

Análisis de la diversidad genética a partir de secuencias del gen ND2 de *Euphonia laniirostris*
en tres localidades de Santander, Colombia

Bianeth García Barrios

Trabajo de Grado para optar al Título de Bióloga

Director

Fernando Rondón González

Ph.D Ciencias-Biología

Universidad industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2018

Agradecimientos

A mi familia por su cariño, paciencia y amor a lo largo de esta carrera profesional y durante mi vida, en especial a mi madre por ser un apoyo incondicional, a mis hermanas por cada una de sus enseñanzas y a mis sobrinos por su amor.

A Gerardo González por ser mi apoyo y acompañamiento en esta etapa de mi vida y por ser parte fundamental en mi formación personal.

A mis compañeros de carrera por hacer de esta un recuerdo muy grato, en especial a Salomé, Lina, Jeffer, Leydy y Julián por todos los momentos compartidos.

Al profesor Fernando Rondón por el aporte a mi formación académica y personal a lo largo de la carrera y en el desarrollo de mi trabajo de grado.

A mis compañeras de trabajo que aportaron cada día a mi formación personal y profesional, en especial a Yami, Claudia y Susana.

A los integrantes del LGPC-UIS, especialmente a Lizeth, Daniela V., Daniel C. y Camila por el acompañamiento tanto en las salidas de campo como al ingreso del laboratorio.

A mis compañeros del LGB-UIS, por el apoyo y el estar presentes en el desarrollo de mi trabajo de grado, en especial a Daniela M., John e Iván.

Al semillero de Ornitología por las experiencias compartidas y el aporte a mi formación, en especial a Silvia F., Angie, Daniel B., y Juan.

A Doña Gloria Núñez y Uriel Vargas, José Elson Meneses y Oswaldo Acevedo, propietarios de las fincas en Río Negro, San Vicente de Chucurí y la Hacienda El Roble, respectivamente, por permitir tener acceso a las propiedades donde se adelantaron los muestreos.

A cada una de las personas que aportaron a mi formación personal y profesional.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	12
1. Objetivos.....	14
1.1 <i>Objetivo General.....</i>	<i>14</i>
1.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>14</i>
2. Marco Teórico.....	14
2.1 <i>Generalidades de Euphonia laniirostris (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837).....</i>	<i>14</i>
2.2 <i>Genética Poblacional</i>	<i>16</i>
2.2.1 <i>Marcadores Moleculares..</i>	<i>16</i>
2.2.2 <i>Generalidades del ADN Mitocondrial.</i>	<i>17</i>
2.2.3 <i>Generalidades del Gen ND2.....</i>	<i>17</i>
2.3 <i>Estudios Moleculares de E. laniirostris.....</i>	<i>18</i>
3. Métodos.....	18
3.1 <i>Fase de Campo</i>	<i>19</i>
3.1.1 <i>Área de Estudio.</i>	<i>19</i>
3.1.2 <i>Toma de Muestras.</i>	<i>20</i>
3.2 <i>Fase de Laboratorio</i>	<i>20</i>
3.2.1 <i>Extracción de ADN.</i>	<i>20</i>
3.2.2 <i>Condiciones de PCR.</i>	<i>20</i>

3.2.3	Visualización de Productos Amplificados.	21
3.2.4	Secuenciación del Gen ND2.	21
3.3	<i>Análisis de Datos</i>	22
4.	Resultados	22
4.1	<i>Amplificación del Gen ND2 en E. laniirostris</i>	22
4.2	<i>Secuenciación del Gen ND2</i>	24
4.2.1	Composición Nucleotídica de Secuencias.	24
4.2.2	Análisis de Secuencias..	24
4.3	<i>Tipo y Número de Haplotipos ND2 en E. laniirostris</i>	25
4.4	<i>Diversidad y Estructura Genética</i>	28
4.4.1	Diversidad Haplotípica (h) y Nucleotídica (π).	28
4.4.2	Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).....	29
4.4.3	Flujo Genético y Test de Neutralidad.....	30
5.	Discusión	30
6.	Conclusiones	36
7.	Recomendaciones	37
	Referencias Bibliográficas	38
	Apéndices	49

Lista de Tablas**Pág.**

Tabla 1. Porcentaje de bases nitrogenadas por localidad en las secuencias ND2 analizadas .	24
Tabla 2. Sitios polimórficos de secuencias del gen ND2 en individuos de <i>E. laniirostris</i> en tres localidades de Santander	26
Tabla 3. Frecuencias de haplotipos ND2 de <i>E. laniirostris</i>	27
Tabla 4. Diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (h) por localidad basada en secuencias ND2 de <i>E. laniirostris</i>	29
Tabla 5. Flujo genético y test de neutralidad a partir de secuencias ND2 de <i>E. laniirostris</i> ..	30

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Área de muestreo.....	20
Figura 2. Producto amplificado por PCR del gen mitocondrial ND2 de <i>E. laniirostris</i>	23
Figura 3. Red de haplotipos del gen ND2 en individuos de <i>E. laniirostris</i> construida con el software Network v4.6.1.6 (2004).	28

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice a. Análisis de las variaciones encontradas en los individuos de <i>E. laniirostris</i>	49
Apéndice b. Traducción de las secuencias del gen ND2 en <i>E. laniirostris</i>	49
Apéndice c. Valores del estadístico F_s (Fu, 1997) a partir de secuencias ND2 de <i>E. laniirostris</i>	49

Resumen en Español

TITULO: ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA A PARTIR DE SECUENCIAS DEL GEN ND2 DE *Euphonia laniirostris* EN TRES LOCALIDADES DE SANTANDER, COLOMBIA*

AUTOR: BIANETH GARCÍA BARRIOS**

PALABRAS CLAVES: DIVERSIDAD GENÉTICA, ADNmt, HAPLOTIPOS.

