que se desarrolle el aislamiento reproductivo ya sea de manera aleatoria (deriva) o en combinación con la selección natural (Mayr, 1963; Price, 2008). Con tiempo suficiente, este proceso genera diferencias fenotípicas, genéticas y/o comportamentales lo suficientemente significativas como para generar incompatibilidades entre los individuos de las poblaciones (especies incipientes) que llevan a un aislamiento reproductivo, aún frente a un eventual contacto secundario (Mayr, 1963; Tobias et al., 2020). Además de la clásica vicarianza, otras vías alternativas de aislamiento genético incluyen, por ejemplo, la alocronía (diferentes épocas de reproducción) (Friesen et al., 2007), o cambios en el comportamiento migratorio (por ejemplo, pérdida del comportamiento migratorio) (Gómez-Bahamón et al., 2020; Withrow y Winker, 2014). Una vez establecido el aislamiento, y en ausencia de flujo genético, la diferenciación puede darse por simple acumulación de cambios estocásticos (proceso lento), o por procesos selectivos (proceso rápido) (Schluter, 2009).

Alternativamente, se ha propuesto que la diferenciación puede ocurrir en presencia de flujo genético, en respuesta a fuertes presiones selectivas divergentes, mediadas por la adaptación de las poblaciones a nichos ecológicos distintos (Schluter, 2009), o por selección sexual (Mayr, 1963; Price, 2008; Seddon et al., 2008). Cabe resaltar que la selección sexual podría generar patrones de estructura genética y fenotípica

semejante a la producida por otras formas de selección natural (Zamudio et al 2016). Esto sería el caso para contextos geográficos de parapatría (poblaciones contiguas o adyacentes) o simpatría (coexistencia en la misma área geográfica, Schluter 2009). El factor principal que promovería divergencia en el caso de diversificación mediada por adaptación a distintos ambientes sería la selección natural divergente (Endler, 1977; T. B. Smith, 1997), la cual contrarresta el efecto homogeneizador del flujo génico (Cruickshank y Hahn, 2014), favoreciendo la divergencia por adaptación diferencial de cada población a los ambientes distintos, y promoviendo el aislamiento reproductivo. Este proceso, mediante el cual las barreras al flujo génico se desarrollan entre las poblaciones como resultado directo de la selección natural divergente entre ambientes, se denomina “especiación ecológica” (Nosil, 2012; Rundle y Nosil, 2005; Schluter, 2001). Cabe destacar que la especiación ecológica en sí puede ocurrir bajo cualquier disposición geográfica de las poblaciones (alopatría, parapatría o simpatría), pero se denominará de esta forma siempre y cuando la selección divergente sea el proceso que impulse, mayoritariamente, la divergencia (Coyne y Orr, 2004; Rundle y Nosil, 2005; Schluter, 2001).

Por otra parte, y en particular en las aves, los mecanismos de aislamiento reproductivo precigótico que surgen por la selección sexual son considerados como iniciadores de los mecanismos evolutivos que dan lugar a la formación de nuevas especies (Losos y Mahler, 2010; Price, 2008; Seddon et al., 2008), o incluso, actuando de manera sincrónica con la selección mediada por factores ecológicos, acelerando y manteniendo la divergencia poblacional iniciada por selección ecológica disruptiva (Van Doorn et al., 2009). Este mecanismo de selección actúa sobre la variación en el éxito reproductivo, asociada con el éxito en la competencia por el acceso a los gametos (Shuker y Kvarnemo, 2021). Como consecuencia, puede generar aislamiento entre poblaciones debido a un apareamiento diferencial, generando diferencias morfológicas y genómicas, y promoviendo de esta manera la diversificación, incluso en parapatría o simpatría (Campagna et al., 2017; Cooney et al., 2017; Price, 1998).

A pesar de su factibilidad teórica, existen pocos ejemplos con evidencia sólida de casos de especiación con flujo genético en la literatura, lo que ha generado un debate sobre si este proceso solo produce especies

efímeras con un impacto limitado en la diversidad a lo largo del tiempo (por ejemplo, Cutter y Gray, 2016; Valente et al., 2015). Si bien esta discusión sobre los modelos geográficos de evolución y el rol de la selección parece haberse cerrado a favor de la especiación en alopatría (por ejemplo, Anderson y Weir, 2022; Tobias et al., 2020), numerosos estudios dan cuenta de casos que desafían ese patrón general, en los que las poblaciones divergen incluso bajo el efecto homogeneizador del flujo genético (Blanckaert y Hermisson, 2018; Ribeiro et al., 2019; Wang y Summers, 2010), y que es la selección lo que impulsa mayoritariamente esa diversificación. Por lo tanto, es significativo estudiar sistemas que, a simple vista, parecen ser casos candidatos a especiación ecológica en presencia de flujo genético. En ese sentido, el continente sudamericano ofrece muchos ejemplos de especies con poblaciones distribuidas de manera contigua a lo largo de gradientes ambientales, potenciales candidatos a casos de especiación con flujo genético.

Como fue mencionado, el mecanismo de especiación alopátrica ha sido el modelo predominante para explicar los procesos de especiación en el Neotrópico, y hasta años recientes, se habían recopilado poca evidencia en favor de la diversificación en parapatría o simpatría (Rull y Carnaval, 2020). La gran variedad de barreras geográficas, tanto históricas como contemporáneas en la región Neotropical, proporciona escenarios ideales para suponer procesos de especiación en alopatría (Newton, 2003; Rull y Carnaval, 2020; Stotz et al., 1996). Los principales factores diversificadores propuestos para la región han sido precisamente estas barreras geográficas: a) la Cordillera de los Andes (Brumfield y Edwards, 2007; Dantas et al., 2016; Valderrama et al., 2014; J. T. Weir, 2006; J. T. Weir y Price, 2011), b) los ríos de gran caudal, como el Amazonas o el Paraná (Fernandes et al., 2012; Kopuchian et al., 2020; Musher et al., 2022; Naka y Brumfield, 2018), c) las áreas entre refugios durante las glaciaciones del Plioceno y el Pleistoceno, especialmente en la región Andino-Patagónica (Lessa et al., 2010; Lijtmaer et al., 2011; Sérsic et al., 2011), d) los corredores de vegetación abierta que separan selvas húmedas, como la Selva Atlántica, las Yungas o el Amazonas (Cabanne et al., 2019; Lavinia et al., 2015, 2019; Trujillo-Arias et al., 2017).

El advenimiento de la era genómica, y con ella, la posibilidad de acceder a nuevas formas de estudio del genoma, acompañado por un mayor desarrollo teórico y de herramientas de análisis de datos, y de un

incremento de la capacidad computacional, ha brindado nuevas oportunidades y enfoques novedosos para reestudiar la historia evolutiva de los organismos, y en particular el proceso de especiación (Davey y Blaxter, 2010; Foote, 2018; Johnson, 2022). A la luz de este nuevo escenario, se reveló que, lejos de lo que se pensaba, la presencia de flujo génico durante el proceso de diversificación es mucho más común de lo previamente observado (Arnold, 2016; Feder et al., 2012; Nosil, 2008; Oswald et al., 2017; Poelstra et al., 2014; Richards et al., 2019; Servedio et al., 2011; Zarza et al., 2016). Un ejemplo icónico es el de los pinzones de Darwin, ejemplo histórico de radiación adaptativa por especiación alopátrica en las diferentes islas que conforman el archipiélago de las Galápagos. Los estudios genómicos han mostrado que la radiación en este grupo ha involucrado no solo casos de diferenciación en alopatría, sino que casos con presencia de flujo génico entre islas o dentro de una misma isla, e incluso especiación híbrida (e.j. Lamichhaney et al., 2015, 2016, 2018). O por ejemplo, el caso de las urracas del género *Aphelocoma*, en el que estudios previos realizados con ADN mitocondrial se ajustaban al modelo estándar de divergencia alopátrica, pero que al estudiar el genoma utilizando técnicas de secuenciación de nueva generación (con, por ejemplo, Elementos Ultraconservados UCEs), se demostró que en realidad la diversificación del género fue marcada por múltiples eventos de flujo genético entre las especies (Zarza et al., 2016). Esta nueva evidencia nos impulsa a investigar mas extensivamente, y a cuestionar, el rol del flujo génico en la divergencia poblacional, y re-evaluar la contribución relativa de la selección y de la deriva génica en el proceso (Foote, 2018).

Herramientas analíticas para diferenciar procesos de diversificación en organismos no modelo

Para distinguir entre la hipótesis nula de divergencia al azar versus la divergencia por selección natural y el escenario geográfico, es necesario comparar la variación fenotípica, genómica y ambiental en el sistema de estudio, donde cada modo de divergencia predice distintos patrones a nivel genómico, y en la variabilidad fenotípica (Figura 1). En el caso de la hipótesis de diversificación sin flujo génico y sin acción de la selección natural (hipótesis nula), una vez que el aislamiento se ha establecido, la deriva afectará a todo el genoma de manera homogénea y lenta dentro de cada población, y las poblaciones transcurrirán derroteros distintos en función de su tamaño poblacional, principalmente. En teoría, en ausencia de flujo génico, esta lenta

acumulación de mutaciones dará lugar a la fijación de alelos, de manera independiente en cada población, y esa acumulación de diferencias, con el tiempo, dará lugar al aislamiento reproductivo (Schluter, 2009). De hecho, en ausencia de selección, la divergencia genética entre poblaciones (F_{ST}) a nivel genómico solo por azar se aproxima a una distribución χ^2 (Lewontin y Krakauer, 1973; Whitlock y Lotterhos, 2015). Por otra parte, si bien se reconoce que la principal fuerza que genera divergencia en caracteres fenotípicos es la selección natural (ecológica o sexual) (Ackermann y Cheverud, 2004, 2004; Leinonen et al., 2006, 2008; Merilä y Crnokrak, 2001; Mutumi et al., 2017), procesos neutros como la deriva, también pueden ser importantes en la divergencia de caracteres (Ackermann y Cheverud, 2004; Brommer, 2011; Jacobs y Mutumi, 2018; Spitze, 1993). La magnitud de cambio puede ser similar a la de los caracteres genómicos neutros, lo cual estará determinado (entre otras variables) por el tiempo que las poblaciones han permanecido en aislamiento (Brommer, 2011; Tobias et al., 2014).

En un escenario geográfico de alopatría (sin flujo genético), pero con la selección natural cumpliendo un rol significativo (Figura 1b), esperamos encontrar una diferenciación genómica basal (la magnitud dependerá de cuánto tiempo las poblaciones estuvieron en aislamiento y de la diferencia de tamaño entre ellas), con regiones genómicas altamente diferenciadas ligadas a caracteres bajo selección mostrando picos de F_{ST} (Irwin et al., 2018). En el caso de divergencia con flujo genético (Figura 1c, especiación parapátrica mediada por factores ecológicos), dado que las poblaciones aun intercambian migrantes, se espera que la mayor parte del genoma tenga muy baja diferenciación entre las poblaciones, mientras que aquellas regiones genómicas ligadas a caracteres bajo selección poseerán un F_{ST} muy superior a la mediana (Zamudio et al., 2016). Si la selección actuó sobre caracteres de variación continua, se espera que estos caracteres tengan mayor divergencia que la predicha por caracteres genómicos neutros. Para evaluar si la diferenciación fenotípica es mayor o menor a lo esperado bajo neutralidad, utilizamos la Prueba S (Karhunen y Ovaskainen, 2012) y la prueba $Q_{ST} - F_{ST}$ (Brommer, 2011). $Q_{ST} - F_{ST}$ se utiliza para probar la acción de la selección natural sobre caracteres morfológicos cuantitativos comparando los niveles de divergencia genética neutra entre

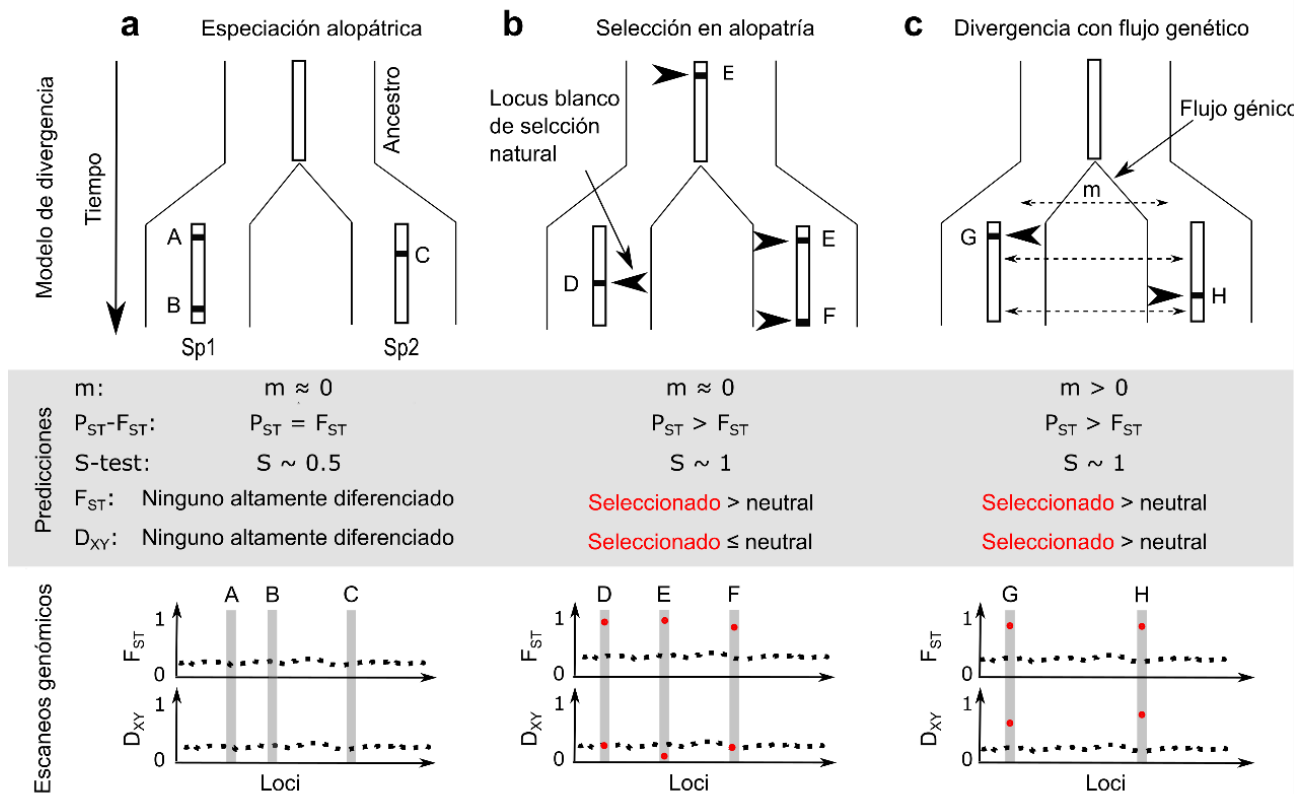


Figura 1. Modelos de divergencia de especies y predicciones basadas en datos genómicos y fenotípicos. Esbozamos cada modelo como una población ancestral que se divide en dos especies hijas (Sp1 y Sp2). Las barras horizontales en negro (en el recuadro "Modelo de divergencia") representan regiones genómicas que pueden ser afectadas por la selección natural (indicado por flechas en b). Las predicciones se basan en comparaciones de migración (m), divergencia fenotípica (P_{ST}) vs. divergencia genómica (F_{ST}) ($P_{ST} - F_{ST}$ y prueba S; Karhunen et al., 2013; Leinonen et al., 2013), y en la relación entre la divergencia relativa (F_{ST}) y absoluta (D_{XY}) de loci entre poblaciones (Cruickshank y Hahn, 2014; Irwin et al., 2018). También se representa la variación esperada de F_{ST} y D_{XY} en los escaneos genómicos. (a) Especiación alopátrica, donde las dos poblaciones hijas no intercambian migrantes durante el proceso, y se asume que la divergencia ocurre por deriva genética aleatoria. Los loci A, B y C divergieron por azar al igual que el resto del genoma, sin generar picos específicos en F_{ST} y D_{XY} . (b) Selección en alopatría, donde no hay flujo génico entre las poblaciones hijas, pero está presente la selección natural. La selección natural podría estar relacionada con la adaptación local que contribuyó a la divergencia inicial (loci D, E y F). (c) Divergencia con flujo génico, donde la selección natural actúa sobre los loci responsables de la divergencia en presencia de flujo génico (loci G y H). Las predicciones son tanto para divergencia primaria como secundaria (contacto).

poblaciones (F_{ST}) con la variación genética de caracteres cuantitativos entre poblaciones (Q_{ST} , o su aproximación fenotípica P_{ST} , Brommer, 2011; Karhunen et al., 2013; Leinonen et al., 2006). Si la morfología evolucionó solo por deriva, tanto las métricas P_{ST} como F_{ST} deberían ser similares (Wright, 1943); de lo contrario, se rechaza la deriva y se apoyan los procesos adaptativos.

Para aplicar la comparación Q_{ST} - F_{ST} en estudios realizados en poblaciones naturales (como en la presente tesis), se aproxima el Q_{ST} mediante P_{ST} , que se obtiene a partir de los datos fenotípicos observados y representa el nivel de divergencia de un rasgo cuantitativo que está determinado principalmente por efectos genéticos aditivos (Brommer, 2011; Leinonen et al., 2008). Si la divergencia morfológica se debe a la deriva genética, P_{ST} (divergencia de rasgos cualitativos) debería ser igual a F_{ST} (divergencia genómica neutra). Si P_{ST} es mayor o menor que F_{ST} , se apoya la selección diversificadora o balanceadora, respectivamente. Para calcular P_{ST} , se deben estimar los componentes de varianza para cada carácter dentro y entre poblaciones, aplicando la formula:

$$P_{ST} = \frac{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2}{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2 + 2\sigma_w^2}$$

La heredabilidad y la proporción de la varianza total debida a efectos genéticos aditivos entre poblaciones son desconocidos en los casos en que se trabaja con poblaciones naturales, y no es posible de calcularlos de manera empírica utilizando esta aproximación, sino que se debe recurrir a experimentos de jardines comunes. Por esta razón, se utiliza el análisis de robustez sugerido por (Brommer, 2011). que consiste en asignar valores entre 0,01 y 2 a dicha constante y estimar el valor de P_{ST} para cada caso. La comparación se realiza evaluando si los intervalos de confianza de P_{ST} y F_{ST} se superponen cuando $\frac{c}{h^2} = 1$. En los casos en que los intervalos de confianza de P_{ST} y F_{ST} no se superponen, se evalúa el $\frac{c}{h^2}$ crítico, que representa el valor de $\frac{c}{h^2}$ donde los intervalos de confianza de P_{ST} y F_{ST} si se superponen.

Por otra parte, la Prueba S tiene mayor capacidad para detectar selección en conjuntos de datos pequeños o con un número bajo de poblaciones (Karhunen et al., 2013). La prueba S trabaja con una matriz de coancestría poblacional, infiriendo la historia demográfica de las poblaciones con marcadores moleculares neutrales, utilizando el marco estadístico del modelo F (Falush et al., 2003; Gaggiotti y Foll, 2010). La prueba S usa los coeficientes de coancestría como medida de parentesco entre individuos o poblaciones, los cuales compara con una matriz de caracteres fenotípicos para detectar señales de selección en rasgos cuantitativos (McKay y Latta, 2002; Merilä y Crnokrak, 2001; Ovaskainen et al., 2011). La prueba S calcula el estadístico S,

que varía de 0 a 1, y se interpreta de la siguiente manera: $S = 0,5$ indica deriva genética aleatoria, $S < 0,05$ sugiere selección natural estabilizadora con un nivel de credibilidad del 95%, y $S > 0,95$ indica selección natural divergente robusta en ese nivel de credibilidad (Ovaskainen et al., 2011).

Área y modelo de estudio

Sudamérica ofrece un escenario interesante para evaluar preguntas relacionadas con los modos de diversificación dado que posee una gran diversidad ambiental, extensos gradientes y barreras potenciales a la migración. Históricamente, los patrones de variación morfológica y genética se han asociado a procesos estocásticos o procesos demográficos asociados a barreras geográficas como ríos, por ejemplo, el caso icónico del río Marañón de Perú (e.g. Winger y Bates, 2015) o el río Amazonas (e.g. Ribas et al., 2011) o, incluso, ambientes climáticamente similares separados entre sí por cientos de kilómetros de ambientes muy disímiles, como el caso de la selva atlántica y las yungas (e.g. Cabanne et al., 2019; Trujillo-Arias et al., 2020) o la amazonia con la selva atlántica (e.g. Lavinia et al., 2019).

Los bosques secos de América del Sur, al contrario de lo que ocurre con los bosques húmedos, han sido escasamente estudiados (Werneck, 2011). El Chaco, Monte y los bosques secos Inter montanos, están florísticamente relacionados (Cabrera, 1976; Pennington et al., 2000), y forman un cinturón que se extiende a lo largo de un amplio gradiente altitudinal y climático desde las tierras bajas hasta las laderas andinas (desde ahora, cinturón de bosques secos Chaco-Andes). Este “cinturón” de bosques secos es interrumpido en las laderas de los Andes por bosque lluviosos y semi caducifolios (Yungas y Bosque Tucumano Boliviano) (Figura 2). Los organismos distribuidos a lo largo del cinturón de bosque seco Chaco-Andes habitan regiones con fuertes gradientes de condiciones bióticas y abióticas, los cuales podrían ser factores impulsores de divergencia poblacional y especiación. Por ejemplo, existe una fuerte estacionalidad y muy altas temperaturas en el Chaco, con bajas precipitaciones anuales, disminuyendo del este al oeste. Por otro lado, en los Andes y en particular en los Bosques Secos Montanos Bolivianos, prevalecen condiciones típicas de ambientes de altitud, como las temperaturas bajas, mucha desecación, alta radiación solar y baja presión parcial de oxígeno (la presión parcial de oxígeno decrece cerca de 40% a una altura de 4000 m, Peacock, 1998).

Estos gradientes de condiciones bióticas y abióticas extremas (como por ejemplo de humedad y temperatura, así como la variación de la presión parcial de oxígeno) entre las tierras bajas y los sitios de altitud, podrían estar impulsando la divergencia ecológica entre las poblaciones andinas y chaqueñas. De hecho, algunos taxones de aves distribuidos conjuntamente en esta área muestran divergencia fenotípica entre regiones (Brusquetti et al., 2018; Herzog y Kessler, 2002), lo que sugiere la acción de procesos evolutivos concertados. Ejemplos de estos taxones con diferencias fenotípicas apreciables (que en algunos casos incluso han llegado a considerarse subespecies) son los taxones hermanos *Cranioleuca pyrrhophia pyrrhophia* (chaqueña) y *C. p. striaticeps* (andina), *Asthenes baeri* (chaqueña) y *Asthenes dorbignyii* (andina), *Phytotoma rutila rutila* (chaqueña) y *P. r. angustirostris* (andina), *M. t. pectoralis* (chaqueña) y *Microspingus torquatus torquatus* (andina).

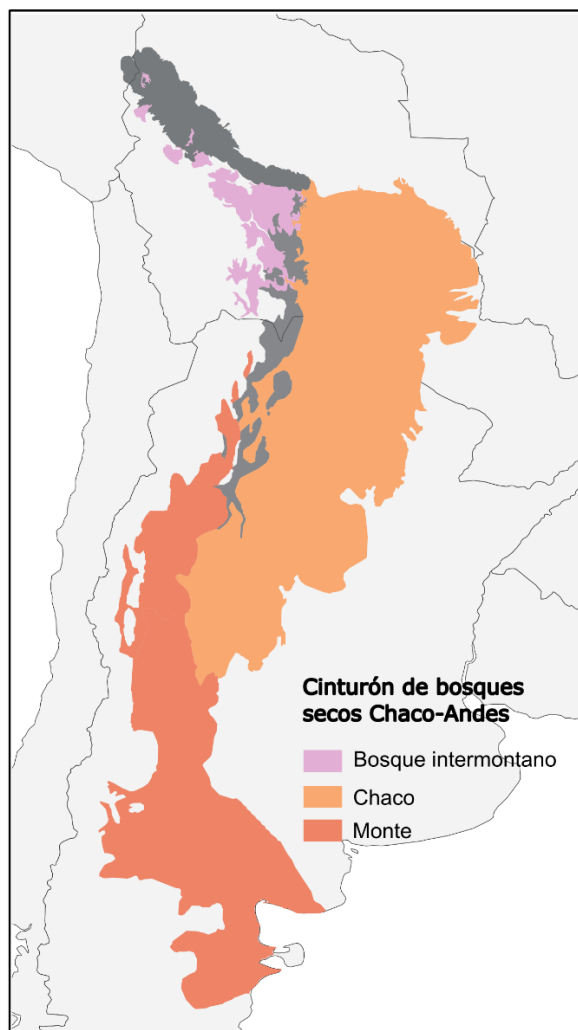


Figura 2. Distribución de las ecorregiones que conforman lo que en este trabajo denominamos Cinturón de Bosques secos Chaco-Andes. Se destaca también la disposición de las Yungas y el Bosque Tucumano Boliviano (Bosque húmedo) como potencial barrera al flujo genético en gris oscuro. Tomado de Olson et al., (2001)

En esta tesis trabajamos con dos especies de aves Passeriformes que se distribuyen a lo largo del Cinturón de Bosques Secos Chaco – Andes: *Phytotoma rutila* (Figura 3a) y *Cranioleuca pyrrhophia* (Figura 3b). Ambas especies poseen variación fenotípica y subespecies que se distribuyen de manera adyacente (distribución actual parapátrica) y que además poseen diferencias fenotípicas (coloración o morfología). Si bien se reconocen en la literatura estas diferencias fenotípicas, ninguna de estas especies ha sido estudiada en profundidad y con métodos cuantitativos en cuanto a su variación fenotípica o genómica.

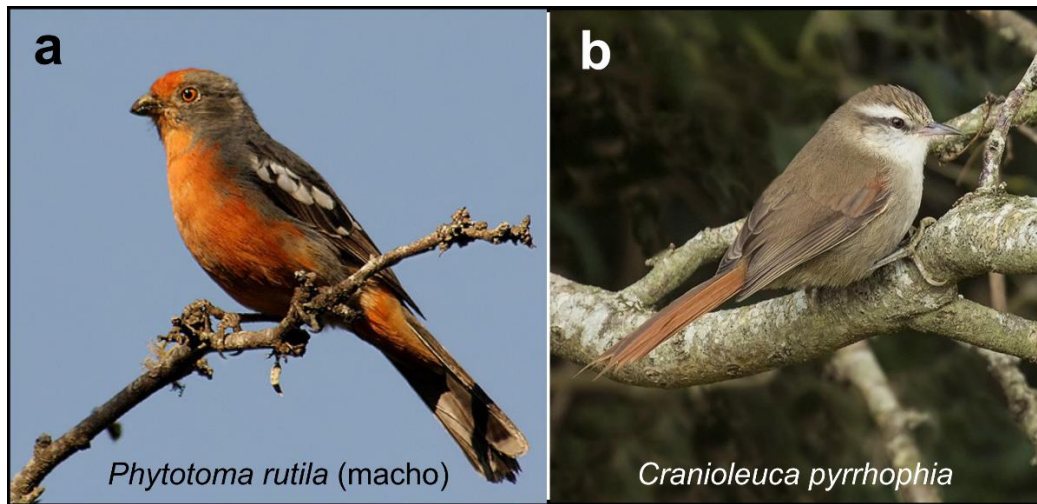


Figura 3. Aves modelo de este estudio. A) *Phytotoma rutila* (Cortarramas) Aves: Passeriformes: Cotingidae, estudiada en los Capítulos 2 y 3. Foto: Román Nardi. B) *Cranioleuca pyrrhophia* (Curutié blanco) Aves: Passeriformes: Furnariidae, estudiada en el Capítulo 4. Foto: Daniel Gil.

Objetivos de la tesis y aproximación metodológica general

El **objetivo general** de esta tesis es poner a prueba el rol de la selección natural en la especiación de organismos no modelo, tanto en el genoma como en el fenotipo, con énfasis en evaluar modelos de divergencia biológica en parapatría.

Para cumplir con este objetivo, realizamos un estudio genómico y fenotípico en aves sudamericanas, donde evaluamos las **siguientes hipótesis**: a) la selección natural posee un rol significativo en la divergencia poblacional a nivel tanto fenotípico como genómico en las especies de estudio, b) la divergencia y especiación con flujo genético ocurre en las especies *Phytotoma rutila* y *Cranioleuca pyrrhophia*.

Para cumplir con estos objetivos estudiamos datos genómicos (loci asociados a sitios de restricción, o *ddRADs* por sus siglas en Inglés), y medidas de coloración y de tamaño corporal de dos pares de linajes hermanos de aves Neotropicales para: a) identificar loci bajo selección natural por medio de escaneos genómicos; b) evaluar predicciones de acción de selección natural y modo de divergencia por medio de estimaciones de flujo génico, distribución y tipo de *outliers* (Figura 1); y c) evaluar la acción de la selección natural sobre el fenotipo por medio de comparaciones de divergencia fenotípica versus divergencia genética neutra.

Organización de la tesis

Luego de la Introducción General (Capítulo 1) de esta tesis, en el **primer capítulo empírico (Capítulo 2)**, estudiamos la variación morfológica y genética del Cortarramas (*Phytotoma rutila*), que posee dos subespecies distribuidas en los extremos del gradiente de los bosques secos y altitud. Comparamos caracteres morfológicos y genéticos con el fin de estudiar la variación morfológica y filogeográfica de la especie y evaluamos predicciones relacionadas con la evolución genética y morfológica. Los resultados respaldan la idea de que el gradiente ambiental a lo largo de los bosques secos Chaco-Andes promueven la diversificación biológica, ya que encontramos que el tamaño corporal del Cortarramas varía de acuerdo con una clina relacionada con la altitud, lo que sugiere la influencia de procesos evolutivos guiados por las diferencias ecológicas.

A continuación (**Capítulo 3**), con el objetivo de evaluar el modelo de divergencia con flujo génico a lo largo del gradiente ambiental del cinturón de bosques secos chaco andes, continuamos estudiando a *Phytotoma rutila* y utilizamos técnicas de secuenciación de nueva generación para obtener loci genómicos (ddRADseq), estudiamos la estructura genética de las poblaciones, evaluamos los efectos de la altitud y el aislamiento por distancia geográfica en la divergencia genómica y realizamos pruebas de hipótesis de modelos de divergencia. Encontramos que *P. rutila* posee un patrón de variación genómica y fenotípica compatible con el modelo de divergencia con flujo genético. Encontramos que tanto la variación genómica como la fenotípica está mayormente explicada por la diferencia ambiental (altitudinal), que existe una mayor divergencia fenotípica que genómica neutra; que existe un flujo génico asimétrico entre las poblaciones andinas y chaqueñas.

En el **Capítulo 4** elegimos al furnárido *Cranioleuca pyrrhophia* para evaluar el rol del modelo de evolución con flujo genético en la conformación de la variación fenotípica a lo largo del gradiente Chaco Andes. Siguiendo la misma aproximación metodológica que en el Capítulo 2, encontramos que la diversificación de ciertos caracteres fenotípicos (principalmente de coloración) son compatibles con el modelo de divergencia

con flujo genético, mientras que encontramos variación neutra (o muy poca variación) en caracteres morfométricos.

Por último, en el **Capítulo 5**, elaboramos y resumimos las conclusiones generales derivadas de los casos de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Ackermann, R. R., y Cheverud, J. M. (2004). Detecting genetic drift versus selection in human evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(52), 17946-17951. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405919102>
- Anderson, S. A. S., y Weir, J. T. (2022). The role of divergent ecological adaptation during allopatric speciation in vertebrates. *Science*, 378(6625), 1214-1218. <https://doi.org/10.1126/science.abo7719>
- Arnold, M. L. (2016). *Divergence with Genetic Exchange*. Oxford University Press.
- Blanckaert, A., y Hermisson, J. (2018). The limits to parapatric speciation II: Strengthening a preexisting genetic barrier to gene flow in parapatry. *Genetics*, 209(1), 241-254. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300652>
- Brommer, J. E. (2011). Whither Pst? The approximation of Qst by Pst in evolutionary and conservation biology. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(6), 1160-1168. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02268.x>
- Brumfield, R. T., y Edwards, S. V. (2007). Evolution Into And Out Of The Andes: A Bayesian Analysis Of Historical Diversification In *Thamnophilus ANTSHRIKES*. *Evolution*, 61(2), 346-367. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00039.x>
- Brusquetti, F., Netto, F., Baldo, D., y Haddad, C. F. B. (2018). What happened in the South American Gran Chaco? Diversification of the endemic frog genus *Lepidobatrachus* Budgett, 1899 (Anura: Ceratophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 123(July 2017), 123-136. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.010>
- Cabanne, G. S., Campagna, L., Trujillo-Arias, N., Naoki, K., Gómez, I., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., Dantas, G. P. M., Aleixo, A., Claramunt, S., Rocha, A., Caparroz, R., Lovette, I. J., y Tubaro, P. L. (2019). Phylogeographic variation within the Buff-browed Foliage-gleaner (Aves: Furnariidae: *Syndactyla rufosuperciliata*) supports an Andean-Atlantic forests connection via the Cerrado. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 133, 198-213. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.01.011>
- Cabrera, A. L. (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. En *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Editorial Acme.

- Cadena, C. D., y Céspedes, L. N. (2020). Origin of elevational replacements in a clade of nearly flightless birds: Most diversity in tropical mountains accumulates via secondary contact following allopatric speciation. En R. V. y C. A. (Eds.), *Neotropical Diversification: Patterns and Processes* (pp. 635-659). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31167-4_23
- Campagna, L., Repenning, M., Silveira, L. F., Fontana, C. S., Tubaro, P. L., y Lovette, I. J. (2017). Repeated divergent selection on pigmentation genes in a rapid finch radiation. *Science Advances*, 3(5), e1602404. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602404>
- Cooney, C. R., Tobias, J. A., Weir, J. T., Botero, C. A., y Seddon, N. (2017). Sexual selection, speciation and constraints on geographical range overlap in birds. *Ecology Letters*, 20(7), 863-871. <https://doi.org/10.1111/ele.12780>
- Coyne, J. A., y Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Sinauer Associates.
- Cruickshank, T. E., y Hahn, M. W. (2014). Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow. *Molecular Ecology*, 23(13), 3133-3157. <https://doi.org/10.1111/mec.12796>
- Cutter, A. D., y Gray, J. C. (2016). Ephemeral ecological speciation and the latitudinal biodiversity gradient. *Evolution*, 70(10), 2171-2185. <https://doi.org/10.1111/evo.13030>
- Dantas, S. M., Weckstein, J. D., Bates, J. M., Krabbe, N. K., Cadena, C. D., Robbins, M. B., Valderrama, E., y Aleixo, A. (2016). Molecular systematics of the new world screech-owls (Megascops: Aves, Strigidae): Biogeographic and taxonomic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 94, 626-634. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.09.025>
- Davey, J. W., y Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5-6), 416-423. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elq031>
- Endler, J. A. (1977). Geographic variation, speciation, and clines. *Monographs in population biology*, 10, 1-246.
- Falush, D., Stephens, M., y Pritchard, J. K. (2003). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.4.1567>
- Feder, J. L., Egan, S. P., y Nosil, P. (2012). The genomics of speciation-with-gene-flow. *Trends in Genetics*, 28(7), 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.03.009>
- Fernandes, A. M., Wink, M., y Aleixo, A. (2012). Phylogeography of the chestnut-tailed antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. *Journal of Biogeography*, 39(8), 1524-1535. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2012.02712.x>
- Foote, A. D. (2018). Sympatric Speciation in the Genomic Era. *Trends in Ecology and Evolution*, 33(2), 85-95. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.11.003>

- Friesen, V. L., Smith, A. L., Gómez-Díaz, E., Bolton, M., Furness, R. W., González-Solís, J., y Monteiro, L. R. (2007). Sympatric speciation by allochrony in a seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(47), 18589-18594. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700446104>
- Gaggiotti, O. E., y Foll, M. (2010). Quantifying population structure using the F-model. *Molecular Ecology Resources*, 10(5), 821-830. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02873.x>
- Gómez-Bahamón, V., Márquez, R., Jahn, A. E., Miyaki, C. Y., Tuero, D. T., Laverde-R, O., Restrepo, S., y Cadena, C. D. (2020). Speciation Associated with Shifts in Migratory Behavior in an Avian Radiation. *Current Biology*, 30(7), 1312-1321.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.01.064>
- Herzog, S. K., y Kessler, M. (2002). Biogeography and composition of dry forest bird communities in Bolivia. *Journal fur Ornithologie*, 143(2), 171-204. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0361.2002.02004.x>
- Irwin, D. E., Milá, B., Toews, D. P. L., Brelsford, A., Kenyon, H. L., Porter, A. N., Grossen, C., Delmore, K. E., Alcaide, M., y Irwin, J. H. (2018). A comparison of genomic islands of differentiation across three young avian species pairs. *Molecular Ecology*, 27(23), 4839-4855. <https://doi.org/10.1111/mec.14858>
- Jacobs, D. S., y Mutumi, G. L. (2018). The Relative Roles of Selection and Drift in Phenotypic Variation: Some Like It Hot, Some Like It Wet. En P. Pontarotti (Ed.), *Origin and Evolution of Biodiversity* (pp. 215-237). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95954-2_13
- Johnson, N. A. (2022). Speciation: Genomic sequence data and the biogeography of speciation. *National Science Review*, 9(12), nwac294. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwac294>
- Karhunen, M., Merilä, J., Leinonen, T., Cano, J. M., y Ovaskainen, O. (2013). driftsel: An R package for detecting signals of natural selection in quantitative traits. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 746-754. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12111>
- Karhunen, M., y Ovaskainen, O. (2012). Estimating population-level coancestry coefficients by an admixture F model. *Genetics*, 192(2), 609-617. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140871>
- Kopuchian, C., Campagna, L., Lijtmaer, D. A., Cabanne, G. S., García, N. C., Lavinia, P. D., Tubaro, P. L., Lovette, I., y Di Giacomo, A. S. (2020). A test of the riverine barrier hypothesis in the largest subtropical river basin in the Neotropics. *Molecular Ecology*, 29(12), 2137-2149. <https://doi.org/10.1111/mec.15384>
- Lamichhaney, S., Berglund, J., Almén, M. S., Maqbool, K., Grabherr, M., Martinez-Barrio, A., Promerová, M., Rubin, C.-J., Wang, C., Zamani, N., Grant, B. R., Grant, P. R., Webster, M. T., y Andersson, L. (2015). Evolution of Darwin's finches and their beaks revealed by genome sequencing. *Nature*, 518(7539), 371-375. <https://doi.org/10.1038/nature14181>
- Lamichhaney, S., Han, F., Berglund, J., Wang, C., Almén, M. S., Webster, M. T., Grant, B. R., Grant, P. R., y Andersson, L. (2016). A beak size locus in Darwin's finches facilitated character displacement during a drought. *Science*, 352(6284), 470-474. <https://doi.org/10.1126/science.aad8786>

- Lamichhaney, S., Han, F., Webster, M. T., Andersson, L., Grant, B. R., y Grant, P. R. (2018). Rapid hybrid speciation in Darwin's finches. *Science*, 359(6372), 224-228. <https://doi.org/10.1126/science.aao4593>
- Lavinia, P. D., Barreira, A. S., Campagna, L., Tubaro, P. L., y Lijtmaer, D. A. (2019). Contrasting evolutionary histories in Neotropical birds: Divergence across an environmental barrier in South America. *Molecular Ecology*, 28(7), 1730-1747. <https://doi.org/10.1111/mec.15018>
- Lavinia, P. D., Escalante, P., García, N. C., Barreira, A. S., Trujillo-Arias, N., Tubaro, P. L., Naoki, K., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., y Lijtmaer, D. A. (2015). Continental-scale analysis reveals deep diversification within the polytypic Red-crowned Ant Tanager (*Habia rubica*, Cardinalidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 89, 182-193. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.04.018>
- Leinonen, T., Cano, J. M., Mäkinen, H., y Merilä, J. (2006). Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of threespine sticklebacks. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(6), 1803-1812. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01182.x>
- Leinonen, T., McCairns, R. J. S., O'Hara, R. B., y Merilä, J. (2013). Q(ST)-F(ST) comparisons: Evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, 14, 179-190. <https://doi.org/10.1038/nrg3395>
- Leinonen, T., O'Hara, R. B., Cano, J. M., y Merilä, J. (2008). Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: A meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01445.x>
- Lessa, E. P., D'Elía, G., y Pardiñas, U. F. J. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology*, 19(15), 3031-3037. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04734.x>
- Lewontin, R. C., y Krakauer, J. (1973). Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*, 74(1), 175-195. <https://doi.org/10.1093/genetics/74.1.175>
- Lijtmaer, D. A., Kerr, K. C. R., Barreira, A. S., Hebert, P. D. N., y Tubaro, P. L. (2011). DNA Barcode Libraries Provide Insight into Continental Patterns of Avian Diversification. *PLoS ONE*, 6(7), e20744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020744>
- Losos, B., y Mahler, D. (2010). Adaptive Radiation: The Interaction of Ecological Opportunity , Adaptation , and Speciation. En *Evolution since Darwin: The First, 150 years* (pp. 381-420). <https://www.semanticscholar.org/paper/Adaptive-Radiation-%3A-The-Interaction-of-Ecological-Losos-Mahler/9bde37bcb9aa021791d91f6b24d0514b18d1a281>
- Mayr, E. (1963). *Animal speciation and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- McKay, J. K., y Latta, R. G. (2002). Adaptive population divergence: Markers, QTL and traits. *Trends in Ecology y Evolution*, 17(6), 285-291. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02478-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02478-3)

- Merilä, J., y Crnokrak, P. (2001). Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(6), 892-903. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00348.x>
- Musher, L. J., Giakoumis, M., Albert, J., Del-Rio, G., Rego, M., Thom, G., Aleixo, A., Ribas, C. C., Brumfield, R. T., Smith, B. T., y Cracraft, J. (2022). River network rearrangements promote speciation in lowland Amazonian birds. *Science Advances*, 8(14). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn1099>
- Mutumi, G. L., Jacobs, D. S., y Winker, H. (2017). The relative contribution of drift and selection to phenotypic divergence: A test case using the horseshoe bats *Rhinolophus simulator* and *Rhinolophus swinnyi*. *Ecology and Evolution*, 7(12), 4299-4311. <https://doi.org/10.1002/ece3.2966>
- Naka, L. N., y Brumfield, R. T. (2018). The dual role of Amazonian rivers in the generation and maintenance of avian diversity. *Science Advances*, 4(8), eaar8575. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar8575>
- Newton, I. (2003). *Speciation and Biogeography of Birds*. Academic Press. <https://shop.elsevier.com/books/speciation-and-biogeography-of-birds/newton/978-0-08-092499-1>
- Nosil, P. (2008). Speciation with gene flow could be common. *Molecular Ecology*, 17(9), 2103-2106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03715.x>
- Nosil, P. (2012). *Ecological speciation*. Oxford University Press.
- Olson, D. M., Dinerstein, E., E, E. D. W. K., Burgess, N. D., L, G. V. N. P. O. W. E. L., D, E. C. U. O., Amico, J. A. D., Itoua, I., Strand, H. O. L. L. Y. E., y Morrison, J. C. (2001). *Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth*. *BioScience*, 51(11), 933-938.
- Oswald, J. A., Overcast, I., Mauck, W. M., Andersen, M. J., y Smith, B. T. (2017). Isolation with asymmetric gene flow during the nonsynchronous divergence of dry forest birds. *Molecular Ecology*, 26(5), 1386-1400. <https://doi.org/10.1111/mec.14013>
- Ovaskainen, O., Karhunen, M., Zheng, C., Arias, J. M. C., y Merilä, J. (2011). A new method to uncover signatures of divergent and stabilizing selection in quantitative traits. *Genetics*, 189(2), 621-632. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.129387>
- Patton, J. L., y Smith, M. F. (1994). Paraphyly, Polyphyly, and the Nature of Species Boundaries in Pocket Gophers (Genus *Thomomys*). *Systematic Biology*, 43(1), 11-26.
- Peacock, A. J. (1998). Oxygen at high altitude. *BMJ : British Medical Journal*, 317(7165), 1063-1066.
- Pennington, R. T., Prado, D. E., Pendry, C. A., y Botanic, R. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. 261-273.
- Poelstra, J. W., Vijay, N., Bossu, C. M., Lantz, H., Ryll, B., Müller, I., Baglione, V., Unneberg, P., Wikelski, M., Grabherr, M. G., y Wolf, J. B. W. (2014). The genomic landscape underlying phenotypic integrity in the face of gene flow in crows. *Science*, 344(6190). <https://doi.org/10.1126/science.1253226>
- Price, T. D. (1998). Sexual selection and natural selection in bird speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 353(1366), 251-260. <https://doi.org/10.1098/rstb.1998.0207>

- Price, T. D. (2008). Speciation in birds. Roberts and Company.
- Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C. R., Miyaki, C. Y., y Cracraft, J. (2011). A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1729), 681-689. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1120>
- Ribeiro, Â. M., Puetz, L., Pattinson, N. B., Dalén, L., Deng, Y., Zhang, G., Fonseca, R. R., Smit, B., y Gilbert, M. T. P. (2019). 31° South: The physiology of adaptation to arid conditions in a passerine bird. *Molecular Ecology*, 28(16), 3709-3721. <https://doi.org/10.1111/mec.15176>
- Richards, E. J., Servedio, M. R., y Martin, C. H. (2019). Searching for Sympatric Speciation in the Genomic Era. *BioEssays*, 41(7), 1-10. <https://doi.org/10.1002/bies.201900047>
- Rodríguez-Cajaville, M. J., Campagna, L., Lima-Rezende, C. A., Carboni, M., Tubaro, P. L., y Cabanne, G. S. (2022). Genomic and phenotypic divergence-with-gene-flow across an ecological and elevational gradient in a neotropical bird. *Journal of Biogeography*, 49(8), 1535-1548. <https://doi.org/10.1111/jbi.14449>
- Rull, V. y Carnaval. (2020). Neotropical Diversification: Patterns and Processes (V. Rull y A. C. Carnaval, Eds.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-31167-4>
- Rundle, H. D., y Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3), 336-352. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x>
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(7), 372-380. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02198-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02198-X)
- Schluter, D. (2009). Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science*, 323(5915).
- Seddon, N., Merrill, R. M., y Tobias, J. A. (2008). Sexually selected traits predict patterns of species richness in a diverse clade of suboscine birds. *The American Naturalist*, 171(5), 620-631. <https://doi.org/10.1086/587071>
- Sérsic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Johnson, L. A., Pozner, R., Avila, L. J., Sites Jr., J. W., y Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia: PHYLOGEOGRAPHICAL PATTERNS FROM PATAGONIA. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 475-494. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01656.x>
- Servedio, M. R., Doorn, G. S. V., Kopp, M., Frame, A. M., y Nosil, P. (2011). Magic traits in speciation: 'Magic' but not rare? *Trends in Ecology y Evolution*, 26(8), 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.04.005>
- Shuker, D. M., y Kvarnemo, C. (2021). The definition of sexual selection. *Behavioral Ecology*, 32(5), 781-794. <https://doi.org/10.1093/beheco/arab055>
- Smith, T. B. (1997). A Role for Ecotones in Generating Rainforest Biodiversity. *Science*, 276(5320), 1855-1857. <https://doi.org/10.1126/science.276.5320.1855>
- Spitze, K. (1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: Quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, 135(2), 367-374.

- Stotz, D. F., Fitzpatrick, J. W., III, T. A. P., y Moskovits, D. K. (1996). *Neotropical Birds: Ecology and Conservation*. University of Chicago Press. <https://press.uchicago.edu/ucp/books/book/chicago/N/bo3635040.html>
- Tobias, J. A., Cornwallis, C. K., Derryberry, E. P., Claramunt, S., Brumfield, R. T., y Seddon, N. (2014). Species coexistence and the dynamics of phenotypic evolution in adaptive radiation. *Nature*, 506(7488), 359-363. <https://doi.org/10.1038/nature12874>
- Tobias, J. A., Ottenburghs, J., y Pigot, A. L. (2020). Avian Diversity: Speciation, Macroevolution, and Ecological Function. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51, 533-560. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-025023>
- Trujillo-Arias, N., Dantas, G. P. M., Arbeláez-Cortés, E., Naoki, K., Gómez, M. I., Santos, F. R., Miyaki, C. Y., Aleixo, A., Tubaro, P. L., y Cabanne, G. S. (2017). The niche and phylogeography of a passerine reveal the history of biological diversification between the Andean and the Atlantic forests. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 112(July), 107-121. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.03.025>
- Trujillo-Arias, N., Rodríguez-Cajaville, M. J., Sari, E., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., Witt, C. C., Barreira, A. S., Gómez, I., Naoki, K., Tubaro, P. L., y Cabanne, G. S. (2020). Evolution between forest macrorefugia is linked to discordance between genetic and morphological variation in Neotropical passerines. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 149, 106849. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106849>
- Valderrama, E., Pérez-Emán, J. L., Brumfield, R. T., Cuervo, A. M., y Cadena, C. D. (2014). The influence of the complex topography and dynamic history of the montane Neotropics on the evolutionary differentiation of a cloud forest bird (*Premnoplex brunnescens* , Furnariidae). *Journal of Biogeography*, 41(8), 1533-1546. <https://doi.org/10.1111/jbi.12317>
- Valente, L. M., Phillimore, A. B., y Etienne, R. S. (2015). Equilibrium and non-equilibrium dynamics simultaneously operate in the Galápagos islands. *Ecology Letters*, 18(8), 844-852. <https://doi.org/10.1111/ele.12461>
- Van Doorn, G. S., Edelaar, P., y Weissing, F. J. (2009). On the Origin of Species by Natural and Sexual Selection. *Science*, 326(5960), 1704-1707. <https://doi.org/10.1126/science.1181661>
- Wang, I. J., y Summers, K. (2010). Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular Ecology*, 19(3), 447-458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04465.x>
- Weir, J. T. (2006). Divergent Timing and Patterns of Species Accumulation in Lowland and Highland Neotropical Birds. *Evolution*, 60(4), 842-855.
- Weir, J. T., y Price, M. (2011). Andean uplift promotes lowland speciation through vicariance and dispersal in *Dendrocincla* woodcreepers. *Molecular Ecology*, 20(21), 4550-4563. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05294.x>

- Werneck, F. P. (2011). The diversification of eastern South American open vegetation biomes: Historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30(13-14), 1630-1648. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2011.03.009>
- Whitlock, M. C., y Lotterhos, K. E. (2015). Reliable Detection of Loci Responsible for Local Adaptation: Inference of a Null Model through Trimming the Distribution of F_{ST} . *The American Naturalist*, 186(S1), S24-S36. <https://doi.org/10.1086/682949>
- Winger, B. M., y Bates, J. M. (2015). The tempo of trait divergence in geographic isolation: Avian speciation across the Marañón Valley of Peru. *Evolution*, 69(3), 772-787. <https://doi.org/10.1111/evo.12607>
- Withrow, J. J., y Winker, K. (2014). Genetics of a High-Latitude Cryptic Speciation Event: American and Pacific Golden-Plovers. *The Wilson Journal of Ornithology*, 126(3), 429-442.
- Wright, S. (1943). Isolation by Distance. *Genetics*, 28(2), 114-138.
- Zamudio, K. R., Bell, R. C., y Mason, N. A. (2016). Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8041-8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602237113>
- Zarza, E., Faircloth, B. C., Tsai, W. L. E., Bryson, R. W., Klicka, J., y McCormack, J. E. (2016). Hidden histories of gene flow in highland birds revealed with genomic markers. *Molecular Ecology*, 25(20), 5144-5157. <https://doi.org/10.1111/mec.1381>

CAPÍTULO 2

El tamaño corporal y la variación genética en el Cortarramas (*Phytotoma rutila*: Cotingidae) sugieren divergencia ecológica a través del cinturón de bosques secos Chaco-Andes

Este capítulo fue publicado en la revista Journal of Ornithology bajo el título “*Body size and genetic variation in the White-tipped Plantcutter (Phytotoma rutila: Cotingidae) suggest ecological divergence across the Chaco–Andes dry forest belt*” (DOI: <https://doi.org/10.1007/s10336-019-01694-3>)

RESUMEN

Los bosques secos caracterizan muchos biomas del sur de América del Sur, y en particular, los bosques del Chaco y los valles interandinos forman un cinturón continuo que se extiende desde zonas a nivel del mar hasta el altiplano (el cinturón de bosques secos Chaco-Andes). En los extremos de este sistema de bosques, algunos taxones presentan diferenciación genética y fenotípica, lo que sugiere la influencia de procesos evolutivos concertados, como la divergencia parapátrica. Con el fin de evaluar esta hipótesis, investigamos la variación morfológica y filogeográfica del Cortarramas *Phytotoma rutila* (Cotingidae) y evaluamos predicciones relacionadas con la evolución genética y morfológica. Los resultados respaldan la idea de que el gradiente ambiental a lo largo de los bosques secos Chaco-Andes promueven la diversificación biológica, ya que encontramos que el tamaño corporal del Cortarramas varía de acuerdo con una clina correlacionada con la altitud, lo que sugiere la influencia de procesos parapátricos. Además, existen otros taxa distribuidos en toda la región de estudio que muestran patrones similares de variación geográfica, lo que sugiere la presencia de fenómenos evolutivos concertados entre especies que habitan el Cinturón de bosques secos Chaco-Andes.

INTRODUCCIÓN

Muchos de los biomas del sur de Sudamérica y las regiones Andinas se caracterizan por estar conformados por bosques secos. Por ejemplo, el Chaco es un bioma que comprende un mosaico de bosques xerofíticos, matorrales y sabanas, que cubre las planicies bajas del norte argentino, el oeste paraguayo y el sudeste boliviano (Figura 1a) (Prado, 1993). El Chaco es reemplazado hacia el oeste por otros tipos de bosques secos, como el Monte en la base de los Andes y los Bosques de valles interandinos (el Bosque Seco Montano Boliviano) (Olson et al., 2001). Muchos de estos bosques están florísticamente relacionados (Cabrera, 1976; Pennington et al., 2000), y forman un cinturón continuo que se extiende a lo largo de un amplio gradiente altitudinal y climático. De esta forma, el Chaco, el Monte y el Bosque Seco Montano Boliviano forman un cinturón continuo de vegetación xerofítica (Figura 1a), desde las tierras bajas hasta las laderas andinas (desde ahora, cinturón de bosques secos Chaco-Andes). Curiosamente, algunos taxones vertebrados están codistribuidos a lo largo de este cinturón de bosques secos (por ejemplo, diez especies de Paseriformes, Ridgely y Tudor, 2009) presentando, algunas de ellos, variaciones geográficas y divergencia entre extremos de este cinturón boscoso (por ejemplo, las especies hermanas *Asthenes baeri* -Chaqueña- y *Asthenes dorbignyii* -Andina-, Derryberry et al., 2011). Este patrón de linajes hermanos asociados a los extremos de este cinturón sugieren la acción de procesos evolutivos comunes.

Los organismos uniformemente distribuidos a lo largo del cinturón de bosque seco Chaco-Andes habitan gradientes de condiciones bióticas y abióticas que podrían ser potenciales factores impulsores de la evolución. Por ejemplo, existe una fuerte estacionalidad y muy altas temperaturas en las tierras bajas del Chaco (la temperatura más alta registrada fue de 54°C, pero en un año normal las temperaturas ascienden por encima de 40°C), además que las precipitaciones son bajas, disminuyendo del este al oeste. Por otro lado, en los Andes y en particular en los Bosques Secos Montanos Bolivianos, prevalecen condiciones típicas de ambientes de altitud, como las temperaturas bajas, mucha desecación, alta radiación solar y baja presión parcial de oxígeno (la presión parcial de oxígeno decrece cerca de 40% a una altura de 4000 m, Peacock, 1998).

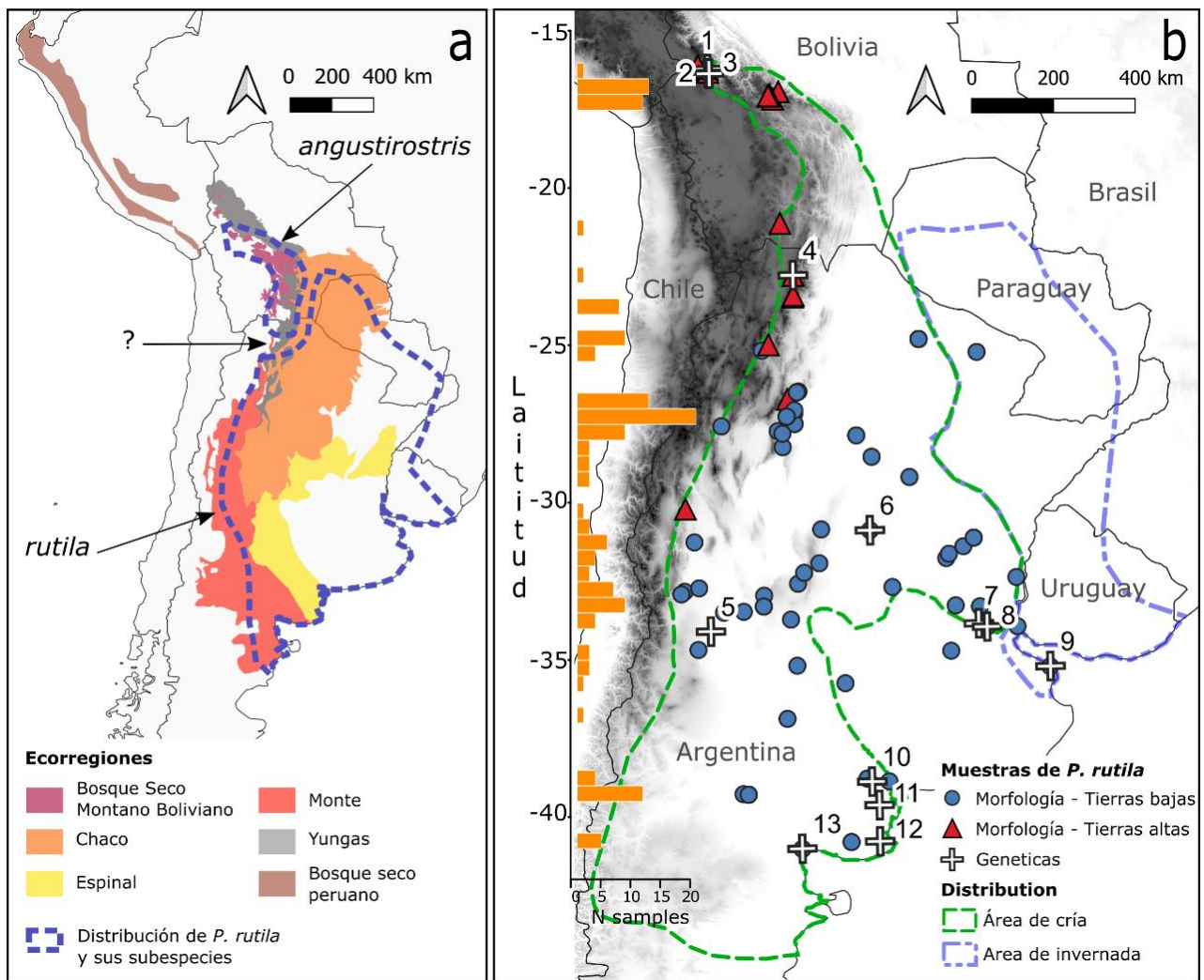


Figura 1. Área de estudio para el análisis morfológico y filogeográfico de *Phytotoma rutila*. (A) Principales ecorregiones (Olson et al., 2001) y distribución de *P. rutila* y sus subespecies según Ridgely y Tudor (2009). (B) Localidades de muestreo para el estudio morfológico y genético (ver detalles en la Tabla 1). También se representan las áreas de reproducción e invernada (es decir, ocupados principalmente durante el invierno) (ver también Anexo 1, Figura A1.1). Se muestra un modelo digital de elevación para América del Sur, donde las altitudes más altas se representan en gris oscuro. Las ubicaciones de los especímenes de museo estudiados se clasifican como tierras altas y tierras bajas según los resultados del modelo de mezcla normal (NMM). Para obtener más información sobre las ubicaciones del estudio genético, consultar la Tabla 1. El histograma indica la distribución de muestreo del análisis morfológico para cada 0,5° de latitud.

Estas clinas de factores ambientales a lo largo de la región, particularmente definidas por condiciones asociadas a la humedad y la altitud, podrían conducir a divergencia en estos organismos distribuidos a lo largo de la región. Bajo de este escenario, la selección divergente (actuando sobre el metabolismo, morfología, comportamiento), entre extremos de este gradiente ambiental podría ser fuerte, y llevar a covariación entre características fenotípicas y el gradiente geográfico (Blackburn et al., 1999; Endler, 1977; Gaston y Blackburn, 2000; Huey et al., 2003; Rundle y Nosil, 2005). A pesar de que los organismos pueden presentar altas tasas de

flujo genético a lo largo del gradiente, si las condiciones ambientales y la dirección de la selección natural difieren fuertemente entre las poblaciones ubicadas en los extremos del gradiente (es decir, entre las tierras altas bolivianas y los bosques del Chaco), el flujo genético puede restringirse promoviendo la diferenciación morfológica y genética. Esta divergencia con flujo génico en el contexto de la selección natural se conoce como "especiación ecológica", o geográficamente hablando como "especiación parapátrica" (Mayr, 1942; Rundle y Nosil, 2005; Schluter, 2001, 2000).

La especiación ecológica predice la existencia de patrones de diferenciación fenotípica y genética correlacionados con gradientes ambientales. Sin embargo, patrones similares podrían ocurrir en un escenario de divergencia en alopatría seguido de contacto secundario e introgresión, donde la deriva, en lugar de la selección, sería el factor importante que impulsaría la diferenciación de las poblaciones (Mayr, 1942). El cinturón de bosque seco Chaco-Andes abarca parte de la cordillera andina, donde debido a la complejidad del paisaje, podrían surgir muchas barreras para el flujo genético y oportunidades de divergencia en alopatría. Sin embargo, la deriva es relativamente ineficiente para producir diferenciación morfológica y aislamiento reproductivo (Sobel et al., 2010), por lo que el tiempo necesario para alcanzar los mismos patrones que en una divergencia impulsada por la adaptación es mucho mayor. Además, se espera que la divergencia y la deriva en alopatría tengan un impacto en todo el genoma, mientras que se espera que la selección natural solo tenga un impacto en los caracteres objetivo y sus marcadores genéticos asociados. Por lo tanto, para discriminar los efectos de los procesos no adaptativos (deriva) versus adaptativos (selección), es esencial comparar varias líneas de evidencia, como la variación en los rasgos fenotípicos y la variación en los marcadores genéticos neutros (Antoniazza et al., 2010; Lehtonen et al., 2009). Si la selección natural ha impulsado la variación geográfica de un carácter, se espera que la variación de este carácter entre las poblaciones no siga la divergencia de marcadores genéticos neutros, dado que estos últimos divergen, justamente, de forma neutral. Por ejemplo, el enfoque conocido como comparación Q_{ST} - F_{ST} se utiliza para probar la acción de la selección natural sobre caracteres morfológicos cuantitativos comparando los niveles de divergencia genética neutra entre poblaciones (F_{ST}) con la variación genética de caracteres cuantitativos entre poblaciones (Q_{ST} , o su aproximación fenotípica P_{ST} , Brommer, 2011; Karhunen et al., 2013; Leinonen et al., 2006). Si la morfología

evolució solo por deriva, tanto las métricas P_{ST} como F_{ST} deberían ser similares (Wright, 1943); de lo contrario, se rechaza la deriva y se apoyan los procesos adaptativos.

Asimismo, de existir variación genética entre extremos de un gradiente ambiental, podría encontrarse un flujo genético asimétrico entre regiones, ya que un rasgo beneficioso positivamente seleccionado en un extremo del gradiente podría tener una aptitud reducida en el extremo opuesto. Por ejemplo, en un estudio realizado en patos con poblaciones andinas que presentan adaptaciones genéticas para condiciones de alta altitud (en particular, se estudió la hemoglobina con alta afinidad al O_2), la migración fue más alta en sentido zonas bajas hacia zonas altas, que en la dirección opuesta (McCracken, Barger, et al., 2009). Este patrón migratorio podría darse a causa de que la hemoglobina de las poblaciones de tierras altas tendría una adecuación reducida en altitudes intermedias y bajas, por tanto, reduciendo el flujo genético de tierras altas hacia tierras bajas. Alternativamente, el flujo genético simétrico podría ser observado entre extremos de un gradiente ambiental cuando los organismos se adaptan a un paisaje heterogéneo mediante mecanismos basados en la plasticidad fenotípica (Cheviron et al., 2014). Si bien otros factores además de la selección podrían modular el flujo genético, tal como la diferencia de tamaño efectivo entre las poblaciones, o la historia de las mismas, exploramos principalmente el patrón migratorio.

En éste capítulo exploramos la evolución de la poblaciones en el cinturón de bosques secos Chaco-Andino realizando un estudio morfológico y genético del Cortarramas *Phytotoma rutila* Vieillot 1818 (Cotingidae). *Phytotoma rutila* habita desde las planicies de tierras bajas (0 msnm) hasta las tierras altas bolivianas (c.3900 m de altitud), en la cordillera de los Andes (Figura 1a). Están descritas dos subespecies que serían producto de selección divergente a lo largo de la región: *angustirostris* d'Orbigny y Lafresnaye 1937, que está asociado a los bosques secos de los valles interandinos (entre 2000 y 3900 msnm), y la subespecie *rutila*, que habita las tierras bajas. No existen límites geográficos claros entre subespecies ni barreras evidentes que podrían aislarlas. Las características del tamaño corporal de cada subespecie no están bien caracterizadas, y la literatura sólo menciona diferencias en el tamaño del pico y color de la cola (Brooke et al., 2004).

El aumento del tamaño corporal se considera un mecanismo importante para hacer frente a condiciones de gran altitud como bajas temperaturas y baja presión parcial de O₂ (Lutz et al., 1974; Schmidt-Neilsen y Larimer, 1958; Zink y Remsen Jr, 1986). Entonces, dado que las aves de altitud (*angustirostris*) estarían adaptadas a condiciones de tierras altas, esperamos que sean de mayor tamaño (Blackburn et al., 1999; Gutiérrez-Pinto et al., 2014; Meiri y Dayan, 2003). Asimismo, hay poblaciones con diferente comportamiento migratorio en la especie. Específicamente, la población de *rutilla* más austral (que habita el norte de Chubut y sur de Río Negro, Argentina) migra luego de la temporada reproductiva (Figura 1b), aparentemente hacia el noreste argentino, Uruguay, el este paraguayo y sudoeste boliviano (Ridgely y Tudor, 1994), mientras que otras poblaciones de Argentina, así como la de tierras altas y valles intermontanos de Bolivia y de Argentina (*angustirostris*), son residentes todo el año (Herzog et al., 2016; Ridgely y Tudor, 1994).

El objetivo del presente estudio es evaluar si el gradiente que caracteriza al cinturón de bosques xerofíticos Chaco-Andes promueve la diversificación biótica, así como explorar el rol de los procesos alopátricos y parapátricos en la región. A fin de concretar el objetivo, estudiamos las variaciones morfológicas y filogeográficas del *Phytotoma rutilla* y evaluamos las siguientes predicciones: a) esperamos encontrar divergencia fenotípica y genética a lo largo del gradiente altitudinal del cinturón de bosque seco Chaco-Andes); b) si procesos neutrales son responsables por el patrón de variación morfológica observado, esperamos que la divergencia morfológica sea similar a la divergencia genética neutral ($P_{ST} = F_{ST}$) ; c) Alternativamente, si procesos adaptativos promueven la divergencia morfológica, esperamos encontrar que la divergencia fenotípica sea más alta que la diferenciación genética neutra ($P_{ST} > F_{ST}$); y que d) las aves de tierras altas sean mayores en tamaño que las de tierras bajas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos fenotípicos

A fin de seleccionar especímenes y muestras de tejido de *Phytotoma rutilla* de las áreas de reproducción, primero revisamos los rangos de las áreas de reproducción e invernada de la especie (Figura 1b, ver metodología y resultados en Anexo A). Después de realizado dicho estudio, elegimos 146 especímenes de

ambos sexos recolectadas en las áreas de reproducción a lo largo de todo el año, y muestras de zonas de invernada que fueron recolectadas en la temporada estival (octubre a marzo). A fin de restringir el análisis morfológico a regiones con datos genéticos disponibles, estudiamos también una submuestra de 83 especímenes, en los cuales excluimos especímenes recolectados a más de 400 km de cualquier locación con datos genéticos (en lo sucesivo, muestra reducida). Una distancia máxima de 400 km fue la menor distancia que permitió obtener un muestreo con un número representativo de especímenes. Medimos seis rasgos morfológicos en cada espécimen: largo de pico (BLT), largo de pico desde narina (BLN), ancho de pico (BW), alto de pico (BD), largo de ala (WL) y largo de tarso (TS). MJRC tomó las medidas del 81% de los especímenes utilizando un calibre manual Mitutoyo con una precisión de 0,05 mm, mientras que GSC tomó las medidas sobre los especímenes restantes. Aun cuando no incluimos el dato de masa corporal en el conjunto de datos morfológicos porque no todos los especímenes presentaban esta información, registramos este dato de 58 especímenes, de ambos sexos, para evaluar si el PC1 de los rasgos morfológicos es un buen proxy del tamaño corporal. El archivo con el conjunto de datos morfológicos crudos se encuentra disponible en Mendeley Data (DOI: <https://doi.org/10.17632/6xxw3hvzyb.1>)

Obtención de datos genéticos

Utilizamos muestras de músculo pectoral y sangre de 23 individuos de *P. rutila*, colectados a lo largo del área de reproducción (Figura 1b y Tabla 1). También estudiamos dos muestras de *P. rara*, y secuencias de *P. raimondii* y *P. rutila* disponibles en *GeneBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Obtuvimos secuencias del intrón 9 del gen Receptor de Lipoproteína de Baja Densidad, ubicado en el cromosoma Z (VLDL, 401 bp, cebadores VLDL9R y VLDL9F de Borge et al., 2008) y del intrón 11 del Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa (Fjeldså et al., 2003; G3PDH, 372 bp, usando los cebadores GAPDL890 and GAPDH950 de Friesen et al., 1997) así como el gen Citocromo-b (Cytb, 1019 bp, cebadores L14841 y H16065 de Loughheed et al., 2000). Las secuencias fueron depositadas en *Genebank* bajo números de acceso N226948-MN226967 y MN239908-MN239953. Las secuencias que contenían *indels* heterocigotos fueron analizadas para resolver los haplotipos mediante el uso del algoritmo “*process heterozygous indels*” en el programa CodonCode v. 3.7 (CodonCode Corp., Dedham, MA). Resolvimos la fase gamética de marcadores nucleares sin *indels*, usando

PHASE (Stephens y Donnelly, 2003), implementada en DnaSP (Librado y Rozas, 2009). Adicionalmente, y porque resolver la fase gamética del VLDL requería conocer el sexo de la muestra, determinamos el sexo siguiendo Griffiths et al., (1998).

Análisis de los datos fenotípicos

Reducimos la dimensionalidad de los conjuntos de datos fenotípicos seleccionando Componentes Principales (PCs) con la función *prcomp* en R (R Core Team, 2016) y realizado todos los análisis posteriores (excepto los NMM) con el PC1, que representó el 59,8% de la variación fenotípica total.

Tabla 1. Muestras usadas en los análisis genéticos de *Phytotoma rutila*.

N. Loc	N muestras	Especie	País	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
1	3	<i>P. rutila</i>	Bolivia	Ciudad de La Paz, La Paz	-16.53	-68.06	3480
2	3	<i>P. rutila</i>	Bolivia	Huajchilla, La Paz	-16.63	-68.05	3300
3	1	<i>P. rutila</i>	Bolivia	Mecapaca, La Paz	-16.67	-68.01	2850
4	1	<i>P. rutila</i>	Argentina	Ñacuñan, Mendoza	-34.05	-67.95	580
5	1	<i>P. rutila</i>	Argentina	Río Primero, Córdoba	-30.89	-63.00	90
6	1	<i>P. rutila</i>	Argentina	San Pedro, Buenos Aires	-33.79	-59.61	5
7	1	<i>P. rutila</i>	Argentina	Baradero, Buenos Aires	-33.89	-59.35	15
8	1	<i>P. rutila</i>	Argentina	Magdalena, Buenos Aires	-35.12	-57.38	6
9	3	<i>P. rutila</i>	Argentina	Nicolás Levalle, Buenos Aires	-38.72	-62.93	0
10	2	<i>P. rutila</i>	Argentina	Pedro Luro, Buenos Aires	-39.45	-62.70	20
11	1	<i>P. rutila</i>	Argentina	Cardenal Cagliero, Buenos Aires	-40.58	-62.68	0
12	5	<i>P. rutila</i>	Argentina	Las Grutas, Rio Negro	-40.81	-65.10	0

De forma preliminar a cualquier análisis estadístico, transformamos el conjunto de datos para asegurarnos normalidad. Ajustamos modelos lineales generalizados R (con función de enlace Gaussiana) y modelos lineales para estudiar cómo la morfología (PC1) variaba a lo largo de la altitud, el observador y el sexo. Aplicamos un análisis de correlación Pearson a la masa corporal, para poner a prueba si PC1 era un indicador preciso de tamaño corporal. De todas formas, las cargas de cada variable sobre el PC1 fueron positivas (Tabla A1.1), por lo que confirmamos que esta variable es una buena indicadora del tamaño corporal.

Para identificar el número de unidades morfológicas en *P. rutila*, seguimos Cadena et al. (2017) y ajustamos Modelos Normales Mixtos (*Normal Mixed Models*, NMM, McLachlan y Peel, 2000) para los datos

morfológicos. El uso de NMMs permite poner a prueba objetivamente la existencia de distintos grupos morfológicos basandose en datos fenotípicos multivariados (Edwards y Knowles, 2014; Ezard et al., 2010; Guillot et al., 2012). Este procedimiento toma en consideración Fisher (1918) y asume que la variación fenotípica de un rasgo poligénico continuo en una especie o población panmictica sigue una distribución normal. De esta forma, NMM permite determinar el número de distribuciones normales necesarias para describir la variación en los rasgos fenotípicos estudiados sin definir a priori los límites de grupos o poblaciones. En una primera etapa seleccionamos el conjunto de aquellos PCs más útiles para el análisis de NMMs (aquellos que, en su conjunto, son útiles para discriminar los grupos en la muestra) usando el paquete R *clustvarsel* (Scrucca y Raftery, 2018). Luego exploramos todos los posibles grupos normales (definiendo un K entre 1 a 10) mediante el análisis con *mclust* 5.4 para R (Scrucca et al., 2016), el cual evalúa modelos de mezcla finita gaussiana ajustados mediante el algoritmo de expectativa-maximización para la agrupación basada en modelos. Medimos el respaldo empírico utilizando el criterio de información bayesiano (BIC, Schwarz, 1978) y utilizamos los grupos descriptos por los NMMs para los análisis posteriores.

Análisis de datos genéticos

Utilizamos un alineamiento concatenado de los genes *Cytb*, *VLDL* y *G3PDH* para realizar un análisis filogenético intraespecífico de *P. rutila*. Seleccionamos el modelo de sustitución más adecuado con *jModelTest* (Nylander, 2004): para *Cytb*, modelo HKY+G; *VLDL*, HKY y para *G3PDH*, GTR+G. Realizamos un análisis filogenético bayesiano en *MrBayes* 3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), con dos corridas paralelas, una cadena fría y una caliente, por un total de 10 millones de generaciones y muestreo cada 1000 generaciones. Los alineamientos fueron particionados por marcador y analizados bajo el modelo que mejor se ajustó para cada partición. Se utilizó un *burn-in* del 25%, se reconstruyó un árbol consenso y las probabilidades posteriores para cada nodo se calcularon usando el *Majority rule consensus* del 50%. También realizamos un análisis filogenético de máxima verosimilitud con *GARLI* 2.0 (Zwickl, 2006), con una búsqueda de un máximo de 5 millones de generaciones y 100 réplicas de búsqueda utilizando la adición gradual. Para cada marcador, utilizamos el modelo de evolución molecular que mejor se ajustara y permitimos que los parámetros varíen. El soporte de los nodos se evaluó con 500 réplicas de remuestreo con *bootstrap* no paramétrico. Se

construyeron redes de haplotipos mediante la técnica de *median joining* (Bandelt et al., 1999) utilizando el programa Network 5 (<http://www.fluxus-engineering.com/>).

Exploramos la estructura genética de la población mediante el análisis bayesiano de estructura poblacional (BAPS) versión 6.0 (Cheng et al., 2013), con $K = 1-15$, ajustes predeterminados y utilizando el modelo de agrupamiento espacial de individuos. Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando Arlequin 3.5.2 (Excoffier y Lischer, 2010) para estimar los valores de F_{ST} entre poblaciones definidas por el análisis NMM: una "población de tierras altas", que incluye todas las muestras de Bolivia; y una "población de tierras bajas", con todas las muestras de Argentina. Los intervalos de confianza (CI 95%) del F_{ST} se estimaron mediante *bootstrap*.

Realizamos estimaciones del tiempo de divergencia y flujo genético entre las poblaciones de tierras altas y bajas utilizando todos los marcadores genéticos en el programa IMA2 (Hey y Nielsen, 2004). Para ello, ejecutamos el análisis durante 300.000.000 de generaciones y guardamos 300.000 genealogías para estimar el tamaño efectivo, el tiempo y la migración bidireccional. Las condiciones utilizadas en el análisis fueron las siguientes: -q 50, -t 10, -m 10, -b 1.000.000, -l 0,5, -hfg, -hn 30, -ha 0,9, -hb 0,9, -j 8. Asumimos un tiempo de generación de un año y convertimos los parámetros a escala demográfica siguiendo las instrucciones del manual del usuario y las tasas de sustitución específicas: para Cytb, $1,05 \times 10^{-2}$ sust./sitio/Myr (Weir y Schluter, 2008); y para G3PDH y VLDL, utilizamos $1,35 \times 10^{-3}$ subst./sitio/Myr y $1,62 \times 10^{-3}$ subst./sitio/Myr, respectivamente (Ellegren, 2007).

Análisis P_{ST} - F_{ST}

Para explorar la hipótesis nula de que la divergencia morfológica observada entre las poblaciones de tierras altas y bajas de *P. rutila* fue impulsada por procesos estocásticos, aplicamos el procedimiento de comparación Q_{ST} - F_{ST} (Leinonen et al., 2006) al conjunto de datos completo y al reducido. Para esta prueba, se aproximó el Q_{ST} calculando el P_{ST} , que se obtiene a partir de los datos fenotípicos observados (ver más abajo) y representa el nivel de divergencia de un rasgo cuantitativo cuya expresión está determinada principalmente por efectos genéticos aditivos (Brommer, 2011; Leinonen et al., 2008). Si la deriva explica la divergencia

morfológica, la predicción $P_{ST} = F_{ST}$ no debe ser rechazada. Alternativamente, si $P_{ST} > F_{ST}$ o $P_{ST} < F_{ST}$, se apoyaría la selección de diversificadora o balanceadora, respectivamente (Merilä y Crnokrak, 2001).

Para este análisis, se compararon las poblaciones de tierras altas y bajas, como fueran determinadas con el análisis de NMM. El P_{ST} observado se calculó con PC1, así como con cada carácter morfológico individual, siguiendo a Brommer (2011):

$$P_{ST} = \frac{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2}{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2 + 2\sigma_w^2}$$

siendo σ_w^2 y σ_b^2 los componentes de varianza dentro y entre poblaciones, respectivamente, h^2 la heredabilidad, y c la proporción de la varianza total que se presume que se debe a efectos genéticos aditivos entre poblaciones. Para obtener el P_{ST} observado asumimos $\frac{c}{h^2} = 1$. Los componentes de varianza se estimaron mediante un análisis de varianza convencional, como se describe en Antoniazza et al. (Antoniazza et al., 2010). El intervalo de confianza del 95% del P_{ST} se estimó por *bootstrap*.

Dado que P_{ST} puede verse influenciado por efectos genéticos ambientales y no aditivos (Leinonen et al., 2006; Merilä y Crnokrak, 2001), lo que produciría una violación de una suposición del modelo (es decir, que $\frac{c}{h^2} = 1$), las comparaciones P_{ST} - F_{ST} deben incluir un análisis de sensibilidad para evaluar la robustez de los resultados. Cuando se observó que P_{ST} y F_{ST} eran diferentes (es decir, los CI no se solapaban), seguimos a Brommer (2011) y evaluamos $\frac{c}{h^2}$ crítico, estadístico utilizada para evaluar la robustez, y que representa el valor de $\frac{c}{h^2}$ más cercano a 1 que produciría CIs superpuestos entre P_{ST} y F_{ST} . Evaluamos el $\frac{c}{h^2}$ crítico estimando el valor de P_{ST} usando diferentes valores de $\frac{c}{h^2}$ (tomó valores de 0 a 2, con pasos de 0,2) e identificando el valor de $\frac{c}{h^2}$ que produjo una superposición de los CI de F_{ST} y P_{ST} (ver más detalles en Brommer 2011). Una fuerte desviación de $\frac{c}{h^2} = 1$ se interpreta como que los CI de P_{ST} y F_{ST} se superpusieron en una situación poco realista (es decir, una fuerte desviación de la suposición $\frac{c}{h^2} = 1$), y que tanto P_{ST} como F_{ST} son significativamente diferentes. Seguimos a Brommer (2011) y adoptamos como indicativo de un resultado robusto un $\frac{c}{h^2}$ crítico

igual o inferior a 0,2. Cuando tomó valores entre $0,3 > \frac{c}{h^2} \text{ crítico} > 0,2$, interpretamos los resultados como límite.

RESULTADOS

Análisis morfológico

Se aplicó un Análisis de Componentes Principales y se seleccionó el primer PC (PC1, 59,78% de la variación total, Tabla A1.1) para ser utilizado como proxy del tamaño corporal general y para realizar análisis posteriores (excepto el análisis NMM). Los seis rasgos morfológicos mostraron una correlación positiva con PC1, variando de 0,33 a 0,5 (Tabla A1.1). El análisis de correlación Pearson de PC1 con la masa corporal indicó una correlación positiva (Corr = 0,54, $p = 0,006$) por lo que lo usamos como indicador de tamaño corporal. El modelo lineal generalizado indicó que PC1 tiene una correlación positiva con la altitud ($b \text{ parcial} = 8,4 \times 10^{-5}$, $p < 0,01$), una correlación baja con la variable observador ($b \text{ parcial} = 3,3 \times 10^{-2}$, $p = 0,04$) y ninguna correlación con el sexo ($p = 0,12$). Debido a que la importancia del observador y el sexo fue baja y a que su efecto fue muy pequeño, no se lo consideró en los análisis posteriores. En concreto, la variación entre los *scores* de PC1 correspondientes a diferentes observadores representó el 6% de la varianza de PC1 ($3,3 \times 10^{-2}/0,54$, siendo 0,54 el rango total de PC1). Comparativamente, la altitud explica el 62% de la varianza total de PC1 [$(8,4 \times 10^{-5} \times 3960 \text{ m}) / 0,54$]. El modelo lineal entre PC1 y altitud explicó aún más la relación antes mencionada ($b = 7,9 \times 10^{-5}$, $p < 0,01$, $R^2 = 0,6634$, Figura 2a).

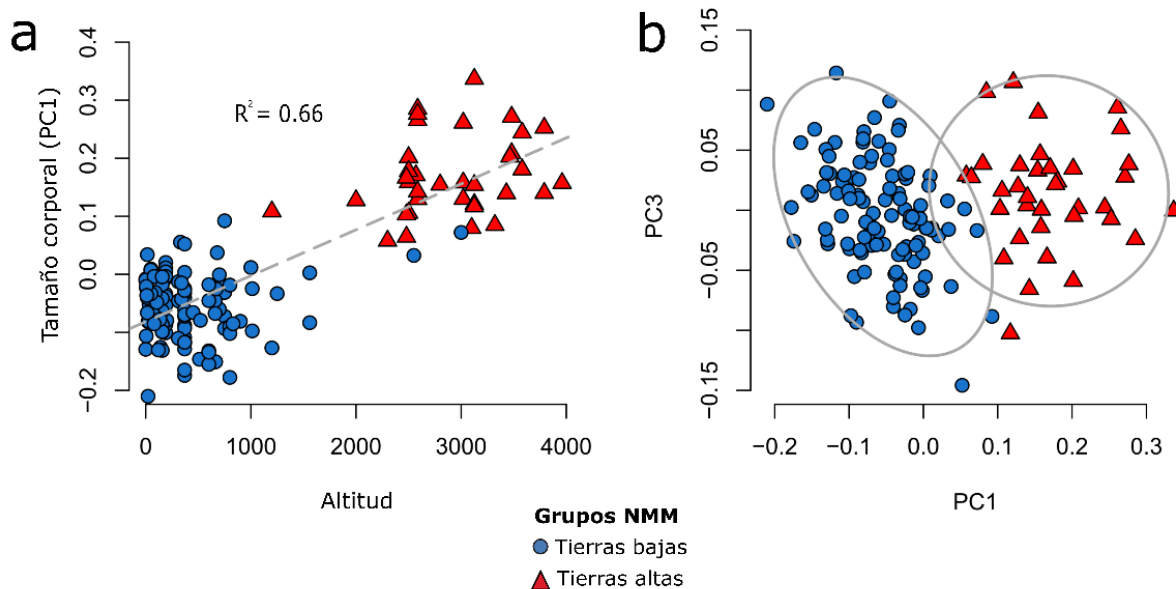


Figura 2. Variación del tamaño corporal de *P. rutila* en función de la altitud y resultados del análisis del modelo mixto normal (NMM). (a) Relación entre el tamaño corporal (componente principal 1 (PC1)) y la altitud. (b) Variación de PC1 vs. PC3 y resultados del análisis del NMM. Se muestran elipses del 95% de probabilidad. Se indica la asignación de especímenes a cada uno de los dos grupos morfológicos descritos por el análisis del MMN.

Los PC más útiles para la discriminación de grupos en los modelos NMM fueron PC1 y PC3. Los modelos obtenidos con este análisis mostraron que el número más probable de grupos morfológicos fue de dos ($K = 2$, Figura 2). La mayoría de los especímenes del primer grupo fueron recolectados de 0 a 1800 m de altitud, y la mayoría de los especímenes del segundo grupo fueron recolectados a más de 1800 m, por lo que los identificamos como grupos de tierras bajas y tierras altas, respectivamente (Figura 1b, 2a y Figura A1.2). El grupo de las tierras altas se asoció a la subespecie *angustirostris*, mientras que el grupo de las tierras bajas a la subespecie nominal, siguiendo la bibliografía. Dentro de esos grupos, no hubo una relación significativa entre PC1 y la altitud. Los individuos del grupo de las tierras altas fueron los más grandes (Tabla 2); por ejemplo, la profundidad del pico y la longitud del tarso fueron un 9,2% y un 9,5% más pequeñas en las tierras bajas que en tierras bajas, respectivamente.

Tabla 2. Características morfométricas y genéticas de las poblaciones de altas y bajas altitudes de *P. rutila*. Se presentan la media (mm) y la desviación estándar (entre paréntesis) de las siguientes variables morfológicas (siglas en inglés): longitud del pico (BLT), longitud del pico desde la narina (BLN), ancho del pico (BW), profundidad del pico (BD), longitud del ala (WL) y longitud del tarso (TS). Se presentan la diversidad nucleotídica (π), los sitios polimórficos (s), D (Tajima 1989), Fs (Fu 1997) para cada marcador y población, y los valores de θ globales para cada población. Cytb se refiere al gen citocromo b, VLDL se refiere al gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad ligado al cromosoma Z y G3PDH se refiere al gen de la gliceraldehído-3-fosfodehidrogenasa.

Medidas y conjunto de datos	Población de tierras altas			Población de tierras bajas		
Morfología						
n (individuos)	35			111		
BLT	13,65 (0,7)			12,26 (0,67)		
BLN	9,29 (0,47)			8,73 (0,42)		
BW	7,02 (0,37)			6,47 (0,36)		
BD	8,09 (0,4)			7,34 (0,27)		
WL	94,57 (3,91)			85,58 (2,65)		
TS	21,31 (0,94)			19,25 (0,7)		
Genética						
Marcador	Cytb	VLDL	G3PDH	Cytb	VLDL	G3PDH
N (secuencias)	6	8	10	16	24	30
π	0,0005	0	0,006	0,002	0,002	0,018
s	1	0	8	11	4	40
Tajima's D	0,85	0	-0,89	-1,004	-1,106	-1,031
Fu's Fs	0,62	1	-1,53	-3,351	-0,246	-13,95*
Theta global	0,825 (0,12 - 2,87)			11,82 (4,97 - 36,27)		

*p < 0,02

Estructura filogenética y poblacional

Se obtuvieron secuencias de ADN de 22 *P. rutila* y de cuatro muestras del grupo externo. No logramos recolectar secuencias de ADN de una muestra de *P. rutila* del norte argentino (MACN-Or-Ct 3705, localidad 4). El análisis filogenético mostró que los individuos de Bolivia formaron un grupo monofilético anidado dentro de un clado junto con otras muestras de tierras bajas (Figura 3). Todas las demás muestras no formaron ningún grupo geográficamente coherente. Este resultado fue congruente con las redes de haplotipos obtenidas con cada marcador (Figura 3), que denotaron aislamiento superficial de las muestras bolivianas. Los análisis BAPS indicaron que el número más probable de grupos en cada marcador es de uno.

Tabla 3. Comparaciones P_{ST} - F_{ST} entre las poblaciones de tierras altas y bajas de *P. rutila*. Se muestran los intervalos de confianza (95%) entre paréntesis. PC representa el componente principal, NA indica que no es aplicable; para otras abreviaturas, consultar la Tabla 2.

Morfología		Datos genéticos					
Medida de tamaño corporal	P_{ST} Observado	Cytb		VLDL		G3PDH	
		$F_{ST}=0,46$ (0,05-0,69)		$F_{ST}=0,44$ (0,30-0,50)		$F_{ST}=0,132$ (0,07-0,20)	
		$p < 0,01$		$p < 0,01$		$p < 0,01$	
		Comparación	$\frac{c}{h^2}$ crítico	Comparación	$\frac{c}{h^2}$ crítico	Comparación	$\frac{c}{h^2}$ crítico
PC1 (completo)	0,78 (0,74-0,82)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,86	$P_{ST} > F_{ST}$	0,38	$P_{ST} > F_{ST}$	0,09**
PC1 (reducido)	0,64 (0,63-0,72)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} > F_{ST}$	0,66	$P_{ST} > F_{ST}$	0,16**
BLT	0,54 (0,45-0,63)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} > F_{ST}$	0,35
BLN	0,13 (0,03-0,28)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} < F_{ST}$	1,07	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
BW	0,37 (0,25-0,47)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} > F_{ST}$	0,72
BD	0,57 (0,47-0,66)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} > F_{ST}$	1,04	$P_{ST} > F_{ST}$	0,25*
WL	0,44 (0,28-0,58)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} > F_{ST}$	0,63
TS	0,62 (0,55-0,70)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	$P_{ST} > F_{ST}$	0,79	$P_{ST} > F_{ST}$	0,19**

* Resultado *borderline*. ** resultado robusto cuando $\frac{c}{h^2} < 2$ (siguiendo a Brommer (2011)).

Las pruebas demográficas de neutralidad (D de Tajima y F_s de Fu) no apoyaron la desviación de la neutralidad en los tres marcadores (Tabla 2). La población de tierras bajas de *P. rutila* presentó la mayor diversidad genética. La estructura genética poblacional de *P. rutila* entre tierras altas (muestras bolivianas) y tierras bajas (muestras no bolivianas) fue de baja a moderada, dependiendo del marcador genético (Tabla 3). Vale la pena señalar que debido a que carecemos de secuencias de ADN del norte de Argentina (Figura 1b), estos valores de F_{ST} podrían representar una sobreestimación de la divergencia entre las poblaciones de tierras altas y bajas. El análisis de IMA2 indicó una mayor migración de las tierras altas a las tierras bajas (4,40 migrantes por generación, HPD95 0-12,47) que en la dirección opuesta (0 migrantes por generación, HPD95 0-1,00). Aunque estas estimaciones de migración tienen intervalos de confianza superpuestos, hubo

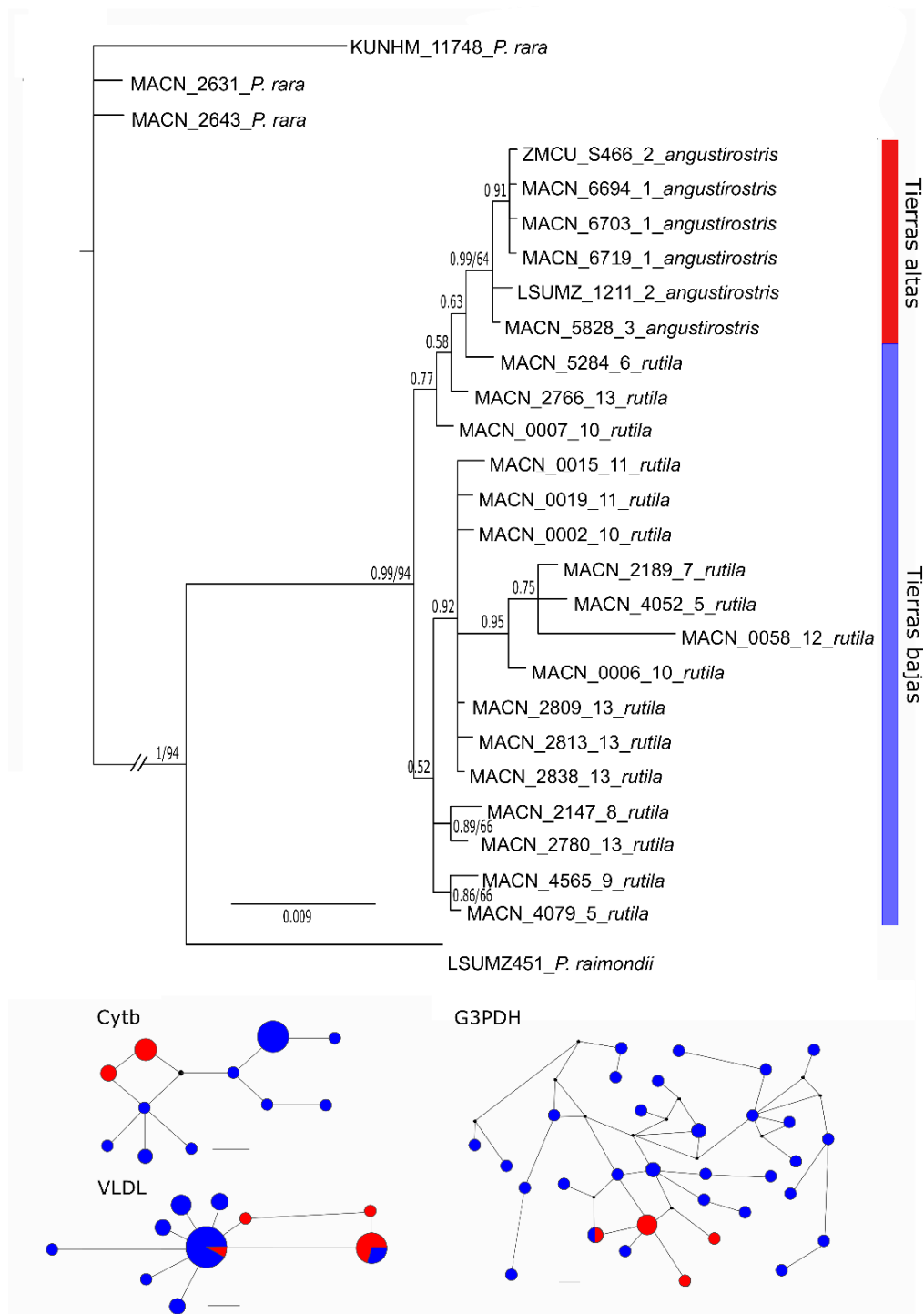


Figura 3. Análisis filogenético y de redes de haplotipos de secuencias del citocromo b (Cytb), el gen del receptor de lipoproteína de baja densidad ligado al cromosoma Z (VLDL) y la gliceraldehído-3-fosfodehidrogenasa (G3PDH) de *P. rutila*. Los números en los nodos de la filogenia representan la probabilidad posterior y el soporte de *bootstrap* del análisis de máxima verosimilitud (solo se muestran los valores por encima del 50%). Los nombres de los terminales representan el número de tejido, el número de identificación de la localidad de muestreo (de acuerdo con Tabla 1) y la subespecie. Se indica la asociación con unidades morfológicas (tierras bajas o altas) según lo descrito por el análisis del NMM. Se incluye una escala que indica un paso de mutación debajo de cada red de haplotipos. Zoological Museum University of Copenhagen, MACN Museo Argentino de Ciencias Naturales, LSUMZ Louisiana State University Museum of Natural Science.

una clara diferencia en los valores más probables (0 vs 4,41), lo que indica una migración asimétrica. Este análisis indicó, además, que la población de las tierras bajas es la más diversa genéticamente, teniendo el Theta más grande (Tabla 2), lo que también sugiere que esta población es de mayor tamaño. No informamos el tiempo de divergencia entre regiones porque la estimación no fue confiable, de acuerdo con el alto flujo génico observado y la baja divergencia entre regiones (Figura 3).

Comparaciones P_{ST} - F_{ST}

El P_{ST} observado entre las poblaciones de tierras altas y bajas fue de 0,78, que es más alto que cualquiera de los F_{ST} estimados, un resultado consistente con el origen adaptativo de la divergencia del tamaño corporal entre las poblaciones de *P. rutila* (Tabla 3 y Figura 4). Solo las comparaciones con el marcador nuclear G3PDH fueron robustas, y mientras que las comparaciones con VLDL no lo fueron, los resultados obtenidos con PC1 estuvieron más cerca de un $\frac{c}{h^2} \text{ critico} = 0$ que de 1. Esto muestra una tendencia hacia una desviación de la expectativa neutral. El análisis de los rasgos individuales indicó que los resultados significativos se deben a la desviación de la neutralidad de los caracteres del pico (BD y BLT con una baja robustez), así como de la longitud del tarso (TS). Los resultados de la comparación P_{ST} - F_{ST} utilizando el conjunto de datos reducido coinciden con los obtenidos con la muestra completa, por lo que se extrae que las diferentes escalas

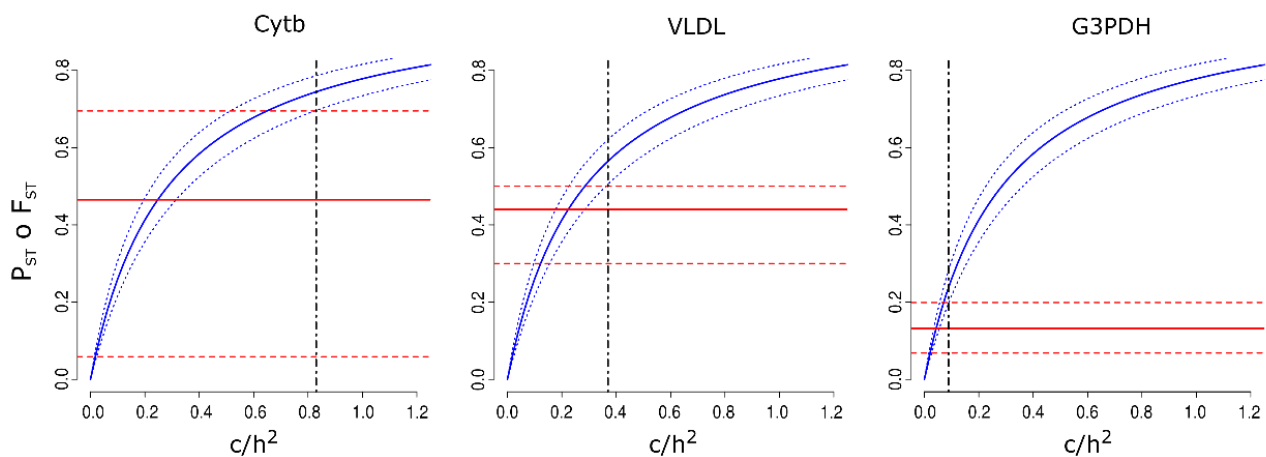


Figura 4. Comparaciones P_{ST} - F_{ST} de rasgos de tamaño corporal (PC1) de *P. rutila* ($n = 146$) con tres marcadores genéticos (Ctyb, VLDL y G3PDH). Los valores de F_{ST} se indican en rojo (intervalo de confianza del 95% indicado por líneas discontinuas) y los valores de P_{ST} se indican en azul (intervalo de confianza del 95% indicado por líneas punteadas). La línea vertical punteada y discontinua indica el límite c/h^2 . Ctyb: gen citocromo b, VLDL: gen del receptor de lipoproteínas de baja densidad ligado al cromosoma Z, G3PDH: gen de la gliceraldehído-3-fosfodehidrogenasa.

geográficas de muestras genéticas y morfológicas no afectaron los resultados finales (Tabla 3, Figura A1.3). Como se mencionó anteriormente, no logramos obtener datos genéticos del norte de Argentina, lo que implica que los valores de F_{ST} entre regiones podrían haber sido sobreestimados. Vale la pena destacar que si los valores de F_{ST} fueron sobreestimados, entonces los resultados de las pruebas $P_{ST-F_{ST}}$ pueden considerarse conservadores.

DISCUSIÓN

En este estudio, realizamos un análisis morfológico y filogeográfico del Passeriforme de bosque seco *P. rutila* para explorar si los gradientes bióticos y abióticos que caracterizan los bosques xerófitos Chaco- Andino promueven la diversificación, así como para explorar los procesos alopátricos y parapátricos en la región. Nuestros resultados respaldan la hipótesis de que el gradiente ambiental a lo largo de este cinturón de bosques secos podría estar promoviendo la diversificación, ya que encontramos que las métricas morfológicas de la especie focal varían según una clina relacionada con la altitud (Figura 2), y que los procesos parapátricos podrían ser responsables de este patrón, ya que los niveles de divergencia fenotípica en toda la región son más altos de lo esperado de manera neutral. Además, encontramos un flujo génico asimétrico entre las tierras altas y las tierras bajas.

Unidades morfológicas de *P. rutila*.

El análisis de NMM respaldó la divergencia morfológica a lo largo del eje de tierras altas y tierras bajas del cinturón forestal Chaco-Andes, lo que sugiere la existencia de un proceso de diversificación alineado con los gradientes ambientales en esta región. El análisis respaldó la existencia de dos unidades morfológicas en *P. rutila* (Figura 2), que coinciden con el rango geográfico descrito para las subespecies. La mayoría de los especímenes se agruparon claramente en estos grupos, y aunque el muestreo en la base de los Andes fue denso (Figura 1b), el número de muestras estudiadas de la zona de transición entre ambos grupos (es decir, alrededor de 2000 m en Argentina; Figura 2a) fue pequeño debido a que la especie no es abundante en esta franja altitudinal. *Phytotoma rutila* habita principalmente los bosques secos del Chaco, el Monte y los Bosques Secos Montanos de Bolivia; en la región de estudio, la franja altitudinal de transición entre los grupos

morfológicos está en su mayor parte cubierta por los bosques húmedos de las Yungas de Argentina y Bolivia (Figura 1a), donde la especie no se encuentra regularmente (Herzog et al., 2016). Por lo tanto, la distribución altitudinal de las muestras reflejó la abundancia del ave a través del gradiente altitudinal del área de estudio (Figura 2a y Figura 1b), y la descripción de estos dos grupos no es un artefacto de muestreo de extremos de una clina continua de tamaño corporal. Según este resultado, los bosques de Yungas parecen representar una barrera parcial para la dispersión de *P. rutila*, o la frontera entre regiones donde la selección natural favorece diferentes fenotipos. Es necesaria una mayor intensidad de muestreo en esa franja altitudinal para evaluar el efecto del bosque de Yungas en la evolución de la biota del cinturón de bosque seco Chaco-Andes.

Nuestro análisis sugiere que la morfología externa de *P. rutila* fue moldeada por la selección natural. Los individuos del grupo de las tierras altas son los más grandes (por ejemplo, con picos más grandes y tarsos más largos (Tabla 2), de conformidad con la regla ecogeográfica de Bergmann (Zink y Remsen Jr, 1986) y nuestras predicciones. De acuerdo con la regla de Bergmann, el tamaño corporal en los homeotermos se correlaciona positivamente con la disminución de la temperatura y la humedad (James, 1970), mientras que un mayor tamaño corporal se supone que es una adaptación a temperaturas más bajas, climas extremos y/o a un aumento de la estacionalidad (revisado en Zink y Remsen Jr, 1986), los cuales son factores comunes en los altos Andes. La correlación del tamaño corporal con los gradientes de altitud es común en la naturaleza, y particularmente en las aves en los Andes (Blackburn y Ruggiero, 2001; Meiri y Dayan, 2003). Por lo tanto, la variación del tamaño corporal de *P. rutila* podría ser un reflejo de la adaptación diferencial entre las poblaciones de tierras altas y bajas. Dentro de cada grupo morfológico, no encontramos correlación entre los caracteres de tamaño corporal y la altitud, lo que sugiere la existencia de una presión de selección homogénea dentro de los grupos.

Estructura genética poblacional poco profunda y migración asimétrica en *P. rutila*

Los resultados genéticos sugirieron que existe un aislamiento incipiente entre las poblaciones de tierras altas y bajas de *P. rutila*. Además, estos resultados respaldan la idea de que las muestras de tierras altas tienen un ancestro en tierras bajas, ya que se encuentran anidados filogenéticamente dentro de un clado junto

con otras muestras de tierras bajas (Figura 3). Este resultado concuerda con la idea de que una gran proporción de las poblaciones andinas de especies que además tienen poblaciones de zonas bajas, tienen un origen reciente y sus ancestros provienen de tierras bajas y de latitudes más altas (por ejemplo, de la Patagonia, Fjeldså et al., 2012).

La estructura genética entre las muestras de *P. rutila* en tierras altas y bajas fue reducida o moderada (Tabla 3), sin embargo, estuvo de acuerdo con la predicción de divergencia genética a lo largo del cinturón de bosque seco Chaco-Andes. La falta de monofilia recíproca entre las unidades morfológicas coincide con los resultados de AMOVA y con la existencia de migración entre regiones. Además, estos resultados respaldan el estatus de subespecie de las poblaciones asociadas con cada región. La población de tierras bajas de *P. rutila* fue la más grande, en concordancia con lo que se encontró en otros estudios de especies de aves ampliamente distribuidas que habitan los altos Andes, así como la región del Cono Sur de América del Sur (McCracken, Bulgarella, et al., 2009; Wilson et al., 2013), lo cual reflejaría historias biogeográficas paralelas de colonización de las tierras altas desde las tierras bajas.

Encontramos migración asimétrica entre muestras de *P. rutila*, siendo la migración desde tierras altas a tierras bajas más alta que en sentido contrario, lo que podría estar relacionado con la existencia de diferentes procesos adaptativos entre estas regiones. Alternativamente, otros factores como la historia de colonización y/o la variación en el tamaño efectivo de la población también podrían haber influenciado este patrón asimétrico de migración. La filogenia intraespecífica (Figura 3) sugirió que las muestras de tierras altas de *P. rutila* tienen un ancestro de tierras bajas, tal vez producto de la colonización desde tierras bajas. Sin embargo, debido a que la migración estimada más alta fue de tierras altas a tierras bajas, es poco probable que la historia biogeográfica haya sesgado las estimaciones de flujo génico. Además, la población de tierras bajas fue la más grande, ya que presentó el mayor valor de θ poblacional (Tabla 2). Por lo tanto, si las tasas de migración estimadas de *P. rutila* solo reflejaran el proceso de difusión neutral de migración desde la población más grande (es decir, aquella con la mayor probabilidad de ser la fuente de migrantes) hacia la población más pequeña (es decir, aquella con la mayor probabilidad de ser el destino), la migración desde las tierras bajas hacia las tierras

altas debería haber sido la más frecuente, que es justamente lo contrario a lo observado. Por lo tanto, la migración neutral no explica el patrón de migración observado en *P. rutila* y tiene sentido recurrir a procesos no neutrales para explicar el patrón.

Las poblaciones caracterizadas por migración asimétrica son comunes en la naturaleza, en particular en sistemas con fuertes gradientes ambientales como el existente entre los altos Andes y las tierras bajas del Chaco (Paz-Vinas et al., 2013). Un resultado similar, con mayor migración de las tierras altas a las tierras bajas se encontró entre las subespecies del Pato colorado *Anas cyanoptera* (Wilson et al., 2013). Sin embargo, un estudio similar con otros patos sudamericanos reportó mayor flujo de genes en la dirección opuesta (Bulgarella et al., 2012; McCracken, Bulgarella, et al., 2009). La baja migración a las tierras altas desde las tierras bajas podría implicar cierta dificultad de las aves de las tierras bajas, o de los individuos portadores de alelos fijados en esas regiones, para reproducirse en las tierras altas. Por ejemplo, Monge y León-Velarde (1991) realizaron experimentos de trasplante y demostraron que las aves de tierras bajas tienen dificultades para reproducirse a gran altitud. Una de las razones de esta dificultad se refleja en la baja tasa de eclosión de los huevos en condiciones atmosféricas de gran altitud, en comparación con las condiciones de tierras bajas (Visschedijk et al., 1980).