DESCRIPCION:

Euphonia laniirostris es una especie de ave de amplia distribución y menor preocupación según la IUCN, con diferentes estudios relacionados con su biología, pero ninguno con su diversidad genética y por ende con su conservación; motivada, por lo general, por el descenso en el tamaño poblacional. Pocos estudios se centran en especies cosmopolitas, desconociendo sus dinámicas poblacionales y grado de amenaza, los cuales a futuro pueden ser importantes en la implementación de programas de conservación que involucren estas especies. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue estimar la diversidad y el grado de estructura genética de *E. laniirostris* a partir del uso de secuencias del gen ND2 del ADNmt. Para esto se amplificó y secuenció el gen ND2 en 39 muestras de *E. laniirostris* recolectadas en tres localidades del departamento de Santander, Colombia. Las secuencias fueron editadas con BioEdit v.7.0.5 (1999) y ensambladas en Mega v.7.0. (2016). Distintos parámetros genéticos poblacionales y de estructura genética fueron estimados con Arlequin v.3.5 (2010). Producto de esta investigación se caracterizaron 36 haplotipos en *E. laniirostris* entre las posiciones 17 a 964 del gen ND2, entre las que se encontraron 21,4% de sitios polimórficos. San Benito presentó mayor número de haplotipos (15), La Hacienda el Roble mayor diversidad nucleotídica ($\pi=0,0236$) y menor flujo génico ($Nm=26,295$ Roble-Diviso y $Nm=13,180$ Roble-San Benito). Adicionalmente, se encontró poca diferenciación genética pero altamente significativa entre las localidades consideradas ($\phi=0,02909$, $p=0,00587$), 9/947 sitios polimórficos estarían contribuyendo a la poca diferenciación. A partir de las secuencias ND2 analizadas en *E. laniirostris* se concluye que esta especie de jilguero constituye una metapoblación, con ligera diferenciación genética en las localidades estudiadas, debido a la falta de haplotipos compartidos, distintos sitios privados y nueve sitios polimórficos que aportan a la misma. Además, el presente estudio brinda evidencia que soporta la importancia de conservar los bosques asociados a cafetales de la Hacienda El Roble, dado que en estos se detectó el mayor número de haplotipos distintivos de esta especie de jilguero aparentemente cosmopolita.

*Trabajo de Grado

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director Fernando Rondón González Ph.D Ciencias-Biología

Resumen en Inglés

TITLE: ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY FROM SEQUENCES OF THE GENE ND2 OF *Euphonia laniirostris* IN THREE LOCATIONS IN SANTANDER, COLOMBIA*

AUTHOR: BIANETH GARCÍA BARRIOS**

KEYWORDS: GENETIC DIVERSITY, mtDNA, HAPLOTYPES.

DESCRIPTION:

Euphonia laniirostris is a species of bird of wide distribution and less concern according to the IUCN, has different studies of its biology, but none of genetic diversity. Few studies focus on cosmopolitan species, ignoring their population dynamics and degree of threat, which in the future may be important in the implementation of conservation programs involving these species. On that basis, the objective consisted in estimating the diversity and the degree of genetic structure of *E. Laniirostris* from sequences present in MtDNA. For this amplified and sequenced the gene ND2 in 39 samples collected in three locations in the Department of Santander, Colombia. The sequences were edited with BioEdit v. 7.0.5 and assembled in Mega v. 7.0. Different population genetic parameters and genetic structure were estimated with Arlequin v. 3.5. 36 haplotypes were typified between the positions 17 to 964 of the ND2 gene, detecting 21.4% of polymorphic sites among them. San Benito presented a greater number of haplotypes (15), while the Hacienda El Roble greater diversity nucleotide ($\pi = 0,0236$) and lower gene flow ($Nm=26,295$ Roble-Diviso y $Nm=13,180$ Roble-San Benito). In addition, little genetic differentiation was found but highly significant among the locations considered ($\Phi = 0,02909$, $p = 0,00587$), where 9 polymorphic sites would be contributing to this differentiation. From the sequences ND2 analyzed in *E. laniirostris* concludes that this goldfinch species constitutes a metapopulation, with light genetic differentiation in the studied localities, due to the absence of shared haplotipos, different private places and nine polymorphic sites that contribute the same one. In addition, the present study provides evidence that supports the importance of preserving the forests associated with coffee plantation of the Hacienda El Roble, since this locality detected the largest number of distinctive haplotypes of this species of goldfinch apparently cosmopolitan.

* Bachelor Thesis.

**Facultad de Ciencias, Escuela de Biología. Director Fernando Rondón González Ph.D Ciencias-Biología

Introducción

Euphonia laniirostris (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837) es una especie de ave perteneciente al orden Passeriformes y a la familia Fringillidae, la cual según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza está clasificada como preocupación menor (UICN, 2016; Remsen et al., 2017). Presenta una amplia distribución desde Costa Rica hasta la Amazonía Brasileña ocupando gran variedad de hábitats (Hilty & Brown, 1986; Restall et al., 2006).

Esta especie de jilguero presenta amplia distribución en Colombia (Hilty & Brown, 1986; Restall et al., 2006; Ayerbe, 2018) y un número considerable de poblaciones reportadas en su rango de distribución (Sullivan, 2009). De *E. laniirostris* se conocen aspectos ecológicos relacionados con su dieta (Wetmore, 1914), anidamiento (Slager et al., 2012), parásitos (Price & Johnson, 2009; Valan et al., 2016), procesos metabólicos (Wiersma et al., 2007; Jiménez et al., 2014), inmunología (Fassbinder-Orth et al., 2016), además de estudios orientados a establecer sus relaciones filogenéticas (Burns, 1997; Yuri & Mindell, 2002; Zuccon et al., 2012; Wu et al., 2015; Payevsky, 2015).

Muchos estudios de diversidad genética de aves se centran en: a) especies que evidencien un descenso en el tamaño poblacional (Price et al., 2015; Canal et al., 2017; Olah et al., 2017; Contina et al., 2018); b) la toma de decisiones de aspectos relacionados con la conservación de las especies o los ecosistemas (Boulet et al., 2005; Lambertucci, 2007; MADS, 2012; Pruett et al., 2015); c) los que se evidencian tendencias de susceptibilidad a la desaparición (Garza & Williamson, 2001; Bollmer et al., 2011) o d) casos de endemismo (Coetzer et al., 2017; Haworth et al., 2018, Whiteman et al., 2018), ya que en la mayoría de estos casos las especies suelen ser susceptibles a la pérdida de diversidad por factores como la deriva, endogamia, reducción del

potencial de adaptación y el posible incremento de la probabilidad de extinción (Garza & Williamson, 2001; Hartl & Clark, 2007; Bush et al., 2016; Nunes et al., 2017).

Lo anterior presupone una limitante al estudio de especies del cual se desconoce el estado de sus poblaciones, dado el hecho que tienen preocupación menor, las cuales no están exentas de experimentar un descenso en el tamaño de sus poblaciones, lo que puede conllevar a vacíos de conocimiento de las especies denominadas “comunes”. Es el caso de *E. laniirostris*, especie con preocupación menor (UICN, 2016), aparentemente cosmopolita y de la que se desconocen aspectos de su genética poblacional.

Con base en lo anterior, el presente trabajo de grado en modalidad investigación tuvo como objetivo determinar la diversidad y el grado de estructura genética de *E. laniirostris* en distintas localidades del departamento de Santander-Colombia, mediante el uso de secuencias del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2). Los resultados obtenidos constituyen un primer acercamiento a la genética de poblaciones de esta especie de jilguero y adicionalmente, contribuyen al conocimiento en su biología molecular.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la diversidad y el grado de estructura genética de *Euphonia laniirostris* presente en tres localidades del departamento de Santander a partir del uso de secuencias del gen ND2.