La demografía histórica puede afectar la estimación de las tasas de migración (Sundqvist et al., 2016). Las huellas dejadas por eventos demográficos históricos (por ejemplo, expansiones de la población) pueden afectar los signos de migración reciente en los datos genéticos, lo que dificulta la estimación de los verdaderos patrones de migración. Durante los períodos de máximos glaciarios, los glaciares avanzaron sobre áreas que actualmente están libres de hielo (Clapperton, 1993). Por ejemplo, en los Andes meridionales y centrales, los glaciares se extendieron más de 1000 m por debajo del límite altitudinal de los campos de hielo modernos (Porter, 2000), tal vez en regiones que hoy son hábitat de la población de las tierras altas de *P. rutila*. Por lo tanto, debido al impacto intenso y directo de los ciclos globales de glaciaciones en los Andes, las poblaciones de las tierras altas de *P. rutila* podrían presentar fluctuaciones demográficas más fuertes que las tierras bajas, lo que a su vez podría reflejarse en las tasas de migración. Sin embargo, no encontramos signos claros de

demografía histórica diferencial entre las poblaciones de *P. rutila*, y por lo tanto no está claro cómo los eventos históricos podrían haber impactado en los patrones de flujo génico.

Comparación P_{ST} - F_{ST} y posible adaptación local en *P. rutila*

Los resultados de la comparación P_{ST} - F_{ST} indicaron una mayor divergencia en el tamaño corporal que en algunos de los marcadores genéticos estudiados, lo que sugiere la acción de la selección natural divergente en este rasgo (Tabla 3 y Figura 4). El análisis de los caracteres morfológicos individuales indicó que los resultados significativos se deben a la desviación de la neutralidad tanto en los caracteres de pico como en los de tarso. Los resultados de la prueba con los marcadores nucleares fueron robustos, pero la comparación con Cytb no fue robusta y no rechazó la hipótesis nula de neutralidad. Sin embargo, la comparación P_{ST} - F_{ST} con Cytb debe interpretarse con precaución. En primer lugar, la prueba asume tasas de mutación similares entre los loci que codifican para el rasgo bajo investigación (es decir, pico y tarso) y los loci utilizados para calcular la expectativa neutral (Kekkonen et al., 2012; Whitlock, 2008). Debido a que se espera que la mayoría de los genes que afectan las características estudiadas del fenotipo estén codificados en autosomas (por ejemplo, vonHoldt et al., 2018), y debido a que los marcadores mitocondriales como Cytb son generalmente más variables que los marcadores autosómicos, esta suposición se viola con Cytb. En segundo lugar, los marcadores mitocondriales tienen un tamaño efectivo cuatro veces menor que los marcadores autosómicos (y tres veces más bajo que los marcadores del cromosoma Z como VLDL), lo que implica una mayor tasa de coalescencia. Por lo tanto, se espera encontrar valores más altos de F_{ST} en los marcadores de ADNmt que en los marcadores autosómicos, y por lo tanto la comparación con los valores P_{ST} obtenidos de caracteres fenotípicos que están codificados en autosomas podría ser inadecuada. Finalmente, Cytb participa en el metabolismo del oxígeno, y podría estar bajo las mismas presiones selectivas que están dando forma a la morfología externa de *P. rutila*. Los marcadores mitocondriales son objeto de una fuerte selección purificadora (Ballard y Whitlock, 2004; Nachman, 1998) que podría ser una característica diferencial en comparación con los marcadores nucleares.

El aislamiento por distancia (IBD) es un proceso que podría haber contribuido a impulsar la divergencia entre las poblaciones del ave estudiada (por ejemplo Seeholzer y Brumfield, 2017). Sin embargo, si solo la IBD

hubiera impulsado la variación del tamaño corporal de *P. rutila*, habríamos observado un resultado no significativo de la comparación P_{ST} - F_{ST} porque la divergencia básicamente ocurriría por la reducción del flujo de genes entre poblaciones distantes y por la deriva, o sea, procesos neutrales.

Nuestros resultados de la comparación P_{ST} - F_{ST} son concordantes con otros estudios similares con aves (Wilson et al., 2013; por ejemplo, Bertrand et al., 2016; Brommer et al., 2014; Laaksonen et al., 2015; Seeholzer y Brumfield, 2017), que reportaron para rasgos relacionados con el tamaño corporal como masa corporal, longitud de ala y tarso, valores similares de P_{ST} y $\frac{c}{h^2}$ crítico como los obtenidos en nuestro análisis con los marcadores nucleares. Además, algunos de estos estudios también realizaron comparaciones a través de un gradiente de altitud y encontraron una correlación positiva entre el tamaño corporal y la altitud (Bertrand et al., 2016; Brommer et al., 2014; Seeholzer y Brumfield, 2017; Wilson et al., 2013). Por ejemplo, Wilson et al. (2013) obtuvieron un $P_{ST} = 0,56$ con PC1 obtenido a partir de caracteres de tamaño corporal (pico, ala y tamaño de tarso) en *Anas cyanoptera*. Por su parte, Seeholzer y Brumfield (2017) obtuvieron un $P_{ST} = 0,85$ con métricas similares en *Cranioleuca antisiensis*.

Nuestros resultados revelan una correlación positiva entre el tamaño corporal y la altitud, acompañada de una estructura poblacional moderada. Además, observamos que el grado de divergencia en los rasgos funcionales es superior a lo anticipado bajo la premisa de neutralidad, respaldando la hipótesis de que la variación genética y morfométrica en *P. rutila* probablemente no haya sido modelada por la evolución neutra. Estos hallazgos proporcionan respaldo a la idea de que la selección ha desempeñado un papel significativo a lo largo del Cinturón de Bosques Secos Chaco-Andes, influyendo en las características de la población. Es plausible que otros procesos evolutivos hayan actuado de manera sinérgica con la adaptación local, como el aislamiento por distancia o la vicarianza, temas que exploramos detalladamente en el Capítulo 3. La observación de que otros taxa y linajes que coexisten con *P. rutila* exhiben un patrón geográfico similar de variación morfológica sugiere la presencia de un fenómeno evolutivo concertado en la región.

BIBLIOGRAFÍA

- Antoniazza, S., Burri, R., Fumagalli, L., Goudet, J., y Roulin, A. (2010). Local adaptation maintains clinal variation in melanin-based coloration of European barn owls (*Tyto alba*). *Evolution*, 64(7), 1944-1954. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00969.x>
- Ballard, J. W. O., y Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13(4), 729-744. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.02063.x>
- Bandelt, H. J., Forster, P., y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bertrand, J. A. M., Delahaie, B., Bourgeois, Y. X. C., Duval, T., García-Jiménez, R., Cornuault, J., Pujol, B., Thébaud, C., y Milá, B. (2016). The role of selection and historical factors in driving population differentiation along an elevational gradient in an island bird. *Journal of Evolutionary Biology*, 29(4), 824-836. <https://doi.org/10.1111/jeb.12829>
- Blackburn, T. M., Gaston, K. J., y Loder, N. (1999). Geographic gradients in body size: A clarification of Bergmann's rule. *Diversity and Distributions*, 5(4), 165-174. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.1999.00046.x>
- Blackburn, T. M., y Ruggiero, A. (2001). Latitude, elevation and body mass variation in Andean passerine birds. *Global Ecology and Biogeography*, 10(3), 245-259. <https://doi.org/10.1046/j.1466-822X.2001.00237.x>
- Borge, T., Webster, MT., Anderson, G., y Saetre, GP. (2008). Contrasting patterns of polymorphism and divergence on the Z chromosome and autosomes in two *Ficedula* flycatcher species. *Genetics*, 171, 1861-1873.
- Brommer, J. E. (2011). Whither Pst? The approximation of Qst by Pst in evolutionary and conservation biology. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(6), 1160-1168. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02268.x>
- Brommer, J. E., Hanski, I. K., Kekkonen, J., y Väisänen, R. A. (2014). Size differentiation in Finnish house sparrows follows Bergmann's rule with evidence of local adaptation. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(4), 737-747. <https://doi.org/10.1111/jeb.12342>
- Brooke, M., Walther, B., y Snow, D. (2004). Family Cotingidae. En J. Del Hoyo, A. Elliot, y D. Christie (Eds.), *Handbook of the Birds of the World: Volume 9, Cotingas to Pipits and Wagtails* (pp. 32-109). Lynx Edicions.
- Bulgarella, M., Peters, J. L., Kopuchian, C., Valqui, T., Wilson, R. E., y McCracken, K. G. (2012). Multilocus coalescent analysis of haemoglobin differentiation between low- and high-altitude populations of crested ducks (*Lophonetta specularioides*). *Molecular Ecology*, 21(2), 350-368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05400.x>
- Cabrera, A. L. (1976). Regiones Fitogeográficas Argentinas. En *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería*. Editorial Acme.

- Cadena, C. D., Zapata, F., y Jiménez, I. (2017). Issues and Perspectives in Species Delimitation using Phenotypic Data: Atlantean Evolution in Darwin's Finches. *Systematic Biology*, January. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx071>
- Cheng, L., Connor, T. R., Siren, J., Aanensen, D. M., y Corander, J. (2013). Hierarchical and Spatially Explicit Clustering of DNA Sequences with BAPS Software. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1224-1228. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst028>
- Chevireon, Z. A., Natarajan, C., Projecto-Garcia, J., Eddy, D. K., Jones, J., Carling, M. D., Witt, C. C., Moriyama, H., Weber, R. E., Fago, A., y Storz, J. F. (2014). Integrating Evolutionary and Functional Tests of Adaptive Hypotheses: A Case Study of Altitudinal Differentiation in Hemoglobin Function in an Andean Sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Molecular Biology and Evolution*, 31(11), 2948-2962. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu234>
- Clapperton, C. M. (1993). Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 101(3-4), 189-208. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(93\)90012-8](https://doi.org/10.1016/0031-0182(93)90012-8)
- Derryberry, E. P., Claramunt, S., Derryberry, G., Chesson, R. T., Cracraft, J., Aleixo, A., Pérez-Emán, J., Remsen, J. V., y Brumfield, R. T. (2011). Lineage diversification and morphological evolution in a large-scale continental radiation: The Neotropical Ovenbirds and Woodcreepers (Aves: Furnariidae). *Evolution*, 65(10), 2973-2986. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01374.x>
- Edwards, D. L., y Knowles, L. L. (2014). Species detection and individual assignment in species delimitation: Can integrative data increase efficacy? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1777), 20132765-20132765. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2765>
- Ellegren, H. (2007). Molecular evolutionary genomics of birds. *Cytogenetic and Genome Research*, 117(1-4), 120-130. <https://doi.org/10.1159/000103172>
- Endler, J. A. (1977). Geographic variation, speciation, and clines. *Monographs in population biology*, 10, 1-246.
- Excoffier, L., y Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Ezard, T. H., Pearson, P. N., y Purvis, A. (2010). Algorithmic approaches to aid species' delimitation in multidimensional morphospace. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 175. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-175>
- Fisher, R. A. (1918). The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 52, 399-433.
- Fjeldså, J., Baiker, J., Engblom, G., Franke, I., Geale, D., Krabbe, N. K., Lane, D. F., Lezama, M., Schmitt, F., Williams, R. S. R., Ugarte-núñez, J., Yábar, V., y Yábar, R. (2012). Reappraisal of Koepcke 's Screech Owl

- Megascops koepckeae and description of a new subspecies. Bulletin British Ornithologists' Club, 132(3), 180-193.
- Fjeldså, J., Zuccon, D., Irestedt, M., Johansson, U. S., y Ericson, P. G. P. (2003). Sapayoa aenigma: A New World representative of «Old World suboscines». Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270 Suppl(Suppl 2), S238-41. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0075>
- Friesen, V. L., Congdon, B. C., Walsh, H. E., y Birt, T. P. (1997). Intron variation in Marbled murrelets detected using analyses of single-stranded conformational polymorphisms. Molecular Ecology, 6(11), 1047-1058. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1997.00277.x>
- Gaston, K. J., y Blackburn, T. M. (Eds.). (2000). Pattern and Process in Macroecology. Blackwell Science Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470999592>
- Griffiths, R., Double, MC., Orr, K., y Dawson, RJG. (1998). A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology, 7, 1071-1075.
- Guillot, G., Renaud, S., Ledevin, R., Michaux, J., y Claude, J. (2012). A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic, and geographic data. Systematic Biology, 61(6), 897-911. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys038>
- Gutiérrez-Pinto, N., McCracken, K. G., Alza, L., Tubaro, P. L., Kopuchian, C., Astie, A., y Cadena, C. D. (2014). The validity of ecogeographical rules is context-dependent: Testing for Bergmann's and Allen's rules by latitude and elevation in a widespread Andean duck. Biological Journal of the Linnean Society, 111(4), 850-862. <https://doi.org/10.1111/bij.12249>
- Herzog, S. K., Terrill, R. S., Jahn, A. E., Remsen, J. V., Maillard, O. Z., García-Sol z, V. H., MacLeod, R., Maccormick, A., y Vidoz, J. Q. (2016). Birds of Bolivia Field Guide. Asociación Armon a.
- Hey, J., y Nielsen, R. (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of Drosophila pseudoobscura and D. persimilis. Genetics, 167(2), 747-760. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.024182>
- Huey, R. B., Hertz, P. E., y Sinervo, B. (2003). Behavioral drive versus behavioral inertia in evolution: A null model approach. The American naturalist, 161(3), 357-366. <https://doi.org/10.1086/346135>
- James, F. C. (1970). Geographic size variation in birds and its relationship to climate. Ecology, 51, 365-390.
- Karhunen, M., Merilä, J., Leinonen, T., Cano, J. M., y Ovaskainen, O. (2013). driftsel: An R package for detecting signals of natural selection in quantitative traits. Molecular Ecology Resources, 13(4), 746-754. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12111>
- Kekkonen, J., Jensen, H., y Brommer, J. E. (2012). Morphometric differentiation across House Sparrow Passer domesticus populations in Finland in comparison with the neutral expectation for divergence. Ibis, 154(4), 846-857. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2012.01252.x>

- Laaksonen, T., Sirkiä, P. M., Calhim, S., Brommer, J. E., Leskinen, P. K., Primmer, C. R., Adamík, P., Artemyev, A. V., Belskii, E., Both, C., Bureš, S., Burgess, M. D., Doligez, B., Forsman, J. T., Grinkov, V., Hoffmann, U., Ivankina, E., Král, M., Krams, I., ... Sokolov, L. (2015). Sympatric divergence and clinal variation in multiple coloration traits of *Ficedula* flycatchers. *Journal of Evolutionary Biology*, 28(4), 779-790. <https://doi.org/10.1111/jeb.12604>
- Lehtonen, P. K., Laaksonen, T., Artemyev, A. V., Belskii, E., Both, C., Bureš, S., Bushuev, A. V., Krams, I., Moreno, J., Mägi, M., Nord, A., Potti, J., Ravussin, P. A., Sirkiä, P. M., Sætre, G. P., y Primmer, C. R. (2009). Geographic patterns of genetic differentiation and plumage colour variation are different in the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*). *Molecular Ecology*, 18(21), 4463-4476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04364.x>
- Leinonen, T., Cano, J. M., Mäkinen, H., y Merilä, J. (2006). Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of threespine sticklebacks. *Journal of Evolutionary Biology*, 19(6), 1803-1812. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2006.01182.x>
- Leinonen, T., O'Hara, R. B., Cano, J. M., y Merilä, J. (2008). Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: A meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01445.x>
- Librado, P., y Rozas, J. (2009). DNASP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Lougheed, SC., Freeland, JR., Handford, P., y Boag, PT. (2000). A molecular phylogeny of Warbling-Finches (*Poospiza*): Paraphyly in a Neotropical emberizid genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3, 367-378.
- Lutz, P. L., Longmuir, I. S., y Schmidtnielsen, K. (1974). Oxygen affinity of bird blood. *Respiration Physiology*, 20(3), 325-330. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(74\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0034-5687(74)90029-2)
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press.
- McCracken, K. G., Barger, C. P., Bulgarella, M., Johnson, K. P., Kuhner, M. K., Moore, A. V., Peters, J. L., Trucco, J., Valqui, T. H., Winker, K., y Wilson, R. E. (2009). Signatures of High-Altitude Adaptation in the Major Hemoglobin of Five Species of Andean Dabbling Ducks. *The American Naturalist*, 174, 631-650. <https://doi.org/10.1086/606020>
- McCracken, K. G., Bulgarella, M., Johnson, K. P., Kuhner, M. K., Trucco, J., Valqui, T. H., Wilson, R. E., y Peters, J. L. (2009). Gene flow in the face of countervailing selection: Adaptation to high-altitude hypoxia in the betaA hemoglobin subunit of yellow-billed pintails in the Andes. *Molecular Biology and Evolution*, 26(4), 815-827. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp007>
- McLachlan, G., y Peel, D. A. (2000). *Finite mixture models*. JohnWiley and Sons.

- Meiri, S., y Dayan, T. (2003). On the validity of Bergmann's rule. *Journal of Biogeography*, 30(3), 331-351.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00837.x>
- Merilä, J., y Crnokrak, P. (2001). Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 14(6), 892-903. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2001.00348.x>
- Monge, C., y Leon-Velarde, F. (1991). Physiological adaptation to high altitude: Oxygen transport in mammals and birds. *Physiological Reviews*, 71(4), 1135-1172.
- Nachman, M. W. (1998). Deleterious mutations in animal mitochondrial DNA. *Genetica*, 102-103(1-6), 61-69.
- Nylander, J. (2004). MrModeltest v2. Program distributed by the author [Software]. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University. www.abc.se/nylander
- Olson, D. M., Dinerstein, E., E, E. D. W. K., Burgess, N. D., L, G. V. N. P. O. W. E. L., D, E. C. U. O., Amico, J. A. D., Itoua, I., Strand, H. O. L. L. Y. E., y Morrison, J. C. (2001). Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience*, 51(11), 933-938.
- Paz-Vinas, I., Quéméré, E., Chikhi, L., Loot, G., y Blanchet, S. (2013). The demographic history of populations experiencing asymmetric gene flow: Combining simulated and empirical data. *Molecular Ecology*, 22(12), 3279-3291. <https://doi.org/10.1111/mec.12321>
- Peacock, A. J. (1998). Oxygen at high altitude. *BMJ : British Medical Journal*, 317(7165), 1063-1066.
- Pennington, R. T., Prado, D. E., Pendry, C. A., y Botanic, R. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. 261-273.
- Porter, S. C. (2000). Snowline depression in the tropics during the Last Glaciation. *Quaternary Science Reviews*, 20(10), 1067-1091. [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(00\)00178-5](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(00)00178-5)
- Prado, D. E. (1993). What is the Gran Chaco vegetation in South America?. I. A review. Contribution to the study of flora and vegetation of the Chaco. *Candollera*, 48, 145-172.
- R Core Team. (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing).
- Ridgely, R. S., y Tudor, G. (1994). The Birds of South America, Volume 2: The Suboscine Passerines. University of Texas Press.
- Ridgely, R. S., y Tudor, G. (2009). Field guide to the songbirds of South America: The passerines. University of Texas Press.
- Ronquist, F., y Huelsenbeck, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. 19(12), 1572-1574. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>
- Rundle, H. D., y Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3), 336-352.
<https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x>
- Schluter, D. (2001). Ecology and the origin of species. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(7), 372-380.
[https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02198-X](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02198-X)

- Schluter, Dolph. (2000). The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press.
<https://global.oup.com/academic/product/the-ecology-of-adaptive-radiation-9780198505235?cc=arylang=en>
- Schmidt-Neilsen, K., y Larimer, J. L. (1958). Oxygen Dissociation Curves of Mammalian Blood in Relation To Body Size. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 195(2), 424-428.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1958.195.2.424>
- Schwarz, G. (1978). Estimating the Dimension of a Model. *The Annals of Statistics*.
<https://doi.org/10.1214/aos/1176344136>
- Scrucca, L., Fop, M., Murphy, T. B., y Raftery, A. E. (2016). mclust 5: Clustering, Classification and Density Estimation Using Gaussian Finite Mixture Models. *The R Journal*, 8(1), 205-233.
- Scrucca, L., y Raftery, A. E. (2018). clustvarsel: A Package Implementing Variable Selection for Gaussian Model-Based Clustering in R. *Journal of Statistical Software*, 84(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v084.i01>
- Seeholzer, G. F., y Brumfield, R. T. (2017). Isolation-by-distance, not incipient ecological speciation, explains genetic differentiation in an Andean songbird (Aves: Furnariidae: *Cranioleuca antisensis*, Line-cheeked Spinetail) despite near three-fold body size change across an environmental gradie. *Molecular Ecology*, May, 1-18. <https://doi.org/10.1111/mec.14429>
- Sobel, J. M., Chen, G. F., Watt, L. R., y Schemske, D. W. (2010). The biology of speciation. *Evolution*, 64(2), 295-315. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00877.x>
- Stephens, M., y Donnelly, P. (2003). A Comparison of Bayesian Methods for Haplotype Reconstruction from Population Genotype Data. *En Am. J. Hum. Genet* (Vol. 73, pp. 1162-1169).
<http://www.stat.washington.edu/stephens/>
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P., y Kleinhans, D. (2016). Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and Evolution*, 6(11), 3461-3475. <https://doi.org/10.1002/ece3.2096>
- Visschedijk, A. H. J., Ar, A., Rahn, H., y Piiper, J. (1980). The independent effects of atmospheric pressure and oxygen partial pressure on gas exchange of the chicken embryo. *Respiration Physiology*, 39(1), 33-44.
[https://doi.org/10.1016/0034-5687\(80\)90012-2](https://doi.org/10.1016/0034-5687(80)90012-2)
- vonHoldt, B. M., Kartzinel, R. Y., Huber, C. D., Le Underwood, V., Zhen, Y., Ruegg, K., Lohmueller, K. E., y Smith, T. B. (2018). Growth factor gene IGF1 is associated with bill size in the black-bellied seedcracker *Pyrenestes ostrinus*. *Nature Communications*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07374-9>
- Weir, J. T., y Schluter, D. (2008). Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology*, 17(10), 2321-2328.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03742.x>
- Whitlock, M. C. (2008). Evolutionary inference from Qst. *Molecular Ecology*, 17(8), 1885-1896.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03712.x>

- Wilson, R. E., Peters, J. L., y McCracken, K. G. (2013). Genetic and phenotypic divergence between low- and high-altitude populations of two recently diverged cinnamon teal subspecies. *Evolution*, 67(1), 170-184.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2012.01740.x>
- Wright, S. (1943). Isolation by Distance. *Genetics*, 28(2), 114-138.
- Zink, R. M., y Remsen Jr, J. V. (1986). Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. *Current Ornithology*, 4, 1-69.

CAPÍTULO 3

Divergencia genómica y fenotípica con flujo genético a lo largo de un gradiente ecológico y altitudinal en un ave Neotropical

Este capítulo fue publicado en la revista Journal of Biogeography bajo el título “*Genomic and phenotypic divergence-with-gene-flow across an ecological and elevational gradient in a Neotropical bird*” (DOI: <https://doi.org/10.1111/jbi.14449>)

RESUMEN

Algunas especies tienen poblaciones que varían en rasgos ecológicamente relevantes a lo largo de gradientes ambientales, un patrón que a menudo es generado por divergencia en la alopatría. Sin embargo, una explicación alternativa para dicho patrón sería un escenario donde las poblaciones divergen en presencia de flujo génico a través de la acción de una fuerte selección natural. Nuestro objetivo fue probar el modelo de divergencia con flujo génico a lo largo de un gradiente ambiental en un ave del bosque seco Chaco-Andes. El estudio se llevó a cabo en la región de la Cordillera de los Andes centrales y la región del Gran Chaco, abarcando áreas de Argentina y Bolivia. Se recolectaron muestras de tejido de 23 individuos y se obtuvieron datos de variación de tamaño corporal de 146 especímenes de museo. Utilizamos técnicas de secuenciación de nueva generación para obtener loci genómicos (ddRADseq) y estudiar la estructura genética de las poblaciones, y para evaluar los efectos de la altitud y el aislamiento por distancia geográfica en la divergencia genómica. Para distinguir la divergencia en alopatría de la divergencia con flujo génico, comparamos la divergencia de rasgos fenotípicos (pico, tarso y ala) con la variación genómica neutral (pruebas S y comparaciones P_{ST} - F_{ST}), realizamos análisis coalescentes para estimar el flujo génico y el tiempo de divergencia, y calculamos la divergencia genómica relativa (F_{ST}) versus absoluta (D_{XY}). Encontramos que a) *P. rutila* difiere genómica y fenotípicamente siguiendo el eje altitudinal de la región de estudio, con la variación altitudinal explicando la variación genómica; b) mayor divergencia fenotípica que genómica neutra; c) flujo génico asimétrico entre las poblaciones andinas y chaqueñas; y d) un patrón de diferenciación genómica relativa y absoluta compatible con la divergencia con flujo génico. Los resultados apoyan que el mecanismo detrás de la diversificación morfológica y genómica a lo largo del cinturón del bosque seco Chaco-Andes en *P. rutila* es la divergencia con flujo génico. La diversificación en América del Sur ocurre por un conjunto de procesos, como el flujo génico entre las poblaciones, la selección natural a lo largo de gradientes ambientales y también la vicarianza. Esta combinación compleja contrasta con la idea tradicional de que la especiación en aves ocurrió principalmente en la alopatría.

INTRODUCCIÓN

La divergencia alopátrica ha sido destacada como el modo de especiación más común en muchos organismos bien estudiados, como mamíferos y aves (Cadena y Céspedes, 2020; Mayr, 1963; Patton y Smith, 1994; Tobias et al., 2020). La divergencia alopátrica se considera como el modelo nulo en estudios evolutivos, donde las poblaciones ancestrales divergen bajo un aislamiento geográfico completo (es decir, sin flujo génico) solo por deriva genética al azar, o en combinación con selección natural (Figura 1a, b). Un modelo geográfico de evolución, alternativo a la alopatría, es la divergencia con flujo génico (por ejemplo, parapatría o simpatría, Figura 1c), en la cual la diferenciación ocurre sin un aislamiento geográfico completo, y donde la selección natural disruptiva es el principal factor que impulsa la divergencia y contrarresta el efecto homogeneizador del flujo génico (Endler, 1977; T. B. Smith, 1997). Bajo estas condiciones, la selección natural (o sexual), actuando sobre rasgos ecológicamente relevantes, es el principal factor que causa el aislamiento reproductivo y la especiación (Arnold, 2016; Nosil, 2012; Ribeiro et al., 2011; Rundle y Nosil, 2005; Smith et al., 2004). Actualmente, el papel y la prevalencia de la divergencia con flujo génico aún está bajo estudio.

La mayoría de los primeros estudios que respaldan la divergencia alopátrica como el modo de especiación más común en ciertos grupos zoológicos no evaluaron empíricamente hipótesis alternativas, principalmente debido a la falta de datos y enfoques metodológicos adecuados (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1963), lo que llevó a muchos investigadores a adoptar el modelo alopátrico como una regla (Arnold, 2016). La mayoría de estos estudios que encontraron evidencia a favor del modelo alopátrico, se basan en análisis filogeográficos de caracteres genéticos neutros (Cabanne et al., 2008; Cadena y Céspedes, 2020; Carnaval et al., 2009; Hewitt, 2000), y no abordan análisis de patrones de variación de rasgos complejos, no neutrales. Solo poniendo a prueba predicciones que consideren múltiples caracteres neutrales y no neutrales (Seeholzer y Brumfield, 2017) podremos comprender el papel de la divergencia con flujo génico en la divergencia poblacional y la especiación (Arnold, 2016).

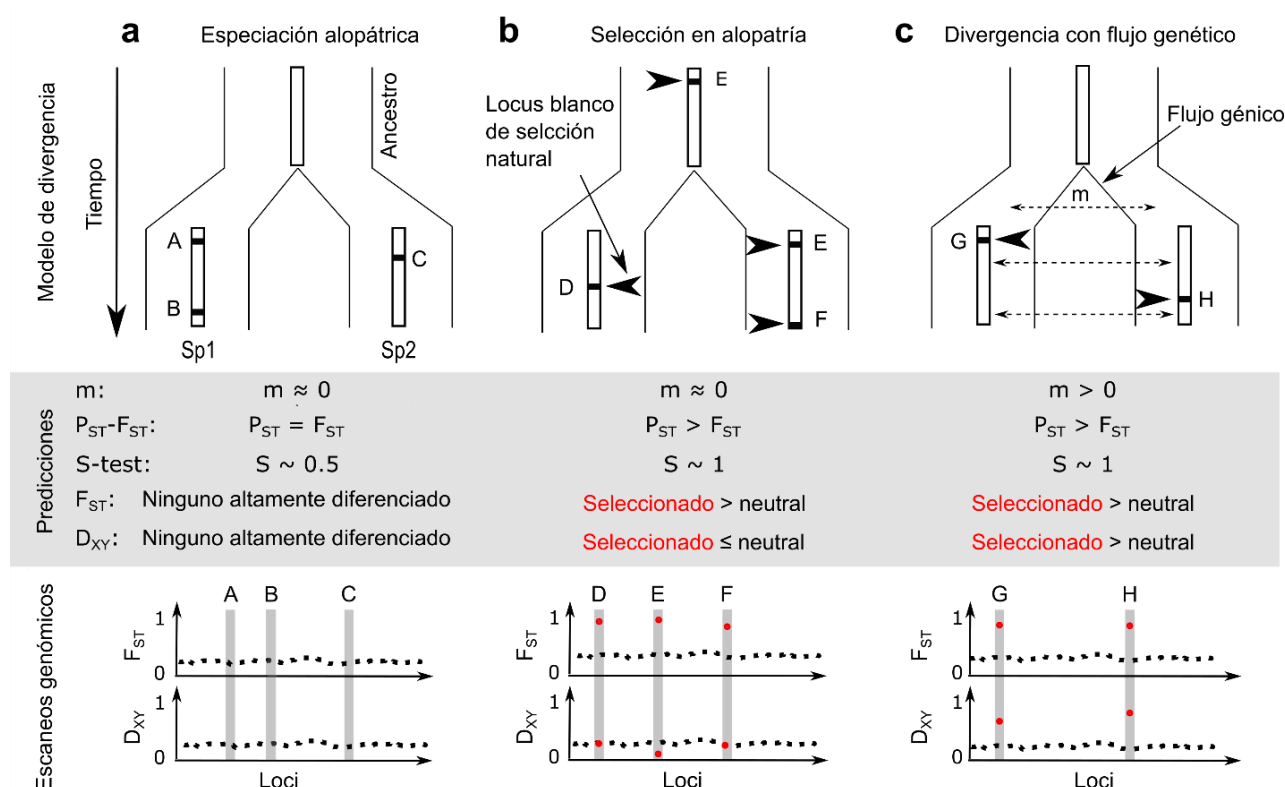


Figura 1. Modelos de divergencia de especies y predicciones basadas en datos genómicos y fenotípicos. Esbozamos cada modelo como una población ancestral que se divide en dos especies hijas (Sp1 y Sp2). Las barras horizontales en negro (en el recuadro "Modelo de divergencia") representan regiones genómicas que pueden ser afectadas por la selección natural (indicado por flechas). Las predicciones se basan en comparaciones de migración (m), divergencia fenotípica (P_{ST}) vs. divergencia genómica (F_{ST}) ($P_{ST} - F_{ST}$ y prueba S; Karhunen et al., 2013; Leinonen et al., 2013), y en la relación entre la divergencia relativa (F_{ST}) y absoluta (D_{XY}) de loci entre poblaciones (Cruickshank y Hahn, 2014; Irwin et al., 2018). También se representa la variación esperada de F_{ST} y D_{XY} en los escaneos genómicos. (a) Especiación alopátrica, donde las dos poblaciones hijas no intercambian migrantes durante el proceso, y se asume que la divergencia ocurre por deriva genética aleatoria. Los loci A, B y C divergieron por azar al igual que el resto del genoma, sin generar picos específicos en F_{ST} y D_{XY} . (b) Selección en alopatría, donde no hay flujo génico entre las poblaciones hijas, pero está presente la selección natural. La selección natural podría estar relacionada con la adaptación local que contribuyó a la divergencia inicial (loci D, E y F). (c) Divergencia con flujo génico, donde la selección natural actúa sobre los loci responsables de la divergencia en presencia de flujo génico (loci G y H). Las predicciones son tanto para divergencia primaria como secundaria (contacto).

Mientras que la divergencia alopátrica (y la deriva) tienen un impacto homogéneo en todo el genoma, se espera que la divergencia con flujo génico solo afecte a rasgos que son objeto de selección divergente (Zamudio et al., 2016). Por lo tanto, para discriminar escenarios (es decir, deriva versus procesos adaptativos, ver Figura 1 para un resumen del enfoque metodológico), es esencial comparar varias líneas de evidencia, como la variación entre rasgos fenotípicos y marcadores genéticos neutrales (por ejemplo, Antoniazza et al., 2010; Lehtonen et al., 2009). Si un rasgo específico se ha modificado por azar (por deriva), se espera que el

nivel de variación fenotípica entre poblaciones sea similar al nivel de variación genética neutra entre dichas poblaciones (Antoniazza et al., 2010; Brommer, 2011). En cambio, si la selección natural ha impulsado la variación del rasgo, se espera que la variación en este rasgo sea mayor o menor a la variación observada en los marcadores genéticos neutrales. Evaluamos estas predicciones utilizando pruebas que comparan la divergencia del rasgo de interés con las expectativas de divergencia genética neutral, como la prueba S (Karhunen et al., 2013; Ovaskainen et al., 2011) y la comparación Q_{ST} - F_{ST} (Leinonen et al., 2013). El test S evalúa si los fenotipos promedio de la población han evolucionado de manera diferente a lo esperado según la deriva génica aleatoria y el patrón de co-ancestría de la población local, estimado a partir de marcadores neutrales (Karhunen et al., 2014; Ovaskainen et al., 2011). Por otra parte, la prueba Q_{ST} - F_{ST} compara la variación genética relativa de caracteres fenotípicos cuantitativos entre poblaciones (Q_{ST} ; Leinonen et al., 2013), con los niveles de divergencia genética neutral entre poblaciones (F_{ST}).

Los modelos de divergencia descritos anteriormente predicen distintas señales genómicas (Cruickshank y Hahn, 2014; Irwin et al., 2016, 2018; Nachman y Payseur, 2012) que se pueden evaluar comparando, para cada locus o región genómica, patrones de divergencia relativa (F_{ST}) y absoluta (D_{XY} , el número promedio de diferencias entre pares) entre poblaciones. Bajo neutralidad (Figura 1a), donde solo actúa la deriva, los valores de F_{ST} se aproximan a una distribución χ^2 (Lewontin y Krakauer, 1973), y el modelo predice una ausencia de loci o regiones genómicas con valores extremos de D_{XY} o F_{ST} . Bajo selección en la alopatría (Figura 1b), los valores de F_{ST} de los loci bajo selección serán altos en comparación con aquellos loci que no se encuentran bajo selección, pero en cambio los valores de D_{XY} en estos mismos loci no se verán fuertemente afectados (Cruickshank y Hahn, 2014). Por lo tanto, se espera que los loci bajo selección presenten altos valores de F_{ST} , y que a su vez presenten valores de D_{XY} uniformes entre todos los loci (seleccionados y neutrales). En el modelo de divergencia con flujo génico, los loci bajo selección y las regiones cromosómicas ligadas a ellos tendrán un flujo génico reducido (Nosil et al., 2009; Via, 2012; Wu, 2001), mientras que las regiones neutrales y las regiones no vinculadas a las seleccionadas fluirán al azar. Bajo dicho escenario, se espera que D_{XY} y F_{ST} sean más altos en regiones bajo selección (Weir y Cockerham, 1984; Wright, 1943) que en regiones que no están sometida a la presión selectiva (Figura 1c). La combinación de estos tests, junto con las

estimaciones de flujo genético, proporciona un enfoque confiable para evaluar modelos de divergencia y la acción de la selección natural en rasgos no neutrales.

Los bosques secos y otros biomas abiertos neotropicales han sido históricamente menos estudiados que las selvas tropicales (Bush y Oliveira, 2006; Cabanne et al., 2008; Carnaval y Moritz, 2008; Haffer, 1969), por lo tanto, los mecanismos evolutivos que actúan sobre los organismos que los habitan no son del todo comprendidos (Pennington et al., 2006; Werneck, 2011). En el sur de la región Neotropical, el Chaco y los bosques secos montanos Bolivianos forman una franja casi continua de vegetación xerofítica (el cinturón de bosque seco Chaco-Andes) que abarca un amplio gradiente altitudinal y climático, desde las tierras bajas del centro de Argentina hasta el norte de Bolivia (alcanzando cerca de 4000 m de elevación) y a lo largo de las laderas y quebradas de la cordillera de los Andes (Figura 2a). Este cinturón de bosque seco está parcialmente interrumpido por selvas tropicales y bosques semidecíduos (por ejemplo, Yungas) en las laderas andinas. Algunos taxones que se distribuyen en esta área (por ejemplo, especies de aves mencionadas en Herzog y Kessler, 2002) muestran divergencia fenotípica entre los extremos de la región, lo que sugiere la acción concertada de diferentes procesos evolutivos. Dado que estos organismos habitan gradientes de condiciones bióticas extremas (por ejemplo, interacciones intraespecíficas, patógenos, depredadores) y abióticas como la humedad, la temperatura y la presión parcial de oxígeno, y que hay una variación fenotípica observable a lo largo del gradiente, postulamos que estos gradientes podrían estar impulsando la divergencia con flujo génico en las poblaciones de aves distribuidas a lo largo del cinturón de bosque seco Chaco-Andes.

En este estudio, exploramos la divergencia a lo largo del cinturón de bosque seco Chaco-Andes utilizando al Cortarramas *Phytotoma rutila* (Aves: Cotingidae) como modelo de estudio. *Phytotoma rutila*, que es endémico de la región (Figura 2a), tiene dos subespecies que podrían haber evolucionado por selección divergente: *angustirostris* d'Orbigny y Lafresnaye 1937, que habita entre aproximadamente 2.000 y 3.900 m de elevación, y *rutila* Vieillot 1818, que se encuentra en tierras bajas (por debajo de 2.000 m sobre el nivel del mar). Estas subespecies se diferencian por su canto (Uribarri et al., 2020) y tamaño corporal (por

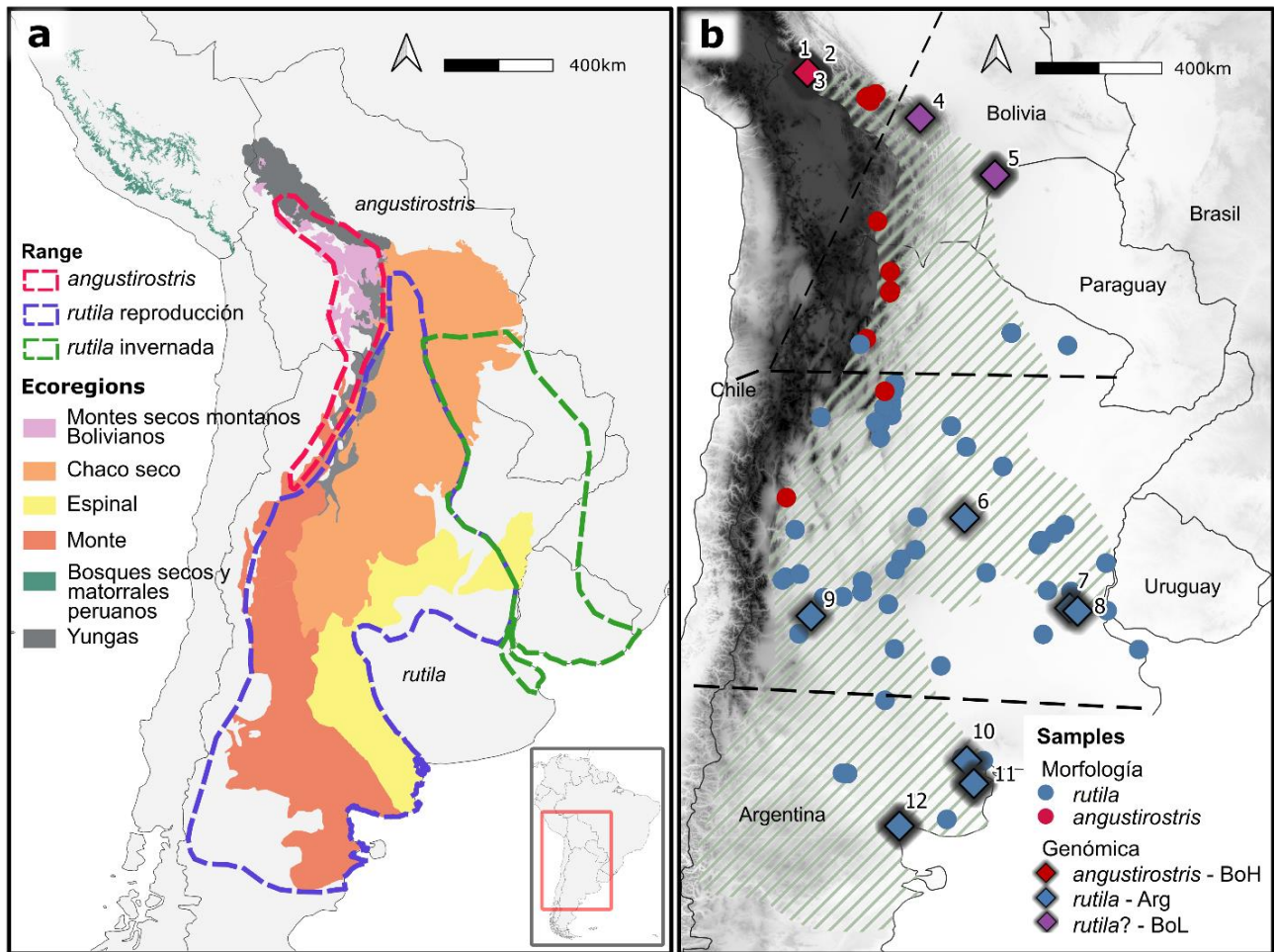


Figura 2. Distribución del cinturón de bosque seco del Chaco-Andes y área de estudio para el análisis morfológico y genómico de *Phytotoma rutila*. (a) Distribución geográfica de las subespecies de *P. rutila* y las ecorregiones en el área de estudio, según Ridgely y Tudor (2009) con modificaciones en los rangos de reproducción y migración en invierno según Capítulo 2, Anexo 1 (Revisión de los límites geográficos de las áreas de reproducción e invernada de *Phytotoma rutila*) y de distribución de las subespecies según los resultados del Capítulo 2. El mapa de distribución de las ecorregiones se basa en Dinerstein et al. (2017). El mapa insertado describe la ubicación del área de estudio en América del Sur. (b) Localidades de muestreo para el estudio morfológico y genómico. Se muestra un modelo digital de elevación para América del Sur, con las elevaciones más altas representadas en negro. El área de reproducción se representa con barras diagonales verdes. La distribución de los ejemplares (pieles de estudio depositadas en museos) y su asignación a subespecies se basa en los resultados del Capítulo 1. Las muestras del estudio genómico se clasifican siguiendo los resultados de STRUCTURE para $K = 3$ (ver Figura 3) y se nombran según la asociación de subespecies y la región geográfica (BoH: tierras altas de Bolivia; Arg: tierras bajas de Argentina; BoL: tierras bajas de Bolivia). Las líneas discontinuas indican los límites de la subdivisión en cuatro poblaciones utilizada para las pruebas S y $P_{ST-F_{ST}}$. Las localidades de colecta para el estudio genómico se identifican con números, los cuales pueden ser consultados en la Tabla A2.1. Proyección del mapa: EPSG:4326 - WGS 84

ejemplo, la longitud del tarso es aproximadamente un 9,5% más corta en *rutila*; Capítulo 2). Además, a pesar de ser fenotípicamente divergentes, no son monofiléticas recíprocas, y *rutila* es parafilética (Capítulo 2).

Nuestro objetivo fue evaluar modelos alternativos (alopatría versus divergencia con flujo génico, Figura 1) que explican la evolución de poblaciones de *P. rutila* a lo largo del gradiente ambiental, mediante el estudio de caracteres genómicos y morfológicos. Nuestras preguntas son: a) ¿cuál es el impacto de la distancia geográfica y la variación altitudinal en la estructura filogeográfica? Y b) ¿los datos genéticos y fenotípicos respaldan la divergencia con flujo génico?

MATERIALES Y METODOS

Obtención de datos genéticos

Muestreamos tejidos de 23 especímenes de *Phytotoma rutila* provenientes de 12 localidades diferentes, recolectadas en todo el rango reproductivo y altitudinal de la especie (Figura 2b, Tabla A2.1). Los especímenes son los mismos que los utilizados en el Capítulo 2. El ADN genómico se purificó a partir de músculo o sangre utilizando el kit de purificación DNeasy Blood y Tissue (Qiagen). Los marcadores genómicos se obtuvieron mediante secuenciación de ADN asociado a sitios de restricción de doble digestión (ddRADseq; Peterson et al., 2012), siguiendo el enfoque descrito por Peterson et al. (2012) y detallados en Thrasher et al. (2018). En resumen, las muestras se digirieron con SbfI y MspI (New England Biolabs, MA) y se ligaron los fragmentos de ADN digerido a adaptadores en los extremos 5' y 3' para su multiplexación. Los adaptadores 5' contaban con códigos de barras únicos para cada muestra, mientras que en el extremo 3' el código de barras fue común a grupos de 20 muestras. Combinamos los fragmentos con código de barras 5' únicos y seleccionamos fragmentos de ADN en el rango de 400-700 pares de bases. Las librerías fueron enriquecidas y se incorporaron los adaptadores TruSeq mediante 13 ciclos de PCR. Finalmente, las librerías se combinaron en proporciones equimolares y se secuenciaron en una plataforma Illumina HiSeq 2500 en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Cornell, obteniendo secuencias de 101 pares de bases, un solo extremo (*single-end*).

Realizamos el demultiplexado, recorte, filtrado, ensamblaje de loci y llamado de polimorfismos de nucleótido único (SNP) con *ipyrad* 0.7.28 (Eaton y Overcast, 2020). Los parámetros utilizados para el flujo de trabajo de *ipyrad* y las condiciones adicionales de filtrado de SNPs utilizando VCFtools (Danecek et al., 2011)

se encuentran en la Tabla A2.2. Dado que dos de las muestras presentaron un alto porcentaje de sitios faltantes, utilizamos un primer conjunto de datos de 23 muestras para análisis exploratorios y un segundo conjunto de datos de 21 muestras (sin las muestras que presentaban alta tasa de sitios faltantes) para todos los análisis posteriores. Los archivos de salida de *ipyrad* del conjunto de datos de 23 muestras se utilizaron para los análisis exploratorios, como STRUCTURE, la reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud y el análisis de componentes principales (PCA). Para obtener el conjunto de datos de 21 muestras, eliminamos dos individuos con excesivos datos faltantes (> 78%, MACN-Or-Ct 4079 y MACN-Or-Ct 2766) y volvimos a ejecutar *ipyrad* con los 21 individuos restantes. Luego, procedimos con un filtrado adicional de SNPs utilizando VCFtools. Nuestros criterios para obtener el conjunto de datos final fueron: (a) eliminar sitios con una puntuación de calidad inferior a 30; (b) excluir sitios con más del 80% de datos faltantes (N); (c) eliminar SNPs de baja frecuencia estableciendo una frecuencia alélica mínima de 0,05; (d) mantener solo SNPs bialélicos; (e) reducir la cobertura máxima de profundidad a 300x (cobertura promedio de profundidad de un SNP en nuestra muestra + 1 desviación estándar) y una cobertura mínima de profundidad de 6x. Este conjunto de parámetros de filtrado se utilizó para eliminar SNPs que podrían ser producto de errores de secuenciación, ya que estos pueden generar sesgos en la inferencia de procesos demográficos (Linck y Battey, 2019; O'Leary et al., 2018; Willis et al., 2017). Luego, seleccionamos aleatoriamente un SNP por locus, obteniendo un conjunto de datos final de 4.893 SNPs no ligados ($n = 21$ muestras, tasa máxima de datos faltantes por individuo del 31,6%, una cobertura promedio de profundidad en todos los loci de 89,1x). Utilizamos este conjunto de datos final de ddRADseq para todos los análisis genéticos restantes, excepto los mencionados anteriormente. Además, utilizamos los archivos de salida *.gphocs* y *.loci* de *ipyrad* para llevar a cabo los análisis G-PhoCS y D_{XY} - F_{ST} , respectivamente. Los mismos análisis fueron realizados con la totalidad de los SNPs por loci. Dado que no encontramos diferencias entre los dos conjuntos de datos, solo se presentan los resultados con el conjunto de datos reducido.

Obtención de datos fenotípicos

Estudiamos un conjunto de datos fenotípicos obtenido en el Capítulo 2 (Rodríguez-Cajarville, Calderón, Tubaro y Cabanne, 2019), que comprende 146 especímenes adultos de ambos sexos recolectados durante la

temporada de reproducción. El conjunto de datos contiene las siguientes seis medidas: longitud del pico (BLT), longitud del pico desde la narina (BLN), ancho del pico (BW), profundidad del pico (BD), longitud del ala (WL) y longitud del tarso (TS), así como el primer componente principal de todas estas variables (PC1). Este último se utilizó como una aproximación al tamaño corporal debido a que se correlacionaba positivamente con todas las características morfológicas y la masa corporal (Zink y Remsen Jr, 1986), representando el 59.78% de la variación morfológica total (Capítulo 2). La mayoría de las localidades de recolección de los especímenes fenotípicos son diferentes de las utilizadas en el análisis genómico.

Análisis de datos genéticos

Primero, exploramos la estructura genética de la población con el conjunto de datos RADseq de 23 muestras y utilizamos STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, Stephens y Donnelly, 2000), que implementa un método de agrupamiento basado en modelos con marcadores no ligados (es decir, utilizamos el archivo de salida "u.str" de *ipyrad*, que contiene un sitio variable seleccionado al azar por locus). Ejecutamos STRUCTURE durante 500.000 generaciones (20% de *burn-in*), desde $K = 1$ hasta 10, con 10 iteraciones por K . Siguiendo a Evanno et al. (2005), seleccionamos el número de grupos y resumimos las corridas con el algoritmo *greedy* en CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007). Estimamos un árbol filogenético de máxima verosimilitud con RAxML v 8.2.12 (Stamatakis, 2014), utilizando el modelo GTRGAMMA. También exploramos la diferenciación entre poblaciones con el Análisis de Componentes Principales (PCA), implementado con la función *snpgdsPCA* en el paquete *SNPRelate* (Zheng et al., 2012) para R (Somanathan et al., 2004). Los individuos fueron asignados a poblaciones utilizando un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC, Jombart, Devillard y Balloux, 2010) implementado en la función *find.clusters* en *adegenet* 2.1.3 (Jombart, 2008) para R. Los análisis se realizaron conservando los componentes principales que en conjunto representaban el 80% de la varianza y un máximo de diez grupos. Utilizamos el Criterio de Información Bayesiano (BIC) para seleccionar el número más apropiado de agrupamientos.

Realizamos pruebas de aislamiento por distancia geográfica (IBD) y el impacto de la variación altitudinal en la divergencia genética entre los 21 individuos utilizando una prueba de Mantel en *vegan* 2.5.7 (Oksanen et al., 2012) para R. Utilizamos una matriz de disimilitud genética entre las muestras (1 - identidad

por estado, obtenida en *SNPRelate*) como matriz de respuesta, y la distancia euclidiana geográfica y la disparidad altitudinal entre las muestras como predictores. Además, evaluamos el aislamiento por distancia y el flujo génico mediante la estimación de superficies efectivas de migración (EEMS; Petkova, Novembre y Stephens, 2016). En resumen, este enfoque utiliza un modelo genético de población en piedemonte para relacionar las tasas de migración efectiva en equilibrio con las disimilitudes genéticas esperadas, produciendo una representación visual de las tasas de migración que resalta la desviación del aislamiento por distancia. El resultado principal de EEMS indica áreas consistentes con el aislamiento por distancia (base), áreas con migración por encima de la tasa promedio (corredores) y regiones con migración por debajo de la tasa promedio de migración (barreras). La ventaja principal de EEMS en comparación con otros métodos para evaluar la estructura genética de la población (por ejemplo, PCA) es que no es tan sensible a los *gaps* en el muestreo geográfico (Petkova et al., 2016). Configuramos los parámetros siguiendo el manual del programa (<https://github.com/dipetkov/eems>; mayo de 2021) e implementamos el análisis en *runeems_snps* utilizando una matriz de disimilitud genética entre las muestras calculada con 4.893 SNPs ($n = 21$ muestras). Las gráficas finales de EEMS se generaron con *rEEMSSplots* v. 0.0.0.9 para R obtenido desde la página *web* del programa. Las condiciones del análisis final, que permitieron tasas de aceptación de parámetros $> 10\%$ y $< 50\%$, fueron: $nDemes = 1.000$, $diploide = true$, $numMCMCIter = 6.000.000$, $numBurnIter = 1.000.000$, $numThinIter = 9.999$, $mSeedsProposalS2 = 0,9$, $qSeedsProposalS2 = 0,99$, $mEffctProposalS2 = 0,99$ y $qEffctProposalS2 = 0,2$. Realizamos múltiples réplicas para evaluar la robustez de la convergencia.

Pruebas de modelos alternativos de divergencia.

Estimamos el tiempo de divergencia (T_{div}), los tamaños efectivos de población (N_e) y el flujo génico (M) utilizando un modelo completo de aislamiento con migración en el coalescente en G-PhoCS 1.3 (Gronau et al., 2011). Utilizamos como archivo de entrada para G-PhoCS el archivo *.gphocs* de *ipyrad* (7.318 loci), que incluye sitios variantes e invariantes. Para estimar los parámetros genéticos de la población (un total de 13 parámetros libres), dividimos las muestras en tres poblaciones siguiendo los resultados de STRUCTURE con $K = 3$: tierras altas de Bolivia (BoH, $n = 9$), tierras bajas de Bolivia (BoL, $n = 3$) y muestras de Argentina (Arg, $n = 9$), siendo Arg y BoL poblaciones hermanas. Realizamos cinco réplicas con aproximadamente 1.100.000 ciclos

cada una y un periodo de *burn-in* del 20%. Verificamos la convergencia y combinamos las ejecuciones en un solo análisis en Tracer v. 1.6 (Rambaut et al., 2018). De acuerdo con la documentación de G-PhoCS, convertimos los parámetros del modelo a unidades de individuos o tiempo, asumiendo una tasa de mutación de $4,6 \times 10^{-9}$ sustituciones por sitio por generación (Smeds et al., 2016) y un tiempo de generación de 2,8 años (Bird et al., 2020).