1.2 Objetivos Específicos

- * Amplificar el gen mitocondrial ND2 en muestras de individuos de *E. laniirostris*.
- * Secuenciar el gen ND2 a partir de las muestras amplificadas.
- * Caracterizar el tipo y número de haplotipos presentes en las secuencias ND2 de *E. laniirostris*.
- * Estimar la diversidad y el grado de estructura genética presente en *E. laniirostris*.

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades de *Euphonia laniirostris* (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837)

Según lo reportado en el Sistema de Información de Biodiversidad (SiB), Colombia tiene cerca de 56423 especies biológicas descritas, de las cuales 1932 son especies de aves, ubicándose como el país con mayor diversidad a nivel mundial de este grupo de organismos (Rhett, 2016;

SiB Colombia, 2016; Avendaño, 2017; Ayerbe, 2018). Este grupo presenta un gran número de órdenes, siendo el más representativo el orden Passeriformes contando con el mayor porcentaje de las familias registradas en el país (Sullivan, 2009; McMullan et al., 2016).

Dentro de Passeriformes se encuentra la familia Fringillidae, representada por jilgueros y afines, que en Colombia cuenta con 24 especies distribuidas en tres géneros, a saber: *Spinus*, *Euphonia* y *Chlorophonia* (Ayerbe, 2018). De estos, el género *Euphonia* presenta 14 especies entre las que se encuentra *E. laniirostris* (McMullan et al., 2011, 2016; Proaves, 2014; Remsen et al., 2017; Ayerbe, 2018).

E. laniirostris es una especie distribuida desde Costa Rica hasta el sur de la Amazonía Brasileña, que en Colombia se encuentra hasta los 1800 metros sobre el nivel del mar (m s.n.m.) en gran parte del territorio nacional y debido a su amplia distribución ocupa una gran variedad de hábitats desde regiones húmedas hasta áreas secas (Hilty & Brown, 1986; Neotropical Birds, 2017). Actualmente, está considerada con preocupación menor de conservación (UICN, 2016).

Esta especie de jilguero mide alrededor de 10 cm y tiene un marcado dimorfismo sexual, donde el macho presenta una coronilla y garganta amarilla, cuerpo y espalda azul violáceo y márgenes internas de las rectrices blancuzcas (dada la subespecie distribuida para la cordillera oriental) (Ayerbe, 2018). La hembra por su parte, presenta tonalidades verdes amarillento en la parte superior y en la parte inferior un verde más pálido (Hilty & Brown, 1986; Restall et al., 2006; Ayerbe, 2018).

En Colombia, se han registrado temporadas reproductivas de *E. laniirostris* a lo largo de todo el año, principalmente, entre los meses de abril a julio; con tamaños de postura de 2 a 5 huevos en nidos ubicados a baja altura en diferentes sedimentos (Hilty & Brown, 1986; Slager et al., 2012). Su dieta se basa especialmente de frutos de muérdagos (Arango, 2016), pero también se

ha registrado alimentándose de frutos de palmas e higos (Wetmore, 1914) y especies de la familia Melastomataceae (Haffey et al., 2017). Se han reportado diferentes estudios relacionados con su metabolismo (Wiersma et al., 2007; Jiménez et al., 2014), ectoparásitos (Price & Johnson, 2009; Valan et al., 2016), predación (Restrepo et al., 2018) e inmunología (Fassbinder-Orth et al., 2016).

2.2 Genética Poblacional

La genética poblacional se centra en el conocimiento de las interacciones intra e inter-específicas a través del análisis de la diversidad genética mediante el uso de marcadores moleculares, con los que se puede determinar algunos parámetros como flujo genético, endogamia, estructura genética y tamaño efectivo poblacional, lo que permite a los investigadores inferir sobre fenómenos recientes, procesos de hibridación, endogamia, migración, entre otros, a partir del análisis de sus polimorfismos (Godoy, 2009; Hedrick, 2011).

2.2.1 Marcadores Moleculares. Los marcadores moleculares son segmentos de ADN nuclear o mitocondrial fácilmente detectables, los cuales permiten estimar de manera objetiva la variación genética entre individuos. Son secuencias genómicas de ubicación conocida, que facilitan su seguimiento en análisis genéticos (Alcántara, 2007; Godoy, 2009). Adicionalmente, corresponden a genes con expresiones que permiten un efecto cuantificable u observable, estos se clasifican en marcadores de locus simple y multilocus basados en hibridación, amplificación y secuenciación (Morales et al., 2017). Entre estos se encuentran las secuencias de genes presentes

en el ADN mitocondrial, nuclear, microsatélites, RFLPs, entre otros, los cuales tienen la capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples (Simpson, 1997).

2.2.2 Generalidades del ADN Mitocondrial. El ADN mitocondrial (ADNmt) de vertebrados es una molécula circular, haploide, de herencia matrilineal y longitud entre 15 y 16 kb, la cual no presenta procesos de recombinación (Hwang & Kim, 1999). Su tasa de mutación es alta, lo que la hace interesante no sólo para estudios genéticos poblacionales, sino de historia evolutiva (Akiyama et al., 2017), calibración de reloj biológico (Haddrath & Baker, 2001) y diferenciación interespecífica (Kocher et al., 1989; Guo et al., 2017), entre otros.

El ADNmt de las aves cuenta con 37 genes, 13 que codifican proteínas, dos para las subunidades del ARN ribosomal (ARNr) y 22 genes para ARN de transferencia (ARNt), los cuales son importantes en diferentes procesos como respiración, fosforilación oxidativa, traducción, transcripción y procesamiento del ARN (Akiyama et al., 2017).

Entre las secuencias presentes en la molécula se encuentran algunos genes de citocromos, NADH deshidrogenasas, ATPasas, además, de la región control o D-loop (Shields & Helm-Bychowski, 1988; Haddrath & Baker, 2001). Sin embargo, aunque muchas de estas secuencias son altamente conservadas y presentan una organización muy similar a la de otros vertebrados, el ADNmt en algunos órdenes de Aves como Galliformes exhibe un orden particular ya que los genes ARNtGlu y ND6 están situados junto al D-loop, justo antes de los genes ARNtPro, ARNtThr y citocromo b (Desjardins & Morais, 1990; Pereira, 2000; Akiyama et al., 2017).