Prueba de selección natural en rasgos cuantitativos.

Realizamos dos análisis para detectar SNPs *outliers* y seleccionar SNPs neutrales (aquellos no identificados como *outliers* por ningún método) que se utilizarían en las comparaciones S-test y $P_{ST-F_{ST}}$. En primer lugar, utilizamos *pcadapt* 4.03.3 (Luu et al., 2017), que detecta SNPs altamente diferenciados en todo el genoma al encontrar candidatos para adaptación local teniendo en cuenta la estructura poblacional (Luu et al., 2017). Marcamos loci como *outliers* si tenían al menos un SNP seleccionado como *outliers*. Para ejecutar *pcadapt*, primero evaluamos el número óptimo de grupos ($K = 1$ a 10) utilizando la regla de Cattell (Cattell, 1966) basada en el gráfico de escalamiento. Mantuvimos $K = 2$ y obtuvimos una lista de SNPs candidatos utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995) con una tasa de falso descubrimiento esperada de $\alpha = 0,1$.

En segundo lugar, ejecutamos modelos mixtos de factores latentes (*Latent Factors Mixed Models*, LFMM) implementados en 'LEA' 3.6.0 (Frichot y François, 2015) para R con el fin de detectar SNPs asociados a variables climáticas teniendo en cuenta la estructura poblacional subyacente (factores latentes). El método tiene como supuesto que en aquellos loci que se encuentren asociados con el clima (o con cualquier variable de entrada deseada) es indicador de una desviación de la neutralidad en dichos loci. Realizamos cinco análisis MCMC independientes con un $K = 2$ (número de factores latentes, de acuerdo con los resultados de STRUCTURE y PCA), utilizando la elevación y siete variables ambientales no correlacionadas. Para seleccionar las variables ambientales, primero extrajimos las 19 variables Bioclimáticas (resolución de 0,5 arcsec) de la base de datos WorldClim (<http://www.worldclim.org>) de las localidades donde recolectamos especímenes para los conjuntos de datos morfológicos y genéticos. Descartamos al azar una variable de aquellos pares altamente correlacionados (valor absoluto de r de Pearson $> 0,8$). Los valores p de los cinco análisis se

combinaron y se ajustaron por pruebas múltiples utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg con una corrección de tasa de falso descubrimiento (*false discovery rate*) de 0,1. Para el MCMC, ejecutamos 100.000 iteraciones con un *burn-in* de 50.000.

Para evaluar las predicciones morfológicas presentadas en la Figura 1, llevamos a cabo dos pruebas principales: la prueba S y la comparación Q_{ST} - F_{ST} . El test S se distingue de otras pruebas en su enfoque, dado que utiliza la información de todos los rasgos omitiendo el cálculo de métricas resumidas (Ovaskainen et al., 2011), como si lo requiere F_{ST} o Q_{ST} , lo que resulta en un aumento en el poder estadístico para la detección de selección. Esto es especialmente valioso en situaciones en las que el número de poblaciones estudiadas es bajo (Leinonen et al., 2013) o cuando se trabaja con conjuntos de datos de tamaño reducido (Karhunen et al., 2013). Este análisis utiliza la estadística S, que según Ovaskainen et al. (2011) y Karhunen et al. (2014), se interpreta de la siguiente manera: $S = 0,5$ implica deriva genética aleatoria, $S < 0,05$ implica selección natural estabilizadora al 95% de nivel de credibilidad, y $S > 0,95$ implica selección natural divergente robusta con un 95% de nivel de credibilidad. Para realizar la prueba S, obtuvimos la matriz de coancestría poblacional en RAFM (Karhunen y Ovaskainen, 2012) en R, utilizando 50.000 iteraciones con la función AFM. Obtuvimos el valor de S utilizando como datos de entrada la matriz de coancestría y la matriz de rasgos fenotípicos crudos usando el paquete *driftsel* (Karhunen et al., 2013), con 10.000 iteraciones para el algoritmo MCMC.

Para aplicar la comparación Q_{ST} - F_{ST} , aproximamos Q_{ST} mediante P_{ST} , que se obtiene a partir de los datos fenotípicos observados y representa el nivel de divergencia de un rasgo cuantitativo que está principalmente determinado por efectos genéticos aditivos (Brommer, 2011; Leinonen et al., 2008). Si la deriva genética explica la divergencia morfológica, la predicción $P_{ST} = F_{ST}$ no debería ser rechazada. Alternativamente, si $P_{ST} > F_{ST}$ o $P_{ST} < F_{ST}$, se respaldaría la selección diversificadora o la selección balanceadora, respectivamente (Merilä y Crnokrak, 2001). Calculamos P_{ST} utilizando la fórmula propuesta por Leinonen et al. (2006) y siguiendo a Brommer (2011):

$$P_{ST} = \frac{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2}{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2 + 2\sigma_w^2}$$

σ_w^2 y σ_b^2 representan los componentes de varianza del carácter dentro y entre poblaciones, respectivamente, h^2 representa heredabilidad y c es la proporción de la varianza total que se presume es debida a efectos genéticos aditivos entre poblaciones. Los componentes de varianza se estimaron utilizando cada variable del conjunto de datos morfológicos como variable dependiente, y considerando el sexo y la población como factores independientes. Para obtener una estimación de la variación neutral esperada para comparar con el P_{ST} observado, estimamos F_{ST} del conjunto de datos de SNPs no seleccionados (4.193 SNPs) utilizando el método de Weir y Cockerham (1984) en *SNPRelate* 1.28.0 (Zheng et al., 2012). Debido a que no existe un consenso claro sobre cómo estimar la distribución nula de los valores de F_{ST} de marcadores neutrales (Brommer, 2011; Leinonen et al., 2013), decidimos comparar P_{ST} con la media de F_{ST} y su intervalo de confianza del 95%, y por otro lado con el 95% de la distribución de los valores de F_{ST} calculados para cada locus. La comparación P_{ST} - F_{ST} utilizando esta última aproximación es un enfoque más conservador, dado que la distribución de F_{ST} tiene una dispersión de valores muy amplia.

Realizamos un análisis de robustez de la comparación P_{ST} - F_{ST} basado en Brommer (2011), implementado en el *script* de R disponible en https://github.com/Glaucidium/PST_FST_Brommer2011. Debido a que la estimación de P_{ST} puede ser influenciada por efectos ambientales (Leinonen et al., 2006; Merilä y Crnokrak, 2001), lo cual produciría la violación del supuesto $\frac{c}{h^2} = 1$, este análisis debe incluir un estudio de sensibilidad para evaluar la robustez de la suposición $P_{ST} = Q_{ST}$. En los casos en los que los valores centrales de P_{ST} y F_{ST} no se superpusieron (que se interpreta como que hay diferencia entre la variación observada del fenotipo de interés y la variación esperada según neutralidad), evaluamos el $\frac{c}{h^2}$ crítico, que representa el valor de c/h^2 donde se produce la superposición entre los intervalos de confianza de P_{ST} y F_{ST} . Evaluamos el $\frac{c}{h^2}$ crítico variando $\frac{c}{h^2}$ (de 0 a 2) durante el cálculo del valor de P_{ST} , e identificamos el valor de $\frac{c}{h^2}$ que produce intervalos de confianza superpuestos entre F_{ST} y P_{ST} . Si este valor de $\frac{c}{h^2}$ crítico es muy distinto de 1, se interpreta como que tanto P_{ST} como F_{ST} son significativamente diferentes. Seguimos a Brommer (2011) y adoptamos como indicativo de resultados robustos un $\frac{c}{h^2}$ crítico $\leq 0,2$, y cuando $0,3 > \frac{c}{h^2} > 0,2$, interpretamos los resultados como *borderline*.

Realizamos las dos pruebas de selección en grupos de dos y cuatro poblaciones. Para el primer agrupamiento, seguimos los resultados de STRUCTURE ($K = 2$) y asignamos las muestras a subespecies. Para el conjunto de datos fenotípicos, se asignaron los individuos a cada grupo según nuestro análisis previo (Capítulo 2). Para el segundo agrupamiento, con el fin de aumentar el número de réplicas para el análisis P_{ST} - F_{ST} , asignamos las muestras genómicas a poblaciones de acuerdo con los resultados de STRUCTURE para $K = 3$ y dividimos el grupo argentino en dos subgrupos, lo que resultó en cuatro poblaciones (Tabla A2.1). Para asignar las muestras fenotípicas a cada una de las cuatro poblaciones determinadas por las muestras genéticas, obtuvimos los centroides de cada grupo genético para dibujar polígonos de Voronoi en QGIS, definiendo un porcentaje de extensión de 400%. A cada grupo le correspondieron los individuos contenidos dentro de cada polígono (Figura 2b). Los grupos 1 a 4 en el conjunto de cuatro poblaciones se asignaron a subespecies de acuerdo con el rango conocido de las subespecies (Figura 2a).

Pruebas de modelos alternativos de divergencia.

Para evaluar las predicciones de la Figura 1, comparamos el promedio de D_{XY} entre conjuntos de loci identificados como altamente diferenciados y aquellos que no fueron identificados como altamente diferenciados utilizando 'PopGenome' 2.7.5 (Pfeifer et al., 2014) para R. Evaluamos la correlación entre D_{XY} y F_{ST} en todos los loci. Estimamos D_{XY} y F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) para cada locus y entre poblaciones con 'PopGenome'. Consideramos como loci altamente diferenciados aquellos con $F_{ST} \geq 0.2$ (Stene et al., 1993). Establecimos los valores negativos de F_{ST} como iguales a cero y utilizamos 1.000 réplicas de *bootstrap* para obtener intervalos de confianza del 95% de F_{ST} en 'StAMPP' (Pembleton et al., 2013).

RESULTADOS

Estructura filogeográfica y variación genética.

El análisis genético de la población en STRUCTURE y el método Evanno respaldaron a $K = 2$ como el mejor número de agrupaciones genéticas, ya sea con el conjunto de datos de 21 o 23 muestras (Figura 3a). Las muestras de la subespecie *rutila* (provenientes de las tierras bajas argentinas) se agruparon juntas, mientras

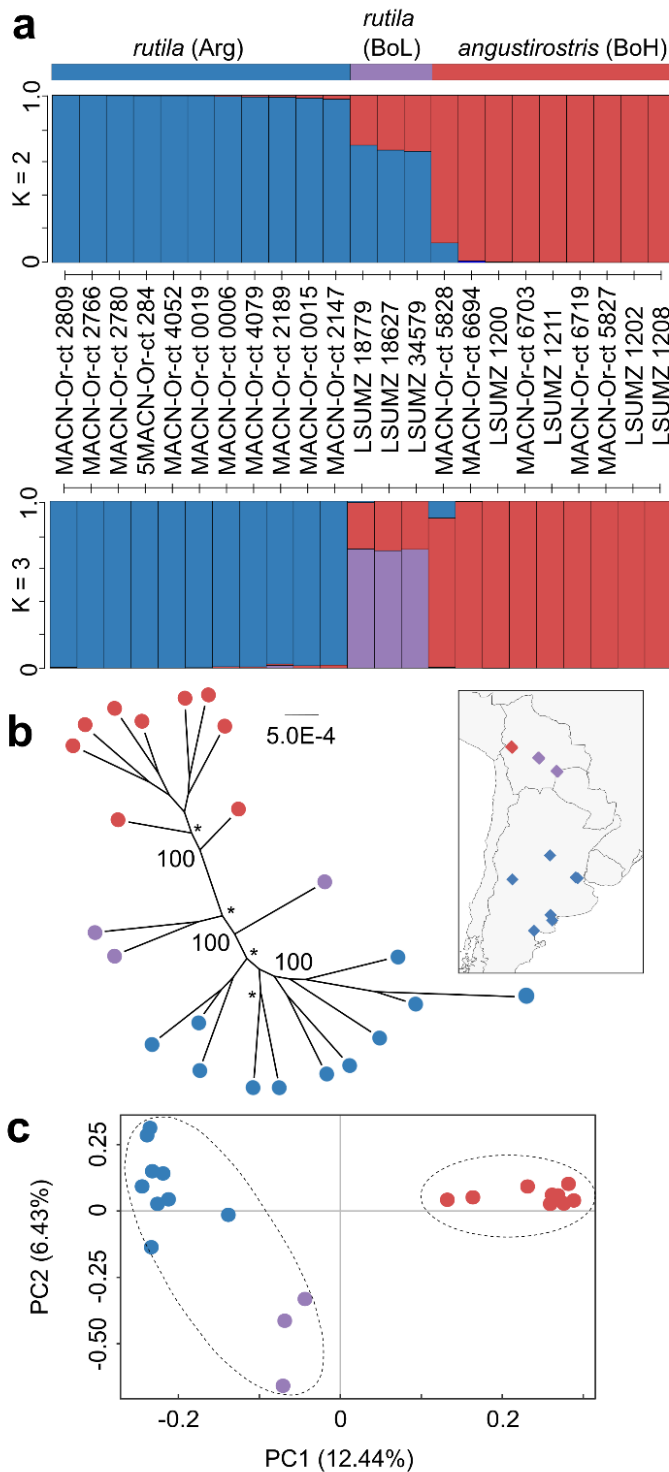


Figura 3. Análisis de la estructura filogeográfica de la población de *Phytotoma rutila* basado en loci de ddRADseq (6.293 loci, 9.956 SNPs, n = 23). (a) Gráfico del análisis de STRUCTURE para K = 2 (seleccionado por el método de Evanno) y K = 3. (b) árbol de máxima verosimilitud. Se proporciona un mapa accesorio con la distribución de las muestras. Los círculos están coloreados según la asignación de población de STRUCTURE para K = 3. Solo se etiquetan los nodos con el máximo apoyo. Consultar la Figura A2.1 para obtener información completa sobre el apoyo de los nodos. (c) Análisis de Componentes Principales, tasa de datos faltantes = 0,2. Las elipses indican los grupos de DAPC con mayor apoyo (K = 2).

que las muestras de la subespecie *angustirostris* (altitud en Bolivia) formaron el segundo grupo. Las muestras de las tierras bajas de Bolivia mostraron un alto grado de mezcla genética (*admixture*), pero con valores más altos de asignación a la población *rutila*. Explorando K = 3, las muestras híbridas de las tierras bajas de Bolivia formaron un tercer grupo separado del grupo de muestras de Argentina. El árbol de máxima verosimilitud

agrupó las muestras de *angustirostris* en un clúster monofilético, con un fuerte soporte, mientras que las muestras de *rutila* de Argentina se agruparon en un grupo monofilético pero con bajo soporte (Figura 3b, Figura A2.1). Las muestras de las tierras bajas de Bolivia (*rutila*) se agruparon entre *angustirostris* y las muestras de *rutila* de Argentina. El análisis de PCA agrupó las muestras en tres grupos; sin embargo, el análisis de DAPC solo respaldó dos grupos consistentes con la clasificación de subespecies (Figura 3c).

El F_{ST} global entre las subespecies *rutila* y *angustirostris* fue de 0,100 (CI 95%: 0,096 – 0,104), mientras que el F_{ST} global entre el grupo de cuatro poblaciones fue de 0,123 (CI 95%: 0,119 – 0,127). Identificamos con *pcadapt* 196 SNPs *outliers* y con LFMM 553 SNPs asociados a la elevación y a siete variables climáticas BIOCLIM (Rango diurno medio, Rango anual de temperatura, Temperatura media del trimestre más cálido, Temperatura media del trimestre más frío, Estacionalidad de precipitación, Precipitación del trimestre más cálido y Precipitación del trimestre más frío). El número total de SNPs identificados como *outliers* por al menos un método fue de 700, con 49 SNPs señalados simultáneamente por ambos métodos. El F_{ST} global entre las poblaciones *rutila* y *angustirostris* obtenido con SNPs neutrales fue de 0,084 (CI 95%: 0,081 – 0,087), mientras que el F_{ST} global entre el grupo de cuatro poblaciones estimado con SNPs neutrales fue de 0,096 (CI 95%: 0,093 – 0,099).

Aislamiento por distancia, flujo génico y tiempo de divergencia.

El test de Mantel parcial indicó que tanto el aislamiento por distancia (r parcial = 0,601, p = 0,0003, controlando la elevación) como la variación de elevación (r parcial = 0,445, p = 0,002, controlando la distancia geográfica) explicaron la divergencia genética entre las muestras. El análisis EEMS (*Estimating Effective Migration Surfaces*) respaldó la existencia de tres grupos genéticos en la especie, siendo *angustirostris* el más aislado (Figura 4a). Estos resultados indicaron que la barrera más importante para el flujo génico en la especie es la Cordillera de los Andes, lo cual concuerda con la prueba de Mantel. Además, las llanuras del Chaco parecen ser otra barrera para el flujo génico.

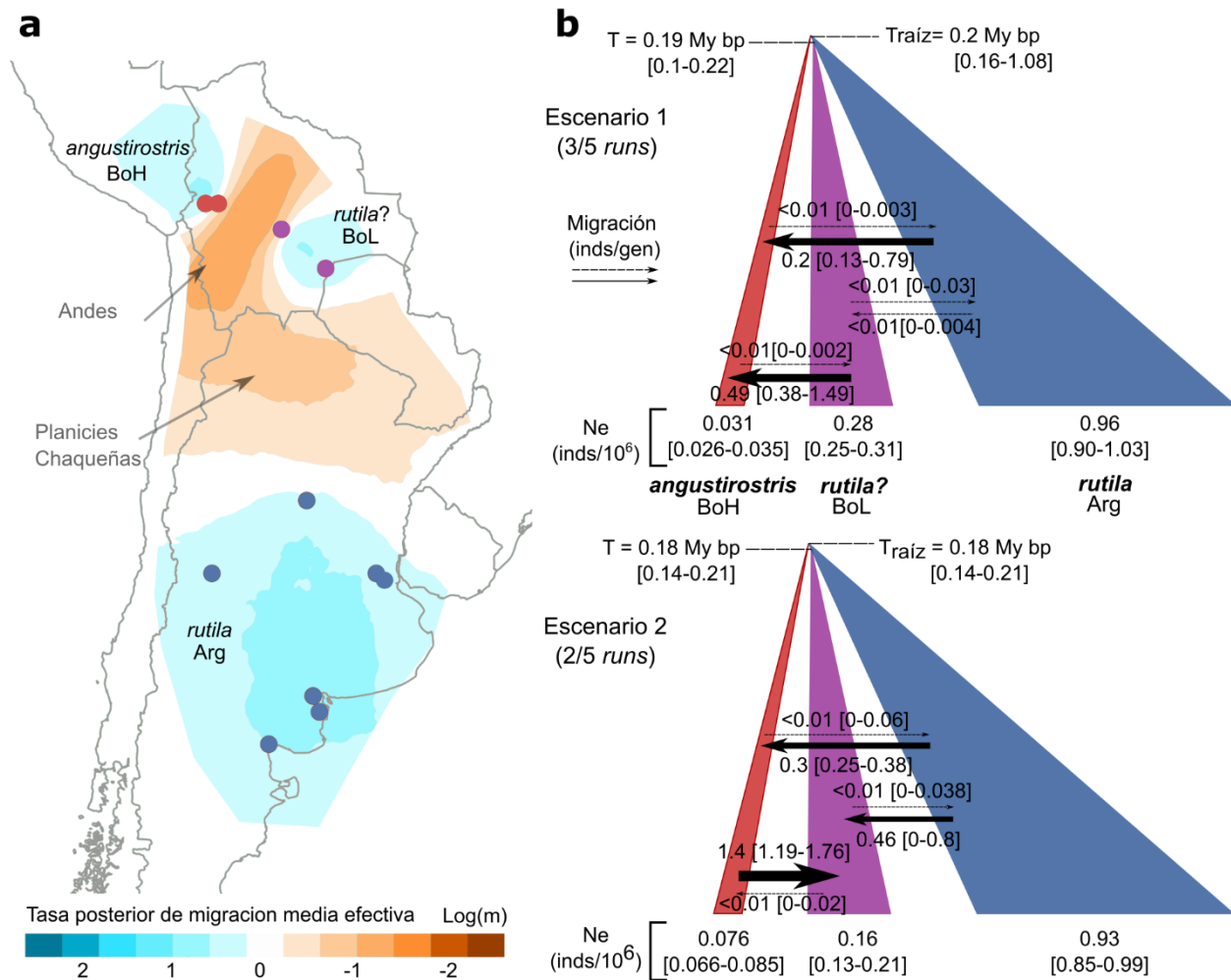


Figura 4. Flujo genético y tiempo de divergencia entre las poblaciones de *P. rutila* basado en 7.318 loci de RADseq (n = 21 muestras). (a) Superficie estimada de migración efectiva de *P. rutila* obtenida en EEMS. Los puntos representan las localidades de muestreo y están coloreados de acuerdo al agrupamiento K = 3 de STRUCTURE (BoH: Tierras Altas de Bolivia; BoL: Tierras Bajas de Bolivia; Arg: Tierras Bajas de Argentina). El mapa indica áreas consistentes con el aislamiento por distancia (en blanco), áreas con migración por encima de la tasa promedio (corredores, azul claro) y regiones con migración por debajo de la tasa promedio (barreras, naranja). (b) Los resultados de G-PhoCS muestran los dos escenarios más probables obtenidos con cinco corridas (*runs*) finales. Representamos la relación filogenética de las poblaciones tal como se utilizaron en el análisis. La migración se representa con flechas, siendo el grosor proporcional a la tasa de migración (inds/gen: individuos/generación). El ancho de las ramas es proporcional al tamaño efectivo de la población (Ne, en millones de individuos). El tiempo de divergencia T se muestra en millones de años antes del presente (My bp).

Estimamos el flujo génico y el tiempo de divergencia entre las tres poblaciones (*angustirostris*, *rutila* y *rutila* de las tierras bajas de Bolivia) utilizando G-PhoCS. Estos análisis convergieron en dos escenarios que variaban ligeramente en la magnitud del flujo génico (Figura 4b). En conjunto, estos escenarios indicaron que los eventos de divergencia ocurrieron simultáneamente durante el Pleistoceno tardío y que el flujo génico entre regiones fue asimétrico, siendo mayor de *rutila* hacia *angustirostris*, excepto en el escenario 2 donde hay

un mayor flujo génico de *angustirostris* hacia *rutila* de las tierras bajas de Bolivia. Además, analizamos un modelo simplificado con solo dos poblaciones, fusionando *rutila* y las tierras bajas de Bolivia en un solo grupo (*rutila*), que también describió un flujo génico asimétrico con tasas más altas de *rutila* hacia *angustirostris* (Figura A2.2).

Divergencia de rasgos adaptativos

Los análisis de S-test realizados sobre el rasgo tamaño corporal (PC1) de *P. rutila* rechazaron la deriva y respaldaron la selección natural divergente tanto en el análisis de dos poblaciones como en el de cuatro poblaciones ($S > 0,99$, Tabla 1). Un escenario similar fue respaldado para otros rasgos ($S > 0,90$) como profundidad del pico (BD) y la longitud del ala (WL). En cuanto a las comparaciones de P_{ST} - F_{ST} , el P_{ST} estimado con PC1 fue mayor que la expectativa neutral en todas las comparaciones, lo que respalda un origen adaptativo de la divergencia en el tamaño del cuerpo entre las poblaciones (Tabla 1, Figura A2.3). La robustez fue alta en todos estos análisis de PC1 ($\frac{c}{h^2}$ crítico $\approx 0,20$), excepto al analizar cuatro poblaciones y comparar el P_{ST} observado con la distribución de F_{ST} de un solo locus. Las comparaciones de P_{ST} - F_{ST} indicaron que la mayoría de los rasgos individuales se desviaron de la variación neutral (es decir, $P_{ST} > F_{ST}$), pero solo fueron robustos los resultados de los caracteres profundidad del pico y la longitud del ala que implicaron comparaciones con F_{ST} promedio.

Tabla 1. Resultados de las comparaciones test S y $P_{ST}-F_{ST}$ para evaluar la acción de la selección natural sobre los rasgos fenotípicos de *Phytotoma rutila*. Ambos análisis se llevaron a cabo en dos poblaciones (subespecies) y en cuatro poblaciones. Las comparaciones $P_{ST}-F_{ST}$ se basan en comparar el P_{ST} observado con la media del F_{ST} y con la distribución de los F_{ST} para cada locus. Los rasgos individuales estudiados son longitud del pico (BLT), longitud del pico desde la narina (BLN), ancho del pico (BW), profundidad del pico (BD), longitud del ala (WL) y longitud del tarso (TS), y PC1 es el primer componente principal de todas estas variables, un proxy del tamaño corporal.

Dos poblaciones <i>angustirostris</i> (n = 35) versus <i>rutila</i> (n = 100)							Cuatro poblaciones media n = 36, (min = 19, max = 82)					
Rasgo	S-test		$P_{ST}-F_{ST}$, P_{ST} comparación con:				S-test		$P_{ST}-F_{ST}$, P_{ST} comparison to:			
	S	P_{ST} (95% CI)	F_{ST} medio (95% CI): 0,084 (0,080-0,087)		F_{ST} distribución 95%: 0-0,400		S	P_{ST} (95% CI)	F_{ST} medio (95% CI): 0,096 (0,093-0,099)		F_{ST} distribución 95%: 0-0,380	
			Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico			Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico
PC1	0,991**	0,772 (0,71 - 0,82)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,039**	$P_{ST} > F_{ST}$	0,263*	0,998**	0,584 (0,50 - 0,68)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,097**	$P_{ST} > F_{ST}$	0,552
BLT	0,863	0,523 (0,41 - 0,65)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,131**	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.	0,892	0,353 (0,28 - 0,49)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,374	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.
BLN	0,824	0,291 (0,13 - 0,46)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,432	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.	0,642	0,176 (0,07 - 0,34)	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.
BW	0,864	0,363 (0,21 - 0,49)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,273	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.	0,883	0,186 (0,09 - 0,35)	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.
BD	0,965**	0,594 (0,51 - 0,71)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,090**	$P_{ST} > F_{ST}$	0,762	0,966**	0,443 (0,32 - 0,57)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,253*	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.
WL	0,995**	0,692 (0,63 - 0,76)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,061**	$P_{ST} > F_{ST}$	0,485	0,994**	0,595 (0,51 - 0,71)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,113**	$P_{ST} > F_{ST}$	0,954
TS	0,989**	0,641 (0,55 - 0,72)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,078**	$P_{ST} > F_{ST}$	0,615	0,908*	0,432 (0,29 - 0,53)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,293	$P_{ST} = F_{ST}$	n.a.

******, *****: Resultados robustos o *borderline*, respectivamente, del análisis S-test o el análisis $P_{ST}-F_{ST}$. Consideramos que $S > 0,95$ es evidencia de selección divergente. La evaluación de la robustez del análisis $P_{ST}-F_{ST}$ se basa en Brommer (2011). n.a.: no aplicable."

Pruebas de divergencia relativa y absoluta.

La media de D_{XY} de los loci altamente diferenciados (es decir, la media de D_{XY} de los loci con $F_{ST} \geq 0,2 = 0,0094$, CI 95%: 0,0091 – 0,0098, $n = 861$) fue mayor que la de los demás loci (es decir, la media de D_{XY} de los loci con $F_{ST} < 0,2 = 0,0038$, CI 95%: 0,0037 – 0,0040; prueba de Mann-Whitney $p < 0,01$, Figura 5a). Esta diferencia fue aún mayor al considerar criterios más rigurosos para definir loci altamente diferenciados, como $F_{ST} \geq 0,5$ y $\geq 0,8$ (Figura A2.4). Además, hubo una correlación positiva entre F_{ST} y D_{XY} (Figura 5b, correlación de Spearman: 0,6, $p < 0,01$).

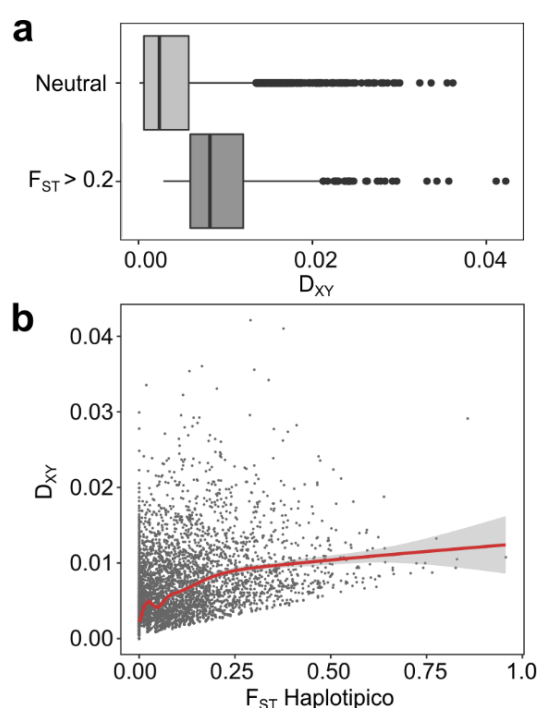


Figura 5. Divergencia relativa versus divergencia absoluta entre 7.318 loci RADseq de *Phytotoma rutila* ($n = 21$ muestras). (a) Comparación de la divergencia absoluta D_{XY} entre loci altamente diferenciados ($F_{ST} \geq 0.2$, $n = 861$) versus loci neutrales (aquellos que no se identificaron como *outliers*, $n = 6.457$). (b) D_{XY} versus F_{ST} de los loci ddRAD. La línea de regresión suavizada y el intervalo de confianza del 95% se obtuvieron mediante el método GAM de *ggplot2* para R (Wickham, 2016).

DISCUSIÓN

El propósito de este estudio fue examinar la influencia del flujo génico y el papel de la selección natural en la divergencia morfológica entre las subespecies de *P. rutila*, un ave que habita los bosques secos de Sudamérica, a lo largo de gradientes de distancia y elevación. En conjunto, nuestros resultados respaldan la idea de que la selección natural desempeña un papel fundamental en la diversificación a lo largo del cinturón de bosques secos del Chaco y los Andes. Entre los hallazgos destacamos: a) Identificamos una diferenciación tanto genómica como fenotípica que coincide con el gradiente de tierras altas-bajas en la región de estudio,

donde la variación altitudinal emerge como un factor crítico que explica la variación genómica. b) Observamos una mayor variación fenotípica en comparación con la genómica neutral, lo que sugiere la evolución adaptativa de rasgos fenotípicos. c) Confirmamos la presencia de un flujo génico significativo. d) Detectamos un patrón de diferenciación genómica tanto relativa como absoluta que es congruente con el proceso de divergencia con flujo génico.

Estructura filogeográfica de *P. rutila* a lo largo del cinturón del bosque seco Chaco-Andes.

Nuestros análisis revelaron patrones de divergencia genómica y morfológica dentro de *P. rutila* que se alinean con el eje de tierras altas y tierras bajas del cinturón del bosque seco Chaco-Andes, lo que sugiere la acción de fuerzas de diversificación a lo largo de los gradientes ambientales de esta región. Encontramos grupos genéticos asociados con las subespecies de *P. rutila*, así como individuos híbridos, que divergieron durante el Pleistoceno tardío (aproximadamente hace 0,2 millones de años; Figura 3, Figura 4b). Además, encontramos que el principal predictor de la divergencia genética entre los individuos fue la variación altitudinal a lo largo de las laderas de los Andes, así como la distancia geográfica (Figura 4a). Los resultados de EEMS también mostraron un flujo génico más alto de lo esperado entre las muestras del sur y una fuerte barrera que coincide con el eje de tierras altas y tierras bajas en el sur de Bolivia. Además, se detectó un flujo génico menor de lo esperado entre los dos principales grupos de tierras bajas (Sur de Bolivia y Argentina) en la zona centro de Argentina (Figura 4a). Aunque no hay un muestreo homogéneo en toda el área de estudio, estos resultados son robustos porque el método EEMS no es afectado por deficiencias en el muestreo (Petkova et al., 2016). Estos patrones de divergencia fenotípica y genética coinciden con el eje de tierras altas y tierras bajas de la región de estudio, un patrón que se observa con frecuencia en otras aves que habitan en ambientes de montaña (Chevion y Brumfield, 2009; Milá et al., 2009; Seeholzer y Brumfield, 2017).

El análisis demográfico G-PhoCS confirmó que la subespecie *rutila* tiene un tamaño poblacional efectivo más grande, como se sugirió en nuestros resultados preliminares (Capítulo 2). Además, encontramos un flujo génico asimétrico entre las subespecies de *P. rutila*, con mayor tasa en dirección a la subespecie de tierras altas *angustirostris* (Figura 4b, Figura A2.3). Este patrón de flujo génico asimétrico podría ser consecuencia de la difusión génica (Lenormand, 2002) desde la región con el tamaño poblacional efectivo más

grande (*rutila*) hacia la más pequeña (*angustirostris*), o debido a diferentes procesos adaptativos entre las subespecies. Sin embargo, es poco probable que la magnitud de la divergencia observada en algunos loci se mantenga bajo una migración tan alta en ausencia de una fuerte selección.

Una explicación plausible no neutral para este patrón es que los alelos adaptativos en las tierras altas Andinas sean deletéreos en las condiciones de tierras bajas. Los individuos de tierras bajas que heredan tales alelos no podrían transmitirlos en el nuevo ambiente, disminuyendo la frecuencia de estos genes en esa población y creando así un patrón de flujo génico limitado desde las tierras altas hasta las tierras bajas. Este resultado es concordante con otros estudios realizados en aves que habitan los altos Andes y las tierras bajas del cono sur de América del Sur (por ejemplo Bulgarella et al., 2012; McCracken et al., 2009; Wilson et al., 2013). La existencia de patrones filogeográficos compartidos respalda historias compartidas entre los taxones de la región.

El papel de la selección natural en la evolución de las subespecies de *P. rutila*.

Nuestro análisis respaldó el papel de la selección natural divergente en la evolución de las subespecies de *P. rutila* entre los extremos del cinturón de bosques secos Chaco-Andes. En primer lugar, los análisis de variación morfológica versus genómica neutral (tests S y $P_{ST-F_{ST}}$) rechazaron el modelo nulo y respaldaron la presencia de selección natural diversificadora actuando sobre el tamaño corporal (Tabla 1). Ambos enfoques se basan en una serie de supuestos simplificados (Merilä y Crnokrak, 2001; Ovaskainen et al., 2011; Whitlock, 2008). Por ejemplo, asumen que los marcadores genéticos estudiados son neutrales, que los rasgos morfológicos evaluados son de codificación poligénica y se basan en marcadores de efecto aditivo, que hay ausencia de efectos maternos, que la mutación es homogénea entre las poblaciones y, en cuanto a la comparación $P_{ST-F_{ST}}$, que existe una estimación imparcial de la diferenciación genética de los rasgos cuantitativos. Dado que se considera que la varianza genética no aditiva y los efectos maternos en los rasgos son bajos (Merilä y Crnokrak, 2001), y debido a que hemos utilizado un gran número de marcadores que no han sido identificados como *outliers* ni asociados con variables climáticas, los resultados indicarían que las pruebas han cumplido la mayoría de estas suposiciones. Esto es cierto, excepto para la comparación $P_{ST-F_{ST}}$, ya que el enfoque aproximó la diferenciación genética de los rasgos cuantitativos con la diferenciación observada

de los rasgos (es decir, $Q_{ST} = P_{ST}$). Tal aproximación no tendría en cuenta el impacto de los factores ambientales y, por lo tanto, confundiría los efectos de la plasticidad fenotípica y la selección natural. Sin embargo, solo a través de experimentos de jardines comunes es posible obtener una estimación imparcial de Q_{ST} (Whitlock, 2008), lo cual es casi imposible en estudios de organismos no modelo como *P. rutila*. Por lo tanto, siguiendo a Brommer (2011), evaluamos la precisión de esta aproximación y encontramos que la mayoría de las comparaciones P_{ST} - F_{ST} realizadas con el PC1 del fenotipo de *P. rutila* son sólidas en todas las pruebas (Tabla 1, Figura A2.3). Por ejemplo, el valor más pequeño obtenido de $\frac{c}{h^2}$ crítico fue 0,039, lo que significa que, para ese rasgo, el efecto genético aditivo entre las poblaciones tendría que ser el 3,9% del efecto intra poblacional para que la deriva genética explique la divergencia fenotípica ($Q_{ST} = P_{ST}$), lo cual es poco realista (Brommer, 2011). Solo un valor de $\frac{c}{h^2}$ crítico no fue robusto (0,78), correspondiente al análisis en el que se comparó el P_{ST} observado con la distribución de F_{ST} (Tabla 1), lo cual se podría considerar como un enfoque conservador en contraste con la comparación con la media de F_{ST} . Las comparaciones P_{ST} - F_{ST} realizadas con rasgos individuales se desviaron de la variación neutral, pero solo fueron sólidas en las comparaciones con el F_{ST} promedio realizadas con la profundidad del pico y la longitud del ala. En conjunto, los resultados de las pruebas S y de comparación P_{ST} - F_{ST} respaldan una señal de selección divergente para el PC1 de la morfología de *P. rutila*, así como una tendencia similar para la profundidad del pico y la longitud del ala. Aunque estos análisis no son concluyentes acerca de la acción de la selección natural y no descartan por completo los efectos ambientales, consideramos que sus resultados son sólidos y proporcionan evidencia de la acción de la selección natural divergente en *P. rutila*. A pesar de no haber podido obtener datos genéticos de poblaciones intermedias entre los altos Andes y la región baja de Argentina (norte de Argentina), confiamos en que los resultados de las comparaciones fenotípicas-genómicas son sólidos. De hecho, estos tests deben considerarse como conservadores, porque al no tener muestras de estas regiones intermedias, es posible que hayamos sobreestimado la divergencia genética entre las poblaciones de tierras altas y bajas.

Otra línea de evidencia que respalda la acción de la selección natural entre subespecies es que los individuos de tierras altas (*angustirostris*) tienen el tamaño corporal más grande (Capítulo 2), lo cual

probablemente sea adaptativo a las condiciones de montaña. Una correlación de un rasgo con un gradiente ambiental (por ejemplo, tamaño corporal con elevación, temperatura o humedad) proporciona evidencia en contra de la deriva genética (Whitlock, 2008). Además, un aumento correlacionado con la altitud en rasgos relacionados con el tamaño se ha interpretado como una respuesta adaptativa a las condiciones ambientales de alta montaña (Ashton, 2002; Zink y Remsen Jr, 1986), como se establece en la regla de Bergmann (Bergmann, 1847). Según esta regla, el tamaño corporal en homeotermos se correlaciona positivamente con la disminución de la temperatura y la humedad (James, 1970), mientras que se supone que un tamaño corporal más grande es una adaptación a temperaturas más bajas, climas extremos y/o a una fuerte estacionalidad (Zink y Remsen Jr, 1986), que son condiciones comunes en los altos Andes. Además, rasgos individuales como la profundidad del pico y la longitud del ala parecen haber sido más afectados por la selección divergente que los otros rasgos que analizamos. Dado que todos los rasgos tuvieron una correlación positiva alta con el PC1 (Capítulo 2), es fácil concluir que la señal observada de selección en esos rasgos podría ser consecuencia de la alometría (todos los rasgos tenían valores más altos en *angustirostris* que en *rutila*), pero también una señal de procesos adaptativos. Se espera que la profundidad del pico se vea afectada por la variación en la ecología de forrajeo y también se ha encontrado que está bajo selección en otros estudios de aves (Eroukhmanoff et al., 2013). Sin embargo, no hay consenso sobre cómo la variación altitudinal afectaría la morfología del pico (Landmann y Winding, 1995), especialmente en un ave folívora como *P. rutila*. En cuanto a la longitud del ala, su variación estaría relacionada, por ejemplo, con la densidad de vegetación y la continuidad del hábitat (Cabanne et al., 2014; Milá et al., 2009; Winkler y Leisler, 2008). El hábitat de las tierras altas de *P. rutila* es intrínsecamente más fragmentado que en las tierras bajas de las regiones del Chaco y Monte, ya que principalmente consiste en una red de bosques secos y arbustos dispersos en valles, en lugar de un bosque seco continuo y denso. En este caso, las alas largas y puntiagudas de la subespecie *angustirostris* podrían ser una adaptación a la vida en grandes altitudes (Landmann y Winding, 1993, 1995) y en un hábitat fragmentado con baja densidad de vegetación, donde se espera que los vuelos sean más largos y en vegetación más abierta que en las tierras bajas.

Alopatría versus divergencia con flujo génico y la importancia del cinturón de bosque seco del Chaco-Andes

Nuestros resultados respaldan que las subespecies de *P. rutila* han divergido en presencia de flujo génico. El análisis genómico no respaldó un modelo de divergencia en alopatría porque encontramos que los loci altamente diferenciados presentaron una divergencia absoluta (D_{XY}) más alta que los loci no diferenciados (Figura 5a), lo cual concuerda con las predicciones del modelo de divergencia con flujo génico (Figura 1). El D_{XY} promedio de los loci con $F_{ST} \geq 0,2$ fue 2.5 veces mayor que los loci con $F_{ST} < 0,2$; y cuando los criterios para seleccionar loci altamente diferenciados fueron más rigurosos (por ejemplo, $F_{ST} > 0,5$ y $F_{ST} > 0,8$), la diferencia entre los valores medios de D_{XY} fue aún mayor (Figura A2.4). Además, F_{ST} y D_{XY} estaban correlacionados (Figura 5b), lo cual concuerda con el resultado anterior. Este resultado, junto con la existencia de flujo génico entre regiones (Figura 4) y los resultados de las pruebas S y las comparaciones P_{ST-FST} (Tabla 1), rechazaron la divergencia alopatrica neutral y respaldaron la divergencia con flujo génico.

Las estimaciones de flujo génico entre las subespecies de *P. rutila* (Figura 4; Figura A2.2) representan la migración promedio que ocurre durante la divergencia de un ancestro común y no distinguen el contacto primario (flujo génico constante bajo) del contacto secundario (períodos de alopatría seguidos de alto flujo génico) (Cruickshank y Hahn, 2014). Sin embargo, el análisis genómico de *P. rutila* indicó que algunos loci tienen menos introgresión que otros (es decir, loci con valores pico de F_{ST} y D_{XY}), lo cual es compatible con la divergencia con flujo génico (Figura 1). Estos loci altamente divergentes entre las subespecies pueden ser blancos de selección natural e indicar una adaptación local diferencial entre las regiones de los altos Andes y las tierras bajas (es decir, adaptación a temperaturas extremas, estacionalidad y variación en las presiones parciales de oxígeno). Por ejemplo, las poblaciones de la subespecie más sureña, *rutila*, migran hacia el norte durante el invierno austral, lo cual podría indicar que tienen una menor tolerancia al frío extremo que las subespecies andinas, que no son migratorias (Capítulo 2). Además, la subespecie *angustirostris* podría estar localmente adaptada para enfrentar la hipoxia, las bajas temperaturas y la alta demanda energética impuesta por vivir a grandes altitudes.

Nuestros resultados respaldan que los gradientes ambientales a lo largo de los bosques secos del Chaco y los Andes han promovido la diversificación parapátrica entre las subespecies de *P. rutila*. Los ecotonos y otros gradientes como el cinturón de bosques secos del Chaco y los Andes pueden ser fundamentales para la evolución y el mantenimiento de la biodiversidad en regiones tropicales (Smith et al., 2004). Mucho más compleja de lo que tradicionalmente pensábamos, la diversificación aviar en estas regiones implica no solo la vicarianza, sino también el flujo génico entre poblaciones y la selección natural que actúa simultáneamente a lo largo de los gradientes ambientales (Nosil, 2012; Orr y Smith, 1998; Smith, 1997), en contraste con la idea de especiación basada principalmente en modelos alopátricos (Mayr, 1963; Smith et al., 2014).

BIBLIOGRAFÍA

- Antoniazza, S., Burri, R., Fumagalli, L., Goudet, J., y Roulin, A. (2010). Local adaptation maintains clinal variation in melanin-based coloration of European barn owls (*Tyto alba*). *Evolution*, 64(7), 1944-1954. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00969.x>
- Arnold, M. L. (2016). *Divergence with Genetic Exchange*. Oxford University Press.
- Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, 57, 289-300.
- Brommer, J. E. (2011). Whither Pst? The approximation of Qst by Pst in evolutionary and conservation biology. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(6), 1160-1168. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02268.x>
- Cabanne, G. S., D'Horta, F. M., Sari, E., Santos, F. R., y Miyaki, C. Y. (2008). Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(3), 760-773. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.09.013>
- Cadena, C. D., y Céspedes, L. N. (2020). Origin of elevational replacements in a clade of nearly flightless birds: Most diversity in tropical mountains accumulates via secondary contact following allopatric speciation. En R. V. y C. A. (Eds.), *Neotropical Diversification: Patterns and Processes* (pp. 635-659). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31167-4_23
- Carnaval, A. C., Hickerson, M. J., Haddad, C. F. B., Rodrigues, M. T., y Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323(5915), 785-789. <https://doi.org/10.1126/science.1166955>
- Cattell, R. B. (1966). The scree test for the number of factors. *Multivariate Behavioral Research*, 1(2), 245-276. https://doi.org/10.1207/s15327906mbr0102_10

- Cruickshank, T. E., y Hahn, M. W. (2014). Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow. *Molecular Ecology*, 23(13), 3133-3157. <https://doi.org/10.1111/mec.12796>
- Dobzhansky, T. (1937). *Genetics and the Origin of Species*. Columbia University Press.
- Endler, J. A. (1977). Geographic variation, speciation, and clines. *Monographs in population biology*, 10, 1-246.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913. <https://doi.org/10.1038/35016000>
- Irwin, D. E., Milá, B., Toews, D. P. L., Brelsford, A., Kenyon, H. L., Porter, A. N., Grossen, C., Delmore, K. E., Alcaide, M., y Irwin, J. H. (2018). A comparison of genomic islands of differentiation across three young avian species pairs. *Molecular Ecology*, 27(23), 4839-4855. <https://doi.org/10.1111/mec.14858>
- Karhunen, M., Merilä, J., Leinonen, T., Cano, J. M., y Ovaskainen, O. (2013). driftsel: An R package for detecting signals of natural selection in quantitative traits. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 746-754. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12111>
- Karhunen, M., Ovaskainen, O., Herczeg, G., y Merilä, J. (2014). Bringing habitat information into statistical tests of local adaptation in quantitative traits: A case study of nine-spined sticklebacks. *Evolution*, 68(2), 559-568. <https://doi.org/10.1111/evo.12268>
- Leinonen, T., McCairns, R. J. S., O'Hara, R. B., y Merilä, J. (2013). Q(ST)-F(ST) comparisons: Evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, 14, 179-190. <https://doi.org/10.1038/nrg3395>
- Linck, E., y Battey, C. J. (2019). Minor allele frequency thresholds strongly affect population structure inference with genomic data sets. *Molecular Ecology Resources*, 19(3), 639-647. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12995>
- Mayr, E. (1963). *Animal speciation and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Nosil, P. (2012). *Ecological speciation*. Oxford University Press.
- O'Leary, S. J., Puritz, J. B., Willis, S. C., Hollenbeck, C. M., y Portnoy, D. S. (2018). These aren't the loci you're looking for: Principles of effective SNP filtering for molecular ecologists. *Molecular Ecology*, 27(16), 3193-3206. <https://doi.org/10.1111/mec.14792>
- Ovaskainen, O., Karhunen, M., Zheng, C., Arias, J. M. C., y Merilä, J. (2011). A new method to uncover signatures of divergent and stabilizing selection in quantitative traits. *Genetics*, 189(2), 621-632. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.129387>
- Patton, J. L., y Smith, M. F. (1994). Paraphyly, Polyphyly, and the Nature of Species Boundaries in Pocket Gophers (Genus *Thomomys*). *Systematic Biology*, 43(1), 11-26.

- Pembleton, L. W., Cogan, N. O. I., y Forster, J. W. (2013). StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 946-952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12129>
- Ribeiro, Â. M., Lloyd, P., y Bowie, R. C. K. (2011). A tight balance between natural selection and gene flow in a Southern African arid-zone endemic bird. *Evolution*, 65(12), 3499-3514. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01397.x>
- Ridgely, R. S., y Tudor, G. (2009). *Field guide to the songbirds of South America: The passerines*. University of Texas Press.
- Rundle, H. D., y Nosil, P. (2005). Ecological speciation. *Ecology Letters*, 8(3), 336-352. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00715.x>
- Seeholzer, G. F., y Brumfield, R. T. (2017). Isolation-by-distance, not incipient ecological speciation, explains genetic differentiation in an Andean songbird (Aves: Furnariidae: *Cranioleuca antisensis*, Line-cheeked Spinetail) despite near three-fold body size change across an environmental gradie. *Molecular Ecology*, May, 1-18. <https://doi.org/10.1111/mec.14429>
- Smith, T. B. (1997). A Role for Ecotones in Generating Rainforest Biodiversity. *Science*, 276(5320), 1855-1857. <https://doi.org/10.1126/science.276.5320.1855>
- Smith, T. B., Calsbeek, R., Wayne, R. K., Holder, K. H., Pires, D., y Bardeleben, C. (2004). Testing alternative mechanisms of evolutionary divergence in an African rain forest passerine bird. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(2), 257-268. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2004.00825.x>
- Stene, J., Jain, J. P., y Prabhakaran, V. T. (1993). Genetics of Populations. *Biometrics*, 49(2), 672. <https://doi.org/10.2307/2532586>
- Tobias, J. A., Ottenburghs, J., y Pigot, A. L. (2020). Avian Diversity: Speciation, Macroevolution, and Ecological Function. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51, 533-560. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-025023>
- Willis, S. C., Hollenbeck, C. M., Puritz, J. B., Gold, J. R., y Portnoy, D. S. (2017). Haplotyping RAD loci: An efficient method to filter paralogs and account for physical linkage. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 955-965. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12647>
- Zamudio, K. R., Bell, R. C., y Mason, N. A. (2016). Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8041-8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602237113>

Depositamos el conjunto de datos de ddRADseq procesados (.vcf y archivos .loci) y la lista de loci outliers encontrados por *pcadapt* y LFMM en Dryad

(https://datadryad.org/stash/share/76PAAAR_gMdKlIDh80xP_g9a_k3IPpoMoF5L5NqTP6U).

El conjunto de datos morfométricos también está disponible en Mendeley Data
(<https://doi.org/10.17632/6xxw3hvzyb.1>).

CAPÍTULO 4

Diferentes procesos evolutivos desacoplan la divergencia con flujo génico entre la coloración y morfología de un ave (*Cranioleuca pyrrhophia*, Furnariidae) a lo largo del gradiente de bosques secos Chaco Andes

RESUMEN

Múltiples especies poseen poblaciones que muestran variación espacial en caracteres fenotípicos. Esta heterogeneidad espacial en los rasgos fenotípicos se genera y mantiene por procesos aleatorios y/o determinísticos, y está consensuado que, en cuanto al escenario geográfico, es necesario un evento de alopatría (aunque sea temporal) para lograr divergencia poblacional y especiación. No obstante, numerosos estudios dan cuenta de casos que desafían ese patrón general, donde las poblaciones divergen incluso bajo el efecto homogeneizador del flujo genético. En este capítulo el objetivo fue evaluar el modelo de divergencia con flujo génico a lo largo de un gradiente ambiental, utilizando como modelo de estudio al ave del bosque seco Chaco-Andes *Cranioleuca pyrrhophia*. Se recolectaron muestras de tejido, se obtuvieron datos de variación de tamaño corporal y espectrofotométricos de especímenes de museo. Analizamos la variación espacial de los rasgos y utilizamos técnicas de secuenciación de nueva generación para obtener loci genómicos (ddRADseq) y estudiar la estructura genética de las poblaciones. Evaluamos los efectos de las condiciones ambientales, la altitud y el aislamiento por distancia geográfica tanto en la divergencia genómica como en la divergencia fenotípica. Además, para distinguir la divergencia en alopatría de la divergencia con flujo génico, comparamos la variación de rasgos fenotípicos con la variación genómica neutral (pruebas S y comparaciones P_{ST} - F_{ST}), realizamos análisis coalescentes para estimar el flujo génico y el tiempo de divergencia, y calculamos la divergencia genómica relativa (F_{ST}) versus absoluta (D_{XY}). Encontramos que a) *C. pyrrhophia* es uniforme en cuanto a los rasgos morfométricos, aunque hay una leve variación correlacionada con el eje longitudinal, b) en relación con los caracteres de coloración, se encontró evidencia de estructura geográfica en las timoneras centrales, rasgo diagnóstico para identificar subespecies, c) las subespecies de *C. pyrrhophia* no forman grupos evolutivamente independientes, d) mayor divergencia fenotípica que genómica neutra en algunos caracteres; e) flujo génico asimétrico entre las poblaciones andinas y chaqueñas; y f) un patrón de diferenciación genómica relativa y absoluta compatible con la divergencia con flujo génico. Los resultados soportan que el mecanismo detrás de la diversificación morfológica y genómica a lo largo del cinturón del bosque seco Chaco-Andes en *C. pyrrhophia* es la divergencia con flujo génico. Además, La diversificación en América del Sur ocurre por un

conjunto de procesos, como el flujo génico entre las poblaciones, la selección natural a lo largo de gradientes ambientales y también la vicarianza.

INTRODUCCION

¿Cuáles son los mecanismos que generan y mantienen la variación fenotípica a lo largo de la distribución de una especie? Múltiples especies poseen poblaciones que, aisladas o no, muestran variación espacial en caracteres fenotípicos, como en el tamaño y forma corporal, la coloración, el canto, entre otros. Esta heterogeneidad espacial en los rasgos fenotípicos se mantiene por procesos aleatorios y/o determinísticos ligados a condiciones pasadas y contemporáneas (Zamudio et al., 2016). Se han propuesto tres factores principales que se destacan como fuentes de variación fenotípica en la naturaleza: 1) variación neutra, o por deriva, dado que los procesos estocásticos pueden producir cambios fenotípicos si las poblaciones pasan suficiente tiempo en aislamiento (Mayr, 1942); 2) adaptación local, como resultado de la selección natural cuando las poblaciones adquieren rasgos ventajosos bajo la influencia de las condiciones ambientales locales (Williams, 1996); y 3) la plasticidad fenotípica, que es el potencial de un organismo de producir, a partir de un mismo genotipo, un rango de fenotipos en múltiples condiciones ambientales (DeWitt et al., 1998). Debido a esto, dicha variación fenotípica no es heredada. Otros factores pueden ser la mutación y el flujo génico.

El contexto geográfico en el que ocurre la diversificación es objeto de debate, y la pregunta central ha sido si la divergencia ocurre mayoritariamente entre poblaciones aisladas geográficamente (en alopatría), ya sea al azar o por intermedio de selección natural, o sin aislamiento geográfico (en parapatría y o simpatría) y por medio de selección natural divergente (Coyne y Orr, 2004; Darwin y Wallace, 1858; Schluter, 2009). Está consensuado que la mayoría de los procesos de especiación requieren una fase alopátrica (Anderson y Weir, 2022; Coyne y Orr, 2004; Tobias et al., 2020), tanto en presencia como en ausencia de divergencia ecológica adaptativa (Nosil, 2012; Tobias et al., 2020), ya que se ha visto que, por ejemplo, a nivel macro evolutivo, la divergencia fenotípica es explicada por el tiempo desde la divergencia inicial (Tobias et al., 2014). De todas formas, numerosos estudios dan cuenta de casos que desafían ese patrón general, en los que las poblaciones divergen incluso bajo el efecto homogeneizador del flujo genético (Blanckaert y Hermisson, 2018; Ribeiro et al., 2019; Rodríguez-Cajarville et al., 2022; Wang y Summers, 2010), indicando que la selección natural es el factor que impulsa mayoritariamente esa diversificación. Es posible que la noción de que la alopatría es fundamental

para el inicio de la especiación sea producto de que los primeros estudios del tema no evaluaron hipótesis alternativas al aislamiento, o que carecían de métodos y o datos para un estudio completo de las distintas alternativas (Arnold, 2016).

Para distinguir entre la divergencia al azar versus la divergencia por selección natural (y los escenarios geográficos), es necesario comparar la variación fenotípica, genómica y ambiental en el sistema de estudio, donde cada modo de divergencia predice distintos patrones a nivel genómico, y en la variabilidad fenotípica (Figura 1). La divergencia en alopatría tendrá un impacto homogéneo en todo el genoma dado que cada población seguirá un camino evolutivo independiente. En ausencia de selección, la divergencia genética entre poblaciones (F_{ST}) a nivel genómico solo por deriva genética se aproxima a una distribución χ^2 (Lewontin y Krakauer, 1973; Whitlock y Lotterhos, 2015). Además, se espera que la variación en caracteres de variación continua también cambie con magnitud similar a los caracteres genómicos neutros, lo cual estará determinado (entre otras variables) por el tiempo que las poblaciones han permanecido en aislamiento (Pigot y Tobias, 2013). En un escenario geográfico de alopatría, pero con la selección natural cumpliendo un rol significativo, esperamos encontrar una diferenciación genómica basal (la magnitud dependerá de cuánto tiempo las poblaciones estuvieron en aislamiento y de la diferencia de tamaño entre ellas), con regiones genómicas altamente diferenciadas ligadas a caracteres bajo selección mostrando picos de F_{ST} (Irwin et al., 2018). En el caso de divergencia con flujo genético, dado que las poblaciones aun intercambian migrantes, se espera que la mayor parte del genoma tenga muy baja diferenciación entre las poblaciones. Por otra parte, aquellas regiones genómicas ligadas a caracteres bajo selección, poseerán un F_{ST} muy superior a la mediana (Zamudio et al., 2016). Si la selección actuó sobre caracteres de variación continua, se espera que estos caracteres tengan mayor divergencia que la predicha por caracteres genómicos neutros (Irwin et al., 2016, 2018; Leinonen et al., 2008).

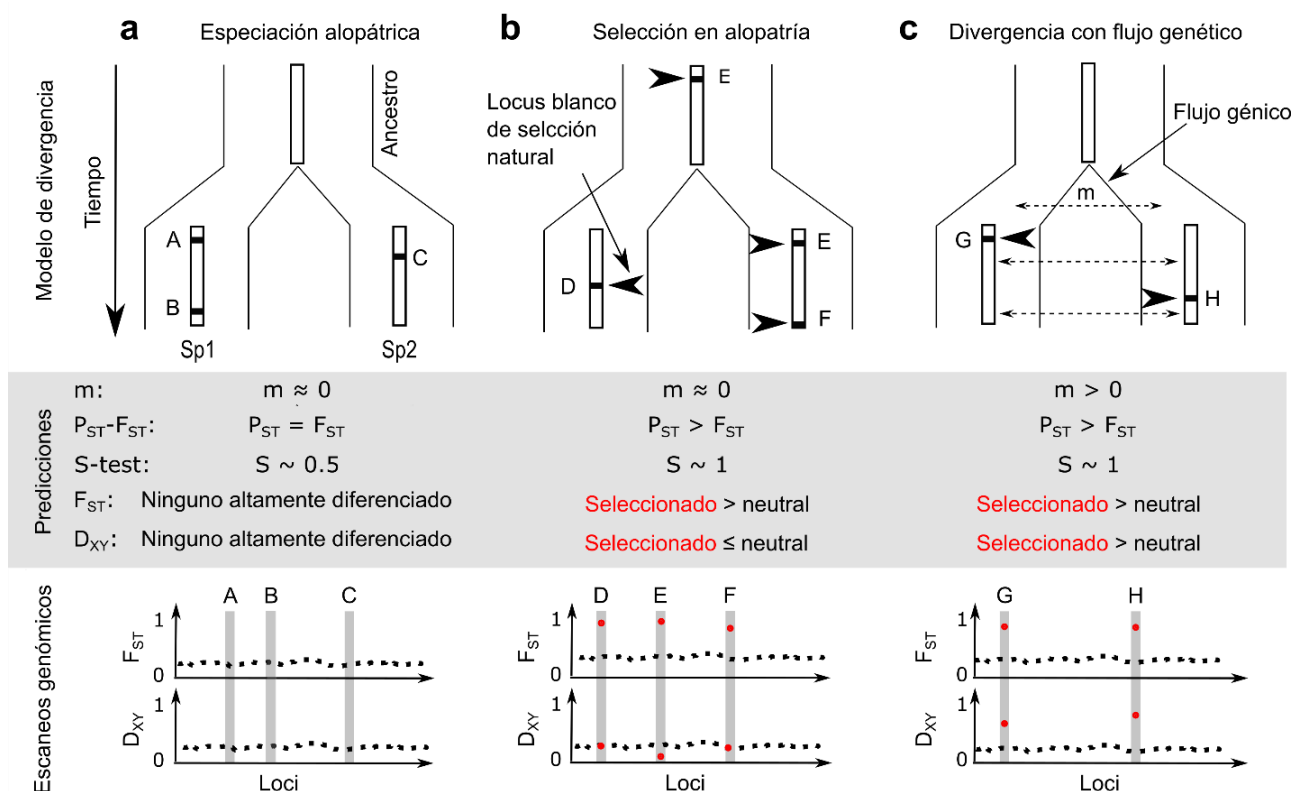


Figura 1. Modelos de divergencia de especies y predicciones basadas en datos genómicos y fenotípicos. Esbozamos cada modelo como una población ancestral que se divide en dos especies hijas (Sp1 y Sp2). Las barras horizontales en negro (en el recuadro "Modelo de divergencia") representan regiones genómicas que pueden ser afectadas por la selección natural (indicado por flechas). Las predicciones se basan en comparaciones de migración (m), divergencia fenotípica (P_{ST}) vs. divergencia genómica (F_{ST}) ($P_{ST} - F_{ST}$ y prueba S; Karhunen et al., 2013; Leinonen et al., 2013), y en la relación entre la divergencia relativa (F_{ST}) y absoluta (D_{XY}) de loci entre poblaciones (Cruickshank y Hahn, 2014; Irwin et al., 2018). También se representa la variación esperada de F_{ST} y D_{XY} en los escaneos genómicos. (a) Especiación alopatrica, donde las dos poblaciones hijas no intercambian migrantes durante el proceso, y se asume que la divergencia ocurre por deriva genética aleatoria. Los loci A, B y C divergieron por azar al igual que el resto del genoma, sin generar picos específicos en F_{ST} y D_{XY} . (b) Selección en alopatría, donde no hay flujo génico entre las poblaciones hijas, pero está presente la selección natural. La selección natural podría estar relacionada con la adaptación local que contribuyó a la divergencia inicial (loci D, E y F). (c) Divergencia con flujo génico, donde la selección natural actúa sobre los loci responsables de la divergencia en presencia de flujo génico (loci G y H). Las predicciones son tanto para divergencia primaria como secundaria (contacto).

Descartar o separar la plasticidad fenotípica de la ecuación no es trivial. Una herramienta clásica en el estudio de la adaptación local son los experimentos de jardines comunes (*common gardens* en inglés, Savolainen et al., 2013). Estos experimentos consisten en criar progenies de individuos extraídos de las poblaciones de interés bajo las mismas condiciones ambientales (normalmente *exsitu*), con el objetivo de controlar el efecto del ambiente sobre la variación fenotípica (de Villemereuil et al., 2016). En organismos no

modelo, realizar experimentos de jardines comunes es muy difícil tanto logística como económicamente, ya que implica reproducir a los individuos extraídos de la naturaleza y criar a la progenie en condiciones de laboratorio o seminaturales. Dado que esta alternativa habitualmente no es viable (por sus dificultades logísticas) para estudiar adaptación local en organismos no modelo, se recurre a métodos indirectos para descartar la plasticidad fenotípica. Una de estas formas es determinar la robustez de las pruebas de selección natural, como el método propuesto por Brommer (2011), donde se compara la variación fenotípica (P_{ST}) con la divergencia genómica neutra. Además, se recurre al estudio de correlaciones entre factores ambientales, fenotípicos y genéticos.

Sudamérica ofrece un escenario interesante para evaluar preguntas relacionadas con los modos de diversificación dado que posee una gran diversidad ambiental, extensos gradientes ambientales y barreras potenciales a la migración. Los bosques secos Chaqueños y andinos (desde ahora, cinturón de bosques secos Chaco-Andino) poseen una distribución geográfica extensa (Figura 2), abarcando un amplio rango altitudinal y climático, que se extiende desde la zona centro de Argentina, se eleva por las laderas andinas en dirección norte y alcanza la zona central de Perú. El cinturón de bosque seco Chaco-Andino es interrumpido en las laderas de los Andes por bosque lluvioso y semi caducifolio (yungas) y en las zonas bajas, por dos ríos principales: el Bermejo y el Pilcomayo. Algunas especies de aves distribuidos conjuntamente en esta área muestran divergencia fenotípica entre regiones, como por ejemplo entre zonas altas y tierras bajas, así como a ambos lados de los ríos mencionados (Brusquetti et al., 2018; Herzog y Kessler, 2002; Nores, 1992), lo que sugiere la acción de procesos evolutivos concertados. Ejemplos de estos taxones con diferencias fenotípicas (que en algunos casos incluso han llegado a considerarse subespecies) son: las especies hermanas *Asthenes baeri* (Chaqueña) y *Asthenes dorbignyii* (Andina), *Phytotoma rutila rutila* (Chaqueña) y *P. r. angustirostris* (Andina), *M. t. pectoralis* (Chaqueña) y *Microspingus torquatus torquatus* (Andina). Estos gradientes de condiciones bióticas y abióticas extremas (como por ejemplo de humedad y temperatura, así como la variación de la presión parcial de oxígeno) entre las tierras bajas y las montañas podrían estar impulsando la divergencia ecológica entre las poblaciones andinas y chaqueñas (Capítulo 2).

En este capítulo estudiamos al ave *Cranioleuca pyrrhophia* (Familia Furnariidae) para responder preguntas sobre el rol de la evolución con flujo genético en la diversificación de los organismos, y sobre la dinámica biogeográfica a lo largo del cinturón de los bosques secos Chaco-Andino. Este furnárido habita los estratos medios y altos en bosques secos, matorrales y espinal, y se distribuye por las provincias fitológicas del Monte, Espinal, Chaco, Campos y Bosques Secos Altoandinos (Figura 2). Posee tres subespecies: la subespecie *rufipennis*, que solo se la conoce por los especímenes tipo en La Paz, Bolivia (Remsen, 2020); *striaticeps*, que habitaría zonas andinas del centro y sur de Bolivia, desde Cochabamba, oeste de Santa Cruz, Chuquisaca y Tarija; y *pyrrhophia*, que se distribuye en la zona Sur de Bolivia (zonas bajas de Santa Cruz y Tarija), oeste de Paraguay, noreste y centro de Argentina, alcanzando el sur de la provincia de Río Negro y norte de Buenos Aires, extremo sureste de Brasil (Sur de Rio Grande do Sul) y Uruguay. La coloración de las rectrices centrales es la característica más conspicua que diferencia a las subespecies: son rojas en *striaticeps* y *rufipennis*, y marrón con rojo en la subespecie nominal (Remsen, 2020). Por otra parte, el jaspeado de la corona es más denso y contrastado hacia el oeste y se reduce gradualmente hacia el sureste de Brasil y Uruguay (Remsen, 2020), sin aparente relación con subespecies. La variación de plumaje aparenta ser clinal, siendo los ejemplares del sur más grisáceos en el dorso y más claros en el vientre (Remsen, 2020). La distribución de *Cranioleuca pyrrhophia* es continua, y no se aprecian barreras geográficas que separen a las subespecies. Esto, sumado a la variación fenotípica clinal, al menos en el plumaje, y que la especie se distribuye a lo largo de un gradiente ambiental, sugiere que un proceso de adaptación local y una incipiente especiación ecológica con flujo genético podría estar ocurriendo entre los extremos de la distribución (por ejemplo, entre las poblaciones de tierras altas de Bolivia y las de tierras bajas de Argentina).

El objetivo general de este capítulo es evaluar el rol de la evolución con flujo genético en la conformación de la variación fenotípica a lo largo de un gradiente ambiental, y en particular el de la región del cinturón de bosques secos Chaco-Andino, utilizando como modelo de estudio a *Cranioleuca pyrrhophia*. Buscamos responder las siguientes preguntas: a) ¿Cuáles son los patrones geográficos de variación fenotípica y genética?, b) ¿Está dicha variación correlacionada con variables climáticas o geográficas?, c) ¿Existen poblaciones diferenciadas

genómicamente?, d) existen barreras al flujo genético? y, e) ¿es la diferenciación entre las poblaciones producto de selección natural en presencia de flujo genético?

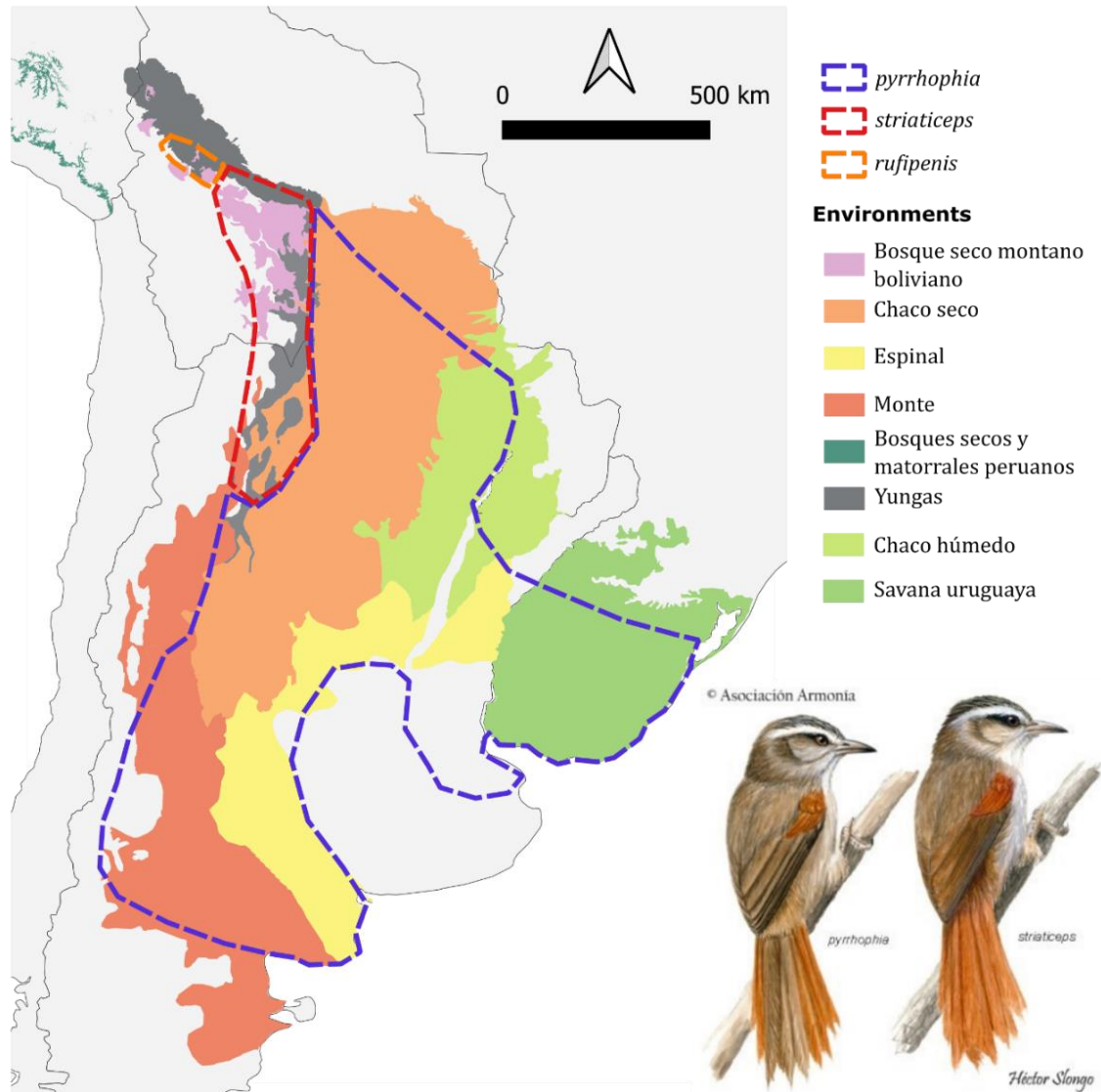


Figura 2. Distribución de *Cranioleuca pyrrhophia* y ecorregiones que habita. El cinturón de bosques secos Chaco-Andino se destaca en colores cálidos, está compuesto por los bosques secos bolivianos, Chaco seco, Espinal y Monte. El mapa de distribución de las ecorregiones fue tomado de Dinerstein et al. (2017). Las subespecies *striaticeps* y *pyrrhophia* se diferencian principalmente por el carácter coloración de las rectrices centrales: rufo en *striaticeps* y mayoritariamente marón en *pyrrhophia*. La distribución de *striaticeps* marcada en el mapa delimita el área que ocupan los ejemplares con rectrices centrales rufas analizados en este estudio. Este carácter diagnóstico, y no la distribución señalada en la literatura, fue lo que escogimos para determinar la identidad subespecífica de cada ejemplar. Las ilustraciones fueron tomadas de Herzog et al., (2016).

Se espera que la adaptación local a lo largo de gradientes ambientales genere clinas fenotípicas que correlacionen con la variación ambiental (Antoniazza et al., 2010), las cuales proveen evidencia del rol de la selección natural en la divergencia fenotípica (Coyne y Orr, 2004; James, 1970, p. 199; Mayr, 1963). Las reglas ecogeográficas describen que múltiples organismos siguen un patrón similar en distintas partes del mundo, lo cual indica un proceso evolutivo concertado que depende de factores similares (Gaston et al., 2008). Por ejemplo, la regla de Bergmann postula que existe una tendencia de las poblaciones de especies homeotermas a tener tamaños corporales mayores en climas fríos o en altitudes mayores (Bergmann, 1847), en la cual la ventaja termorreguladora se obtiene al reducir la razón superficie corporal vs volumen. La regla de Bergmann es comúnmente observable en aves, particularmente a nivel intraespecífico (Ashton, 2002). Esperamos que exista un gradiente morfológico entre las zonas bajas y las zonas altas Andinas, siendo los ejemplares provenientes de mayor altitud de mayor tamaño. Por otra parte, la regla de Gloger describe la correlación entre los colores de mamíferos y aves y las condiciones climáticas en las que habitan (Gloger, 1833), específicamente, sobre el contenido de eumelaninas y feomelaninas depositadas en pelos o plumas. Las eumelaninas confieren colores negros y grises, mientras que las feomelaninas brindan colores marrones y rufos (Galván y Wakamatsu, 2016). La regla de Gloger predice que las eumelaninas prevalecen en climas húmedos y cálidos (dando colores más oscuros), mientras que las feomelaninas en cálidos y secos (colores más rufos) (Delhey, 2017). Si bien en general se presume que las diferencias de coloración en muchos casos son resultado de la selección sexual (Darwin, 1871), en organismos sin dicromatismo sexual como en los Furnáridos (Marcondes y Brumfield, 2019; Winkler et al., 2020) se espera que la variación sea producida por el ambiente. De acuerdo con esto, esperamos que los ejemplares del oeste del área de distribución de *C. pyrrhopia* sean más rufos y más claros que aquellos de más al este, debido a que la primera región es la más cálida y seca.

Para discriminar entre los diferentes procesos evolutivos que podrían estar ocurriendo en las poblaciones de la especie de estudio, se recurrirá a comparar la variación fenotípica con la variación genómica neutra, además de comparar los patrones de divergencia genómica absoluta y relativa, y calcular la tasa de migración (Figura 1). Si la selección natural ha impulsado la variación geográfica de un rasgo fenotípico, se espera que no se correlacione con la divergencia en los marcadores genéticos neutrales (Brommer, 2011;

Whitlock y Guillaume, 2009). Por el contrario, si el rasgo diverge por deriva neutral, la variación en el fenotipo y los marcadores genéticos neutrales serían similares. Para probar esta predicción, utilizaremos la prueba S y la prueba $P_{ST}-F_{ST}$. Bajo alopatría, predecimos una ausencia (o baja cantidad) de loci con diferenciación extrema absoluta ni relativa. En la selección en alopatría pura, se espera que los loci seleccionados presenten valores altos de F_{ST} , pero muestren valores de D_{XY} similares a los loci neutrales (o ligeramente más bajos en aquellos loci sometidos a selección recurrente) (Irwin et al., 2018). En el modelo de divergencia con flujo genético, esperamos que D_{XY} y F_{ST} sean más altos en las regiones bajo selección y D_{XY} y F_{ST} bajos en las no seleccionadas (Irwin et al., 2018). Para probar esta predicción, calcularemos y compararemos los valores F_{ST} y D_{XY} de cada loci. Esperamos que la migración será cercana a cero en ambos escenarios alopátricos y superior a cero en el modelo divergente con flujo de genes, por lo que estimaremos la migración entre subespecies.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de datos fenotípicos

Estudiamos 180 especímenes de museo (en total, considerando tanto los ejemplares de los que se extrajeron medidas morfométricas como de coloración), adultos, de ambos sexos y de toda el área de distribución (Figura 3), con excepción de los especímenes tipo de la subespecie *rufipennis*, los cuales son los únicos ejemplares disponibles de esta subespecie. Los museos visitados fueron: el Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (Buenos Aires, Argentina), el Instituto Argentino de Investigaciones de Zonas Áridas (Mendoza, Argentina), el Museo Nacional de Historia Natural (Montevideo, Uruguay), el Museu de Ciências Naturais de Porto Alegre (Porto Alegre, Brasil), el Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS (Porto Alegre, Brasil), el Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado (Santa Cruz, Bolivia), la Colección Boliviana de Fauna (La Paz, Bolivia), y la University of Washington's Burke Museum (Washington, Estados Unidos).

Medimos seis rasgos morfológicos de 174 especímenes: longitud del pico (BLT), longitud del pico desde la narina (BLN), ancho del pico (BW), profundidad del pico (BD), longitud del ala (WL) y longitud del tarso (TS). MJRC midió los rasgos morfológicos del 94% de los individuos utilizando un calibre Mitutoyo con una precisión de 0,05 mm, mientras que GSC tomó las mediciones en los restantes individuos. No incluimos la masa corporal

en el conjunto de datos morfológicos porque solo la mitad de los ejemplares proporcionaban esta información en los catálogos. La mayoría de los sitios de colecta de los ejemplares de los que se tomaron medidas morfológicas son diferentes de los sitios de colecta de datos genómicos. Aplicamos un análisis de componentes principales (PCA) sobre las medidas morfológicas para reducir los patrones de variación, con las medidas de los rasgos previamente normalizados a media cero y varianza 1 (Z-scores). Ver cargas de cada variable en la Tabla A3.1. PC1 representó el 40% de la variación y fue usado como un *proxi* del tamaño corporal dado que todas las variables cargan en el mismo sentido. Para los análisis de selección sobre la morfología trabajamos con esta variable, así como con las variables crudas (en total siete variables morfológicas).

Medimos la reflectancia de siete parches de plumaje en 134 ejemplares, colectados entre los años 1894 y 2016 (Figura 3). Elegimos solo aquellos especímenes adultos en excelente estado de preservación y con el dato fecha de colecta. Utilizamos un espectrofotómetro Ocean Optics USB4000 (Ocean Optics Inc., Dunedin, Florida) y una fuente de luz de xenón pulsado PX-2 (rango efectivo de emisión de 220 a 750 nm) para medir la reflectancia en el rango de longitud de onda visible. Se calibró contra un estándar blanco de sulfato de bario antes de la medición de cada individuo. El plumaje fue iluminado y los datos de reflectancia fueron recolectados con una sonda QR400-7-UV-BX de Ocean Insigth alojada en un soporte prismático que se sostuvo contra el parche elegido de la piel de estudio. La sonda se mantuvo con un ángulo de 90° con respecto a la superficie del parche de plumaje. El diámetro del área circular medida fue de aproximadamente 6 mm y la distancia entre la sonda y el plumaje fue constante en todas las mediciones. Medimos la reflectancia de siete parches de plumaje: corona, espalda, timoneras centrales, timoneras externas, garganta, pecho y cobertoras. Los parches fueron elegidos en función a las zonas que a priori observamos eran más variables entre individuos, o que definen variación entre subespecies. Tomamos el promedio de tres réplicas de lecturas de cada parche de plumaje en cada espécimen y utilizando el paquete *pavo* (Maia et al., 2019) en R (Somanathan et al., 2004).

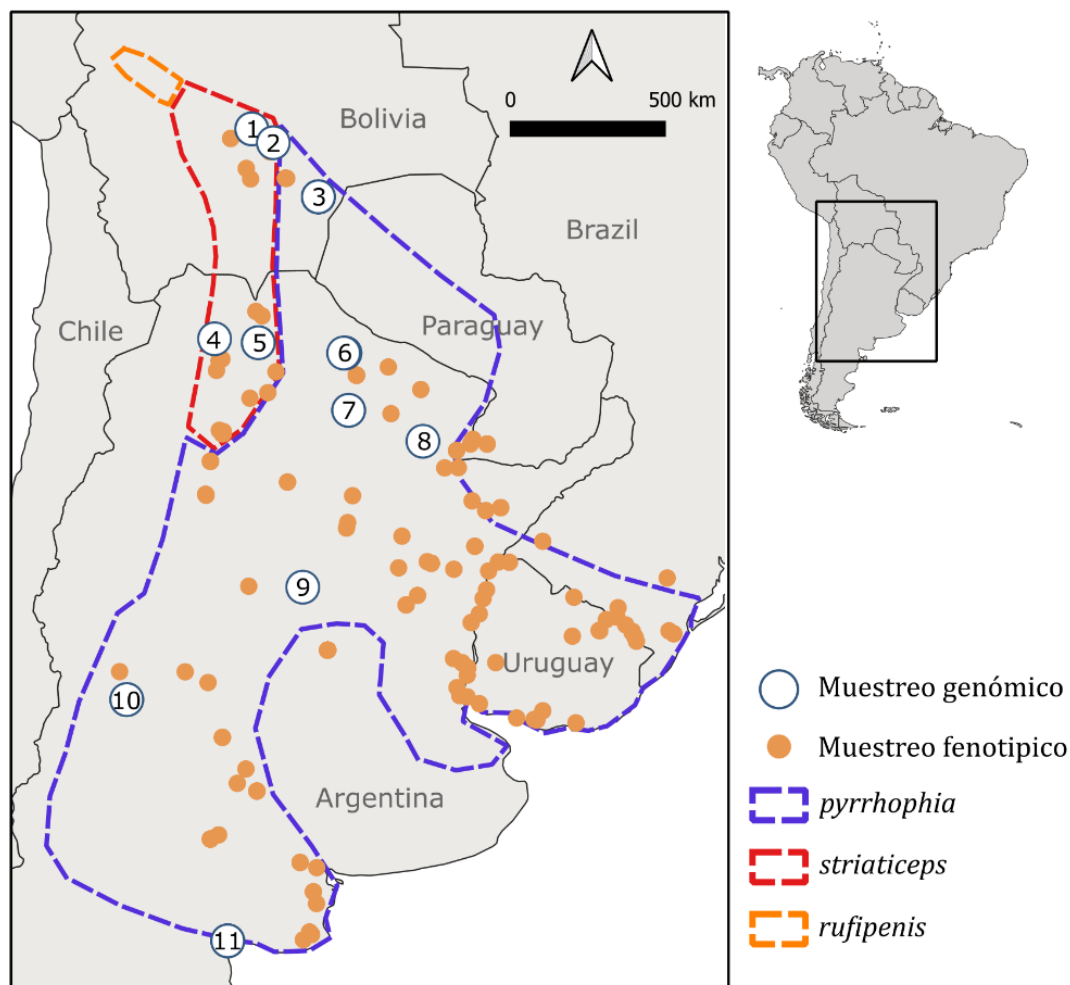


Figura 3. Distribución y localidades de muestreo de *Cranioleuca pyrrhophia*. Se muestra el área de distribución de las tres subespecies de *Cranioleuca pyrrhophia* con líneas punteadas coloreadas, modificado de (BirdLife International y Handbook of the Birds of the World, 2022). La distribución de *striaticeps* se redibujó en base a la distribución de ejemplares con coloración roja en las rectrices centrales, carácter diagnóstico de esta subespecie, depositados en las colecciones revisadas. Se indican con círculos de colores las localidades de los ejemplares de los cuales se extrajeron datos fenotípicos (morfometría y coloración). Con círculos blancos, se indican las localidades de colecta de datos genómicos, y los números dentro de los mismos indican la localidad, detallada en Tabla 1.

Para cada parche de plumaje en cada espécimen, calculamos las 24 variables de *pavo* con el comando *summary*, y extrajimos la reflectancia relativa media en todo el rango espectral entre 300 nm a 700 nm (variable B2), un proxy de la cantidad de eumelanina depositada en las plumas (Galván y Wakamatsu, 2016), y la contribución relativa de la luz total reflejada entre 605 nm y 700 nm (S1R). Valores mayores de esta variable representan colores más rojos, un proxy de la cantidad de feomelanina depositada en el plumaje (Galván y Wakamatsu, 2016). Además, obtuvimos el Componente principal 1 de 18 variables de coloración, que explica

entre 43 y 49% de la varianza (dependiendo del parche) (Tabla A3.2). Se descartaron seis variables relacionadas con la reflectancia del UV.

Variación geográfica y predictores ambientales de los rasgos fenotípicos

Estudiamos la variación de los rasgos fenotípicos en una primera instancia evaluando si existe diferencias morfológicas y de coloración entre machos y hembras. En los caracteres morfométricos, si bien encontramos diferencias entre sexos, esta fue baja (3%, Figura A3.1), por lo que no incorporamos esa variable en los análisis posteriores. Tampoco encontramos diferencias entre sexos en ningún parche de coloración y para ninguna variable colorimétrica (Figura A3.1), por lo que se prosiguió con los análisis de coloración con todos los individuos sin discriminar entre sexos en el resto del estudio.

Tanto para las variables morfológicas como las de coloración, analizamos la existencia de grupos discretos en la distribución utilizando Modelos Normales Mixtos (NMM) siguiendo la metodología propuesta por Cadena et al. (2017). En morfología, utilizamos los datos crudos y el PC1, mientras que en coloración usamos las variables S1R, B2 y PC1 para cada parche. Por último, estudiamos la presencia de clinas latitudinales o longitudinales estudiando la correlación entre estas variables y las variables fenotípicas. Del mismo modo exploramos el posible efecto de la edad de la piel en los caracteres de coloración (Armenta et al., 2008). Por último, realizamos un test de autocorrelación espacial (Cliff y Ord, 1970; Moran, 1950) para evaluar la existencia de agrupamientos o patrones en los caracteres fenotípicos que no fueran detectados por los análisis anteriores.

Evaluamos el efecto de la distancia geográfica, las variables ambientales (temperatura y precipitación) y la altitud sobre las variables morfológicas y de coloración usando *Multiple Matrix Regression with Randomization* (MMRR, (Wang, 2013; Wang y Bradburd, 2014) y partición de la varianza vía *commonality analysis* (Prunier et al., 2015). Este método permite determinar la contribución relativa de cada predictor en la disparidad morfológica (matriz de respuesta), teniendo en cuenta la colinealidad entre las matrices predictoras. El *commonality analysis* divide la varianza general explicada por un modelo de regresión lineal múltiple (es decir, su R^2) en las contribuciones únicas de cada variable predictora y las contribuciones comunes de todas las posibles combinaciones de variables predictoras (Prunier et al., 2015). Para cada predictor, un efecto único (U)

representa la cantidad de varianza explicada solo por ese predictor, así como un efecto común (C) que representa la proporción de varianza que puede explicarse por ese predictor y uno o más de los otros predictores juntos. El efecto total (U + C) representa la contribución total de un predictor independientemente de la colinealidad entre otros predictores (Prunier et al., 2015).

Para la obtención de la métrica de disparidad ambiental trabajamos con las 19 variables de BioClim (<http://www.worldclim.org>, Hijmans et al., 2005) con datos climáticos del presente con una resolución de 0,5 arcsec (30s). Los datos climáticos se extrajeron para cada localidad y se obtuvo el PC1 de las variables de temperatura (TEMP) (BIO1 a BIO11) y el PC1 de las variables de precipitación (PREC) (BIO12 a BIO19), y también utilizamos un PC1 de todas las variables ambientales (CLIM). Las distancias geográficas pareadas entre los sitios de muestreo fueron calculadas como la distancia más corta utilizando el paquete *geosphere* (Hijmans et al., 2015). El dato de altitud (ALT) se obtuvo extrayendo el valor de altitud del modelo digital de elevación de WorldClim 2.1 para cada localidad de colecta. En todos los casos, las matrices de distancia fueron calculadas usando distancias Euclídeas entre todos los pares de medidas normalizadas usando la función *dist* del paquete *stats*.

Datos genómicos: muestreo y genotipificación.

Estudiamos 24 especímenes de *Cranioleuca pyrrhophia* de 11 localidades abarcando las dos subespecies de mayor rango de distribución (Figura 3, Tabla 1). No accedimos a muestras de la subespecie *rufipennis*, la cual solo es conocida por sus ejemplares tipo. Purificamos el ADN genómico a partir de músculo o sangre con el kit de purificación de sangre y tejidos DNeasy (Qiagen). Muestreamos marcadores genómicos mediante secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción de doble digestión (ddRADseq; Peterson et al., 2012) siguiendo el enfoque descrito por Peterson et al. (2012) y descrito en Thrasher et al. (2018). En resumen, digerimos las muestras con las enzimas de restricción SbfI y MspI (New England Biolabs, MA) y ligamos el ADN digerido a adaptadores. Los adaptadores 5' incluyeron los códigos de barras (*barcodes*) e identificaron a cada muestra individual, mientras que el *barcode* 3' fue común a grupos de 20 muestras. Agrupamos aquellas muestras con *barcode* 5' únicos y seleccionamos solo los fragmentos de ADN con un tamaño comprendido en

el rango de 400 a 700 pb. Las librerías se enriquecieron y los adaptadores TruSeq se incorporaron realizando 13 ciclos de PCR. Finalmente, las librerías fueron combinadas en proporciones equimolares y secuenciadas en un carril de Illumina HiSeq 2500, obteniendo secuencias de 101 pb de extremo único (*single-end*).

Demultiplexamos, recortamos, filtramos las lecturas crudas, ensamblamos loci y extrajimos polimorfismos de nucleótido único (SNP) con *ipyrad* v.0.9.84 (Eaton y Overcast, 2020). Los parámetros utilizados para el *pipeline* de *ipyrad* y las condiciones adicionales de filtrado de SNP para VCFtools (Danecek et al., 2011) se encuentran en el Tabla A2.2. Nuestros criterios para obtener el conjunto de datos final de RADseq fueron: a) excluir sitios con una puntuación de calidad (Q-score) inferior a 33; b) excluir loci con más del 20% de datos faltantes; c) excluir los SNPs de baja frecuencia alélica estableciendo una frecuencia alélica mínima de 0,05; d) mantener solo SNPs bialélicos; e) mantener SNPs con cobertura mínima de profundidad de 6x. Este conjunto de parámetros de filtrado se utilizó para eliminar SNPs que podrían ser el producto de errores de secuenciación, ya que estos pueden crear sesgos en la inferencia de procesos demográficos (Linck y Battey, 2019; O’Leary et al., 2018; Willis et al., 2017). Luego, seleccionamos aleatoriamente un SNP por locus, obteniendo un conjunto final de 6.443 SNPs no ligados (n = 24 muestras, tasa máxima de datos faltantes por individuo del 31,6%). Utilizamos este conjunto final de datos de ddRADseq para todos los análisis genéticos.

Estructura y parámetros poblacionales

En primer lugar, exploramos la estructura genética de la población con el conjunto de datos RADseq con PCA y STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Ejecutamos STRUCTURE por 500.000 generaciones (20% de *burn-in*), desde K = 1 hasta 8, y cinco iteraciones por K. Seguimos a (Evanno et al., 2005) para seleccionar el número de grupos que más se adapta a los datos y resumimos las corridas con el algoritmo *greedy* en CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007). También exploramos la diferenciación entre poblaciones con un Análisis de Componentes Principales (PCA), implementado con la función *snpgdsPCA* en el paquete *SNPRelate* (Zheng et al., 2012) en R.

Predictores de la variabilidad genética

Evaluamos la incidencia del aislamiento por distancia geográfica (IBD), y el efecto de las variables ambientales (IBE) y de la variación altitudinal en la divergencia genética entre los 24 individuos estimando las superficies efectivas de migración (EEMS; Petkova et al., 2016) y MMRR.

El análisis de EEMS permite evaluar el aislamiento por distancia, flujo génico y presencia de barreras geográficas. EEMS devuelve un mapa donde se indican las áreas consistentes con aislamiento por distancia, áreas con migración por encima del promedio (corredores, panmixia) y regiones con migración por debajo de la tasa promedio de migración (barreras). Este análisis tiene la ventaja de que es robusto frente a datos geográficos faltantes (Petkova et al., 2016). Configuramos los parámetros siguiendo el manual del programa (<https://github.com/dipetkov/eems>) e implementamos el análisis en *runeems_snps* utilizando una matriz pareada de disimilitud genética entre muestras calculada con 6443 SNPs. Los gráficos finales de EEMS se produjeron con *rEEMSSplots* v. 0.0.0.9 para R. Las condiciones del análisis final que permitieron tasas de aceptación de parámetros $> 10\%$ y $< 50\%$ fueron: $nDemes = 2.000$, $numMCMCIter = 2.000.000$, $numBurnIter = 1.000.000$, $numThinIter = 9.999$, $mSeedsProposalS2 = 1,1$, $qSeedsProposalS2 = 1,5$, $mEffctProposalS2 = 2,0$ y $qEffctProposalS2 = 0,09$. Ejecutamos múltiples réplicas para evaluar la robustez de la convergencia.

Realizamos un análisis de MMRR utilizando como variable dependiente la disimilitud genética entre individuos, o distancia genética 1-identity-by-state (IBS). Esta métrica (IBS) se define como la probabilidad de que los alelos extraídos al azar de dos individuos en el mismo locus sean iguales (Zheng et al., 2012, paquete *SNPRelate* en R). Como variables dependientes usamos: distancia geográfica, la diferencia de altitud, las variables de precipitación (PREC), de temperatura (TEMP) y las climáticas (CLIM), obtenidas de la misma forma que para el cálculo de MMRR de las variables fenotípicas.

Tabla 1. Muestras para el análisis genómico de *Cranioleuca pyrrhophia*. Los números en la columna “N. Localidad” se condicen con los números de localidad de la Figura 3. Las columnas “Categoría”, “Subespecie”, “STRK2” y “POP4” representan las diferentes clasificaciones de las localidades (y los individuos de cada una) usadas en los distintos análisis. “Categoría” diferencia las localidades por la altitud y región; “Subespecie” diferencia las localidades en función a la asignación a subespecie de los individuos que la componen (la asignación a subespecie siguió la coloración de las rectrices centrales); “STRK2” asigna las poblaciones según los resultados del análisis de STRUCTURE para K = 2 (explorando la importancia de la diferencia altitudinal como barrea a la dispersión). Por último, “POP4” separa las localidades según los resultados para K = 3, pero subdividiendo el agrupamiento de las muestras del centro sur de la distribución, de ente modo, AL: muestras de altitud de Bolivia, CN: centro norte, CS: centro sur, S: sur.

N. Localidad	N. de muestras	País	Localidad	Latitud	Longitud	Categoría	Subespecie	STRK2	POP4
1	1	Bolivia	Santa Cruz, Samaipata	-18,40	-63,83	BoHigh	<i>striaticeps</i>	BoAlt	AL
2	2	Bolivia	Santa Cruz, Camarapa	-18,01	-64,44	BoHigh	<i>striaticeps</i>	BoAlt	AL
3	6	Bolivia	Santa Cruz, Estancia Perforación	-19,92	-62,56	BoLow	<i>pyrrhophia</i>	Bajo	CN
4	1	Argentina	Jujuy, Volcán	-23,91	-65,48	ArHigh	<i>striaticeps</i>	Bajo	CN
5	2	Argentina	Jujuy, Palma Sola	-24,02	-64,25	ArHigh	<i>striaticeps</i>	Bajo	CN
6	3	Argentina	Formosa, Reserva Natural Formosa	-24,31	-61,81	ArLow	<i>pyrrhophia</i>	Bajo	CN
7	2	Argentina	Santiago del estero, Parque Nacional Copo	-25,92	-61,71	ArLow	<i>pyrrhophia</i>	Bajo	CN
8	1	Argentina	Chaco, Parque Nacional Chaco	-26,79	-59,62	ArLow	<i>pyrrhophia</i>	Bajo	CN
9	1	Argentina	Córdoba, La Para	-30,89	-63,00	ArLow	<i>pyrrhophia</i>	Bajo	CS
10	2	Argentina	Mendoza, Ñacuñan	-34,05	-67,95	ArLow	<i>pyrrhophia</i>	Bajo	CS
11	3	Argentina	Rio Negro, Las Grutas	-40,83	-65,11	ArLow	<i>pyrrhophia</i>	Bajo	S

Estimación de la tasa de migración

Estimamos el tiempo de divergencia (T_{div}), el tamaño efectivo de la población (N_e) y el flujo genético (m) utilizando un modelo completo de aislamiento con migración coalescente en G-PhoCS 1.3 (Gronau et al., 2011) y 9.636 loci completos. Para estimar los parámetros genéticos de la población, dividimos las muestras en tres poblaciones siguiendo los resultados de STRUCTURE $K = 3$: las tierras altas bolivianas (AltBol, $n = 3$), las tierras bajas de Bolivia y Norte de Argentina (NorArg-Bol, $n = 15$) y las muestras del sur (SurArg, $n = 6$). El árbol de entrada fue (AltBol),(NorArg-Bol, SurArg). Realizamos seis corridas con alrededor de 1.100.000 ciclos cada una y una fase de *burn-in* del 20%. Verificamos la convergencia con el valor ESS y los perfiles de variación de las cadenas de Markov en Tracer v. 1.6 (Rambaut et al., 2018). El modelo final se obtuvo combinando aquellas cadenas de Markov que convergieron. Según la documentación de G-PhoCS, convertimos los parámetros del modelo a unidades de individuos o tiempo, asumiendo una tasa de mutación de $4,6 \times 10^{-9}$ sustituciones por sitio por generación (Smeds et al., 2016) y un tiempo de generación de 1,14 años, de acuerdo a la edad de primera reproducción (Bird et al., 2020).

Detección de loci no neutrales

Realizamos dos análisis para detectar SNPs *outliers* (considerados como candidatos de marcadores no neutrales), a ser usados en las pruebas de selección natural sobre rasgos cuantitativos (comparaciones de S -test y P_{ST} - F_{ST}). En primer lugar, utilizamos el paquete *pcadapt* 4.03.3 (Luu et al., 2017), que detecta SNPs altamente diferenciados en todo el genoma, potenciales candidatos de adaptación local, que tiene en cuenta la estructura poblacional. Se identificaron como *loci outlier* aquellos que tenían al menos un SNP seleccionado como *outlier*. Para ejecutar *pcadapt*, evaluamos el número óptimo de grupos ($K = 1$ a 10) utilizando la regla de Cattell (Cattell, 1966). Conservamos $K = 3$ y obtuvimos una lista de SNPs candidatos utilizando el procedimiento de Benjamini-Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995) con una tasa esperada de falsos positivos (*false discovery rate*) de $\alpha = 0,1$. En segundo lugar, ejecutamos Modelos Mixtos de Factores Latentes implementados en el paquete *LEA* 3.6.0 (*Latent factors mixed models*, Frichot y François, 2015) para detectar SNPs asociados con variables climáticas teniendo en cuenta la estructura poblacional subyacente (factores latentes). Usamos como supuesto que la asociación con el clima indica desviación de la neutralidad. Realizamos cinco análisis

MCMC independientes con un factor latente de $K = 3$ (de acuerdo con los resultados de STRUCTURE y PCA), utilizando la elevación y las 19 variables ambientales de Bioclim. Utilizamos el procedimiento de Benjamini-Hochberg con una corrección de tasa de falsos descubrimientos del 0,1. Para el MCMC, ejecutamos 100.000 iteraciones y un *burn-in* de 50.000.

Test de selección sobre rasgos cuantitativos

Para evaluar las predicciones de variación de rasgos fenotípicos de la Figura 1, aplicamos la prueba S y la comparación $Q_{ST}-F_{ST}$ con los marcadores genéticos no outliers, sobre el color del plumaje y los rasgos morfológicos. La coloración del ave en estudio no es de variación discreta, posee colores basados en melanina (marrones y rufos), y por ende se considera es de base cuantitativa y apta para este tipo de análisis (Burri et al., 2015; Roulin y Ducrest, 2013). La Prueba S tiene mayor capacidad para detectar selección en conjuntos de datos pequeños o con un número bajo de poblaciones (Karhunen et al., 2013). El S-test utiliza el estadístico S, que varía de 0 a 1, y se interpreta de la siguiente manera: $S = 0,5$ indica deriva genética aleatoria, $S < 0,05$ sugiere selección natural estabilizadora con un nivel de credibilidad del 95%, y $S > 0,95$ indica selección natural divergente robusta en ese nivel de credibilidad (Ovaskainen et al., 2011). Para realizar el S-test, obtuvimos la matriz de coancestría poblacional con SNPs neutrales no ligados (5268 SNPs no ligados) en RAFM (Karhunen y Ovaskainen, 2012) para R, utilizando 50.000 iteraciones con la función AFM. Realizamos la prueba con la matriz de coancestría y una matriz de rasgos fenotípicos en *driftsel* (Karhunen et al., 2013), utilizando 10.000 iteraciones para el algoritmo MCMC.

Para aplicar la comparación $Q_{ST}-F_{ST}$, se aproximó el Q_{ST} mediante P_{ST} , que se obtiene a partir de los datos fenotípicos observados y representa el nivel de divergencia de un rasgo cuantitativo que está determinado principalmente por efectos genéticos aditivos (Brommer, 2011; Leinonen et al., 2008). Si la divergencia morfológica se debe a la deriva genética, P_{ST} (divergencia de rasgos cualitativos) debería ser igual a F_{ST} (divergencia genómica neutra). Si P_{ST} es mayor o menor que F_{ST} , se apoya la selección diversificadora o balanceadora, respectivamente. Para calcular P_{ST} , se estimaron los componentes de varianza para cada carácter dentro y entre poblaciones (ver métodos capítulo X), aplicando la formula:

$$P_{ST} = \frac{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2}{\frac{c}{h^2} \sigma_b^2 + 2\sigma_w^2}$$

La heredabilidad y la proporción de la varianza total debida a efectos genéticos aditivos entre poblaciones son desconocidos y no es posible de calcularlos de manera empírica utilizando esta aproximación, sino que se debe recurrir a experimentos de jardines comunes. Por esta razón, usamos un análisis de robustez sugerido por (Brommer, 2011) e implementado en el *script* para R (este trabajo, disponible en https://github.com/Glaucidium/PST_FST_Brommer2011), que consiste en asignar valores entre 0,01 y 2 a dicha constante y estimar el valor de P_{ST} para cada caso. La comparación se realiza evaluando si los intervalos de confianza de P_{ST} y F_{ST} se superponen cuando $\frac{c}{h^2} = 1$. En los casos en que los intervalos de confianza de P_{ST} y F_{ST} no se superponen, se evalúa el $\frac{c}{h^2}$ crítico, que representa el valor de $\frac{c}{h^2}$ donde los intervalos de confianza de P_{ST} y F_{ST} si se superponen. Seguimos a (Brommer, 2011) y adoptamos como indicativo de resultados robustos un $\frac{c}{h^2}$ crítico $\leq 0,2$, mientras que cuando $0,3 > \frac{c}{h^2}$ crítico $> 0,2$, interpretamos los resultados como borderline. El F_{ST} global se estimó con el método de Weir y Cockerham (1984) y su intervalo de confianza del 95% con Hierfstat (Goudet et al., 2022).

Realizamos pruebas de selección sobre tres modelos de divergencia (agrupamientos) de muestras: 1) subespecies *striaticeps* y *pyrrhophia* (i.e., SSP), 2) siguiendo el agrupamiento propuesto por STRUCTURE $K = 2$ (i.e., STRK2) y, 3) cuatro réplicas poblacionales (i.e., POP4), definido de acuerdo una partición balanceada de muestras genéticas y morfológicas. Para asignar las muestras fenotípicas a cada población en cada agrupamiento, se siguieron las siguientes pautas: a) para el caso de SSP, cada ejemplar se asignó a su subespecie de acuerdo a la coloración de las rectrices centrales (Figura 2); b) en caso de STRK2, se asignaron a la población de altura en Bolivia aquellos individuos colectados a más de 800 msnm y a la población de zonas bajas las restantes muestras (incluyendo las de zonas altas de Argentina), quitando del conjunto de datos los ejemplares de zonas de altitud intermedia en Bolivia (dado que sería arbitrario asignarlos a una u otra población); finalmente c) para POP4, a modo de equiparar los tamaños poblacionales para los cálculos de varianza, definimos una población de tierras altas de Bolivia y tres poblaciones en las zonas norte, centro y sur

de Argentina, básicamente respetando el resultado de $K = 3$ de STRUCTURE y separando la población más grande (la de sur de Bolivia y Argentina excepto zona Sur). Para asignar las muestras a dichas poblaciones, obtuvimos los centroides de cada grupo genético, trazamos polígonos de Voronoi utilizando los centroides y asignamos las muestras fenotípicas a los correspondientes polígonos usando QGIS (QGIS Development Team, s. f.). De este modo, solo utilizamos ejemplares dentro de un radio de 400 km de distancia de la muestra genética más cercana, para evitar sesgos.

Modelos alternativos de divergencia

Para evaluar las predicciones de la Figura 1, comparamos el promedio de D_{xy} entre conjuntos de loci identificados como altamente diferenciados y los no diferenciados utilizando el paquete *PopGenome* 2.7.5 (Pfeifer et al., 2014). Consideramos loci altamente diferenciados aquellos con $F_{ST} \geq 0,2$ (Stene et al., 1993). Usamos la estructura poblacional del resultado de STRUCTURE $K = 2$, que representó los extremos de variación genómica dentro de la especie, entre tierras altas de Bolivia y tierras bajas de Argentina. Utilizamos 1.000 réplicas de *bootstrap* para obtener intervalos de confianza del 95% de F_{ST} en 'StAMPP' (Pembleton et al., 2013).

RESULTADOS

Variación geográfica de los rasgos fenotípicos

Cranioleuca phyrrophia presentó bajas diferencias entre machos y hembras en los caracteres BD (Test de Wilcoxon, $p = 0,004$) y WL (ANOVA: $WL \sim \text{Sexo}$, $p = 0,005$) en rasgos morfométricos (Figura A3.1). En estos caracteres, los machos tuvieron medidas 3% mayores que las hembras. La variable sexo no se utilizó entonces como un factor en los análisis posteriores para dichas variables morfológicas, porque consideramos que la diferencia es baja. Por otra parte, para las variables de coloración (Figura A3.1) no encontramos diferencias significativas entre sexos en ninguno de los parches y variables colorimétricas.

En relación a las variables morfológicas, el análisis de NMM no encontró grupos discretos, ya sea usando los componentes principales o los datos crudos. Por otro lado, en relación a coloración, el análisis de NMM encontró grupos discretos. El parche de timoneras centrales mostró dos grupos diferentes que agruparon los ejemplares con rectrices centrales rojas o con rectrices centrales marrón grisáceas. La variable

de coloración S1R fue la que mayor importancia tuvo a la hora de separar los grupos (Figura A3.2 y A3.3). Los restantes parches y variables no formaron agrupamientos con coherencia geográfica ni se asociaron con ninguna variable geográfica (latitud, longitud o elevación).

Algunas variables morfológicas y de coloración presentaron baja a moderada correlación con la latitud (Tabla A3.3, $\text{Corr} < 0,22$, para las variables morfológicas; $\text{Corr} < 0,42$ para las variables de coloración). Solo el parche Timoneras centrales mostró correlación moderada ($\text{Corr} \geq 0,591$) con dos variables de coloración. En el caso de las variables morfológicas y su relación con longitud, se observó una correlación moderada en los caracteres TS ($\text{Corr}_{\text{Spearman}} = 0,464$) y BW ($\text{Corr}_{\text{Pearson}} = 0,473$). Además, encontramos que estos caracteres poseen autocorrelación espacial alta en el caso de TS (índice de Moran = 0,705, $p = 7 \times 10^{-14}$) y moderada en BW (índice de Moran = 0,397, $p = 1 \times 10^{-5}$). En el caso de las variables de coloración y su relación con longitud, solo encontramos correlación moderada para el caso de la métrica B2 de la Corona. La edad de la piel no tuvo efecto importante y significativo sobre la mayoría de las variables de coloración ($R^2 < 0,1$), excepto para el parche Garganta, en la que la edad de la piel explicó 19% de la variación en S1R ($R^2 = 0,187$, $p\text{-valor} = 5 \times 10^{-7}$) y 20% en PC1 ($R^2 = 0,197$, $p\text{-valor} = 2 \times 10^{-7}$) (Tabla A3.4). Por consiguiente, usamos edad de la piel como co-factor en los análisis posteriores para el parche Garganta.