2.2.3 Generalidades del Gen ND2. El gen mitocondrial ND2 de aves está ubicado entre los genes ARNtmet y ARNtrp y en promedio tiene una longitud aproximada de 1041pb

(Johnson & Sorenson, 1998). Este gen ha sido ampliamente utilizado en análisis filogenéticos (Johnson & Clayton, 2000; Zuccon et al., 2012; Ortiz-Ramírez, 2018), filogeográficos (Gawin et al., 2014; Withrow et al., 2018; Shakya et al., 2018), diferenciación interespecífica (Lacerda et al., 2007; Martinsen et al., 2018), hibridación (Carantón-Ayala et al., 2018) y análisis de diversidad genética (Puebla-Olivares, 2008; Miller et al., 2015; Rodrigues et al., 2016; Vargas, 2017).

2.3 Estudios Moleculares de *E. laniirostris*

La posición filogenética de los diferentes géneros pertenecientes a la familia Fringillidae ha sido de interés en los distintos estudios moleculares, y en particular, la relación que tienen los mismos con la familia Thraupidae (Burns, 1997; Ericson & Johansson, 2003). Según Zuccon et al., (2012), la relación filogenética de la familia Fringillidae había sido confundida por la similaridad del plumaje, pero al realizar los estudios moleculares se logró obtener una reconstrucción que resuelve su filogenia en la que *E. laniirostris* se ubica dentro de la subfamilia Euphoniinae (Yuri & Mindell, 2002; Zuccon et al., 2012). Este último estudio corresponde a uno de los pocos realizados para la especie. Pese a lo anterior, no hay reportes de la genética poblacional de *E. laniirostris*.

3. Métodos

El presente trabajo de grado se realizó en dos fases. La fase de campo donde se hizo el muestreo y la fase de laboratorio en la que se procesaron las muestras y se llevaron a cabo los

distintos análisis. Esta última fue realizada en el laboratorio de Genética y Biotecnología de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander (LGB-UIS).

3.1 Fase de Campo

3.1.1 Área de Estudio. El área de estudio comprendió tres localidades ubicadas en la cordillera oriental en el departamento de Santander, a saber: 1. Vereda San Benito (SB), municipio de Rionegro (902m s.n.m); 2. Vereda La Colorada (LC), municipio de San Vicente de Chucurí (1373m s.n.m) y 3. Hacienda El Roble (HR), municipio de Los Santos (1.650m s.n.m.) (*Figura 1*).

Las localidades se caracterizan por presentar zonas de cultivos de cítricos (*Citrus sinensis*) en SB, cacao (*Theobroma cacao*), aguacate (*Persea americana*), plátano (*Musa paradisiaca*) en LC y cafetales de sombra (*Coffea arabica*) en HR, todos estos aledaños a bordes de bosque. En cada localidad se instalaron 10 redes de niebla de 12m a lo largo de los cultivos, las cuales fueron extendidas y abiertas entre las 5:30 am y 16:00 pm, con un esfuerzo de muestreo de 1200 horas/red (Villareal et al., 2014). El muestreo se llevó a cabo entre junio de 2016 y febrero de 2018.

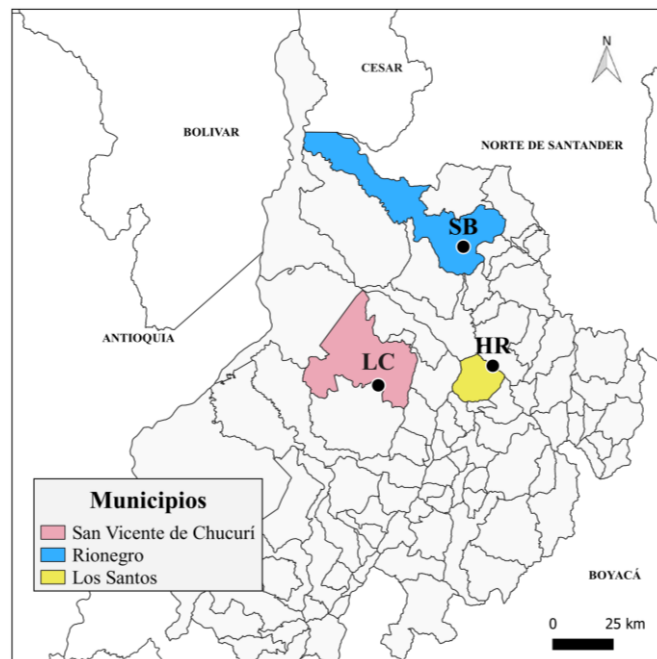


Figura 1. Área de muestreo. SB: San Benito, LC: La Colorada, HR: Hacienda el Roble.

3.1.2 Toma de Muestras. A cada individuo capturado se le extrajo 50 μ L de sangre de la vena braquial y/o yugular utilizando jeringas de 1 ml; posteriormente, la sangre se almacenó en tubos de microcentrífuga, debidamente rotulados, con 50 μ L de Etanol absoluto. Todas las muestras fueron conservadas a una temperatura $<4^{\circ}\text{C}$ hasta su traslado al LGB-UIS.

3.2 Fase de Laboratorio

3.2.1 Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó a 70 muestras de sangre mediante el protocolo de fenol cloroformo propuesto por Green & Sambrook, (2012).

3.2.2 Condiciones de PCR. La amplificación del gen ND2 se llevó a cabo por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), mediante el uso del Kit Top Taq Master Mix

(QIAGEN), al que se adicionaron los cebadores L5215 (Hackett, 1996) y H6313 (Johnson & Sorenson, 1998); los volúmenes para la reacción de PCR se siguieron según lo sugerido por el fabricante, adicionando 20µM de cada cebador y 3,25µl de agua miliQ para un volumen final de 10ul de reacción.

Las condiciones de PCR se siguieron y modificaron según Vargas (2017), esta se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems) y el protocolo de ciclado fue estandarizado como sigue: desnaturalización a 94°C por 5min, 34 ciclos de reacción a 94°C por 30s, 50°C por 30s, 72°C por 1min y extensión final a 72°C por 7min.

3.2.3 Visualización de Productos Amplificados. Los productos amplificados fueron cargados con Ez-Vision® Three Dna Dye & Buffer 6X, para posteriormente ser corridos en electroforesis horizontal en gel de agarosa (AMRESCO) al 1%. La electroforesis consistió en pre corrida durante 15min a 40V seguida de la corrida durante 1h a 90V. El tamaño de los fragmentos se estimó con un marcador de peso molecular de 1000pb (Thermo Fisher Scientific). En todos los casos se corrió como control positivo productos amplificados del gen ND2 de *Ramphocelus dimidiatus* (Vargas, 2017). La visualización de las matrices de agarosa se realizó en un equipo transiluminador UV TFX-35M (Life Technologies) y la documentación de las mismas se realizó en un equipo CSL-MDOCBASIC (Clever scientific).

3.2.4 Secuenciación del Gen ND2. Un volumen de 50µL de cada producto amplificado por PCR se envió al Servicio de secuenciación y análisis molecular (SSIGMOL) de la Universidad Nacional de Colombia, para la purificación y posterior secuenciación utilizando los iniciadores anteriormente mencionados.