Predictores ambientales de la variación fenotípica.

En relación a la variación morfométrica de *C pyrrhophia*, el conjunto de predictores geográficos y climáticos no logró explicar más de un 10% de la variabilidad de cada rasgo individual (el modelo completo de regresión múltiple no paramétrica es: $\text{Rasgo} \sim \text{GEO} + \text{ELE} + \text{PREC} + \text{TEMP} + \text{CLIM}$, $p < 0.02$ para todos los casos). Ver Tabla A3.5 en Anexo 3 por resultados completos.

En el caso de las variables de coloración, solo se observó un efecto considerable ($R^2 > 0,5$) de las variables ambientales en los parches de coloración de las timoneras (Timoneras centrales y Timoneras externas) (Tabla A3.6). Específicamente, para las variables S1R y PC1, el modelo completo explicó 59% y 49% de la varianza total, respectivamente. En Timoneras centrales, ALT fue la variable ambiental más importante,

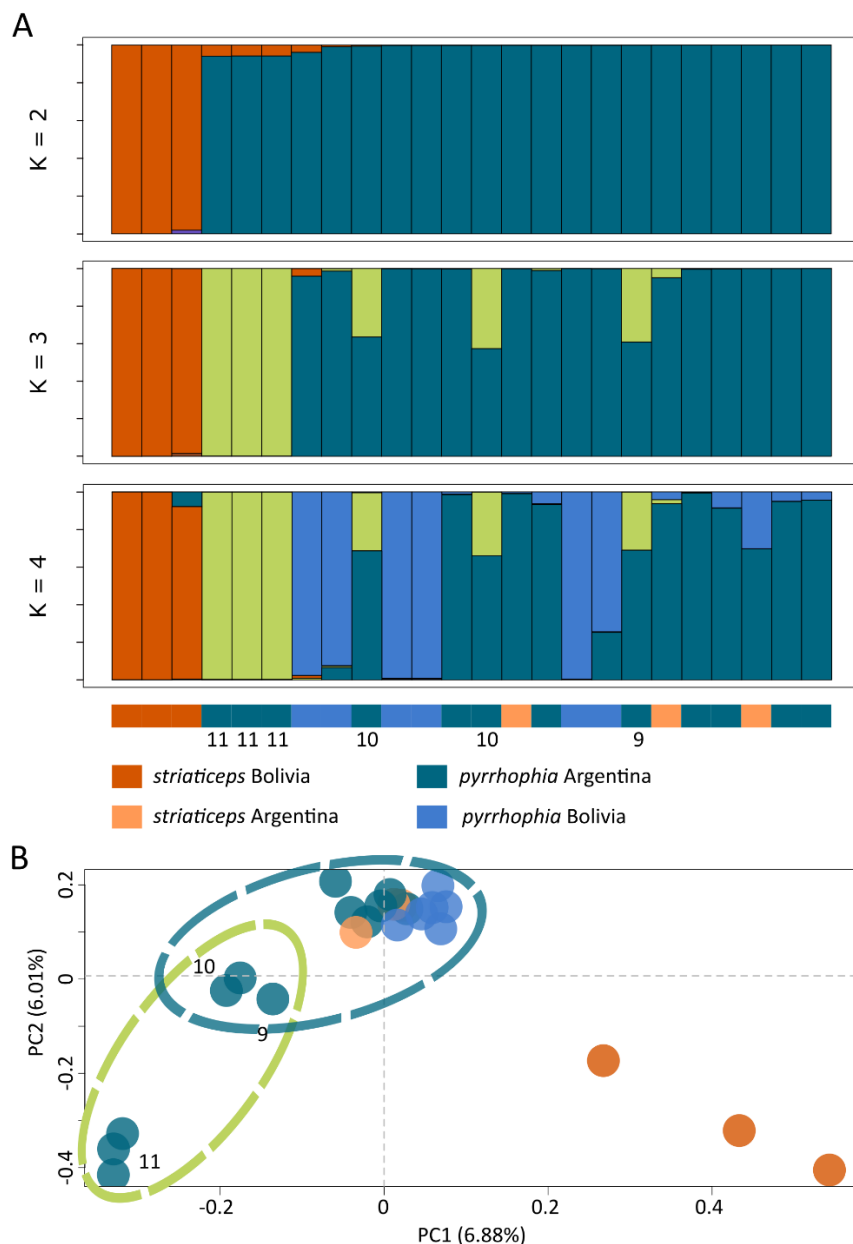


Figura 4. Análisis de la estructura genética poblacional de *Cranioleuca pyrrhophia* basado en 6443 SNPs no ligados. A) Resultados de STRUCTURE para $K = 2$ a 4. $K = 3$ fue el seleccionado por el método Evano. La fila de cuadrados de colores bajo todos los gráficos indica la identidad subespecífica de cada individuo, referenciada debajo. La fila de números indica a cuál población pertenece la muestra (según Tabla 1). No se recuperan las subespecies en ninguno de los K , y en cambio los ejemplares colectados en Rio Negro, Argentina (amarillo, localidad 11) forman una población separada y las muestras de regiones intermedias (poblaciones 9 y 10) parecen ser híbridos entre la población del norte y la del sur. (B) Análisis de componentes principales. Los colores se corresponden con la referencia indicada. Los ejemplares del sur (Rio Negro) se demarcan con un óvalo amarillo.

seguida de GEO y TEMP para explicar la variación en S1R, y la misma relación se mantuvo en PC1. En el caso de las Timoneras externas, el modelo completo explicó 24% de la varianza en PC1, y ELE nuevamente fue la

variable ambiental que mejor explicó esta relación. También se encontró un efecto menor de variables ambientales sobre la coloración del dorso del ave (variable Espalda), donde el PC1 de la coloración tuvo baja asociación a altitud, en concordancia con el resultado previo con las timoneras. Es decir, los parches de coloración más expuestos del cuerpo del ave fueron aquellos que más variaron en relación a métricas ambientales. No se encontró relación alguna con las variables ambientales en ninguna de las variables de coloración en los parches Corona, Garganta, Pecho y Cobertoras.

Estructura y parámetros genómicos poblacionales

El análisis genético poblacional en STRUCTURE y el método de Evanno soportó tres agrupaciones (Figura 4). Este agrupamiento separa I) las zonas altas de Bolivia, II) el extremo sur de la distribución (población 11, Río Negro, Argentina) y el III) resto de las muestras (incluyendo las muestras consideradas *striaticeps* en el norte de Argentina). Los individuos del centro de Argentina (localidades 9 y 10 de Figura 3 y Tabla 1), poseen similares probabilidades de asignación al grupo de zonas bajas de Argentina y Bolivia como la población del extremo sur de la distribución. Con respecto a las muestras de la subespecie *striaticeps* (tierras altas de Bolivia y Argentina) no formaron un grupo separado en ningún otro resultado de posible K. Para K = 4, las muestras de zonas bajas de Bolivia forman un agrupamiento separado. El análisis de PCA (Figura 4) fue congruente con el de STRUCTURE, evidenciándose con mayor claridad la posición de las muestras intermedias. El PC1 de los SNPs no ligados explica el 6,88 % de la variación, mientras que el PC2 explica el 6,06 %. El F_{ST} global entre las dos subespecies fue de 0.021 (95% CI: 0,017-0,026), y entre la población de las zonas altas de Bolivia y el resto fue de 0.076 (0,066-0,086), lo que denota una diferenciación muy baja, aún entre los agrupamientos más divergentes.

Predictores ambientales de la divergencia genética

En conjunto, los resultados indicaron un impacto significativo del aislamiento por distancia y de la variación altitudinal en la divergencia genética del ave estudiada. Todas las variables independientes tuvieron una asociación positiva con la disimilitud genética entre individuos (Tabla 2). El modelo de regresión multivariado explicó 48% de la varianza total de la distancia genética entre individuos ($R^2 = 0,48$; Tabla 2). La

Tabla 2. Resultados del MMRR multivariado y *Commonality analysis* de distancia genética entre individuos de *Cranioleuca pyrrhophia* (1 - *IBS*) y parámetros ambientales. Se expresan los coeficientes, valores p y los coeficientes Único, Común y Total de cada predictor. GEN: distancia genética, GEO: distancia geográfica, ALT: diferencia altitudinal, PREC: diferencia de precipitación, TEMP: diferencia de precipitación, CLIM: disimilitud ambiental).

Modelo Completo	Predictor	Coefficiente	p	Único	Común	Total
GEN ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM $R^2 = 0,48$ $p = 0,0005$	GEO	0,007	0,001	0,111	0,254	0,364
	ALT	0,003	0,001	0,079	0,087	0,167
	PREC	-0,001	0,141	0,008	0,037	0,045
	TEMP	0,000	0,714	0,000	0,142	0,142
	CLIM	-0,001	0,581	0,001	0,200	0,201

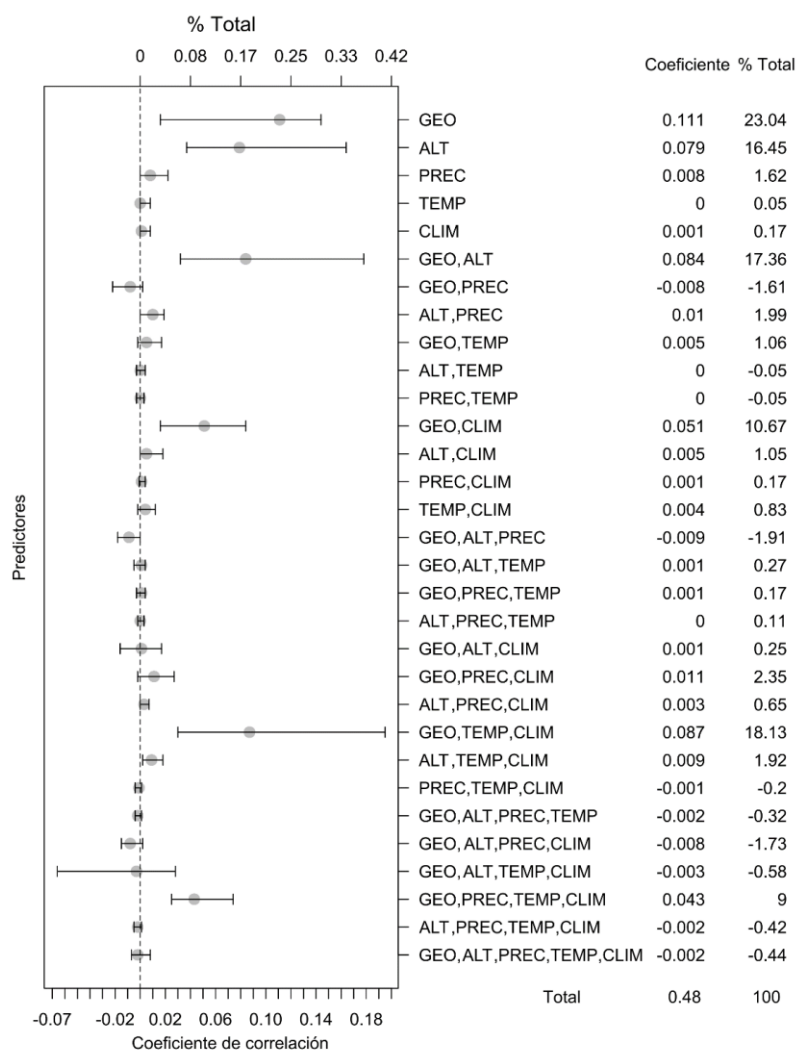


Figura 5. Predictores de la diferenciación genética (1 - *IBS*) en *Cranioleuca pyrrhophia*, estudiados mediante MMRR y *Commonality Analysis*. Cada uno de los 31 coeficientes de comunalidad representa el porcentaje de varianza de la métrica de distancia genética explicada por cada conjunto de Predictores, es decir, su tamaño de efecto. Por otro lado, el porcentaje total representa la proporción de la varianza total explicada en el Modelo multivariado (0,48) por cada conjunto de Predictores. Los intervalos de confianza se calcularon mediante 1000 réplicas *bootstrap* de una selección aleatoria del 90% de las muestras sin reposición.

distancia geográfica (GEO) fue la variable que mejor explicó la disimilitud genética ($R^2 = 0,36$). En el *commonality analysis*, el predictor más importante fue GEO, el cual explicó un 23% (en conjunto de los efectos Únicos y Comunes) de la varianza total explicada por el modelo multivariado (Figura 5). La siguiente variable en importancia y la única otra que tuvo un efecto significativo en el multivariado fue la ALT que explicó un 16,4% de la proporción explicada de la varianza explicada por modelo.

El análisis EEMS (Figura 6) soportó los mismos tres grupos que recuperó STRUCTURE y PCA (Figura 4). Un primer grupo fue formado por las poblaciones de tierras altas de Bolivia (sitios 1 y 2), un segundo grupo por los sitios 3 a 8 y un tercero por los sitios 9 a 11. Lo más destacado es la presencia de una barrera en las laderas de los Andes de Bolivia, en concordancia con los resultados previos de regresión de matrices, y de otra barrera menor al sur del Chaco seco.

Pruebas de selección natural sobre el fenotipo

Identificamos con *pcadapt* 488 SNPs *outliers*, y con LFMM 795 SNPs asociados a la elevación y a las 19 variables climáticas BIOCLIM. El número total de SNPs identificados como *outliers* por al menos un método fue de 1175, lo que representó un 18% del total de SNPs. Estos marcadores fueron extraídos de la base de datos de SNPs global para generar una base de datos de SNPs neutros y para proseguir con los análisis de selección. Ciento nueve SNPs fueron señalados como *outliers* de manera simultánea por ambos métodos. El F_{ST} global entre las subespecies obtenido con SNPs no identificados como *outliers* (neutrales) fue de 0,0087 (95% CI: 0,0053-0,0126).

En cuanto a las variables morfométricas (Tabla 3) y con la prueba $P_{ST-F_{ST}}$, solo en el modelo de divergencia de cuatro réplicas poblacionales (POP4) se rechazó la hipótesis de deriva con la variable que representa el tamaño de cuerpo en general (PC1), y con tamaño de tarso (TS), obteniendo resultados robustos que apoyan la hipótesis de selección divergente ($\frac{c}{h^2}$ crítico = 0,170 y 0,127 respectivamente). El test S no rechazó la hipótesis nula de divergencia neutra en ningún carácter, si bien en el agrupamiento de cuatro poblaciones indicó la prueba S tuvo la misma tendencia que la prueba $P_{ST-F_{ST}}$, pues tanto para PC1 como para TS el valor de la estadística S fue mayor a 0,83.

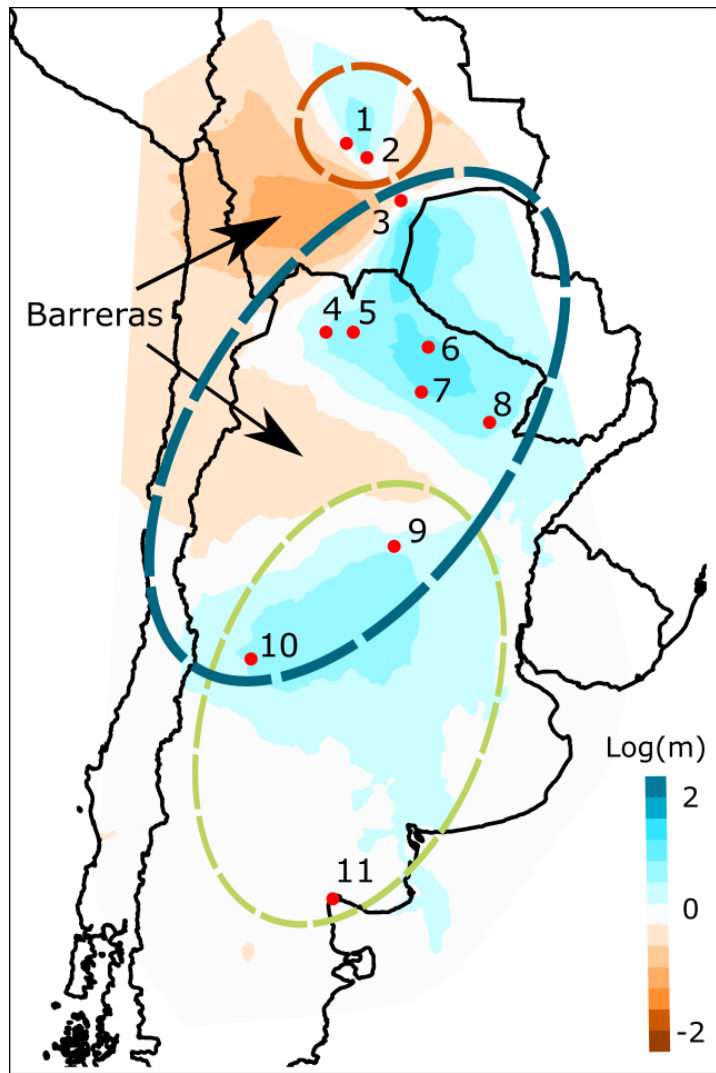


Figura 6. Análisis de la tasa efectiva de migración. Los colores del mapa indican áreas consistentes con el aislamiento por distancia (en blanco), áreas con migración por encima de la tasa promedio (corredores, color azul claro) y regiones con migración por debajo de la tasa promedio (barreras, color naranja). Los puntos rojos indican las localidades de colecta y el número de localidad (Tabla 1). Los óvalos delimitan las localidades comprendidas dentro de cada grupo recuperado por STRUCTURE (Figura 3), los colores son los mismos a los asignados al gráfico de $K = 3$ de STRUCTURE.

Para coloración, rechazamos la hipótesis nula en los parches de plumaje más expuestos a la luminosidad ambiental, siendo estos Corona, Espalda, Timoneras centrales, Timoneras externas y Cobertoras en todos los modelos de divergencia (Tabla 4). Las Timoneras centrales y las externas mostraron, en las variables colorimétricas PC1 y S1R, valores de Prueba S concordantes con selección ($S > 0,95$), y a su vez valores robustos de $\frac{c}{h^2}$ ($\frac{c}{h^2} \text{ crítico} < 0,2$). En los demás parches mencionados, los criterios de robustez de los resultados fueron idiosincráticos entre sí. Cabe resaltar que los parches menos expuestos a la luminosidad ambiental variaron de acuerdo a la hipótesis nula de neutralidad.

Tiempo de divergencia y flujo genético

Los resultados de G-PhoCs se obtuvieron a partir de dos corridas independientes (ESS combinado > 300). El escenario indicó que entre las poblaciones estudiadas existe flujo genético asimétrico y alto, con

dirección desde la región del Norte y centro de Argentina y zonas bajas de Bolivia (NorArg-Bol) hacia las restantes dos poblaciones (AltBol o SurArg, Figura 7). Además, el tamaño efectivo de la población NorArg-Bol fue casi cinco veces mayor que la población AltBol y 50 veces mayor que la población del sur de Argentina. Por otra parte, los tiempos de divergencia estimados para cada nodo fueron semejantes (162.000 años antes del presente), notando que los eventos de separación entre estas poblaciones ocurrieron simultáneamente durante el Pleistoceno tardío.

Modelos alternativos de divergencia

La media de D_{XY} de los loci altamente diferenciados entre tierras altas de Bolivia y el resto de las muestras (es decir, la media de D_{XY} de los loci con $F_{ST} \geq 0,2 = 0,011$, IC del 95%: 0,0093–0,0137, $n = 33$) fue mayor que la de los demás loci (es decir, la media de D_{XY} de los loci con $F_{ST} < 0,2 = 0,0001$, IC del 95%: 0,00001–0,0005; prueba de Wilcoxon $p < 0,01$). Es decir, los resultados soportan divergencia con flujo génico entre subespecies, de acuerdo a las predicciones de la Figura 1.

Tabla 3. Análisis P_{ST} - F_{ST} y test S de los rasgos morfométricos para la divergencia poblacional y entre subespecies de *Cranioleuca pyrrhophia*. Se presentan los tamaños muestrales de cada agrupamiento o población (n). Para STRK2, se descartaron individuos en regiones de altitud intermedias en los andes bolivianos. El F_{ST} global y su intervalo de confianza (CI) se calculó mediante Hierfstat. El P_{ST} y el $\frac{c}{h^2}$ crítico se calculó mediante un *script* personalizado. En negrita se resaltan los resultados robustos. PC1: valor del componente principal 1 de todas las variables morfométricas; BLT: largo total de pico; BLN: largo de pico desde la narina; BW: ancho de pico; BD: alto de pico; WL: largo de ala; TS: tarso.

Rasgo	Modelo de divergencia entre:											
	Subespecies (<i>striaticeps</i> vs <i>pyrrhophia</i>) (SSP)				Poblaciones BoAlt/Bajo (STRK2)				Cuatro-poblaciones (POP4)			
	<i>striaticeps</i> n = 18, <i>pyrrhophia</i> n = 112				BoAlt n = 11, Bajo n = 126				AL n =11, CN n=45, CS n=63, S n=18			
	P_{ST} - F_{ST}				P_{ST} - F_{ST}				P_{ST} - F_{ST}			
	S-test	P_{ST} (95% CI)	F_{ST} Global (95% CI): 0,008 (0,005-0,012)		S-test	P_{ST} (95% CI)	F_{ST} Global (95% CI): 0,019 (0,010-0,028)		S-test	P_{ST} (95% CI)	F_{ST} Global (95% CI): 0,012 (0,008-0,016)	
	S		Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	S		Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	S		Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico
PC1	0,505	0,006 (0-0,166)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,699	0,215 0,031-0,418	$P_{ST} > F_{ST}$	0,594	0,895	0,210 (0,114 - 0,343)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,127*
BLT	0,578	0,064 (0-0,270)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,536	0,157 0-0,390	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,677	0,073 (0,011 - 0,192)	$P_{ST} > F_{ST}$	1,106
BLN	0,403	0 (0-0,168)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,481	0,192 0-0,446	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,676	0,127 (0,053 - 0,266)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,333
BW	0,602	0,038 (0-0,211)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,365	0 0-0,143	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,468	0,061 (0,011 - 0,176)	$P_{ST} = F_{ST}$	1,921
BD	0,460	0 (0-0,070)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,440	0,043 0-0,184	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,786	0,127 (0,060 - 0,240)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,285
WL	0,590	0,011 (0-0,124)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,578	0,076 0-0,258	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,694	0,120 (0,056 - 0,237)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,305
TS	0,509	0,014 (0-0,133)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,621	0,139 0,025- 0,277	$P_{ST} > F_{ST}$	0,674	0,835	0,151 (0,091 - 0,249)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,170*

Tabla 4. Análisis P_{ST} - F_{ST} y Prueba S de parches de coloración del plumaje de *Cranioleuca pyrrhophia*. Se presentan los tamaños muestrales de cada agrupamiento o población (n). Para STRK2, se descartaron individuos en regiones de altitud intermedias en los andes bolivianos. El F_{ST} global y su intervalo de confianza (CI) se calculó mediante *SNPRelate*. El P_{ST} y el $\frac{c}{h^2}$ crítico se calculó mediante un *script* personalizado. En negrita se resaltan los resultados robustos. PC1: valor del componente principal 1 de todas las variables de coloración obtenidas con el paquete *pavo*. S1R: variable representativa de la coloración rojiza (feomelanina). B2: Brillo general, proxy de la coloración oscura (eumelanina).

		Modelo de divergencia entre:																
		Subespecies (<i>striaticeps</i> vs <i>pyrrhophia</i>) (SSP) <i>striaticeps</i> n= 15, <i>pyrrhophia</i> n= 88				Poblaciones BoAlt/Bajo (STRK2) BoAlt n= 10, Bajo n= 89				Cuatro poblaciones (POP4) AL n=10, CN n=33, CS n=38, S n=17								
Parche			P _{ST} -F _{ST}						P _{ST} -F _{ST}						P _{ST} -F _{ST}			
	S-test		P _{ST}	F _{ST} Global (95% CI):		S-test	P _{ST}	F _{ST} Global (95% CI):		S-test	P _{ST}	F _{ST} Global (95% CI):		S-test	P _{ST}	F _{ST} Global (95% CI):		
	(95% CI)		0,008 (0,005-0,012)		(95% CI)		0,019 (0,010-0,028)		(95% CI)		0,012 (0,008-0,016)							
	Rasgo	S		Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	S		Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	S		Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	S		Resultado	$\frac{c}{h^2}$ crítico	
Corona	PC1	0,956	0,461 (0,317-0,794)	P _{ST} > F _{ST}	0,061	0,953	0,628 (0,629- 0,858)	P _{ST} > F _{ST}	0,019	0,818	0,294 (0,181-0,651)	P _{ST} > F _{ST}	0,040					
	S1R	0,626	1,2 x 10 ⁻⁴ (0-0,363)	P _{ST} = F _{ST}	NA	0,502	1,5 x 10 ⁻⁴ (0-0,456)	P _{ST} = F _{ST}	NA	0,452	2,2 x 10 ⁻⁴ (0-0,193)	P _{ST} = F _{ST}	NA					
	B2	0,829	0,223 (0,077-0,557)	P _{ST} > F _{ST}	0,235	0,875	0,403 (0,393-0,681)	P _{ST} > F _{ST}	0,046	0,723	0,294 (0,181-0,651)	P _{ST} > F _{ST}	0,127					
Espalda	PC1	0,965	0,589 (0,552-0,880)	P _{ST} > F _{ST}	c.0	0,961	0,765 (0,760-0,921)	P _{ST} > F _{ST}	c. 0	0,907	0,472 (0,345-0,780)	P _{ST} > F _{ST}	0,020					
	S1R	0,792	0,300 (0,133-0,659)	P _{ST} > F _{ST}	0,085	0,699	0,350 (0,090-0,715)	P _{ST} > F _{ST}	0,120	0,495	0,112 (0-0,448)	P _{ST} > F _{ST}	NA					
	B2	0,794	0,387 (0,263-0,771)	P _{ST} > F _{ST}	0,037	0,902	0,615 (0,572-0,859)	P _{ST} > F _{ST}	0,022	0,495	0,299 (0,174-0,675)	P _{ST} > F _{ST}	0,053					
Timoneras centrales	PC1	0,997	0,785 (0,792-0,928)	P _{ST} > F _{ST}	c. 0	0,989	0,827 (0,848-0,939)	P _{ST} > F _{ST}	c. 0	0,991	0,586 (0,533-0,845)	P _{ST} > F _{ST}	c. 0					
	S1R	0,980	0,814	P _{ST} > F _{ST}	c. 0	0,945	0,877	P _{ST} > F _{ST}	c. 0	0,986	0,675	P _{ST} > F _{ST}	c. 0					

			(0,801-0,955)				(0,879-0,965)				(0,625-0,906)		
	B2	0,486	0,053 (0-0,555)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,836	0,442 (0,172-0,777)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,156	0,605	0,160 (0-0,519)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
Timoneras externas	PC1	0,888	0,451 (0,202-0,833)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,040	0,966	0,711 (0,678-0,902)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,014	0,946	0,377 (0,266-0,708)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,033
	S1R	0,765	0,354 (0,103-0,767)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,072	0,918	0,632 (0,588-0,868)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,016	0,870	0,296 (0,177 -0,648)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,049
	B2	0,686	0,204 (0-0,661)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,774	0,448 (0,306-0,774)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,069	0,715	0,163 (0,029-0,510)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,282
Garganta	PC1	0,521	$2,0 \times 10^{-6}$ (0-0,077)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,440	0,010 (0-0,208)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,449	0,021 (0-0,219)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
	S1R	0,457	$1,2 \times 10^{-6}$ (0-0,220)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,432	0,068 (0-0,388)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,452	0,035 (0-0,235)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
	B2	0,489	3×10^{-6} (0-0,031)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,521	$6,1 \times 10^{-4}$ (0-0,209)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,577	0,029 (0-0,286)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
Pecho	PC1	0,543	$1,4 \times 10^{-4}$ (0-0,285)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,552	0,000 (0-0,232)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,374	0 (0-0,141)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
	S1R	0,439	$1,2 \times 10^{-4}$ (0-0,131)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,488	0,000 (0-0,100)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,439	0 (0-0,199)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
	B2	0,585	0,031 (0-0,319)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,499	0,000 (0-0,253)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA	0,767	0,089 (0-0,347)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
Cobertoras	PC1	0,878	0,328 (0,168-0,722)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,061	0,951	0,539 (0,483-0,822)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,030	0,851	0,240 (0,150-0,574)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,074
	S1R	0,643	0,153 (0,010-0,498)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,760	0,730	0,269 (0,108-0,659)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,494	0,629	0,086 (0-0,360)	$P_{ST} = F_{ST}$	NA
	B2	0,724	0,206 (0,032-0,568)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,430	0,849	0,402 (0,335-0,738)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,056	0,759	0,153 (0,065-0,445)	$P_{ST} > F_{ST}$	0,210

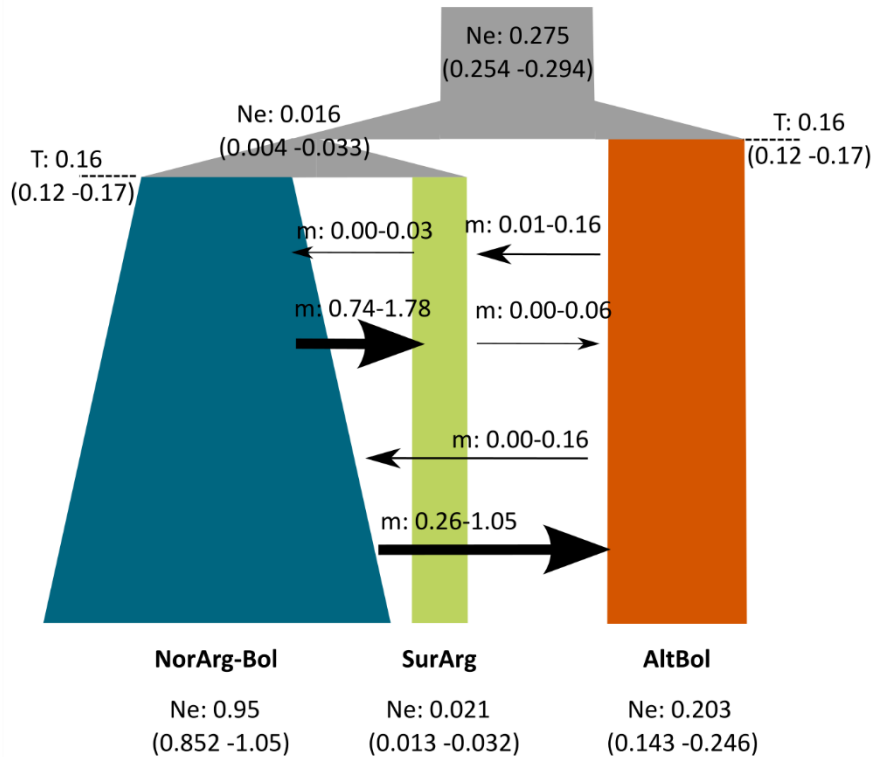


Figura 7. Flujo génico y tiempo de divergencia entre poblaciones de *C. pyrrhophia*. Los resultados de G-PhoCS muestran el escenario más probable obtenido. El árbol representa las poblaciones y su relación filogenética tal como se utilizó para el análisis. La migración se representa con flechas y la letra m, donde el grosor es proporcional a la tasa de migración. El tamaño de las ramas en el árbol es proporcional al tamaño efectivo de la población Ne (en millones de individuos). El tiempo de divergencia T está en millones de años antes del presente. NorArg-Bol: individuos del Norte y centro de Argentina y zonas bajas de Bolivia; SurArg: individuos del Sur de la distribución en Argentina; AltBol: individuos de zonas altas de Bolivia.

DISCUSIÓN

¿Cuáles son los patrones geográficos de variación fenotípica y con qué variables ambientales están correlacionados?

No encontramos diferencias morfométricas substanciales entre sexos de *Cranioleuca pyrrhophia*, como observado en la mayoría de las especies de Furnáridos pues las diferencias en el Ancho de pico (BW) y Largo de ala (WL) no superaron el 3% entre sexos. Del mismo modo, la coloración también fue uniforme entre machos y hembras, característica que también es conservada en la familia. Estos resultados concuerdan con un estudio previo de la especie (Claramunt, 2002), donde se utilizó un muestreo geográficamente acotado.

La variación morfológica intraespecífica en *C. pyrrhophia* fue baja y con estructuración geográfica reducida. Los resultados indicaron que ningún rasgo morfométrico varió latitudinalmente, pero los rasgos

Ancho de Pico (BW) y Tarso (TS) tuvieron una correlación moderada con la longitud (Tabla A3.3). El análisis mostró correlación moderada entre estos rasgos y la longitud. Los ejemplares del Este de la distribución (Uruguay y Sur de Brasil) tuvieron tamaños de Tarso y de Ancho de pico mayores que los del Oeste, en concordancia con estudios previos (Claramunt (2002)) (Figura 8). Adicionalmente, los resultados del análisis de autocorrelación espacial sugieren la existencia de patrones espaciales, revelando una asociación significativa y consistente entre el valor del rasgo y su ubicación geográfica (Tabla A3.3). Al observar la variación del largo de Tarso a escala geográfica, observamos que los ejemplares del Este de la distribución (Uruguay y Brasil), así como los ejemplares del Norte (Noroeste de Argentina y Bolivia), mostraron largos de Tarso superiores a los del centro de la distribución (Paraguay, Centro Norte de Argentina y Sur) (Figura 8). Esto explica el valor de autocorrelación espacial alto (I de Moran = 0,705), así como la moderada correlación con la longitud, pero baja con la latitud. De todas formas, si bien existió cierta estructuración, la diferencia no fue detectada por el análisis NMM.

Los análisis de regresión múltiple de matrices MMRR mostraron baja asociación entre los rasgos morfológicos y las variables ambientales o geográficas. Solo para el largo de Tarso, el modelo completo explicó 10% de la variación total (Tabla A3.5), mientras que, para los restantes rasgos, los modelos explicaron menos de 10% de la variabilidad total. Considerando el patrón de variación observado en el rasgo, es lógico que no se haya observado ninguna asociación con variables ambientales, considerando que las regiones con largos de Tarso mayores son muy distintas climáticamente entre sí.

Estos resultados no soportan la regla de Bergman en *C. pyrrhophia*, la cual predice que los ejemplares de clima frío y/o latitudes mayores tendrían mayor tamaño corporal (el tamaño de tarso, así como PC1, son proxy del tamaño corporal), lo que no fue encontrado (Tabla A3.1). Si bien se cumpliría esta predicción al considerar los ejemplares de altura versus los de tierras bajas de Argentina (Figura 8), no es claro por qué los ejemplares del extremo oriental de la distribución comparten estados morfológicos con aquellas de Bolivia de tierras altas. De todas formas, el alargamiento del tarso puede no estar en este caso relacionado con el tamaño

corporal, sino que tener un comportamiento alométrico respecto del resto de las variables, respondiendo a otras presiones ecológicas.

En relación a la coloración, en la mayoría de los parches no se encontró evidencia de estructura geográfica, con excepción de en las timoneras (Figura A3.2). El análisis NMM encontró dos grupos discretos en el parche Timoneras centrales, que agrupó los individuos de altura (de Argentina y Bolivia) y de zonas bajas. Para los demás parches y variables, NMM no encontró grupos discretos con coherencia geográfica. Según Remsen (2020), los ejemplares del sur del área de distribución serían más grises que los del norte, con un jaspeado de corona más denso hacia el oeste. La coloración grisácea se podría recuperar con las variables S1R (más o menos rojizo) y B2 (más o menos oscuro) así como la densidad del jaspeado de la corona con la variable B2. No recuperamos ningún patrón geográfico en espalda, pero en corona observamos una asociación moderada con la longitud en el Brillo (Tabla A3.3). Estos resultados indican que los ejemplares del Este de la distribución tienen un jaspeado más denso o menos contrastado, o falta de estrías, respecto a los ejemplares del oeste, resultados que concuerdan con los reportados por Claramunt (2002), excepto por la coloración de la espalda.

La variación geográfica de la coloración de las Timoneras Centrales y Timoneras Externas soportó parcialmente lo predicho en la bibliografía en relación a subespecies. Por ejemplo, Timoneras Centrales rufas en la subespecie *striaticeps* y timoneras centrales marrones en *pyrrhophia* (Fig. 2 y 9). Las variables S1R y PC1 de tales caracteres de plumaje se correlacionaron con la latitud y mostraron una estructuración geográfica también significativa. Los individuos del Norte de Argentina y Bolivia fueron los que tuvieron las timoneras centrales más rufas (Figura 9), indicando que la subespecie de timoneras centrales rufas *striaticeps* no se limitaría solo a Bolivia, en contraposición con la bibliografía (Remsen 2020), la población de tierras altas del Nordeste de Argentina tiene caracteres compatibles con tal subespecie (Fig. 9). En el caso de Timoneras Externas, si bien la estructura geográfica fue más moderada, su variación siguió la variación de Timoneras centrales (Fig. A3.3). Para Timoneras Externas las pieles de estudio consistieron en individuos con las colas

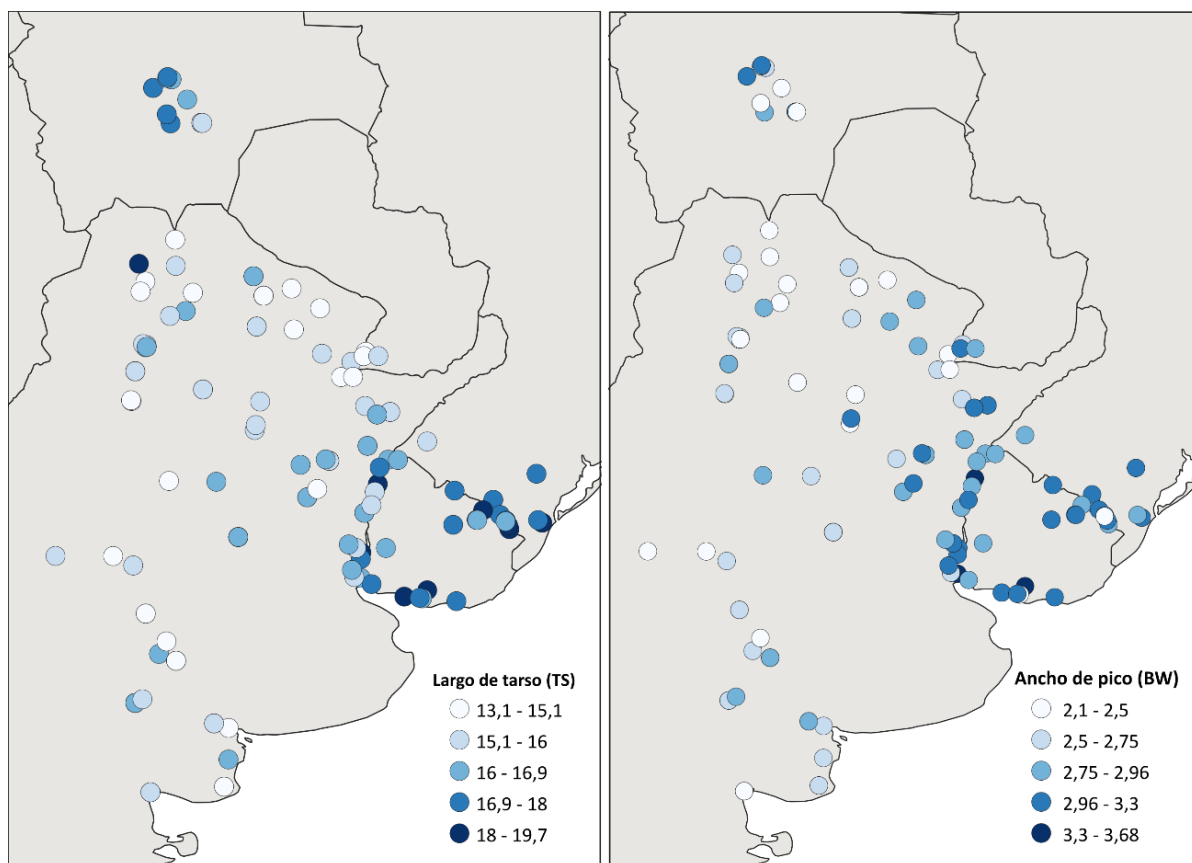


Figura 8. Variación geográfica de largo de tarso (TS) y Ancho de Pico (BW) de *Cranioleuca pyrrhophia*.

completamente rufas (norte de Argentina y Bolivia), individuos con plumas completamente marrones, y todas las proporciones de rojo vs marrón intermedias. La proporción de marrón no mostró una clina ni patrón geográfico apreciable, y los individuos con rectrices centrales completamente marrones estuvieron dispersos por toda la distribución (Fig. A3.3)

En el análisis de regresión múltiple, la coloración rojiza de las Timoneras Centrales fue correlacionada con la Altitud más que con ninguna otra variable climática o geográfica. El modelo no logró explicar más de un 25% de la variación en las demás variables y parches (Timoneras externas y Espalda), en esos casos, fue la altitud la variable que mejor explicó la variación.

La coloración del plumaje de la especie en estudio siguió la regla de Glogger. Según esta regla, esperábamos que la coloración del plumaje mostrara un patrón en el que los ejemplares del oeste del área de distribución fueran más rufos y claros que al este, pues la primera región es la más seca y cálida del área de estudio. Esta relación se cumplió con la métrica indicadora de eumelanina (B2), en los parches Corona, Espalda,

Timoneras centrales, Timoneras externas y Cobertoras (Tabla A3.3). La coloración rufa (S1R) en timoneras centrales siguió un eje de variación Norte-Sur (esta variable mostró correlación con la latitud) (Figura 9, Tabla A3.3). De todas maneras, como fue mencionado, la variable en este parche fue mejor explicada por la altitud y no por variables relacionadas con la humedad, indicando que esta variable en particular no se comportaría según la regla de Glogger (colores más rufos en climas más secos o climas más cálidos).

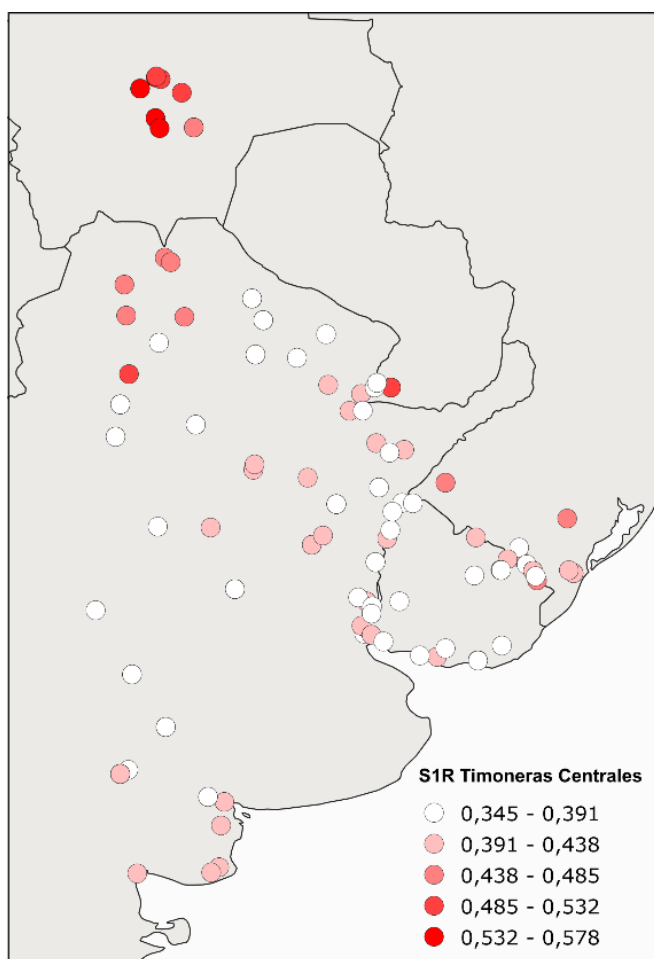


Figura 9. Variación geográfica de las Timoneras centrales de *Cranioleuca pyrrhophia*, variable S1R (redness, coloración rojiza).

El aislamiento por distancia geográfica y la altitud explican la variación genética en *Cranioleuca pyrrhophia*

Al contrario de lo que esperábamos, encontramos que las subespecies de *C. pyrrhophia* poseen divergencia genética muy baja (Figura 4), y que cada una no representa un linaje independiente. Los ejemplares de zonas altas con coloración de rectrices centrales rojas (*striaticiceps*) no son más parecidos genéticamente entre sí que con los ejemplares de rectrices bicoloreadas (rojas-marrones) o marrones (subespecie *pyrrhophia*). Tanto el análisis de *admixture* como de componentes principales separaron las muestras en tres

grupos (Figura 4), siendo baja la diferenciación genética entre estos grupos (p.ej, $F_{ST} = 0,0192$ y un PCA cuyo PC1 no explicó más de 7% de la variación). Si bien la diferenciación fue baja, el patrón se alinea con el eje altitudinal del cinturón de bosques secos Chaco-Andes, mostrando un patrón similar al encontrado con *Phytotoma rutila* (Capítulo 2).

Los principales factores que habrían modelado la variación genómica en la especie fueron el aislamiento por distancia y un aislamiento por altitud (Tabla 2). Posiblemente, ambas variables expliquen porciones distintas de la variación: por un lado, la población de altura contra el resto de las muestras, y por otro la distancia entre la población del sur y la población de más al norte, separadas por más de 2500 km de distancia. El análisis EEMS soporta la existencia de dos barreras al flujo génico (Figura 6), siendo la más importante alineada con el eje altitudinal entre las muestras de Bolivia de altura y las de zonas bajas, y además una zona con un flujo genético menor al esperado entre las poblaciones del sur y las de centro-norte. EEMS es robusto frente a los *gaps* de muestreo (Petkova et al., 2016), entonces no creemos que los resultados estén sesgados, y que efectivamente esas barreras reflejan disminución en el flujo genético. Cabe destacar que estas barreras coinciden con las encontradas en *Phytotoma rutila* (Capítulo 2) y es un patrón que se observa también en otras especies de aves que se codistribuyen a lo largo del cinturón de bosques Secos Chaco Andes (Lima-Rezende et al. in litt.).

Las barreras al flujo génico descritas para *C. pyrrhophia* no parecen corresponderse con expansiones del bosque ribereño de los Ríos chaqueños Bermejo y Pilcomayo, como fue esperado a priori de acuerdo a Nores (1992). Nores (1992) propuso que las oscilaciones climáticas acaecidas durante el Pleistoceno habrían promovido la expansión de bosques húmedos a través del Chaco, reduciendo las áreas de bosques xerófilos aislando las poblaciones de aves xerofíticas especialistas. Durante los períodos Glaciales habrían preponderado condiciones áridas para la región (Iriondo, 1993), seguido por una transición hacia un clima más húmedo en el Pleistoceno Superior-Holoceno Inferior, y en el Holoceno Medio habría preponderado una mayor aridez (Piovano et al., 2009), retrayendo los bosques húmedos de las yungas y Selva Atlántica, así como los bosques de galería de los principales ríos de la región y propiciando la expansión de la diagonal abierta (Nores, 1992).

De manera alternada, los períodos interglaciares habrían propiciado la expansión de los bosques húmedos mencionados, y los bosques de galería del Bermejo y Pilcomayo (Oliveira-Filho y Ratter, 1995; Zurita et al., 2014). La expansión de estos bosques húmedos podría haber aislado a las poblaciones de aves especialistas en bosques xerófilos al norte y al sur, causando diferenciación genética (y morfológica), por efecto del aislamiento (Nores, 1992). No obstante, las barreras descritas por el análisis EMMS no corresponden geográficamente con lo predicho por el planteo anterior (Nores 1992). De hecho, el mapa de EEMS muestra que las poblaciones a un lado y a otro de estos ríos intercambian migrantes a una tasa mayor a la esperada bajo aislamiento por distancia, indicando un alto flujo genético. Por último, podemos descartar el efecto del bosque lluvioso de las Yungas como barrera al flujo genético. Primero, porque se encontró un flujo genético (asimétrico) entre los individuos a un lado y a otro de las yungas a la altura de las poblaciones de los Andes bolivianos y de tierras bajas de Bolivia (Figura 6 y 7), y segundo, porque si bien no se estudió específicamente con G-PhoCs, pero se infiere por los resultados de STRUCTURE y PCA, que también las poblaciones al este y al oeste de las yungas en territorio Argentino poseen alto flujo genético, tanto que estos análisis agrupan las muestras de altura (al oeste de las Yungas), con las de zonas bajas al este de estos bosques húmedos.

¿Es la diferenciación fenotípica entre las poblaciones de *Cranioleuca pyrrhophia* producto de selección natural en presencia de flujo genético?

Nuestros resultados soportan la acción de la selección natural sobre ciertos rasgos de la morfología externa en la divergencia de poblaciones de *Cranioleuca pyrrhophia*. Específicamente, solo en la comparación de cuatro poblaciones (Tabla 3, POP4) se soportó selección divergente sobre toda la morfología, en el análisis con PC1 y con la longitud de tarso (TS). En la misma comparación de cuatro poblaciones, también se observó una tendencia similar en el carácter altura de pico BD, pero sin tener resultados significativos. Cabe resaltar que la longitud de tarso fue el carácter más diferenciado entre regiones, donde la variación entre poblaciones explicó el 15% de la variación total.

En relación con la coloración del plumaje de *C. pyrrhophia*, tanto la prueba S como el análisis $P_{ST}-F_{ST}$ soportaron en todas las comparaciones la acción de la selección natural en la divergencia poblacional (Tabla 4). Se observó divergencia no neutra en todos los parches de plumaje, con excepción de aquellos de la región

ventral (Garganta y Pecho). El carácter con mayor divergencia entre poblaciones fue Timoneras centrales, que es el cual diferencia las subespecies. Esto se observó tanto para el PC1 de todas las variables de coloración ($P_{ST} = 0,78$), como para el carácter individual S1R ($P_{ST} = 0,81$).

Los resultados sugieren la acción de distintas presiones de selección sobre el plumaje del ave entre regiones. Solo el color de parches de coloración dorsal (Corona, Espalda, color de la cola, y en menor medida coloración de Cobertoras), tuvieron impacto de divergencia por selección, mientras que los dos caracteres ventrales (Garganta y Pecho) cambiaron al azar. Esto sugeriría un rol importante de la interacción plumaje y factores ambientales como la luminosidad, y/o exposición a factores diferenciales entre el dorso y ventral del ave, que podrían ser importantes para definir la coloración del plumaje. Por ejemplo, es posible que la coloración del dorso sea más importante que la del ventral para algunas funciones, como el camuflaje. Por ejemplo, en la lechuza *Tyto alba*, diferencias en coloración entre los morfos rufo y blanco ha sido asociado a diferentes comportamientos de dispersión y caza (Charter et al., 2012, 2015; Roulin, 2004; Roulin y Ducrest, 2013; van den Brink et al., 2012). A su vez, en esta lechuza también se describieron cambios de coloración de plumaje por selección natural divergente (Antoniazza et al., 2010; Burri et al., 2015).

Los resultados indican un desacoplamiento entre la variación morfológica y del plumaje de *C. pyrrhophia*, y que el impacto de la divergencia por selección natural a lo largo del gradiente Chaco-Andes habría sido más intenso en la coloración del plumaje que en la morfología externa de la especie. Si bien se hicieron las mismas comparaciones geográficas en ambos conjuntos de caracteres, la divergencia no estocástica entre subespecies y poblaciones fue más notoria y prevalente para el caso del plumaje. Por ejemplo, la divergencia de tamaño de cuerpo fue menor y al azar, siendo como máximo del orden del 20% (Tabla 3) entre las poblaciones de altitud de Bolivia y Argentina, y las de tierras bajas, mientras que en la misma comparación geográfica la divergencia en coloración no fue al azar y superó en algunos parches de plumaje el 80% (Tabla 4). Estos resultados son compatibles con la falta de soporte de que la especie sigue la regla de Bergmann, y con el soporte parcial que se habría encontrado para la regla de Glogger en la especie.

Nuestros resultados están alineados con algunos estudios previos, donde se observa que el plumaje y la morfología externa no varían de la misma manera y donde el plumaje divergió más rápidamente. Por ejemplo, Freeman *et al.* (2023) (ver también Winger y Bates, 2015) compara la variación del canto, plumaje y tamaño de pico entre poblaciones de aves alopátricas en los Andes. Encuentra que la divergencia de plumaje estuvo correlacionada a la divergencia genética, y por ende al tiempo de aislamiento, y que la variación de tamaño de pico no estuvo correlacionada a la divergencia temporal entre poblaciones. Freeman *et al.* 2023 concluye que este resultado podría ser consecuencia de que los caracteres eco morfológicos, como el tamaño de cuerpo o de pico, estarían más sometidos a cambios neutros, o inclusive a selección natural muy débil o balanceadora que impediría la divergencia, y a que el plumaje podría haber sido sometido a selección más intensa y divergente. La falta de presión de selección divergente sobre caracteres de tamaño corporal de aves, a nivel intraespecífico o entre especies próximas, también es sugerido por Trujillo-Arias *et al.* (2020) en su estudio de divergencia morfológica entre regiones históricamente aisladas (Bosques tropicales de los Andes y de la Selva Atlántica). Trujillo-Arias y colaboradores propusieron que, a pesar de que las poblaciones se encuentran aisladas, sus caracteres morfológicos no habrían divergido notoriamente de acuerdo a lo esperado por la divergencia genética, lo que podría ser consecuencia de evolución neutra o de selección balanceadora.

Divergencia con flujo génico a lo largo del gradiente Chaco Andes

Nuestros resultados respaldan que las subespecies de *C. pyrrhophia* han divergido en presencia de flujo génico a lo largo del gradiente Chaco Andes. El análisis genómico no respaldó un modelo de divergencia en alopatría porque encontramos que los loci altamente diferenciados presentaron una divergencia absoluta D_{XY} más alta que los loci no diferenciados, lo que concuerda con las predicciones del modelo de divergencia con flujo génico (Figura 1). El D_{XY} promedio de los loci con $F_{ST} \geq 0,2$ fue dos órdenes de magnitud mayor que los loci con $F_{ST} < 0,2$. Este resultado, junto con la existencia de flujo génico entre regiones (Figura 7) y los resultados de las comparaciones S-test y $P_{ST-F_{ST}}$ (Tabla 3 y 4), rechazó la divergencia neutral alopátrica y respaldó la divergencia con flujo génico.

Las estimaciones de flujo génico entre las poblaciones de *C. pyrrhophia* (Fig. 4) representan la migración promedio durante la divergencia a partir de un ancestro común y no diferencian el contacto primario

(flujo génico constante y bajo) del contacto secundario (períodos de alopatría seguidos de un alto flujo génico) (Cruickshank y Hahn, 2014). Sin embargo, el análisis genómico de la especie indicó que algunos loci son menos introgresivos que otros (es decir, loci con valores máximos de F_{ST} y D_{XY}), lo que es compatible con la divergencia con flujo génico (Figura 1). Estos loci altamente divergentes entre poblaciones pueden ser blancos de selección natural e indicarían una adaptación diferencial local, por ejemplo entre las regiones altoandinas y las tierras bajas (es decir, adaptación a temperaturas extremas, estacionalidad y variación en las presiones parciales de oxígeno).

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, S. A. S., y Weir, J. T. (2022). The role of divergent ecological adaptation during allopatric speciation in vertebrates. *Science*, 378(6625), 1214-1218. <https://doi.org/10.1126/science.abo7719>
- Antoniazza, S., Burri, R., Fumagalli, L., Goudet, J., y Roulin, A. (2010). Local adaptation maintains clinal variation in melanin-based coloration of European barn owls (*Tyto alba*). *Evolution*, 64(7), 1944-1954. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2010.00969.x>
- Armenta, J. K., Dunn, P. O., y Whittingham, L. A. (2008). Effects of Specimen Age on Plumage Color. *The Auk*, 125(4), 803-808. <https://doi.org/10.1525/auk.2008.07006>
- Arnold, M. L. (2016). *Divergence with Genetic Exchange*. Oxford University Press.
- Ashton, K. G. (2002). Patterns of within-species body size variation of birds: Strong evidence for Bergmann's rule. *Global Ecology and Biogeography*, 11(6), 505-523. <https://doi.org/10.1046/j.1466-822X.2002.00313.x>
- Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B*, 57, 289-300.
- Bergmann, C. (1847). Ueber die verhältnisse der wärmeökonomie der thiere zu ihrer grösse. *Gottinger Studien*, 3, 595-708.
- Bird, J. P., Martin, R., Akçakaya, H. R., Gilroy, J., Burfield, I. J., Garnett, S. T., Symes, A., Taylor, J., Şekercioğlu, Ç. H., y Butchart, S. H. M. (2020). Generation lengths of the world's birds and their implications for extinction risk. *Conservation Biology*, 34(5), 1252-1261. <https://doi.org/10.1111/cobi.13486>
- BirdLife International, y Handbook of the Birds of the World. (2022). *Craniroleuca pyrrhophia* [dataset]. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2022-2.

- Blanckaert, A., y Hermisson, J. (2018). The limits to parapatric speciation II: Strengthening a preexisting genetic barrier to gene flow in parapatry. *Genetics*, 209(1), 241-254. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300652>
- Brommer, J. E. (2011). Whither Pst? The approximation of Qst by Pst in evolutionary and conservation biology. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(6), 1160-1168. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02268.x>
- Brusquetti, F., Netto, F., Baldo, D., y Haddad, C. F. B. (2018). What happened in the South American Gran Chaco? Diversification of the endemic frog genus *Lepidobatrachus* Budgett, 1899 (Anura: Ceratophryidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 123(July 2017), 123-136. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.02.010>
- Burri, R., Nater, A., Kawakami, T., Mugal, C. F., Olason, P. I., Smeds, L., Suh, A., Dutoit, L., Bureš, S., Garamszegi, L. Z., Hogner, S., Moreno, J., Qvarnström, A., Ružić, M., Sæther, S.-A., Sætre, G.-P., Török, J., y Ellegren, H. (2015). Linked selection and recombination rate variation drive the evolution of the genomic landscape of differentiation across the speciation continuum of *Ficedula* flycatchers. *Genome Research*, 25(11), 1656-1665. <https://doi.org/10.1101/gr.196485.115>
- Cabanne, G. S., D'HORTA, F. M., MEYER, D., SILVA, J. M. C., y MIYAKI, C. Y. (2011). Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(4), 801-820. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01678.x>
- Cabanne, G. S., Trujillo-Arias, N., Calderón, L., D'Horta, F. M., y Miyaki, C. Y. (2014). Phenotypic evolution of an Atlantic Forest passerine (*Xiphorhynchus fuscus*): Biogeographic and systematic implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(4), 1047-1066. <https://doi.org/10.1111/bij.12362>
- Cadena, C. D., y Céspedes, L. N. (2020). Origin of elevational replacements in a clade of nearly flightless birds: Most diversity in tropical mountains accumulates via secondary contact following allopatric speciation. En R. V. y C. A. (Eds.), *Neotropical Diversification: Patterns and Processes* (pp. 635-659). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31167-4_23
- Cadena, C. D., Pedraza, C. A., y Brumfield, R. T. (2016). Climate, habitat associations and the potential distributions of Neotropical birds: Implications for diversification across the Andes. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), Article 155. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.280>
- Cadena, C. D., Zapata, F., y Jiménez, I. (2017). Issues and Perspectives in Species Delimitation using Phenotypic Data: Atlantean Evolution in Darwin's Finches. *Systematic Biology*, January. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syx071>
- Cattell, R. B. (1966). The scree test for the number of factors. *Multivariate Behavioral Research*, 1(2), 245-276. https://doi.org/10.1207/s15327906mbr0102_10

- Charter, M., Leshem, Y., Izhaki, I., y Roulin, A. (2015). Pheomelanin-based colouration is correlated with indices of flying strategies in the Barn Owl. *Journal of Ornithology*, 156(1), 309-312. <https://doi.org/10.1007/s10336-014-1129-6>
- Charter, M., Peleg, O., Leshem, Y., y Roulin, A. (2012). Similar patterns of local barn owl adaptation in the Middle East and Europe with respect to melanistic coloration. *Biological Journal of the Linnean Society*, 106(2), 447-454. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01863.x>
- Chevignon, Z. A., y Brumfield, R. T. (2009). Migration-selection balance and local adaptation of mitochondrial haplotypes in Rufous-collared Sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an elevational gradient. *Evolution*, 63(6), 1593-1605. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00644.x>
- Claramunt, S. (2002). Variación geográfica en *Cranioleuca pyrrhophia* y el límite con *Cranioleuca obsoleta* (Furnariidae). *Ornitología Neotropical*, 13(4), 255-266.
- Cliff, A. D., y Ord, K. (1970). Spatial Autocorrelation: A Review of Existing and New Measures with Applications. *Economic Geography*, 46(sup1), 269-292. <https://doi.org/10.2307/143144>
- Coyne, J. A., y Orr, H. A. (2004). *Speciation*. Sinauer Associates.
- Cruickshank, T. E., y Hahn, M. W. (2014). Reanalysis suggests that genomic islands of speciation are due to reduced diversity, not reduced gene flow. *Molecular Ecology*, 23(13), 3133-3157. <https://doi.org/10.1111/mec.12796>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., y Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Darwin, C. (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. J. Murray.
- Darwin, C., y Wallace, A. (1858). On the Tendency of Species to form Varieties; and on the Perpetuation of Varieties and Species by Natural Means of Selection. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 3(9), 45-62. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1858.tb02500.x>
- de Villemereuil, P., Gaggiotti, O. E., Moutier, M., y Till-Bottraud, I. (2016). Common garden experiments in the genomic era: New perspectives and opportunities. *Heredity*, 116(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.93>
- Delhey, K. (2017). Gloger's rule. *Current Biology*, 27, R689-R691. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.031>
- DeWitt, T. J., Sih, A., y Wilson, D. S. (1998). Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology y Evolution*, 13(2), 77-81. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01274-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01274-3)
- Dinerstein, E., Olson, D., Joshi, A., Vynne, C., Burgess, N. D., Wikramanayake, E., Hahn, N., Palminteri, S., Hedao, P., Noss, R., Hansen, M., Locke, H., Ellis, E. C., Jones, B., Barber, C. V., Hayes, R., Kormos, C., Martin, V., Crist, E., ... Saleem, M. (2017). An ecoregion-based approach to protecting half the terrestrial realm. *BioScience*, 67(6), 534-545. <https://doi.org/10.1093/biosci/bix014>

- Dingle, C., Halfwerk, W., y Slabbekoorn, H. (2008). Habitat-dependent song divergence at subspecies level in the grey-breasted wood-wren. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(4), 1079-1089. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01536.x>
- Eaton, D. A. R., y Overcast, I. (2020). Ipyrad: Interactive assembly and analysis of RADseq datasets. *Bioinformatics*, 36(8), 2592-2594. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz966>
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Fjeldså, J., Bowie, R. C. K., y Rahbek, C. (2012). The Role of Mountain Ranges in the Diversification of Birds. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(Volume 43, 2012), 249-265. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145113>
- Freeman, B. G., Montgomery, G. A., Heavyside, J., Moncrieff, A. E., Johnson, O., y Winger, B. M. (2023). On the predictability of phenotypic divergence in geographic isolation. 77(1).
- Frichot, E., y François, O. (2015). LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), 925-929. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12382>
- Galván, I., y Wakamatsu, K. (2016). Color measurement of the animal integument predicts the content of specific melanin forms. *RSC Advances*, 6(82), 79135-79142. <https://doi.org/10.1039/C6RA17463A>
- Gaston, K. J., Chown, S. L., y Evans, K. L. (2008). Ecogeographical rules: Elements of a synthesis. *Journal of Biogeography*, 35(3), 483-500. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2007.01772.x>
- Gloger, C. L. (1833). *Das Abändern der Vögel durch Einfluss des Klimas* (August Schulz).
- Goudet, J., Jombart, T., Kamvar, Z. N., Archer, E., y Hardy, O. (2022). hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics (0.5-11) [Software]. <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html>
- Graves, G. R. (1988). Linearity of Geographic Range and Its Possible Effect on the Population Structure of Andean Birds. *The Auk*, 105(1), 47-52. <https://doi.org/10.1093/auk/105.1.47>
- Gronau, I., Hubisz, M. J., Gulko, B., Danko, C. G., y Siepel, A. (2011). Bayesian inference of ancient human demography from individual genome sequences. *Nature Genetics*, 43(10), 1031-1034. <https://doi.org/10.1038/ng.937>
- Herzog, S. K., y Kessler, M. (2002). Biogeography and composition of dry forest bird communities in Bolivia. *Journal für Ornithologie*, 143(2), 171-204. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0361.2002.02004.x>
- Herzog, S. K., Terrill, R. S., Jahn, A. E., Remsen, J. V., Maillard, O. Z., García-Solíz, V. H., MacLeod, R., McCormick, A., y Vidoz, J. Q. (2016). *Birds of Bolivia Field Guide*. Asociación Armonía.
- Hewitt, G. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58(3), 247-276. <https://doi.org/10.1006/bijl.1996.0035>

- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
<https://doi.org/10.1038/35016000>
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., y Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25(15), 1965-1978.
<https://doi.org/10.1002/joc.1276>
- Hijmans, R. J., Williams, E., y Vennes, C. (2015). Geosphere: Spherical trigonometry. R package.
- Iriondo, M. (1993). Geomorphology and late Quaternary of the Chaco (South America). *Geomorphology*, 7(4), 289-303. [https://doi.org/10.1016/0169-555X\(93\)90059-B](https://doi.org/10.1016/0169-555X(93)90059-B)
- Irwin, D. E., Milá, B., Toews, D. P. L., Brelsford, A., Kenyon, H. L., Porter, A. N., Grossen, C., Delmore, K. E., Alcaide, M., y Irwin, J. H. (2018). A comparison of genomic islands of differentiation across three young avian species pairs. *Molecular Ecology*, 27(23), 4839-4855.
<https://doi.org/10.1111/mec.14858>
- Jakobsson, M., y Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- James, F. C. (1970). Geographic size variation in birds and its relationship to climate. *Ecology*, 51, 365-390.
- Karhunen, M., Merilä, J., Leinonen, T., Cano, J. M., y Ovaskainen, O. (2013). driftsel: An R package for detecting signals of natural selection in quantitative traits. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 746-754. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12111>
- Karhunen, M., y Ovaskainen, O. (2012). Estimating population-level coancestry coefficients by an admixture F model. *Genetics*, 192(2), 609-617. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.140871>
- Leinonen, T., McCairns, R. J. S., O'Hara, R. B., y Merilä, J. (2013). Q(ST)-F(ST) comparisons: Evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews Genetics*, 14, 179-190.
<https://doi.org/10.1038/nrg3395>
- Leinonen, T., O'Hara, R. B., Cano, J. M., y Merilä, J. (2008). Comparative studies of quantitative trait and neutral marker divergence: A meta-analysis. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(1), 1-17.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01445.x>
- Lewontin, R. C., y Krakauer, J. (1973). Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*, 74(1), 175-195.
<https://doi.org/10.1093/genetics/74.1.175>
- Linck, E., y Battey, C. J. (2019). Minor allele frequency thresholds strongly affect population structure inference with genomic data sets. *Molecular Ecology Resources*, 19(3), 639-647.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12995>
- Luu, K., Bazin, E., y Blum, M. G. B. (2017). pcadapt: An R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 67-77.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12592>

- Maia, R., Gruson, H., Endler, J. A., y White, T. E. (2019). pavo 2: New tools for the spectral and spatial analysis of colour in r. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(7), 1097-1107. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13174>
- Marcondes, R. S., y Brumfield, R. T. (2019). Fifty shades of brown: Macroevolution of plumage brightness in the Furnariida, a large clade of drab Neotropical passerines. *Evolution*, 73(4), 704-719. <https://doi.org/10.1111/evo.13707>
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press.
- Mayr, E. (1963). *Animal speciation and evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- McCormack, J. E., y Smith, T. B. (2008). Niche expansion leads to small-scale adaptive divergence along an elevation gradient in a medium-sized passerine bird. *Proceedings of the Royal Society B*, 275, 2155-2164. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0470>
- McCracken, K. G., Bulgarella, M., Johnson, K. P., Kuhner, M. K., Trucco, J., Valqui, T. H., Wilson, R. E., y Peters, J. L. (2009). Gene flow in the face of countervailing selection: Adaptation to high-altitude hypoxia in the betaA hemoglobin subunit of yellow-billed pintails in the Andes. *Molecular Biology and Evolution*, 26(4), 815-827. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp007>
- Milá, B., Wayne, R. K., Fitze, P., y Smith, T. B. (2009). Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorhynchus spirurus*, a neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology*, 18(14), 2979-2995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04251.x>
- Moran, P. A. P. (1950). Notes on Continuous Stochastic Phenomena. *Biometrika*, 37(1/2), 17-23. <https://doi.org/10.2307/2332142>
- Moritz, C., Patton, J. L., Schneider, C. J., y Smith, T. B. (2000). Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31(1), 533-563. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.533>
- Nores, M. (1992). Bird Speciation in South America. *The Auk*, 109(2), 346-357.
- Nosil, P. (2012). *Ecological speciation*. Oxford University Press.
- Nosil, P., Vines, T. H., y Funk, D. J. (2005). REPRODUCTIVE ISOLATION CAUSED BY NATURAL SELECTION AGAINST IMMIGRANTS FROM DIVERGENT HABITATS. *Evolution*, 59(4), 705-719. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01747.x>
- O'Leary, S. J., Puritz, J. B., Willis, S. C., Hollenbeck, C. M., y Portnoy, D. S. (2018). These aren't the loci you're looking for: Principles of effective SNP filtering for molecular ecologists. *Molecular Ecology*, 27(16), 3193-3206. <https://doi.org/10.1111/mec.14792>
- Oliveira-Filho, A. T., y Ratter, J. A. (1995). A study of the origin of central Brazilian forests by the analysis of plant species distribution patterns. *Edinburgh Journal of Botany*, 52(2), Article 2. <https://doi.org/10.1017/S0960428600000949>

- Ovaskainen, O., Karhunen, M., Zheng, C., Arias, J. M. C., y Merilä, J. (2011). A new method to uncover signatures of divergent and stabilizing selection in quantitative traits. *Genetics*, 189(2), 621-632. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.129387>
- Paulo, P., Teófilo, F. H., Bertuol, C., Polo, É., Moncrieff, A. E., Bandeira, L. N., Nuñez-Penichet, C., Fernandes, I. Y., Bosholn, M., Machado, A. F., Luna, L. W., Peçanha, W. T., Rampini, A. P., Hashimoto, S., Dias, C., Araripe, J., Aleixo, A., do Rêgo, P. S., Hrbek, T., ... Anciães, M. (2023). Geographic Drivers of Genetic and Plumage Color Diversity in the Blue-Crowned Manakin. *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11692-023-09613-4>
- Pembleton, L. W., Cogan, N. O. I., y Forster, J. W. (2013). StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), 946-952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12129>
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., y Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Petkova, D., Novembre, J., y Stephens, M. (2016). Visualizing spatial population structure with estimated effective migration surfaces. *Nature Genetics*, 48(1), 94-100. <https://doi.org/10.1038/ng.3464>
- Pfeifer, B., Wittelsbürger, U., Ramos-Onsins, S. E., y Lercher, M. J. (2014). PopGenome: An efficient swiss Army knife for population genomic analyses in R. *Molecular Biology and Evolution*, 31(7), 1929-1936. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu136>
- Pigot, A. L., y Tobias, J. A. (2013). Species interactions constrain geographic range expansion over evolutionary time. *Ecology Letters*, 16(3), 330-338. <https://doi.org/10.1111/ele.12043>
- Piovan, E. L., Ariztegui, D., Córdoba, F., Cioccale, M., y Sylvestre, F. (2009). Hydrological Variability in South America Below the Tropic of Capricorn (Pampas and Patagonia, Argentina) During the Last 13.0 Ka. En V. F. K. M, y F. Sylvestre (Eds.), *Past Climate Variability in South America and Surrounding Regions* (Número July, pp. 323-351). Springer Science and Business Media. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2672-9_14
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Prunier, J. G., Colyn, M., Legendre, X., Nimon, K. F., y Flamand, M. C. (2015). Multicollinearity in spatial genetics: Separating the wheat from the chaff using commonality analyses. *Molecular Ecology*, 24(2), 263-283. <https://doi.org/10.1111/mec.13029>
- QGIS Development Team. (s. f.). QGIS Geographic Information System. QGIS Association. <https://www.qgis.org>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., y Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

- Remsen, J. (2020). Curutié Blanco (*Cranioleuca pyrrhophia*), version 1.0. Birds of the World. <https://doi.org/10.2173/bow.stcspi2.01>
- Ribeiro, Â. M., Lloyd, P., y Bowie, R. C. K. (2011). A tight balance between natural selection and gene flow in a Southern African arid-zone endemic bird. *Evolution*, 65(12), 3499-3514. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01397.x>
- Ribeiro, Â. M., Puetz, L., Pattinson, N. B., Dalén, L., Deng, Y., Zhang, G., Fonseca, R. R., Smit, B., y Gilbert, M. T. P. (2019). 31° South: The physiology of adaptation to arid conditions in a passerine bird. *Molecular Ecology*, 28(16), 3709-3721. <https://doi.org/10.1111/mec.15176>
- Rice, W. R., y Hostert, E. E. (1993). Laboratory Experiments on Speciation: What Have We Learned in 40 Years? *Evolution*, 47(6), 1637. <https://doi.org/10.2307/2410209>
- Rodríguez-Cajaville, M. J., Campagna, L., Lima-Rezende, C. A., Carboni, M., Tubaro, P. L., y Cabanne, G. S. (2022). Genomic and phenotypic divergence-with-gene-flow across an ecological and elevational gradient in a neotropical bird. *Journal of Biogeography*, 49(8), 1535-1548. <https://doi.org/10.1111/jbi.14449>
- Roulin, A. (2004). The evolution, maintenance and adaptive function of genetic colour polymorphism in birds. *Biological Reviews*, 79(4), 815-848. <https://doi.org/10.1017/S1464793104006487>
- Roulin, A., y Ducrest, A.-L. (2013). Genetics of colouration in birds. *Seminars in Cell y Developmental Biology*, 24(6), 594-608. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.05.005>
- Savolainen, O., Lascoux, M., y Merilä, J. (2013). Ecological genomics of local adaptation. *Nature Reviews Genetics*, 14(11), 807-820. <https://doi.org/10.1038/nrg3522>
- Schluter, D. (2009). Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science*, 323(5915).
- Schneider, C. J., Smith, T. B., Larison, B., y Moritz, C. (1999). A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: Ecological gradients vs. Rainforest refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13869-13873. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13869>
- Seeholzer, G. F., y Brumfield, R. T. (2017). Isolation-by-distance, not incipient ecological speciation, explains genetic differentiation in an Andean songbird (Aves: Furnariidae: *Cranioleuca antisiensis*, Line-cheeked Spinetail) despite near three-fold body size change across an environmental gradie. *Molecular Ecology*, May, 1-18. <https://doi.org/10.1111/mec.14429>
- Smeds, L., Qvarnström, A., y Ellegren, H. (2016). Direct estimate of the rate of germline mutation in a bird. *Genome Research*, 26(9), 1211-1218. <https://doi.org/10.1101/gr.204669.116>
- Smith, B. T., McCormack, J. E., Cuervo, A. M., Hickerson, M. J., Aleixo, A., Cadena, C. D., Pérez-Emán, J., Burney, C. W., Xie, X., Harvey, M. G., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Derryberry, E. P., Prejean, J., Fields, S., y Brumfield, R. T. (2014). The drivers of tropical speciation. *Nature* 2014 515:7527, 515(7527), 406-409. <https://doi.org/10.1038/nature13687>

- Somanathan, H., Mali, S., Borges, R. M., Shilton, L. A., Altringham, J. D., Compton, S. G., Whittaker, R. J., Russo, S. E., Augspurger, C. K., Nakashima, Y., Inoue, E., Inoue-Murayama, M., Abd Sukor, J. R., McConkey, K. R., Prasad, S., Corlett, R. T., Campos-Arceiz, A., Brodie, J. F., Rogers, H., ... Rawat, G. S. (2004). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. *Oecologia*, 15, 413-448.
- Stene, J., Jain, J. P., y Prabhakaran, V. T. (1993). Genetics of Populations. *Biometrics*, 49(2), 672. <https://doi.org/10.2307/2532586>
- Thrasher, D. J., Butcher, B. G., Campagna, L., Webster, M. S., y Lovette, I. J. (2018). Double-digest RAD sequencing outperforms microsatellite loci at assigning paternity and estimating relatedness: A proof of concept in a highly promiscuous bird. *Molecular Ecology Resources*, 18(5), 953-965. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12771>
- Tobias, J. A., Cornwallis, C. K., Derryberry, E. P., Claramunt, S., Brumfield, R. T., y Seddon, N. (2014). Species coexistence and the dynamics of phenotypic evolution in adaptive radiation. *Nature*, 506(7488), 359-363. <https://doi.org/10.1038/nature12874>
- Tobias, J. A., Ottenburghs, J., y Pigot, A. L. (2020). Avian Diversity: Speciation, Macroevolution, and Ecological Function. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 51, 533-560. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-110218-025023>
- Trujillo-Arias, N., Rodríguez-Cajaville, M. J., Sari, E., Miyaki, C. Y., Santos, F. R., Witt, C. C., Barreira, A. S., Gómez, I., Naoki, K., Tubaro, P. L., y Cabanne, G. S. (2020). Evolution between forest macrorefugia is linked to discordance between genetic and morphological variation in Neotropical passerines. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 149, 106849. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106849>
- van den Brink, V., Dolivo, V., Falourd, X., Dreiss, A. N., y Roulin, A. (2012). Melanic color-dependent antipredator behavior strategies in barn owl nestlings. *Behavioral Ecology*, 23(3), 473-480. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr213>
- Wang, I. J. (2013). Examining the Full Effects of Landscape Heterogeneity on Spatial Genetic Variation: A Multiple Matrix Regression Approach for Quantifying Geographic and Ecological Isolation. *Evolution*, 67(12), 3403-3411. <https://doi.org/10.1111/evo.12134>
- Wang, I. J., y Bradburd, G. S. (2014). Isolation by environment. *Molecular Ecology*, 23(23), 5649-5662. <https://doi.org/10.1111/mec.12938>
- Wang, I. J., y Summers, K. (2010). Genetic structure is correlated with phenotypic divergence rather than geographic isolation in the highly polymorphic strawberry poison-dart frog. *Molecular Ecology*, 19(3), 447-458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04465.x>
- Weir, B. S., y Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358. <https://doi.org/10.2307/2408641>

- Whitlock, M. C., y Guillaume, F. (2009). Testing for spatially divergent selection: Comparing QST to FST. *Genetics*, 183(3), 1055-1063. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.099812>
- Whitlock, M. C., y Lotterhos, K. E. (2015). Reliable Detection of Loci Responsible for Local Adaptation: Inference of a Null Model through Trimming the Distribution of FST. *The American Naturalist*, 186(S1), S24-S36. <https://doi.org/10.1086/682949>
- Williams, G. C. (1996). *Adaptation and Natural Selection: A Critique of Some Current evolutionary Thought*. Princeton University Press.
- Willis, S. C., Hollenbeck, C. M., Puritz, J. B., Gold, J. R., y Portnoy, D. S. (2017). Haplotyping RAD loci: An efficient method to filter paralogs and account for physical linkage. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), 955-965. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12647>
- Winger, B. M., y Bates, J. M. (2015). The tempo of trait divergence in geographic isolation: Avian speciation across the Marañón Valley of Peru. *Evolution*, 69(3), 772-787. <https://doi.org/10.1111/evo.12607>
- Winkler, D. W., Billerman, S. M., y Lovette, I. J. (2020). *Ovenbirds and Woodcreepers (Furnariidae)*, version 1.0. *Birds of the World*. <https://doi.org/10.2173/bow.furnar2.01>
- Zamudio, K. R., Bell, R. C., y Mason, N. A. (2016). Phenotypes in phylogeography: Species' traits, environmental variation, and vertebrate diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8041-8048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602237113>
- Zheng, X., Levine, D., Shen, J., Gogarten, S. M., Laurie, C., y Weir, B. S. (2012). A high-performance computing toolset for relatedness and principal component analysis of SNP data. *Bioinformatics*, 28(24), 3326-3328. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts606>
- Zurita, A. E., Miño Boilini, Á. R., Francia, A., Erra, G., Alcaraz, M. A., Carlini, A. A., Lutz, A. I., y Friedrich, J. (2014). Paleontología y cronología del Cuaternario de las provincias de Corrientes y Formosa, Argentina. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/101493>

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis, estudiamos el rol de la selección natural en la diversificación biológica, evaluando tanto caracteres fenotípicos como genómicos, con énfasis en los modelos de divergencia ecológica en parapatría. Estudiando dos especies de Passeriformes de bosques secos del sur de Sudamérica, presentamos evidencia a favor de que el gradiente ambiental a lo largo de los bosques del Chaco y de los Andes ha promovido la diversificación ecológica en la región. A continuación, revisamos brevemente los hallazgos de esta tesis, y revisamos sus implicancias para comprender la evolución poblaciones en aves, en particular en aquellas de regiones montañosas.

Desde que Darwin propuso por primera vez que nuevas especies podían surgir sin separación geográfica (Darwin, 1859), los biólogos han debatido si la divergencia puede ocurrir o no en presencia de intercambio genético. La primera hipótesis estudiada en esta tesis plantea que la selección natural posee un rol significativo en la divergencia poblacional a nivel tanto fenotípico como genómico en las aves en general, incluso bajo flujo genético. En las especies estudiadas hallamos que distintos grupos de caracteres parecen haber sido objeto de diversificación a nivel fenotípico, mientras que otros parecen haber cambiado neutramente. En *Phytotoma rutila*, encontramos una diferencia de 10% en el tamaño corporal entre poblaciones, lo cual superó la expectativa de variación que se esperaba bajo procesos neutros, y que ofreció evidencia de acción de selección natural (Capítulos 2 y 3). Las diferencias observadas entre las poblaciones de *P. rutila* de tierras altas y tierras bajas podrían estar relacionadas con adaptaciones locales a temperaturas extremas y/o a la estacionalidad de cada región, así como a la variación de condiciones atmosféricas (p. ej., presiones parciales de oxígeno). En el otro modelo de estudio, *Cranioleuca pyrrhophia*, no se observó diferenciación a nivel de rasgos de tamaño corporal (Capítulo 4). No obstante, si observamos diferencias apreciables entre las poblaciones de tierras altas y bajas en los caracteres de coloración, especialmente en los parches de plumaje del dorso y cola. Los caracteres mencionados en ambos sistemas variaron más de lo esperado bajo procesos neutros, siguiendo los resultados obtenidos utilizando el enfoque que integra y compara caracteres tanto fenotípicos como genómicos. A nivel genómico, *Phytotoma rutila* mostró entre sus

poblaciones una mayor divergencia en ciertos marcadores que *Cranioleuca*, pero en ambos casos las poblaciones Andinas se diferenciaron de las de zonas bajas. Los análisis genómicos y fenotípicos de este trabajo ofrecen evidencia a favor de que la selección natural posee un rol significativo en la divergencia poblacional en estas especies, principalmente a nivel fenotípico, y de que la divergencia y especiación en parapatría podría ser un fenómeno sub observado en el grupo.

Históricamente, y en particular en aves y mamíferos, el mecanismo mayormente citado y evaluado para explicar la divergencia poblacional y posterior especiación ha sido el de divergencia en ausencia de flujo genético, por alopatría, sin incorporar explícitamente pruebas de selección (Milá et al., 2009, Tobias et al 2020). De hecho, históricamente se ha trabajado de manera sesgada sobre sistemas alopátricos, en ambientes como la Amazonia, donde existe una gran influencia de ríos que representan fuertes barreras geográficas, generando sistemas de islas o grandes regiones aisladas por grandes ríos, o en el hemisferio norte, donde hay gran influencia de glaciaciones pasadas, de donde surgen las hipótesis de refugios (por ejemplo, Hewitt, 1996, 2000). Es posible que la noción de que la alopatría es fundamental para el inicio de la especiación sea producto de que los primeros estudios del tema no evaluaron hipótesis alternativas al aislamiento, o que carecían de métodos o datos para un estudio integral de las distintas alternativas (Arnold, 2016). En teoría, un linaje podría divergir en respuesta a la adaptación en gradientes ambientales pronunciados (Schluter, 2009), como los que se encuentran en las laderas de los ambientes montañosos. El aislamiento reproductivo en este caso sería dirigido o mantenido por la selección en contra de los inmigrantes, no adaptados al ambiente que ingresan (Nosil et al., 2005). Pero el aislamiento no surge hasta que el flujo génico se reduce lo suficiente, ya sea por el paisaje, la ecología, o el comportamiento. En el caso de las poblaciones distribuidas a lo largo de gradientes ambientales marcados, como la cordillera de los Andes (Graves, 1988), el rol de los rasgos ecológicos parecería ser significativo. En aves y otros organismos, hay ejemplos bien documentados de adaptación local de poblaciones a lo largo de gradientes altitudinales (por ejemplo, Cheviron y Brumfield, 2009; Dingle et al., 2008; McCormack y Smith, 2008; McCracken et al., 2009; Milá et al., 2009; Ribeiro et al., 2011; Seeholzer y Brumfield, 2017) pero no conocemos evidencia concluyente de que este modo de divergencia haya llevado al

aislamiento reproductivo y, por lo tanto, al origen de dos especies distintas a partir de una línea ancestral continuamente distribuida como resultado de la selección divergente.

Las montañas tropicales y subtropicales son bien conocidas por tener una alta diversidad de aves, desproporcionada frente a otros ambientes adyacentes, y son considerados áreas calientes de endemismo (Fjelds  et al., 2012). Esta diversidad se ha atribuido a la fragmentación de hábitat causada por la topografía accidentada, la marcada zonación altitudinal en los hábitats, la extensión longitudinal de la cordillera, además de las fluctuaciones climáticas (que cobra mayor importancia al aumentar de latitud), habría generado oportunidades para la expansión, retracción, colonización de diferentes áreas por las poblaciones (Cadena et al., 2016; Cadena y Céspedes, 2020; Paulo et al., 2023). Pero más allá del rol del aislamiento en la generación de barreras reproductivas, que como se mencionó dan lugar a la diversificación del genoma, el rol de la selección se destaca en la generación de divergencia en caracteres fenotípicos (Cabanne et al., 2011, 2014; Moritz et al., 2000; Rice y Hostert, 1993; Schneider et al., 1999, Capítulos 3 y 4 de esta tesis). Los ecotonos y otros gradientes como el cinturón de bosques secos del Chaco y los Andes pueden ser fundamentales para la evolución y el mantenimiento de la biodiversidad en regiones tropicales (B. T. Smith et al., 2014).

BIBLIOGRAFÍA

- Arnold, M. L. (2016). *Divergence with Genetic Exchange*. Oxford University Press.
- Cabanne, G. S., D'horta, F. M., Meyer, D., Silva, J. M. C., y Miyaki, C. Y. (2011). Evolution of *Dendrocolaptes platyrostris* (Aves: Furnariidae) between the South American open vegetation corridor and the Atlantic forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(4), 801-820. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01678.x>
- Cabanne, G. S., Trujillo-Arias, N., Calderón, L., D'Horta, F. M., y Miyaki, C. Y. (2014). Phenotypic evolution of an Atlantic Forest passerine (*Xiphorhynchus fuscus*): Biogeographic and systematic implications. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(4), 1047-1066. <https://doi.org/10.1111/bij.12362>
- Cadena, C. D., y Céspedes, L. N. (2020). Origin of elevational replacements in a clade of nearly flightless birds: Most diversity in tropical mountains accumulates via secondary contact following allopatric speciation.

En R. V. y C. A. (Eds.), *Neotropical Diversification: Patterns and Processes* (pp. 635-659). Springer, Cham.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-31167-4_23

- Cadena, C. D., Pedraza, C. A., y Brumfield, R. T. (2016). Climate, habitat associations and the potential distributions of Neotropical birds: Implications for diversification across the Andes. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), Article 155.
<https://doi.org/10.18257/raccefyn.280>
- Chevignon, Z. A., y Brumfield, R. T. (2009). Migration-selection balance and local adaptation of mitochondrial haplotypes in Rufous-collared Sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an elevational gradient. *Evolution*, 63(6), 1593-1605. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00644.x>
- Dingle, C., Halfwerk, W., y Slabbekoorn, H. (2008). Habitat-dependent song divergence at subspecies level in the grey-breasted wood-wren. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(4), 1079-1089.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01536.x>
- Fjeldså, J., Bowie, R. C. K., y Rahbek, C. (2012). The Role of Mountain Ranges in the Diversification of Birds. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(Volume 43, 2012), 249-265.
<https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145113>
- Graves, G. R. (1988). Linearity of Geographic Range and Its Possible Effect on the Population Structure of Andean Birds. *The Auk*, 105(1), 47-52. <https://doi.org/10.1093/auk/105.1.47>
- Hewitt, G. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58(3), 247-276. <https://doi.org/10.1006/bijl.1996.0035>
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
<https://doi.org/10.1038/35016000>
- McCormack, J. E., y Smith, T. B. (2008). Niche expansion leads to small-scale adaptive divergence along an elevation gradient in a medium-sized passerine bird. *Proceedings of the Royal Society B*, 275, 2155-2164.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0470>
- McCracken, K. G., Bulgarella, M., Johnson, K. P., Kuhner, M. K., Trucco, J., Valqui, T. H., Wilson, R. E., y Peters, J. L. (2009). Gene flow in the face of countervailing selection: Adaptation to high-altitude hypoxia in the betaA hemoglobin subunit of yellow-billed pintails in the Andes. *Molecular Biology and Evolution*, 26(4), 815-827. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp007>
- Milá, B., Wayne, R. K., Fitze, P., y Smith, T. B. (2009). Divergence with gene flow and fine-scale phylogeographical structure in the wedge-billed woodcreeper, *Glyphorynchus spirurus*, a neotropical rainforest bird. *Molecular Ecology*, 18(14), 2979-2995. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04251.x>

- Moritz, C., Patton, J. L., Schneider, C. J., y Smith, T. B. (2000). Diversification of rainforest faunas: An integrated molecular approach. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31(1), 533-563. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.533>
- Nosil, P., Vines, T. H., y Funk, D. J. (2005). REPRODUCTIVE ISOLATION CAUSED BY NATURAL SELECTION AGAINST IMMIGRANTS FROM DIVERGENT HABITATS. *Evolution*, 59(4), 705-719. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb01747.x>
- Paulo, P., Teófilo, F. H., Bertuol, C., Polo, É., Moncrieff, A. E., Bandeira, L. N., Nuñez-Penichet, C., Fernandes, I. Y., Bosholn, M., Machado, A. F., Luna, L. W., Peçanha, W. T., Rampini, A. P., Hashimoto, S., Dias, C., Araripe, J., Aleixo, A., do Rêgo, P. S., Hrbek, T., ... Anciães, M. (2023). Geographic Drivers of Genetic and Plumage Color Diversity in the Blue-Crowned Manakin. *Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11692-023-09613-4>
- Ribeiro, Â. M., Lloyd, P., y Bowie, R. C. K. (2011). A tight balance between natural selection and gene flow in a Southern African arid-zone endemic bird. *Evolution*, 65(12), 3499-3514. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01397.x>
- Rice, W. R., y Hostert, E. E. (1993). Laboratory Experiments on Speciation: What Have We Learned in 40 Years? *Evolution*, 47(6), 1637. <https://doi.org/10.2307/2410209>
- Schluter, D. (2009). Evidence for Ecological Speciation and Its Alternative. *Science*, 323(5915).
- Schneider, C. J., Smith, T. B., Larison, B., y Moritz, C. (1999). A test of alternative models of diversification in tropical rainforests: Ecological gradients vs. Rainforest refugia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13869-13873. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13869>
- Seeholzer, G. F., y Brumfield, R. T. (2017). Isolation-by-distance, not incipient ecological speciation, explains genetic differentiation in an Andean songbird (Aves: Furnariidae: *Cranioleuca antisensis*, Line-cheeked Spinetail) despite near three-fold body size change across an environmental gradie. *Molecular Ecology*, May, 1-18. <https://doi.org/10.1111/mec.14429>
- Smith, B. T., McCormack, J. E., Cuervo, A. M., Hickerson, M. J., Aleixo, A., Cadena, C. D., Pérez-Emán, J., Burney, C. W., Xie, X., Harvey, M. G., Faircloth, B. C., Glenn, T. C., Derryberry, E. P., Prejean, J., Fields, S., y Brumfield, R. T. (2014). The drivers of tropical speciation. *Nature* 2014 515:7527, 515(7527), 406-409. <https://doi.org/10.1038/nature13687>

ANEXO 1 (A1)

MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 2

El tamaño corporal y la variación genética en el Cortarramas (*Phytotoma rutila*: Cotingidae) sugieren divergencia ecológica a través del cinturón de bosque seco Chaco-Andes

Revisión de los límites geográficos de las áreas de reproducción e invernada de *Phytotoma rutila*

Para seleccionar especímenes de museo y muestras de tejido de *Phytotoma rutila* recolectadas en el área de reproducción de la especie para este estudio, primero revisamos los límites de sus áreas de reproducción e invernada. En primer lugar, mediante el análisis de registros de eBird (<https://ebird.org/>, consultado en agosto de 2018), definimos la duración de las temporadas de reproducción e invernada evaluando la estabilidad de la distribución de la especie durante la temporada de reproducción (durante la primavera y el verano) y durante la invernada (la temporada complementaria a la reproducción). En segundo lugar, descargamos los registros de ocurrencia de *P. rutila* de la *Global Environmental Facility* (GBIF, 10 de agosto de 2018, <https://doi.org/10.15468/dl.ytz6we>). Filtramos el conjunto de datos sin procesar para conservar solo un registro por localidad y fecha, lo que resultó en una base de datos de 3293 observaciones que abarcaron el período de años 1879 a 2018.

Observamos en el conjunto de datos de eBird dos períodos de estabilidad en el rango y luego los definimos como "temporada de reproducción" el período de octubre a marzo, y como "temporada de invernada" el período de abril a septiembre. Luego, dividimos el conjunto de datos de GBIF en subconjuntos de reproducción e invernada, según la fecha de registro, y calculamos, para cada temporada, el número de registros en celdas de 100 km x 100 km. La Figura A1.1 presenta la distribución y abundancia de *P. rutila* durante la temporada de reproducción y durante la temporada de invernada. Utilizamos la distribución de la especie durante la temporada de reproducción para definir la región de muestreo para el estudio morfológico y genético. Los resultados indicaron que el ave está presente durante todo el año en la mayor parte de su rango,

excepto en el extremo más austral de su distribución, así como en la parte oriental de la distribución (noreste de Argentina, este de Paraguay y el extremo sur de Bolivia). La abundancia en las tierras altas de Bolivia y el norte de Argentina se mantuvo estable durante todo el año, lo que indica una naturaleza sedentaria de la especie en estas regiones. Además, este análisis mostró que la especie evita el núcleo del bioma de pastizales de las Pampas, lo que contrasta con la distribución mapeada en la literatura (por ejemplo, Ridgely y Tudor 2009).

Figura A1.1. Límites geográficos de las áreas de reproducción e invernada y abundancia de registros de *P. rutila*. La temporada de reproducción se definió de octubre a marzo, mientras que la temporada de invernada va de abril a septiembre.

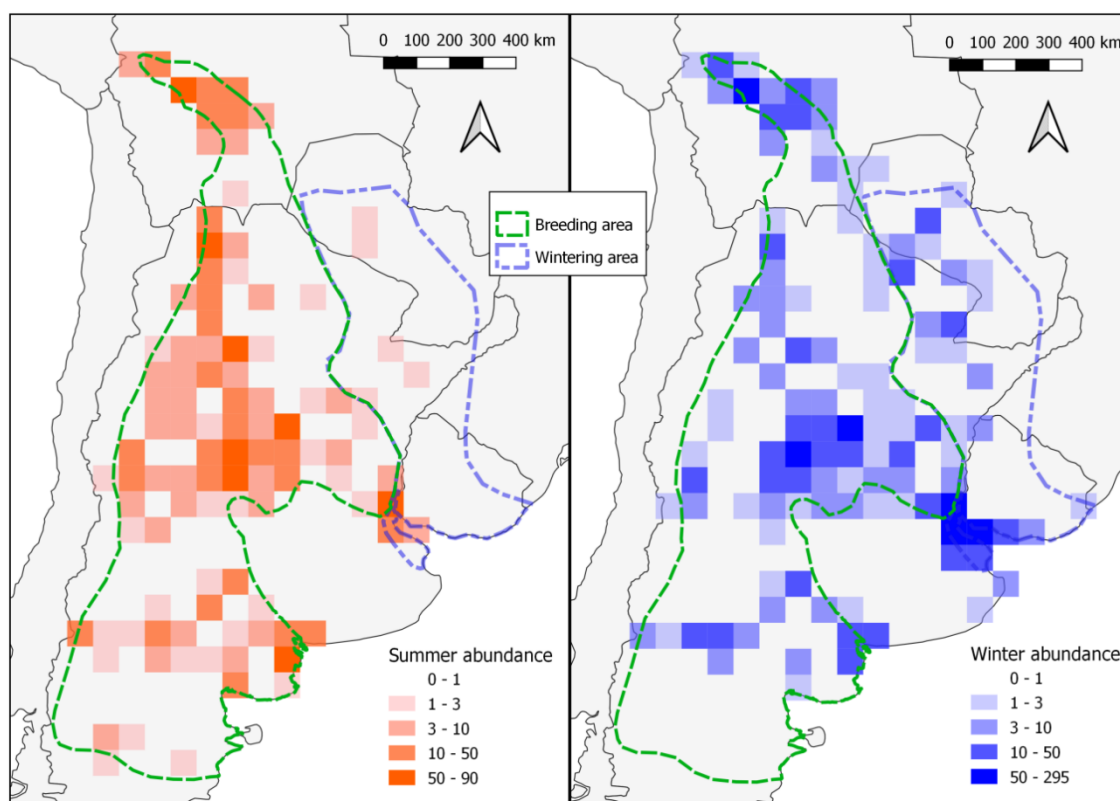


Tabla A1.1. Cargas de los componentes principales (PC) extraídos del conjunto de datos morfológicos de *Phytotoma rutila*. El porcentaje de varianza explicada se informa entre paréntesis.

Rasgos	PC1 (59.78%)	PC2 (13.77%)	PC3 (9.78%)	PC4 (7.51%)	PC5 (6.03%)	PC6 (3.14%)
BLT	0.500	-0.512	-0.298	-0.631	0.013	-0.032
BLN	0.336	-0.329	-0.437	0.747	0.128	-0.118
BW	0.396	0.745	-0.355	-0.117	0.382	0.041
BD	0.407	0.265	0.072	0.071	-0.819	-0.288
WL	0.407	-0.041	0.353	0.146	-0.058	0.827
TS	0.387	-0.052	0.682	0.059	0.404	-0.466

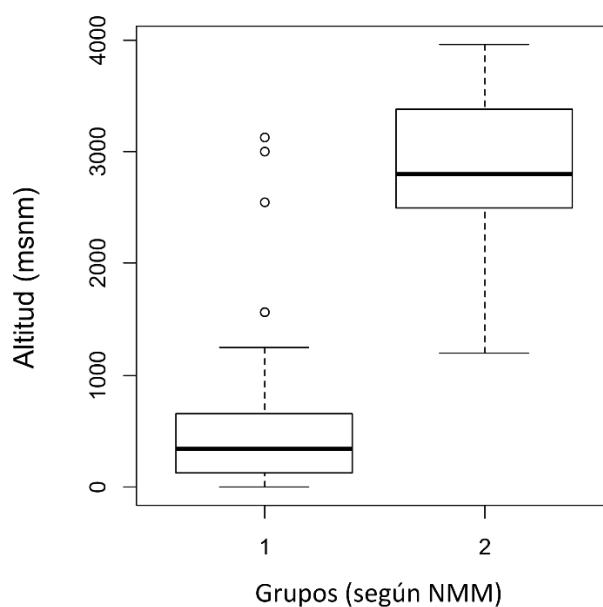


Figura A1.2. Diagrama de cajas de la altitud de la localidad de colecta de especímenes de museo de *P. rutila*, agrupados según el análisis NMM. Grupo 1: grupo de tierras bajas; grupo 2: grupo de tierras altas.

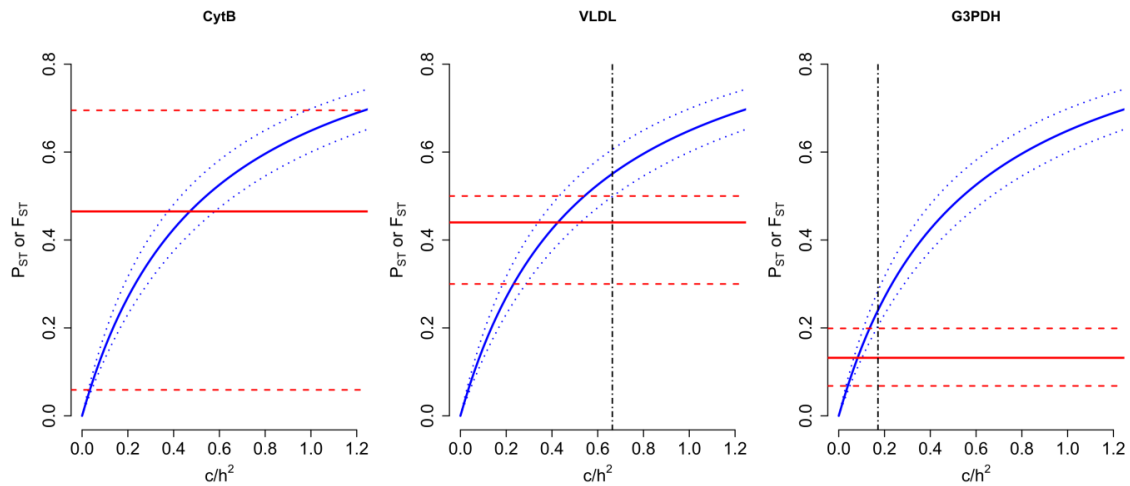


Figura A1.3. Comparaciones P_{ST} – F_{ST} del tamaño corporal (PC1) utilizando la muestra morfológica reducida con los tres marcadores genéticos (Ctyb, VLDL y G3PDH). Los valores F_{ST} se indican en rojo (IC 95% indicado por líneas discontinuas), y los valores P_{ST} se indican en azul (CI 95% indicado por líneas discontinuas). Las líneas verticales discontinuas indican el valor crítico de c/h^2 .

Bibliografía Anexo 1

Ridgely, R. S., y Tudor, G. (2009). Field guide to the songbirds of South America: The passerines. University of Texas Press.

ANEXO 2 (A2)

MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 3

Divergencia genómica y fenotípica con flujo genético a lo largo de un gradiente ecológico y altitudinal en un ave Neotropical

Tabla A2.1. Muestras utilizadas para el análisis genómico de *Phytotoma rutila*.

Número de Localidad	Muestra	País	Localidad	Coordenadas	Altitud (msnm)	Asignación a poblaciones	
						Subespecies	Cuatro poblaciones
1	MACN-Or-Ct 6694	Bolivia	La Paz, La Paz	-16.53, -68.06	3480	<i>angustirostris</i>	1
1	MACN-Or-Ct 6719	Bolivia	La Paz, La Paz	-16.53, -68.06	3480	<i>angustirostris</i>	1
1	MACN-Or-Ct 6703	Bolivia	La Paz, La Paz	-16.53, -68.06	3480	<i>angustirostris</i>	1
2	MACN-Or-Ct 5827	Bolivia	Ananta, La Paz	-16.61, -68.07	3100	<i>angustirostris</i>	1
2	LSUMZ 1208	Bolivia	Huajchilla, La Paz	-16.63, -68.04	3480	<i>angustirostris</i>	1
2	LSUMZ 1211	Bolivia	Huajchilla, La Paz	-16.63, -68.04	3480	<i>angustirostris</i>	1
3	MACN-Or-Ct 5828	Bolivia	Mecapaca, La Paz	-16.67, -68.01	2850	<i>angustirostris</i>	1
3	LSUMZ 1200	Bolivia	Mecapaca, La Paz	-16.69, -68.06	2919	<i>angustirostris</i>	1
3	LSUMZ 1202	Bolivia	Mecapaca, La Paz	-16.69, -68.06	2919	<i>angustirostris</i>	1
4	LSUMZ 34579	Bolivia	Comarapa, Santa Cruz	-18, -64.43	1620	<i>rutila?</i>	2
5	LSUMZ 18627	Bolivia	Charagua, Santa Cruz	-19.84, -62.02	520	<i>rutila?</i>	2
5	LSUMZ 18779	Bolivia	Charagua, Santa Cruz	-19.84, -62.02	520	<i>rutila?</i>	2
6	MACN-Or-Ct 5284	Argentina	Río Primero, Córdoba	-30.89, -63	90	<i>rutila</i>	3
7	MACN-Or-Ct 2189	Argentina	San Pedro, Buenos Aires	-33.79, -59.61	4	<i>rutila</i>	3
8	MACN-Or-Ct 2147	Argentina	Baradero, Buenos Aires	-33.89, -59.35	15	<i>rutila</i>	3
9	MACN-Or-Ct 4052	Argentina	Ñacuñan, Mendoza	-34.05, -67.95	580	<i>rutila</i>	3
9	MACN-Or-Ct 4079	Argentina	Ñacuñan, Mendoza	-34.05, -67.95	580	<i>rutila</i>	3
10	MACN-Or-Ct 0006	Argentina	Nicolás Levalle, Buenos Aires	-38.72, -62.93	1	<i>rutila</i>	4
11	MACN-Or-Ct 0015	Argentina	Pedro Luro, Buenos Aires	-39.45, -62.7	20	<i>rutila</i>	4
11	MACN-Or-Ct 0019	Argentina	Pedro Luro, Buenos Aires	-39.45, -62.7	20	<i>rutila</i>	4
12	MACN-Or-Ct 2766	Argentina	Las Grutas, Río Negro	-40.81, -65.1	0	<i>rutila</i>	4
12	MACN-Or-Ct 2780	Argentina	Las Grutas, Río Negro	-40.81, -65.1	0	<i>rutila</i>	4
12	MACN-Or-Ct 2809	Argentina	Las Grutas, Río Negro	-40.81, -65.1	0	<i>rutila</i>	4

*MACN-Or-Ct: Museo Argentino de Ciencias Naturales, Colección de Tejidos Ultracongelados Ornithology tissue collection.

LSUMZ: Louisiana State University Museum of Natural Science.

Tabla A2.2. Parámetros utilizados para el flujo de trabajo de *ipyrad* y las condiciones adicionales de filtrado de SNP utilizando VCFtools.