3.3 Análisis de Datos

Las secuencias obtenidas fueron visualizadas y editadas con el software Mega v 7.0 (Kumar et al., 2016) y BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999). La comparación y determinación de la composición nucleotídica del gen ND2 al igual que la estimación de los parámetros poblacionales de diversidad nucleotídica (π), diversidad haplotípica (h), determinación de sitios polimórficos, así como el análisis de estructura genética y distintas pruebas de neutralidad se realizaron con el Software Arlequin v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Se construyó una red de haplotipos con el Software Network v4.6.1.6 (2004) (www.fluxus-engineering.com) siguiendo el criterio de “Median-joining” empleado en el análisis de estructura poblacional (Escobar-Gutiérrez et al., 2013) y de visualización de diversidad haplotípica (McCracken et al., 2013).

4. Resultados

4.1 Amplificación del Gen ND2 en *E. laniirostris*

Con los cebadores L5215 (Hackett, 1996) y H6313 (Johnson & Sorenson, 1998) se obtuvo un producto de PCR de 1040 pares de base (pb), correspondiente al gen ND2 (**Figura 2**).

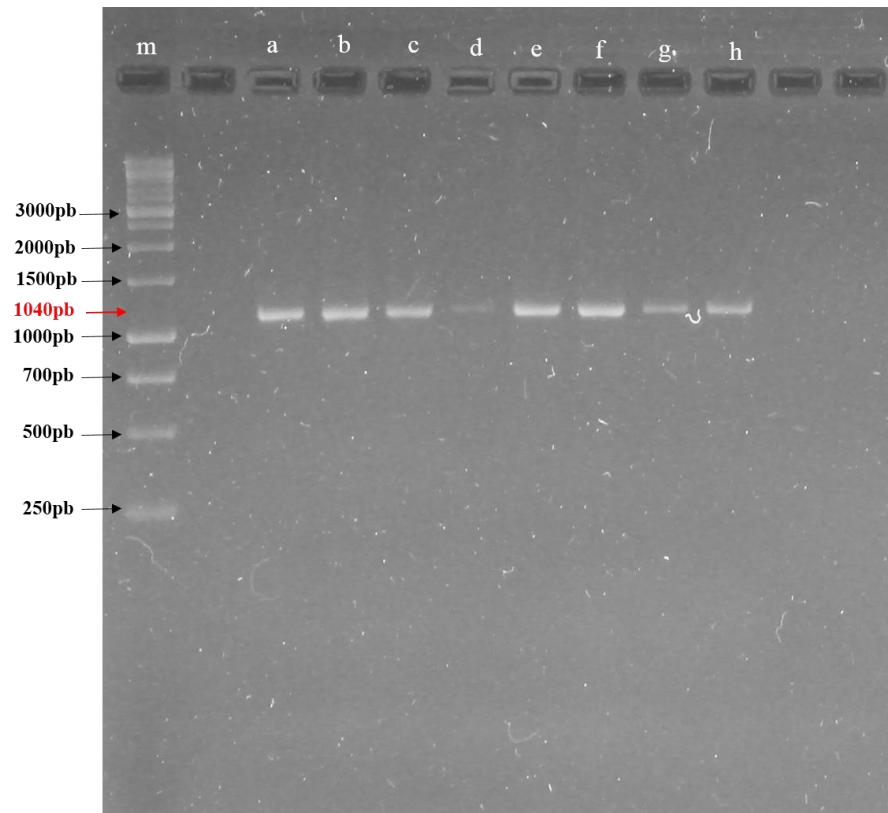


Figura 2. Producto amplificado por PCR del gen mitocondrial ND2 de *E. laniirostris*. Pozo m: marcador de peso molecular de 1000pb (Thermo Scientific); pozos a-g: producto de PCR de 1040pb del gen ND2 de siete individuos distintos de *E. laniirostris*, h: Control positivo.

Todos los productos amplificados en LGB-UIS se obtuvieron con modificaciones respecto a lo propuesto por Vargas (2017), consistentes en: 1) se incrementó a 5 minutos (min) el tiempo de desnaturalización; 2) se disminuyó el número de ciclos a 34; 3) se disminuyó la temperatura de hibridación a 50°C; 4) se incrementó a 1min el tiempo de extensión de cada ciclo y 5) se disminuyó el tiempo de extensión final a 7min.

4.2 Secuenciación del Gen ND2

Del total de muestras recolectadas (N=70), el 90% fueron amplificadas y secuenciadas (Ns=63); de estas, 39 exhibieron picos definidos y longitud superior al 85% del tamaño del gen ND2 (N_{LC}=11; N_{HR}=11 y N_{SB}=17). La extensión de cada secuencia posterior a la edición fue de 947pb, las cuales corresponden a las posiciones 5232 a 6219 de la secuencia del gen ND2 del ADNmt de *E. laniirostris* de referencia (JN715449), reportada por Zuccon (2012).

4.2.1 Composición Nucleotídica de Secuencias. En general las secuencias presentan mayor proporción de Citosinas y Adeninas en tres de las localidades consideradas (Tabla 1). A partir de estas secuencias se realizaron todos los análisis de haplotipos y parámetros poblacionales del presente estudio.

Tabla 1.

Porcentaje de bases nitrogenadas por localidad en las secuencias ND2 analizadas (NLC=11; NHR=11 y NSB=17)

LC	HR	SB
C: 31.85%	C: 31.84%	C: 31.96%
T: 25.22%	T: 25.21%	T: 25.21%
A: 30.94%	A: 30.88%	A: 31.03%
G: 11.99%	G: 12.07%	G: 11.80%

Nota: LC: La Colorada; HR: Hacienda El Roble; SB: San Benito.

4.2.2 Análisis de Secuencias. A partir de las 39 secuencias bien definidas se identificaron 206 sitios polimórficos (21,47%) respecto a la secuencia JN715449 (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.); de estos, se estimaron 75 en promedio por localidad con una media de 45 transiciones y 36 transversiones. Adicionalmente, en La Colorada se identificaron dos inserciones, lo cual redunda en una media aproximada de 0,7 INDELS por

localidad (Apéndice a). Se destaca también que las secuencias ND2 de *E. laniirostris* obtenidas en muestras provenientes de la Hacienda El Roble, presentaron mayor número de loci polimórficos (90) y la mayor cantidad de transiciones y transversiones (55 y 44 respectivamente) (Apéndice a).

4.3 Tipo y Número de Haplotipos ND2 en *E. laniirostris*

En total se identificaron 36 haplotipos, 10 en La Colorada, 11 en la Hacienda El Roble y 15 en San Benito, cuyo número de eventos mutacionales fluctúa entre 84 (haplotipo HR78) y 112 (haplotipo HR77). De todos, los haplotipos LC06, LC09 y SB48 presentan las mismas mutaciones por lo que se consideran el mismo haplotipo, este se caracteriza por presentar 87 cambios nucleotídicos que fueron detectados en muestras provenientes de La Colorada y San Benito. También se destaca entre estas localidades, que los haplotipos LC12, SB37 y SB57 presentan los mismos 88 cambios nucleotídicos. Adicionalmente, en San Benito se encontró que los haplotipos SB40 y SB58 presentan los mismos cambios mutacionales (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

El haplotipo LC11, identificado en La colorada, presenta dos inserciones (Ins) en la secuencia ND2; la primera corresponde a 5690InsT y la segunda corresponde a 5838InsG (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), eventos mutacionales no detectados en ningún otro haplotipo caracterizado en el estudio.

Tabla 2.Sitios polimórficos de secuencias del gen ND2 en individuos de *E. laniirostris* en tres localidades de Santander.

Hap	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	14
-----	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----

El 78,4% de los haplotipos tipificados son únicos y de estos la totalidad de los detectados en las muestras provenientes de la Hacienda El Roble no están compartidos con alguna otra localidad, pese a lo anterior, la frecuencia de estos en HR es muy similar a la frecuencia detectada en los haplotipos de LC (**Tabla 3**). Por su parte LC06=LC12 es el haplotipo más frecuente en La Colorada y en San Benito, SB37 = SB48 son los haplotipos más frecuentes (**Tabla 3**).

Tabla 3.*Frecuencias de haplotipos ND2 de E. laniirostris.*

LA COLORADA (N=11)			HACIENDA EL ROBLE (N=11)			SAN BENITO (N=17)		
Haplotipo	f	Sd	Haplotipo	f	sd	Haplotipo	f	sd
LC01	0,091	0,091	HR67	0,0909	0,0909	SB30	0,0588	0,0588
LC02	0,091	0,091	HR68	0,0909	0,0909	SB31	0,0588	0,0588
LC04	0,091	0,091	HR69	0,0909	0,0909	SB32	0,0588	0,0588
LC05	0,091	0,091	HR70	0,0909	0,0909	SB33	0,0588	0,0588
LC06*	0,182	0,122	HR72	0,0909	0,0909	SB35	0,0588	0,0588
LC07	0,091	0,091	HR73	0,0909	0,0909	SB36	0,0588	0,0588
LC11	0,091	0,091	HR74	0,0909	0,0909	SB37**	0,1176	0,0805
LC12**	0,091	0,091	HR76	0,0909	0,0909	SB38	0,0588	0,0588
LC86	0,091	0,091	HR77	0,0909	0,0909	SB39	0,0588	0,0588
LC88	0,091	0,091	HR78	0,0909	0,0909	SB40	0,1176	0,0805
			HR79	0,0909	0,0909	SB43	0,0588	0,0588
						SB44	0,0588	0,0588
						SB45	0,0588	0,0588
						SB47	0,0588	0,0588
						SB48*	0,0588	0,0588
Promedio	0,0975	0,0937	Promedio	0,0909	0,0909	Promedio	0,0645	0,0613

Nota: f: Frecuencia haplotípica y sd: desviación estándar (Tajima & Nei, 1984); *: mismo haplotipo; **: mismo haplotipo.

El análisis de agrupación mostró una red en la que se concentran la mayoría de los haplotipos de La Colorada, siendo el haplotipo *LC06, el que da origen, en un evento mutacional, a los haplotipos LC02, LC11, LC07, **LC12 y HR72 (El Roble) y por dos eventos mutacionales los haplotipos LC01, LC04 y LC05; de estos dos últimos se originan haplotipos detectados en la Hacienda El Roble y San Benito (**Figura 3**).

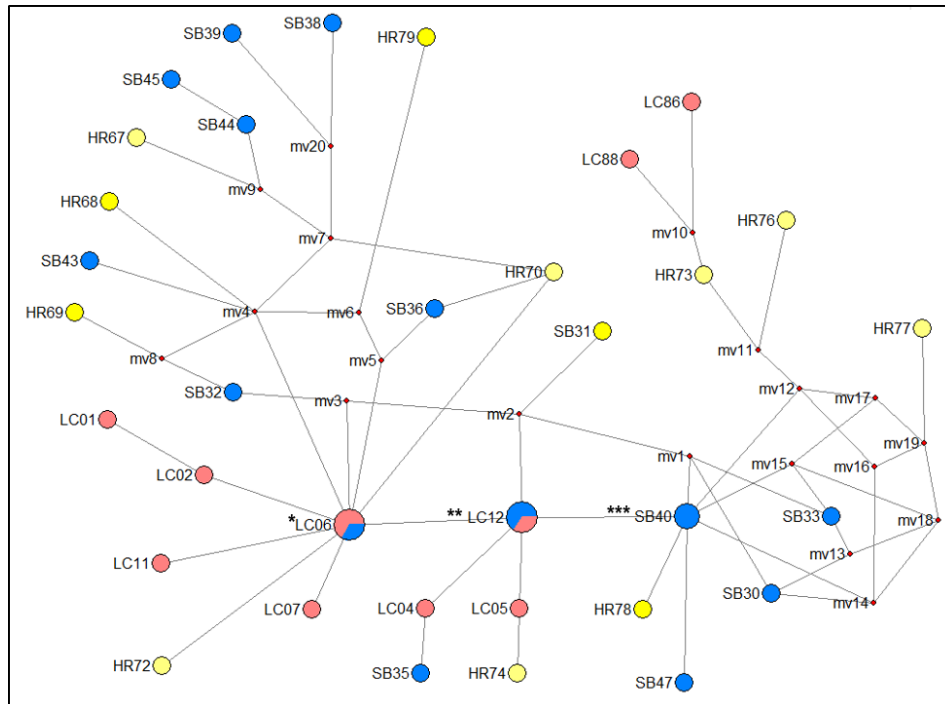


Figura 3. Red de haplotipos del gen ND2 en individuos de *E. laniirostris* construida con el software **Network v4.6.1.6 (2004)**. *: Mismo haplotipo que LC09 y SB48; **: mismo haplotipo que SB37 y SB57; ***: mismo haplotipo que SB58.

La red también evidencia la dispersión de varios haplotipos tipificados tanto en la Hacienda El Roble como en San Benito, de hecho, muestra que algunos de estos se originaron por varios pasos mutacionales, como el haplotipo HR73 el cual está involucrado en el origen de los haplotipos LC86 y LC88 (**Figura 3**).