Parámetros de *ipyrad*

XXXXXXXX	## [0] [assembly_name]: Assembly name. Used to name output directories for assembly steps
XXXXXXXX	## [1] [project_dir]: Project dir (made in curdir if not present)
	## [2] [raw_fastq_path]: Location of raw non-demultiplexed fastq files
	## [3] [barcodes_path]: Location of barcodes file
Path	## [4] [sorted_fastq_path]: Location of demultiplexed/sorted fastq files
denovo	## [5] [assembly_method]: Assembly method (denovo, reference)
	## [6] [reference_sequence]: Location of reference sequence file
ddrad	## [7] [datatype]: Datatype (see docs): rad, gbs, ddrad, etc.
TGCAG,	## [8] [restriction_overhang]: Restriction overhang (cut1,) or (cut1, cut2)
5	## [9] [max_low_qual_bases]: Max low quality base calls (Q<20) in a read
33	## [10] [phred_Qscore_offset]: phred Q score offset (33 is default and very standard)
6	## [11] [mindepth_statistical]: Min depth for statistical base calling
6	## [12] [mindepth_majrule]: Min depth for majority-rule base calling
10000	## [13] [maxdepth]: Max cluster depth within samples
0.85	## [14] [clust_threshold]: Clustering threshold for de novo assembly
0	## [15] [max_barcode_mismatch]: Max number of allowable mismatches in barcodes
2	## [16] [filter_adapters]: Filter for adapters/primers (1 or 2=stricter)
35	## [17] [filter_min_trim_len]: Min length of reads after adapter trim
2	## [18] [max_alleles_consens]: Max alleles per site in consensus sequences
0.022	## [19] [max_Ns_consens]: Max N's (uncalled bases) in consensus
0.05	## [20] [max_Hs_consens]: Max Hs (heterozygotes) in consensus
19	## [21] [min_samples_locus]: Min # samples per locus for output (~80%)
0.22	## [22] [max_SNPs_locus]: Max # SNPs per locus
8	## [23] [max_Indels_locus]: Max # of indels per locus
0.5	## [24] [max_shared_Hs_locus]: Max # heterozygous sites per locus
0, 0, 0, 0	## [25] [trim_reads]: Trim raw read edges (R1>, <R1, R2>, <R2) (see docs)
0, 0, 0, 0	## [26] [trim_loci]: Trim locus edges (see docs) (R1>, <R1, R2>, <R2)
*	## [27] [output_formats]: Output formats (see docs)
	## [28] [pop_assign_file]: Path to population assignment file
	## [29] [reference_as_filter]: Reads mapped to this reference are removed in step 3

Parámetros de VCFTools

```
--mac 2
--max-alleles 2
--min-alleles 2
--max-missing 0.8
```

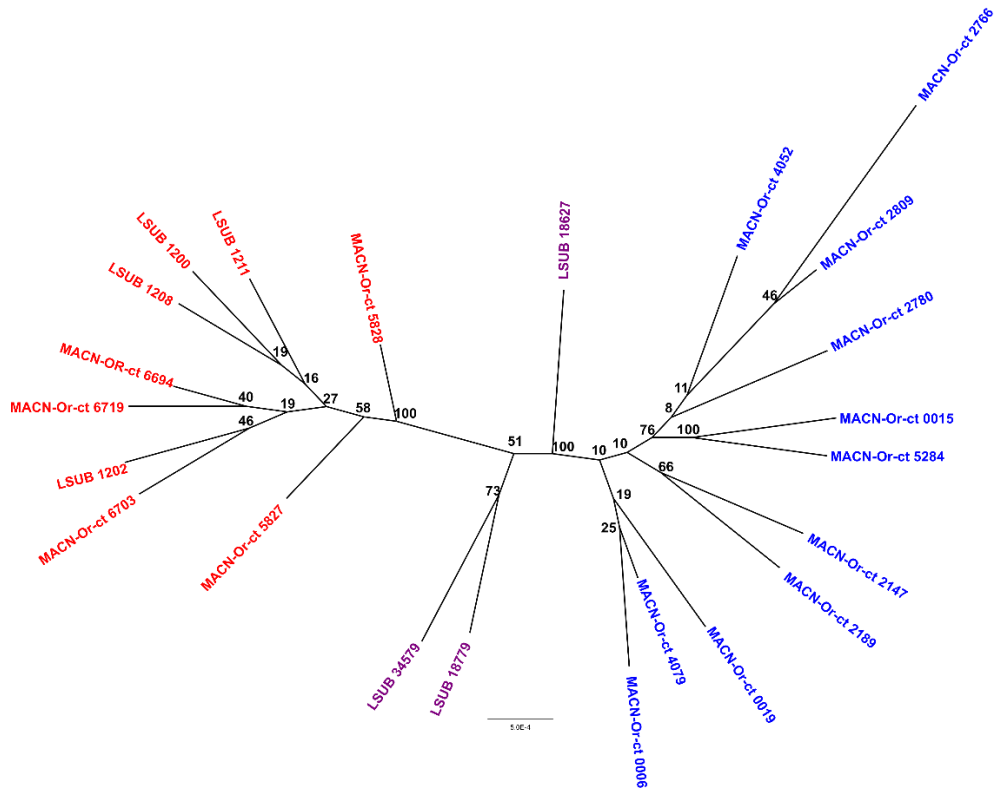


Figura A2.1. Árbol de máxima verosimilitud de las 23 muestras genómicas de *Phytotoma rutila*. Los ID de las muestras están coloreados de acuerdo con la asignación de población previa en STRUCTURE para $K = 3$. El soporte de *bootstrap* se muestra para cada nodo. La reconstrucción se realizó utilizando el programa RaxML.

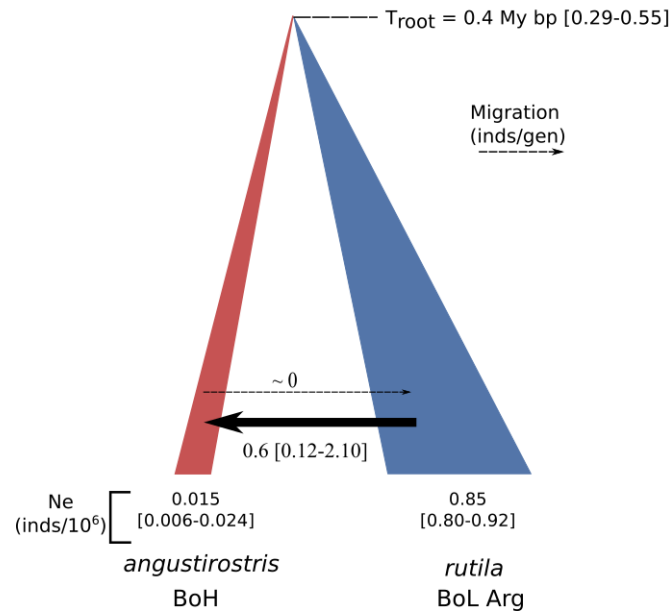


Figura A2.2. Resultados de GPhoc-S que muestran el flujo génico y el tiempo de divergencia entre las poblaciones de *Phytotoma rutila* utilizando el conjunto de datos de 21 muestras y $K = 2$. BoH: Tierras altas de Bolivia; BoL: Tierras bajas de Bolivia; Arg: Tierras bajas de Argentina. La migración se representa con flechas, siendo el grosor proporcional a la tasa de migración (inds/gen: individuos/generación). Las ramas del árbol

(que indican distintas poblaciones) son proporcionales a N_e (millones de individuos). El tiempo de divergencia (T) se expresa en millones de años antes del presente (Mya).

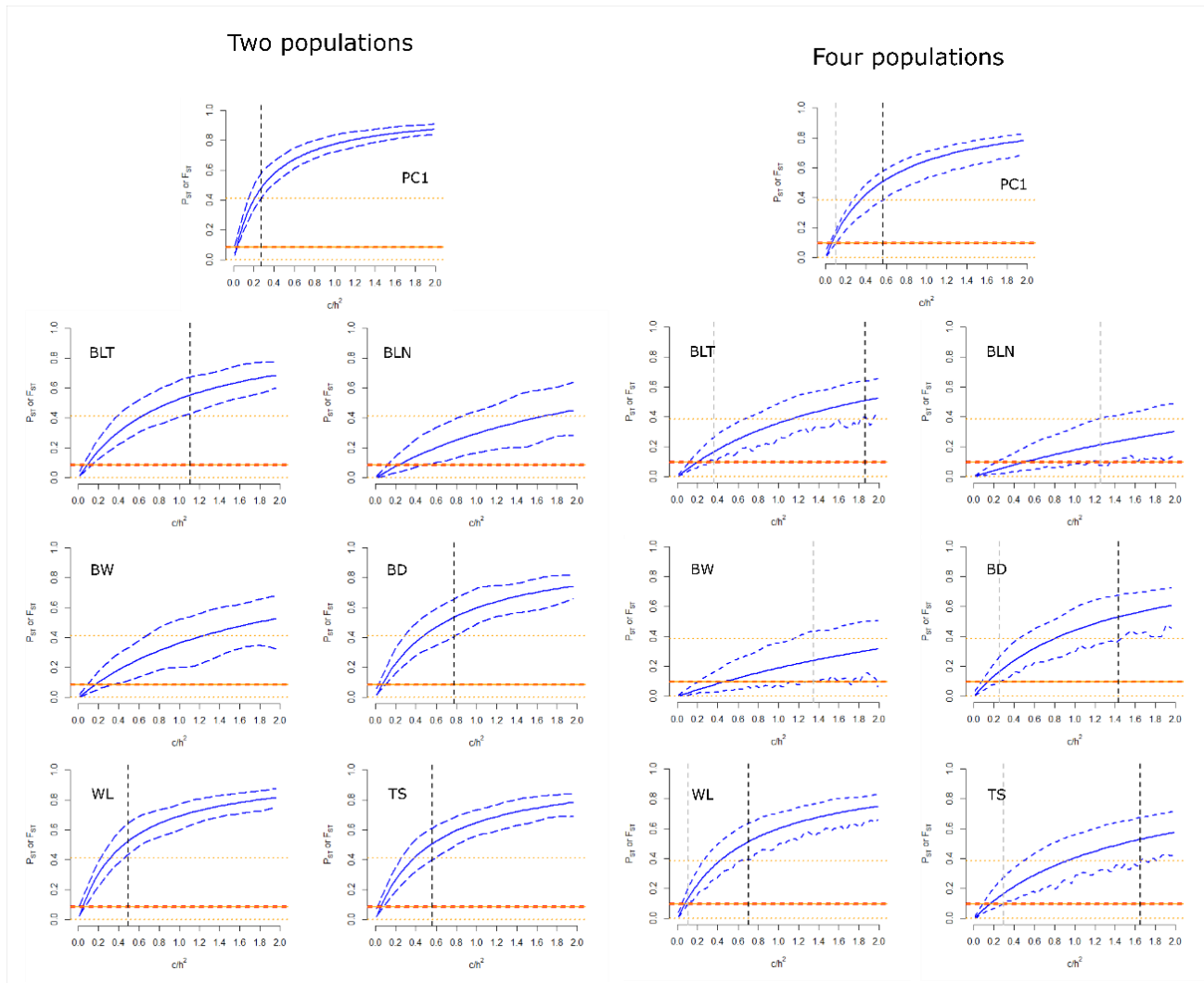


Figura A2.3. Comparaciones P_{ST} - F_{ST} de rasgos de tamaño corporal de *Phytotoma rutila* ($n = 146$) con datos de SNPs (4.193 SNPs) para dos y cuatro poblaciones. Los valores de F_{ST} se indican en naranja (F_{ST} global promedio y CI 95%) con líneas punteadas, y en amarillo (distribución del 95% de los valores de F_{ST}) con líneas punteadas. Los valores promedio de P_{ST} se representan con una línea continua azul, y el intervalo de confianza del 95% se indica con líneas punteadas azules. La línea punteada vertical de color negro indica el valor crítico de $\frac{c}{h^2}$. Abreviaturas: BLT: Longitud total del pico; BLN: Longitud del pico desde la narina; BW: Ancho del pico; BD: Profundidad del pico; WL: Largo de ala; TS: Longitud de tarso.

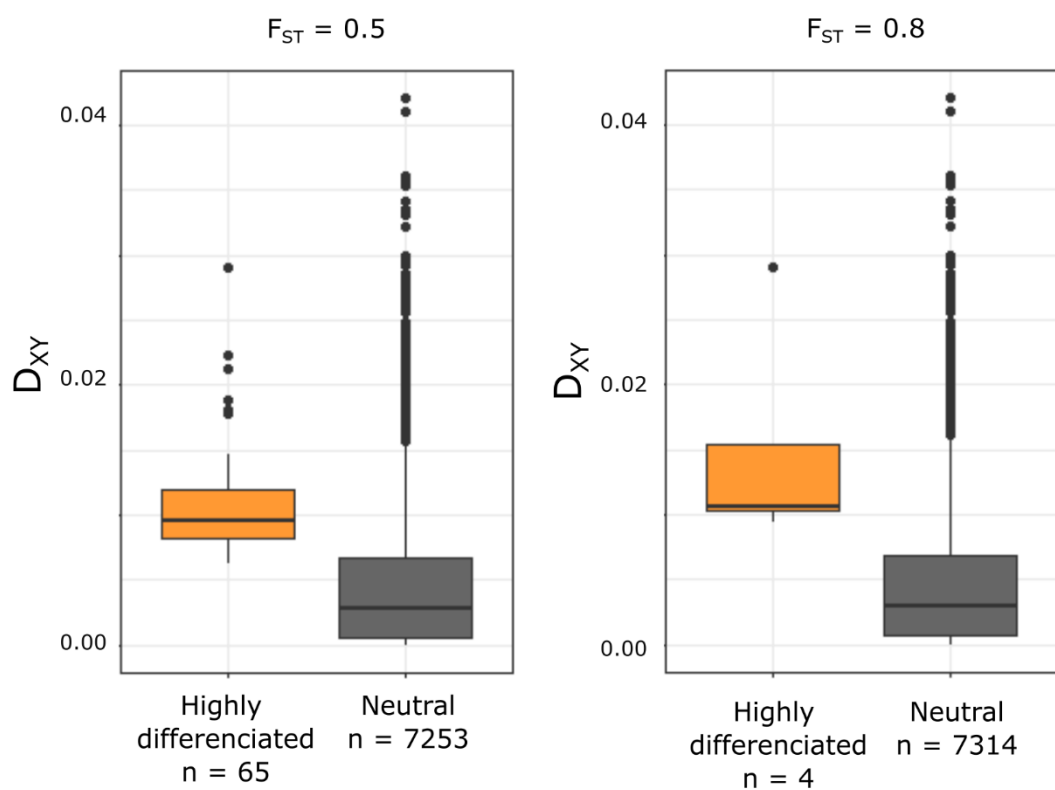


Figura A2.4. Divergencia absoluta entre loci ddRAD de *Phytotoma rutila*. Comparación de los valores de divergencia absoluta D_{XY} entre los loci de ddRAD altamente diferenciados y los loci neutrales (aquellos que no están identificados como *outliers*). D_{XY} promedio de los loci con $F_{ST} \geq 0.5 = 0,0108$ (CI 95%: 0,0098 - 0,012). D_{XY} promedio de los loci con $F_{ST} \geq 0,8 = 0,0149$ (CI 95%: 0,0097 - 0,024).

ANEXO 3 (A3)

MATERIAL SUPLEMENTARIO DEL CAPÍTULO 4

Diferentes procesos evolutivos desacoplan la divergencia con flujo génico entre la coloración y morfología de un ave (*Cranioleuca pyrrhophia*, Furnariidae) a lo largo del gradiente de bosques secos Chaco Andes

Tabla A3.1. Cargas de cada variable morfométrica de *Cranioleuca pyrrhophia* sobre los componentes principales (PC). Rasgos morfométricos: BLT: Largo total de pico (desde la base), BLN: largo de pico desde la narina, BD: profundidad del pico, BW: ancho del pico, WL: longitud del ala, TS: longitud de tarso,

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
BLT	-0,349	0,609	-0,272	0,086	0,190	0,624
BLN	-0,473	0,419	-0,174	-0,247	-0,008	-0,713
BW	-0,412	-0,400	-0,246	-0,513	-0,517	0,282
BD	-0,356	-0,364	-0,431	0,734	-0,025	-0,126
WL	-0,407	0,124	0,752	0,302	-0,398	0,059
TS	-0,438	-0,381	0,289	-0,197	0,733	0,057
Proporción acumulada	0,399	0,626	0,757	0,870	0,948	1,000

Tabla A3.2. Cargas de cada variable colorimétrica de *Cranioleuca pyrrhophia* sobre el componente principal 1 (PC1).

Variables	Corona	Espalda	Timoneras Centrales	Timoneras Externas	Garganta	Pecho	Cobertoras
B1	-0,32	-0,25	-0,08	-0,24	-0,20	0,15	-0,32
B2	-0,32	-0,25	-0,08	-0,24	-0,20	0,15	-0,32
B3	-0,21	-0,01	0,22	-0,03	-0,11	0,03	-0,21
S1U	-0,30	-0,33	-0,32	-0,34	-0,33	0,32	-0,30
S1V	-0,31	-0,34	-0,32	-0,34	-0,33	0,33	-0,31
S1B	-0,30	-0,24	-0,30	-0,31	-0,25	0,22	-0,30
S1G	0,04	0,32	0,07	0,16	0,33	-0,33	0,04
S1Y	0,25	0,34	0,31	0,30	0,34	-0,34	0,25
S1R	0,32	0,31	0,32	0,34	0,34	-0,34	0,32
S3	0,21	0,23	0,30	0,27	0,07	-0,20	0,21
S4	-0,09	0,05	0,10	0,11	0,03	-0,07	-0,09
S5	-0,21	0,11	0,26	-0,01	0,15	-0,15	-0,21
S6	-0,20	0,02	0,24	0,01	-0,02	-0,04	-0,20

S7	0,10	0,19	0,13	0,06	0,25	-0,22	0,10
S8	0,32	0,30	0,32	0,35	0,30	-0,32	0,32
S10	0,04	0,17	0,25	0,22	0,13	-0,18	0,04
H3	0,25	0,23	0,19	0,25	0,30	-0,31	0,25
Proporció n acumulad a	0,44	0,46	0,50	0,43	0,49	0,46	0,46

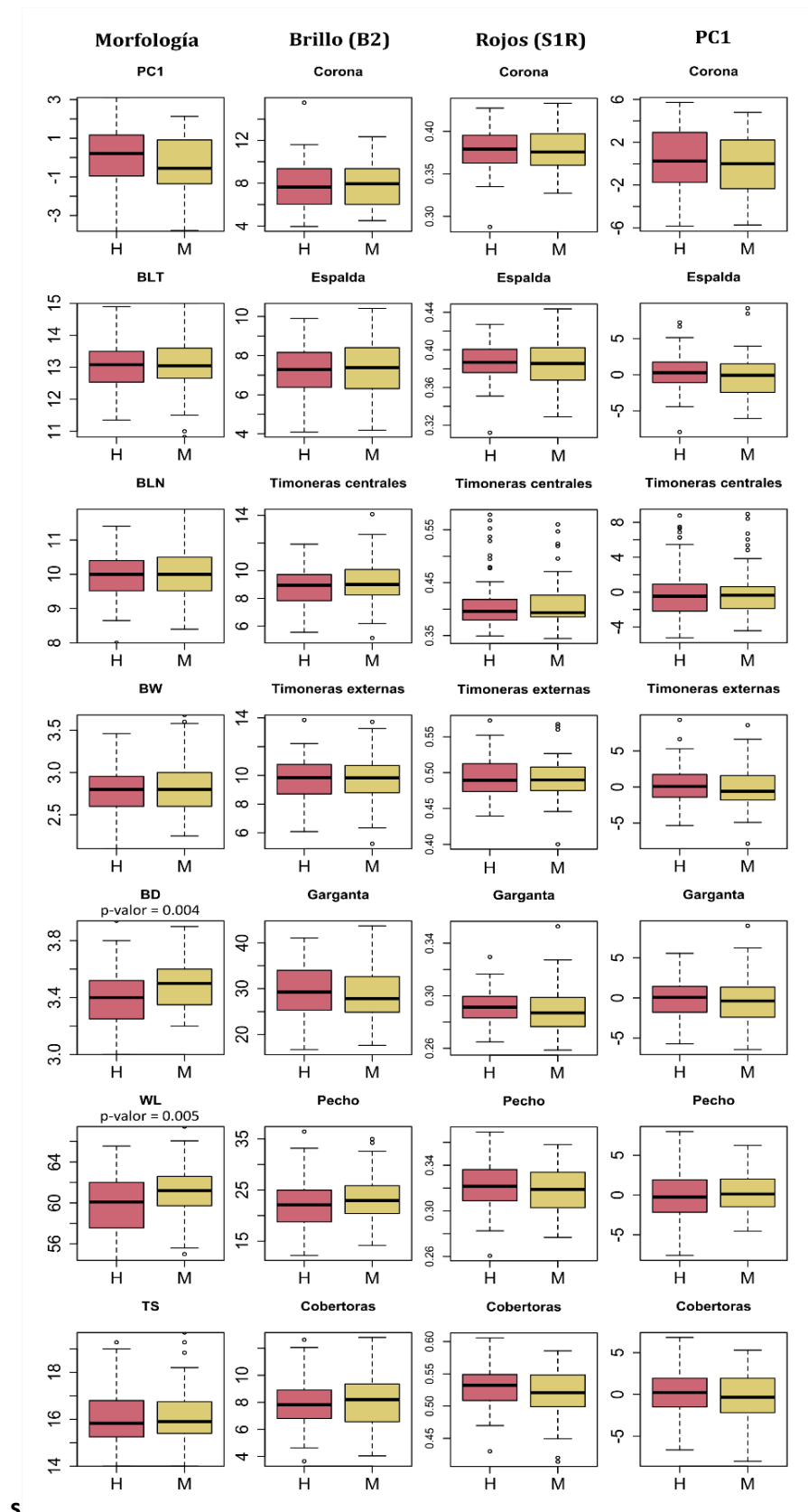


Figura A3.1. Diferencias fenotípicas entre machos y hembras de *Cranioleuca pyrrhophia*. En el diagrama de cajas y bigotes se representan la variación de cada rasgo (morfológico o de coloración) para ambos sexos. Rasgos morfométricos: BLT: Largo total de pico (desde la base), BLN: largo de pico desde la narina, BD:

profundidad del pico, BW: ancho del pico, WL: longitud del ala, TS: longitud de tarso, PC1: Componente principal 1 de los rasgos morfológicos (proxy de tamaño corporal). Variables colorimétricas: B2: reflectancia relativa media en todo el rango espectral entre 300 nm a 700 nm (tonos claros u oscuros); S1R: contribución relativa de la luz total reflejada entre 605 nm y 700 nm (colores rojos); PC1: Componente principal 1 de 18 variables de coloración, que explica entre 43 y 49% de la varianza. Se expresa el valor p para las pruebas de diferencias entre medias en aquellas variables en que la diferencia fue significativa (variables morfométricas BD y WL).

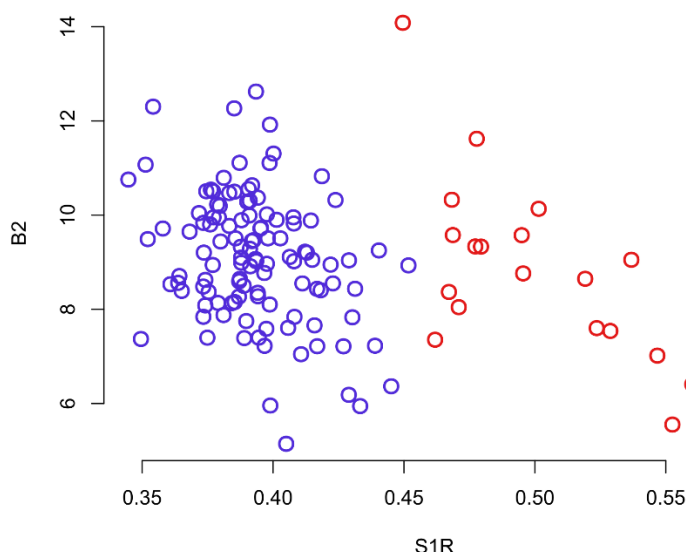


Figura A3.2. Análisis de Modelos Mixtos Normales (*Normal Mixed Models*, NMM) para el parche de Timoneras centrales de *Cranioleuca pyrrhophia*. El análisis mostró dos agrupamientos (grupo azul n = 113, grupo rojo n = 21), que separan los ejemplares de plumas de la cola rojas contra plumas marrones. La variable S1R fue la más importante a la hora de separar estos dos grupos.

Tabla A3.3. Análisis de correlación de Pearson y Spearman, y de Autocorrelación espacial (índice de Moran), para rasgos fenotípicos de *Cranioleuca pyrrhophia* versus latitud y longitud. El test de correlación se determinó en base a la evaluación de supuestos de normalidad, homocedasticidad y linealidad. Si alguno de los supuestos no se cumplió, se utilizó Spearman. Las variables en las que se utilizó Spearman fueron: BLN, TS, Cobertoras S1R, Garganta PC1 y S1R, Espalda PC1 y Corona S1R. En negrita se destacan resultados de correlación moderada o alta con $p < 0,01$.

Rasgo	Correlación con				Autocorrelación espacial	
	Latitud		Longitud		I de Moran	p-valor
	Corr	p-valor	Corr	p-valor		
Morfométricos						
BLT	0,001	0,992	-0,333	3E-07	0,192	0,020
BLN	-0,220	0,005	-0,079	0,317	0,217	0,010
BW	-0,144	0,065	0,473	3E-06	0,397	1E-05
BD	0,130	0,097	0,317	6E-06	0,279	0,002
WL	-0,215	0,006	0,071	0,364	0,201	0,016

TS	-0,110	0,460	0,464	6E-06	0,705	7E-14
PC1	0,111	0,161	-0,267	1E-04	0,448	1E-06
<i>Color Corona</i>						
B2	-0,092	0,292	-0,427	3E-07	0,379	2E-04
S1R	-0,032	0,715	0,271	0,002	0,350	0,001
PC1	0,178	0,039	0,259	0,002	0,468	7E-06
<i>Color Espalda</i>						
B2	-0,163	0,060	-0,210	0,015	0,558	1E-07
S1R	0,215	0,013	-0,110	0,204	0,486	3E-06
PC1	0,376	8E-06	-0,180	0,038	0,619	4E-09
<i>Color Timoneras centrales</i>						
B2	-0,154	0,076	-0,212	0,014	0,276	0,005
S1R	0,645	4E-17	-0,274	0,001	0,698	3E-11
PC1	0,598	3E-14	-0,369	1E-05	0,630	2E-09
<i>Color Timoneras externas</i>						
B2	-0,271	0,002	-0,047	0,591	0,123	0,114
S1R	0,415	6E-07	-0,304	4E-04	0,437	2E-05
PC1	0,425	0,000	-0,385	4E-06	0,422	4E-05
<i>Color Garganta</i>						
B2	-0,009	0,920	-0,238	0,006	0,097	0,170
S1R	-0,061	0,485	0,049	0,574	0,105	0,150
PC1	-0,013	0,878	0,041	0,638	0,115	0,129
<i>Color Pecho</i>						
B2	0,342	5E-05	-0,282	0,001	0,356	4E-04
S1R	-0,061	0,484	0,171	0,049	0,365	3E-04
PC1	0,001	0,987	-0,063	0,471	0,398	1E-04
<i>Color Cobertoras</i>						
B2	-0,150	0,083	-0,352	2E-05	0,475	5E-06
S1R	0,217	0,012	-0,014	0,871	0,274	0,005
PC1	0,279	0,001	0,089	0,305	0,412	6E-05

Tabla A3.4. Resultados del análisis de correlación de Pearson o Spearman de las variables de coloración con la edad de la piel. El test de correlación se determinó en base a la evaluación de supuestos de normalidad, homocedasticidad y linealidad. Si alguno de los supuestos no se cumplió, se utilizó Spearman, de lo contrario, se usó Pearson. En el Parche Garganta se usó la edad de la piel como cofactor.

Parche	Variable	R ²	p-valor
Corona	B2	0,000	0,318
	S1R	0,056	0,003
	PC1	-0,007	0,870
Espalda	B2	0,013	0,099
	S1R	0,063	0,002
	PC1	0,002	0,251
Timoneras centrales	B2	0,010	0,127
	S1R	0,003	0,245
	PC1	-0,007	0,865
Timoneras externas	B2	0,030	0,025

	S1R	0,021	0,051
	PC1	0,006	0,181
Garganta	B2	0,052	0,005
	S1R	0,187	5E-07
	PC1	0,197	2E-07
Pecho	B2	0,080	0,001
	S1R	0,094	5E-07
	PC1	0,094	2E-10
Cobertoras	B2	0,020	0,057
	S1R	-0,006	0,620
	PC1	0,009	0,144

Tabla A3.5. Resultados del MMRR multivariado y *Commonality analysis* de rasgos morfológicos de *Cranioleuca pyrrhophia*. Se expresan los coeficientes, valores p y los coeficientes Único, Común y Total de cada predictor a la distancia morfológica de cada rasgo morfométrico: PC1: Componente principal 1 de los rasgos morfológicos (proxy de tamaño corporal), BLT: Largo total de pico (desde la base), BLN: largo de pico desde la narina, BD: profundidad del pico, BW: ancho del pico, WL: longitud del ala, TS: longitud de tarso.

PC1						
Modelo	Predictor	Coeficiente	Valor p	Único	Común	Total
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,06694 p = 2,2e-16	GEO	-0,155	0,018	0,005	0,019	0,024
	ALT	0,007	0,922	5E-05	0,004	0,004
	PREC	0,076	0,604	2E-04	0,047	0,047
	TEMP	0,021	0,918	1E-06	0,039	0,039
	CLIM	0,340	0,241	0,001	0,059	0,060
BLT						
Modelo	Predictor	Coeficiente	Valor p	Único	Común	Total
BLT ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,03 p = 2,2e-16	GEO	-0,126	0,001	0,010	-0,009	0,001
	ALT	0,094	0,006	0,013	1E-05	0,013
	PREC	0,016	0,857	3E-06	0,003	0,003
	TEMP	0,017	0,870	2E-05	0,007	0,007
	CLIM	0,097	0,551	2E-04	0,008	0,008
BLN						
Modelo	Predictor	Coeficiente	Valor p	Único	Común	Total
BLN ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,01 p = 2,2e-16	GEO	-0,009	0,754	1E-04	0,003	0,003
	ALT	0,055	0,064	0,006	0,005	0,011
	PREC	-0,031	0,661	1E-04	1E-04	2E-04
	TEMP	-0,027	0,785	1E-04	0,004	0,004
	CLIM	0,063	0,626	1E-04	0,003	0,003
BW						
Modelo	Predictor	Coeficiente	Valor p	Único	Común	Total
BW ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,03 p = 0,002	GEO	-0,006	0,625	2E-04	0,012	0,012
	ALT	0,016	0,224	0,003	0,003	0,006
	PREC	0,013	0,687	1E-04	0,029	0,029
	TEMP	-0,044	0,327	0,001	0,006	0,007
	CLIM	0,062	0,307	0,001	0,020	0,020
BD						

Modelo	Predictor	Coefficiente	Valor p	Único	Común	Total
BD ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,01 p = 3e-14	GEO	0,007	0,386	0,001	0,003	0,004
	ALT	-0,011	0,139	0,003	-0,003	0,001
	PREC	-0,013	0,500	3E-04	0,006	0,007
	TEMP	-0,024	0,346	0,001	0,002	0,003
	CLIM	0,043	0,231	0,001	0,005	0,006
WL						
Modelo	Predictor	Coefficiente	Valor p	Único	Común	Total
WL ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,02 p = 2,2e-16	GEO	-0,187	0,145	0,002	-0,001	0,001
	ALT	-0,216	0,052	0,005	-0,004	0,001
	PREC	-0,643	0,024	0,003	-0,003	1E-04
	TEMP	-0,361	0,340	0,001	0,007	0,007
	CLIM	0,236	0,033	0,003	0,002	0,005
TS						
Modelo	Predictor	Coefficiente	Valor p	Único	Común	Total
TS ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,1 p = 2,2e-16	GEO	-0,223	0,001	0,012	0,009	0,021
	ALT	-0,014	0,803	1E-04	0,001	0,001
	PREC	0,500	0,001	0,009	0,046	0,056
	TEMP	0,675	0,001	0,009	0,043	0,053
	CLIM	-0,516	0,050	0,003	0,068	0,071

Tabla A3.6. Resultados del MMRR multivariado y *Commonality analysis* de rasgos de coloración de *Cranioleuca pyrrhophia*. Se expresan los coeficientes, valores p y los coeficientes Único, Común y Total de cada predictor a la distancia colorimétrica de cada parche (Corona, Espalda, Timoneras centrales, Timoneras externas, Garganta, Pecho, Cobertoras) y cada variable: S1R: contribución relativa de la luz total reflejada entre 605 nm y 700 nm (colores rojos), B2: reflectancia relativa media en todo el rango espectral entre 300 nm a 700 nm (tonos claros u oscuros); PC1: Componente principal 1 de 18 variables de coloración, que explica entre 43 y 49% de la varianza.

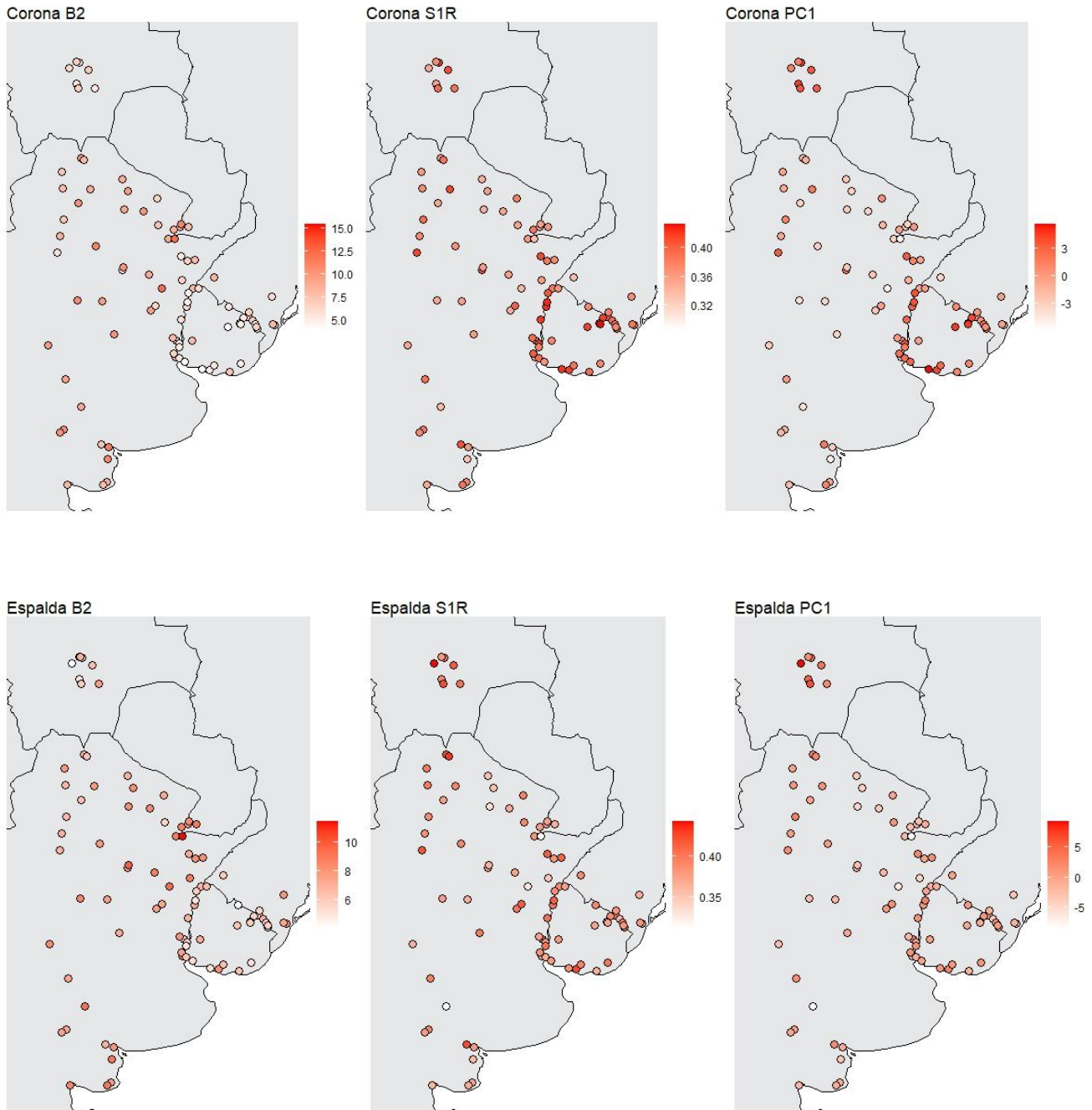
Corona						
Modelo	Predictor	Coefficiente	p-valor	Único	Común	Total
B2 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,014 p = 2,2e-16	GEO	0,039	0,005	0,001	0,000	0,002
	ALT	-0,022	0,011	0,002	-0,001	0,001
	PREC	0,087	0,326	2E-04	0,008	0,008
	TEMP	0,076	0,270	2E-04	0,006	0,006
	CLIM	0,093	0,892	3E-04	0,009	0,009
S1R ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,004 p = 2,2e-16	GEO	-0,013	0,007	0,001	-0,001	2E-04
	ALT	-0,045	0,012	0,002	0,001	0,002
	PREC	0,001	0,852	6E-05	2E-04	2E-04
	TEMP	-0,039	0,599	1E-04	0,002	0,002
	CLIM	-0,027	0,846	2E-04	0,001	0,001
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,015 p = 2,2e-16	GEO	0,076	0,399	1E-04	0,006	0,006
	ALT	0,106	3E-04	0,004	0,008	0,011
	PREC	0,014	0,142	0,001	-3E-04	2E-04
	TEMP	0,096	0,712	2E-04	0,009	0,009
	CLIM	0,075	0,207	3E-04	0,005	0,006
Espalda						
Modelo	Predictor	Coefficiente	p-valor	Único	Común	Total

B2 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,020 p = 2,2e-16	GEO	0,057	0,038	0,001	0,002	0,003
	ALT	0,119	1E-04	0,015	-0,001	0,014
	PREC	0,053	2E-04	0,005	-0,002	0,003
	TEMP	0,051	0,002	0,003	-3E-04	0,003
	CLIM	0,056	0,002	0,003	2E-04	0,003
S1R ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,013 p = 2,2e-16	GEO	0,058	1E-04	0,003	4E-04	0,004
	ALT	0,087	0,003	0,002	0,006	0,008
	PREC	-0,020	0,001	0,002	-0,002	4E-04
	TEMP	0,022	0,002	0,002	-0,002	0,001
	CLIM	0,010	0,009	0,001	-0,001	1E-04
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,189 p = 2,2e-16	GEO	0,225	0,001	0,003	0,048	0,051
	ALT	0,426	1E-04	0,106	0,076	0,182
	PREC	-0,016	0,722	4E-06	3E-04	3E-04
	TEMP	0,172	0,559	1E-04	0,030	0,030
	CLIM	0,113	0,278	3E-04	0,013	0,013
Timoneras Centrales						
Modelo	Predictor	Coefficiente	p-valor	Único	Común	Total
B2 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,080 p = 2,2e-16	GEO	0,111	1E-04	0,007	0,006	0,013
	ALT	0,263	1E-04	0,062	0,007	0,070
	PREC	0,082	0,920	0E+00	0,007	0,007
	TEMP	0,114	0,185	4E-04	0,013	0,013
	CLIM	0,123	0,087	0,001	0,015	0,015
S1R ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R² = 0,591 p = 2,2e-16	GEO	0,469	1E-04	0,011	0,210	0,221
	ALT	0,757	1E-04	0,292	0,282	0,574
	PREC	0,077	1E-04	0,007	-0,001	0,006
	TEMP	0,360	1E-04	0,006	0,124	0,130
	CLIM	0,298	1E-04	0,005	0,085	0,089
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R² = 0,499 p = 2,2e-16	GEO	0,438	1E-04	0,014	0,178	0,192
	ALT	0,694	1E-04	0,241	0,242	0,483
	PREC	0,061	2E-04	0,003	4E-04	0,004
	TEMP	0,328	4E-04	0,003	0,105	0,108
	CLIM	0,265	0,005	0,001	0,069	0,071
Timoneras externas						
Modelo	Predictor	Coefficiente	p-valor	Único	Común	Total
B2 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,036 p = 2,2e-16	GEO	0,071	0,510	1E-04	0,005	0,005
	ALT	0,180	1E-04	0,030	0,002	0,032
	PREC	0,027	0,257	3E-04	0,001	0,001
	TEMP	0,035	0,936	8E-05	0,001	0,001
	CLIM	0,039	0,514	1E-04	0,002	0,002
S1R ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,189 p = 2,2e-16	GEO	0,251	2E-04	0,003	0,061	0,063
	ALT	0,418	1E-04	0,093	0,082	0,175
	PREC	0,004	0,001	0,003	-0,003	7E-05
	TEMP	0,215	1E-04	0,006	0,040	0,047
	CLIM	0,146	1E-04	0,006	0,015	0,021
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,244 p = 2,2e-16	GEO	0,296	0,007	0,002	0,086	0,088
	ALT	0,486	1E-04	0,132	0,105	0,237
	PREC	0,047	0,002	0,003	-0,001	0,002
	TEMP	0,254	1E-04	0,004	0,060	0,065

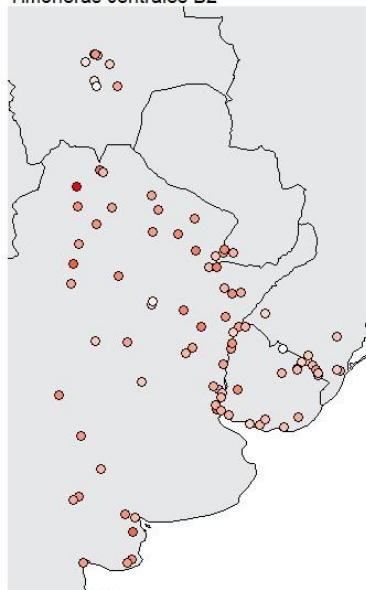
	CLIM	0,195	1E-04	0,004	0,034	0,038
Garganta						
Modelo	Predictor	Coefficiente	p-valor	Único	Común	Total
B2 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,008 p = 2,2e-16	GEO	-0,020	0,073	0,001	-1E-04	4E-04
	ALT	-0,055	0,010	0,001	0,002	0,003
	PREC	0,053	0,527	1E-04	0,003	0,003
	TEMP	-0,020	0,033	0,001	-3E-04	4E-04
	CLIM	0,013	0,037	0,001	-0,001	2E-04
S1R ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,010 p = 2,2e-16	GEO	-0,082	0,006	0,001	0,005	0,007
	ALT	-0,035	0,187	4E-04	0,001	0,001
	PREC	-0,025	0,139	4E-04	2E-04	0,001
	TEMP	-0,091	0,002	0,002	0,007	0,008
	CLIM	-0,070	0,023	0,001	0,004	0,005
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,016 p = 2,2e-16	GEO	-0,099	0,064	0,001	0,009	0,010
	ALT	-0,072	0,251	3E-04	0,005	0,005
	PREC	-0,039	0,002	0,002	-4E-04	0,002
	TEMP	-0,110	1E-04	0,004	0,008	0,012
	CLIM	-0,089	1E-04	0,003	0,005	0,008
Pecho						
Modelo	Predictor	Coefficiente	p-valor	Único	Común	Total
B2 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,003 p = 2,2e-16	GEO	0,039	0,213	3E-04	0,001	0,002
	ALT	0,010	0,197	4E-04	-3E-04	1E-04
	PREC	0,017	0,150	4E-04	-1E-04	3E-04
	TEMP	0,044	0,358	2E-04	0,002	0,002
	CLIM	0,040	0,182	4E-04	0,001	0,002
S1R ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,012 p = 2,2e-16	GEO	-0,047	0,010	0,001	0,001	0,002
	ALT	-0,088	1E-04	0,007	0,001	0,008
	PREC	-0,057	0,102	0,001	0,003	0,003
	TEMP	-0,044	0,006	0,001	0,001	0,002
	CLIM	-0,063	0,004	0,002	0,003	0,004
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,014 p = 2,2e-16	GEO	-0,069	0,026	0,001	0,004	0,005
	ALT	-0,083	2E-04	0,004	0,003	0,007
	PREC	-0,086	0,312	2E-04	0,007	0,008
	TEMP	-0,067	0,025	0,001	0,004	0,005
	CLIM	-0,092	0,011	0,001	0,007	0,009
Cobertoras						
Modelo	Predictor	Coefficiente	p-valor	Único	Común	Total
B2 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,017 p = 2,2e-16	GEO	0,085	0,157	0,001	0,007	0,007
	ALT	0,040	0,880	3E-05	0,002	0,002
	PREC	0,075	0,027	0,001	0,004	0,006
	TEMP	0,123	0,002	0,003	0,013	0,015
	CLIM	0,116	0,047	0,001	0,013	0,014
S1R ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM R ² = 0,014 p = 2,2e-16	GEO	0,029	1E-04	0,004	-0,003	0,001
	ALT	0,052	0,030	0,002	0,001	0,003
	PREC	-0,034	0,001	0,003	-0,002	0,001
	TEMP	-0,011	0,001	0,003	-0,003	1E-04
	CLIM	-0,030	1E-04	0,005	-0,004	0,001
PC1 ~ GEO + ALT + PREC + TEMP + CLIM	GEO	0,134	0,016	0,002	0,017	0,018

$R^2 = 0,069$	ALT	0,247	1E-04	0,033	0,028	0,061
$p = 2,2e-16$	PREC	-0,031	0,125	0,001	0,000	0,001
	TEMP	0,111	0,005	0,002	0,010	0,013
	CLIM	0,059	0,004	0,002	0,001	0,004

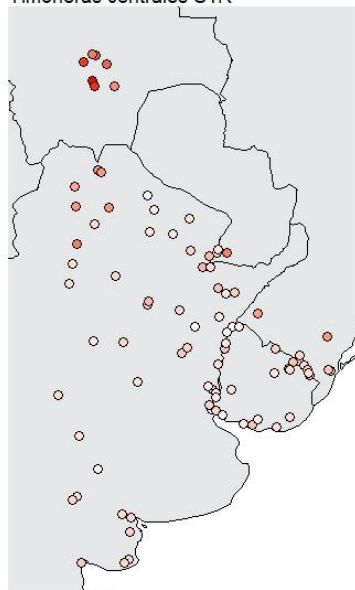
Figura A3.3. Variación geográfica de las variables de coloración (B2, S1R y PC1) por parche del plumaje de *Cranioleuca pyrrhophia*. Los parches de plumaje estudiados fueron Corona, Espalda, Timoneras Centrales, Timoneras externas, Gaganta, Pecho y Cobertoras. Las variables estudiadas por parche fueron brillo (B2), tonos rojizos (S1R) y el PC1 de todas las variables de coloración



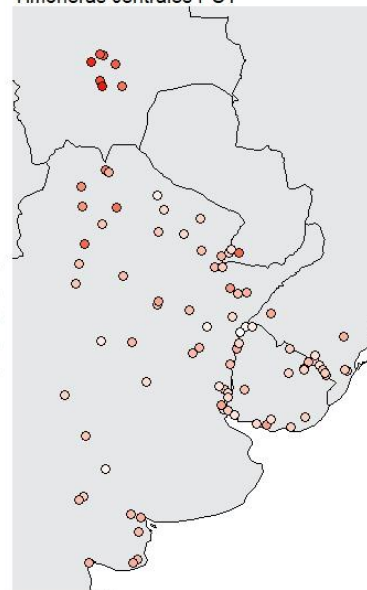
Timoneras centrales B2



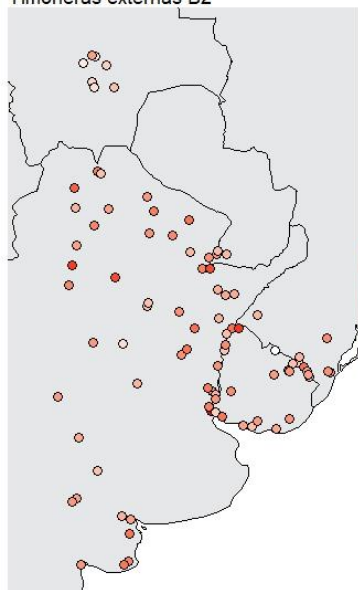
Timoneras centrales S1R



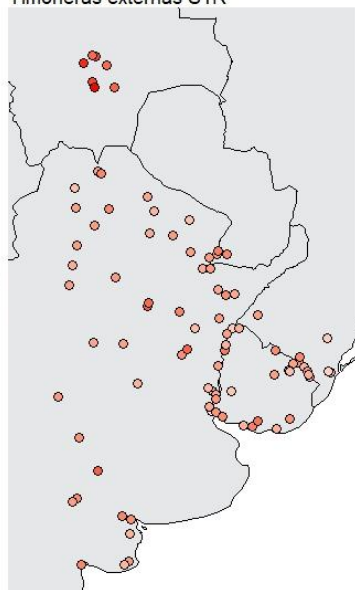
Timoneras centrales PC1



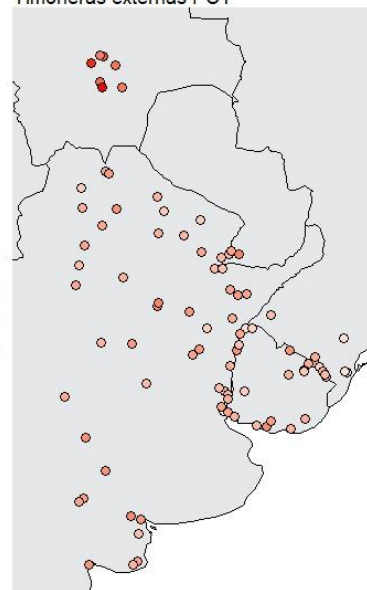
Timoneras externas B2



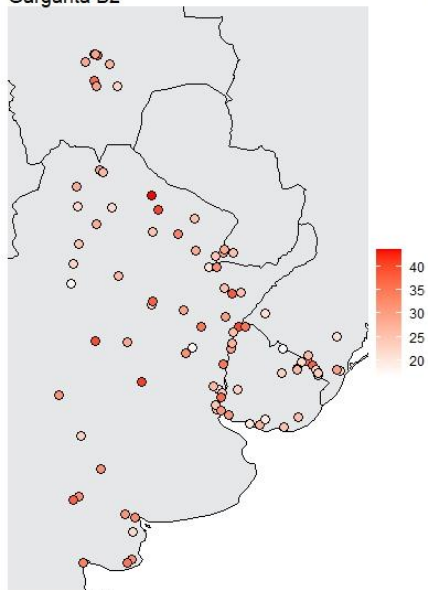
Timoneras externas S1R



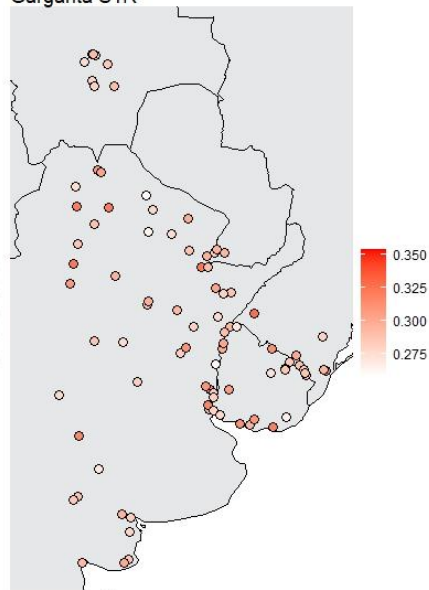
Timoneras externas PC1



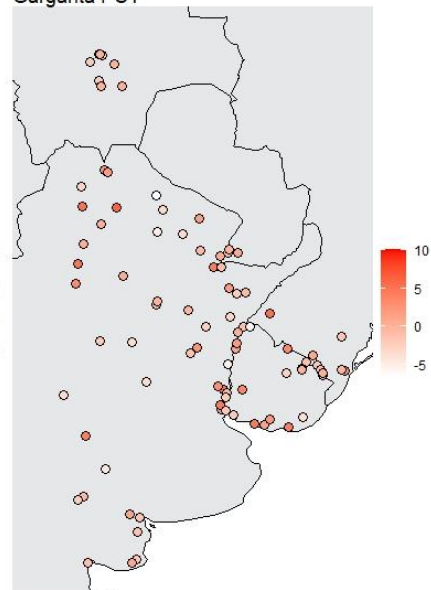
Garganta B2



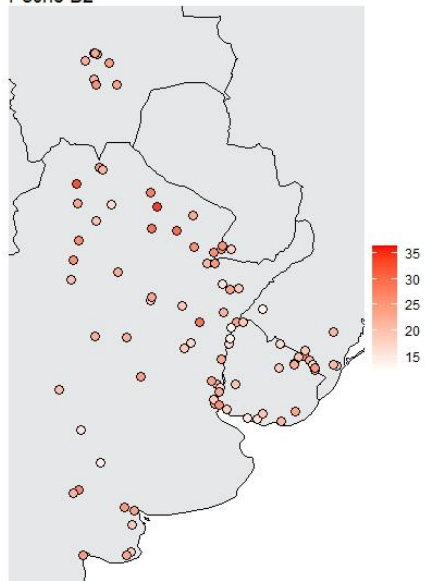
Garganta S1R



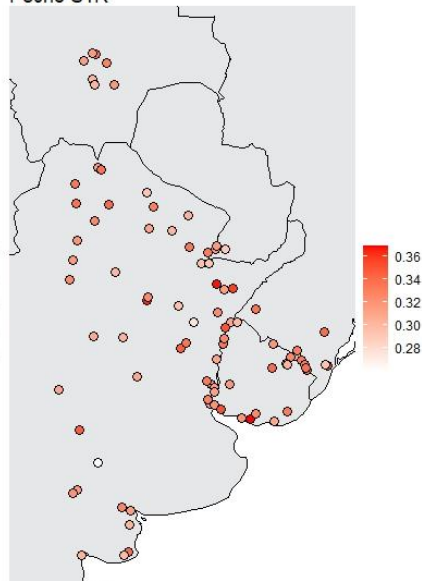
Garganta PC1



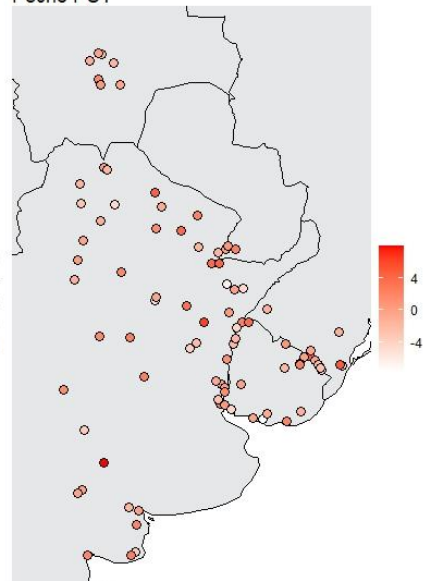
Pecho B2



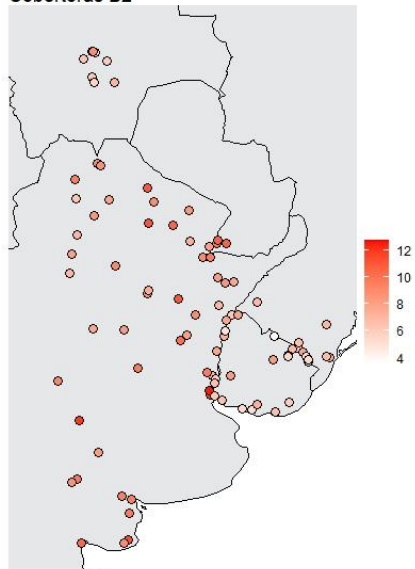
Pecho S1R



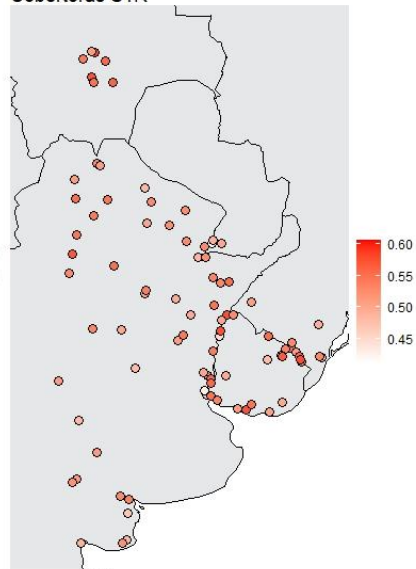
Pecho PC1



Cobertoras B2



Cobertoras S1R



Cobertoras PC1