4.4 Diversidad y Estructura Genética

4.4.1 Diversidad Haplotípica (h) y Nucleotídica (π). A partir del análisis de secuencias ND2 se estimó la diversidad haplotípica en *E. laniirostris* de $h = 0,989 \pm 0,0368$ y la

diversidad nucleotídica en $\pi = 0,0177 \pm 0,0095$ (**Tabla 4**). La localidad donde esta especie de jilguero presentó menor diversidad nucleotídica es San Benito, mostrando diferencias significativas con la Hacienda El Roble ($0,0064 < \pi < 0,0201$); las demás comparaciones pareadas de π no evidenciaron diferencias significativas al 66% (Hartl & Clark, 2007), al igual que ninguna comparación pareada de h .

Tabla 4.

Diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (h) por localidad basada en secuencias ND2 de *E. laniirostris*

LOCALIDAD	π	sd (π)	h	sd (h)
LC	0,0158	0,0086	0,9818	0,0463
HR	0,0236	0,0127	1,0000	0,0388
SB	0,0137	0,0073	0,9853	0,0252
Global	0,0177	0,0095	0,989	0,0368

4.4.2 Análisis Molecular de Varianza (AMOVA). El análisis molecular de varianza mostró un valor de $\Phi_{st} = 0,02909$ ($p = 0,00587 \pm 0,0021$), lo que indica que a partir del análisis de secuencias ND2 de *E. laniirostris* no se evidencia diferenciación genética. Adicionalmente, el 97,09% de la variación de las secuencias es debida al aporte de los individuos, mientras que el 2,91% restante corresponde a diferencias detectadas entre las localidades.

Debido al hecho que el valor de significancia de la prueba estadística del parámetro Φ_{st} fue $p < 0,05$, se realizó un análisis que evidenció que nueve sitios aportan a la poca diferenciación detectada en *E. laniirostris*. Estos sitios corresponden a: G5235C en los haplotipos SB30, SB31; SB32, SB33 y SB35; G5339C en el haplotipo HR74; G5597C en los haplotipos LC86, LC88, HR67, HR68, HR69, HR73, HR76, HR77, HR79, SB39, SB40, SB43, SB44, SB45; A5978C en el haplotipo HR77; C6005A en el haplotipo HR74; A6097C en el haplotipo HR78; A6100T en los haplotipos SB35 y LC04; G6100T en los haplotipos HR77 y HR67; G6148T en los

haplotipos LC12 y LC86 y C6175A en los haplotipos HR68, HR73 y HR74 (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.).

4.4.3 Flujo Genético y Test de Neutralidad. El análisis de la tasa efectiva de migrantes mostró mayor valor entre las localidades Hacienda El Roble y La Colorada ($N_m=26$), lo cual puede guardar relación con el origen de haplotipos entre estas localidades (**Figura 3**). El análisis corrobora que entre las parejas de localidades, *E. laniirostris* no muestra efectos importantes de subdivisión debido a la deriva genética, dado los bajos valores pareados de Φ_{st} (**Tabla 5**).

Tabla 5.

Flujo genético y test de neutralidad a partir de secuencias ND2 de E. laniirostris.

	LC	HR	SB
LC	-1,5771*	0,01866	0,02950
HR	26,295	-1,3079	0,03655
SB	16,447	13,180	-1,6154

Nota: Por encima de la diagonal: valores pareados de Φ_{st} ; por debajo de la diagonal: tasa efectiva de migrantes por generación (N_m) entre parejas de localidades; diagonal: valor D (Tajima 1989), *: $p<0,05$.

La prueba de neutralidad propuesta por Tajima (1989) muestra en las tres localidades un valor negativo del parámetro D, siendo menor en San Benito y mayor en la Hacienda El Roble (**Tabla 5**). Estos resultados estarían indicando, ya sea, un número considerable de sitios segregados en relación a la diversidad de nucleótidos presentes en las muestras de *E. laniirostris* de cada localidad considerada en el estudio, o bien, eventos relacionados a expansión poblacional reciente de esta especie.

5. Discusión

Este estudio es pionero en la evaluación de la diversidad y el grado de estructura genética de *E. laniirostris* a partir de secuencias génicas mitocondriales, en particular las del gen ND2,

tipificadas en muestras de esta especie de jilguero cosmopolita y de preocupación menor presente en el departamento de Santander.

Las secuencias mitocondriales han sido utilizadas en diferentes estudios de biología molecular los cuales incluyen filogenias (Krzemińska et al., 2018), transmisión de mutaciones (Ma et al., 2018), análisis de diferenciación genética (Kingston et al., 2014) y diversidad genética (Hernández-Soto et al., 2018), en diferentes grupos taxonómicos como peces (Pavlova et al., 2017), mamíferos (Kummer et al., 2018), herpetos (Brennan et al., 2017) y aves (Dohms & Burg, 2013; Chen et al., 2018), entre otros. Para aves, el uso de las secuencias mitocondriales y en particular del gen ND2, incluyen trabajos de diversidad genética en diferentes especies (Puebla-Olivares, 2008; Miller et al., 2015; Rodrigues et al., 2016), lo que evidencia el uso de este gen para tal fin a partir de protocolos de PCR previamente establecidos.

Precisamente, en el presente trabajo la amplificación del gen ND2 se realizó con cebadores de amplio uso en distintas especies de aves, a pesar que estos inicialmente fueron diseñados para especies de las familias Thraupidae (Hackett, 1996) y Anatidae (Johnson & Sorenson, 1998), ampliando su uso a otras familias de la Clase Aves en estudios relacionados con diferenciación genética, especiación, filogenia y taxonomía, entre otros (Dove et al., 2013, Kingston et al., 2014; Núñez-Zapata et al., 2016; Collinson et al., 2018; Hernández-Soto et al., 2018).

Estos cebadores presentan diferentes condiciones de amplificación reportadas entre las que hay algunas similitudes y variaciones encontradas para la amplificación del gen ND2 en *E. laniirostris*. En cuanto a la temperatura de desnaturalización (94°C), se mantiene en la mayoría de los estudios, sin embargo, difiere de lo reportado por Zink et al., (2008) quienes la aumentan 1°C. El número de ciclos descrito en el presente trabajo (34), se mantiene dentro del rango reportado en investigaciones realizadas en distintas especies (30-40), dentro de estos, las

temperaturas y tiempos de desnaturalización inicial (94°C) y extensión (72°C) concuerdan con lo reportado en los protocolos de Martínez-Gómez et al., (2017) y Kingston et al., (2014), donde esta última, se encuentra relacionada directamente con el mayor pico de actividad de la polimerasa en la síntesis (Asuar, 2007).

En distintas investigaciones se observa variación de la temperatura de alineamiento al usar los cebadores propuestos por Hackett (1996) y Johnson & Sorenson (1998). Dicha temperatura varía entre 50°C y 55°C (Zink et al., 2008; Woltmann et al., 2014), rango en el cual se puede incluir la temperatura de alineamiento registrada en el presente estudio (50°C), que también concuerda con lo propuesto por Arbeláez-Cortés et al., (2010) cuando amplificaron el gen ND2 para estudiar aspectos relacionados a la filogeografía de *Lepidocolaptes affinis*. En cuanto a la extensión final, no se presentan variaciones en la temperatura. Sin embargo, algunos autores reportan variaciones en el tiempo para permitir la finalización de la síntesis por parte de la *Taq* en fragmentos que queden incompletos (Kingston et al., 2014).

La composición nucleotídica de las secuencias ND2 tipificadas en *E. laniirostris* (**Tabla 1**) es muy similar a la reportadas para este mismo gen en *Lepidocolaptes affinis* (A: 31,12%; C: 31,99%; G: 10,68% y T: 26,21%) (Arbeláez-Cortés et al., 2010) y en *Ramphocelus icteronotus* y *R. dimidiatus* (datos no mostrados) (Vargas, 2017), lo cual es evidencia del grado de conservación de las secuencias de dicho gen en especies pertenecientes a familias distintas dentro de Passeriformes.

La longitud de las secuencias del gen ND2 tipificadas en el presente estudio (947pb) se encuentran dentro del rango de tamaño descrito para otras especies cuyo gen fue amplificado con los mismos cebadores, por ejemplo, Collinson et al., (2018) reportó 599pb en *Phyllastrephus leucolepis*, Arbeláez-Cortés et al., (2010) reportó 903pb en *L. affinis*, Kingston et al., (2014)

reportó 1041pb en *Pipilo maculatus* y *P. ocai* y Martínez-Gómez et al., (2017) reportó 1076pb en *Psittacara holochlorus*. Lo anterior muestra que los cebadores descritos por Hackett (1996) y Johnson & Sorenson (1998) son útiles en la amplificación del gen ND2 en distintos grupos taxonómicos dentro de Aves.

Las 39 secuencias ND2 de *E. laniirostris* tipificadas presentan un considerable porcentaje de sitios polimórficos (21,4%), caracterizados principalmente por transiciones. Este parámetro es bastante variable, de hecho, Arbeláez-Cortés et al., (2010) reportaron 3,6% de sitios polimórficos, mientras que en el estudio de Martínez-Gómez et al., (2017) el parámetro asciende al 50,6%. Concomitante con este hallazgo, en la mayoría de las secuencias no se describen mutaciones que afecten al producto principal del gen ND2 en *E. laniirostris*. Un análisis comparativo mostró que la mayoría de los cambios son silenciosos, no afectan la secuencia de aminoácidos del transcrito, excepto en la secuencia que presentó las inserciones y en unas pocas donde los cambios son sinónimos (Apéndice b).

Los resultados evidencian una gran representación de haplotipos (¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), definidos a partir de la secuencia de referencia ND2 de *E. laniirostris* JN715449 (Zuccon et al., 2012). Esta gran representación de haplotipos (**Figura 2**) guarda coherencia con los altos valores de diversidad haplotípica estimados (**Tabla 4**), además de la tasa reproductiva de las hembras de esta especie que pueden dejar su representación genética entre las distintas localidades (**Tabla 5**) y con aspectos de la biología reproductiva relacionados con los tamaños de nidada (Hilty & Brown, 1996; obs. per).

Distintos estudios de diversidad genética a partir de secuencias mitocondriales, en las que se incluye el gen ND2, muestran un patrón de valores bajos de diversidad nucleotídica y altos valores de diversidad haplotípica (Arbeláez-Cortés et al., 2010; Herr et al., 2011; Vargas, 2017;

Hernández-Soto et al., 2018), lo que puede soportar la idea de una posible expansión poblacional reciente. En el sentido expuesto, los resultados aportados por la prueba D de Tajima (**Tabla 5**) podrían dar sustento al hecho que en *E. laniirostris* está ocurriendo un fenómeno similar, sin embargo, a diferencia de esos estudios, la presente muestra valores de π que están en el orden de 10^{-2} , siendo mayores a los estimados en otros estudios que usaron secuencias ND2. Adicionalmente, Li & Sadler (1991) y Ruegg & Smith (2002) plantearon que bajos valores de π es indicador de tamaños poblacionales reducidos o baja tasa mutacional o cuellos de botella severos en el pasado reciente, aspectos que son contrarios ante el número importante de haplotipos descritos a partir de las secuencias ND2 analizadas en *E. laniirostris* y corroborado con los valores negativos de D de Tajima (1989).

Euphonia laniirostris presenta poca diferenciación genética entre las localidades consideradas y por ende constituye una metapoblación (Hartl & Clark, 2007), soportada en la ausencia de agrupamientos notorios en la red de haplotipos (**Figura 2**). Sin embargo, el análisis estadístico del valor Φ_{st} ($p=0,00587$), indica la existencia de diferenciación la cual se puede deber a: 1) la falta de haplotipos compartidos, principalmente entre la Hacienda El Roble y las demás localidades de estudio; 2) los sitios polimórficos G5235C, G5339C, G5597C, A5978C, C6005A, A6097C, G6100T, G6148T y C6175A, que presentaron valores de $p<0,05$ en el análisis locus por locus del valor Φ_{st} (Excoffier et al., 1992) y 3) distintos sitios privados que hacen parte de haplotipos únicos detectados, por ejemplo HR74 el cual contiene 3/9 sitios anteriormente listados.

El flujo génico estimado entre parejas de localidades (**Tabla 5**), podría limitar la diferenciación genética, evidenciando en las áreas de mayor tamaño una estructura poblacional pequeña (Slatkin, 1985; De Jong et al., 2011). De hecho, en *E. laniirostris* se podría presentar

similitud entre subpoblaciones, ya que la migración actúa como fuerza homogeneizadora que puede limitar la divergencia en las localidades consideradas (Vähä et al., 2008; Vargas, 2017). Lo anterior sumado al hecho que en esta especie hay evidencia de pocos haplotipos ND2 compartidos entre parejas de localidades (**Tabla 3** y **Figura 3**), permite suponer que el flujo genético puede provenir de otras localidades distintas a las consideradas, incluso de zonas diferentes a la cordillera oriental, aspecto que constituye una pregunta a desarrollar en un futuro estudio.

La prueba de Tajima permitió comparar la cantidad de variación genética en las secuencias ND2 analizadas y su relación con los sitios polimórficos y las diferencias nucleotídicas. A partir de los valores obtenidos del parámetro D (**Tabla 5**) se puede inferir una posible expansión poblacional (Perfectti et al., 2009), y dado el hecho que la prueba estadística del estimador no fue significativa en la Hacienda El Roble y en San Benito, indica que en estas localidades no está operando la selección (Küpper et al., 2012) en el gen ND2 de *E. lanirostris*. Adicionalmente, se realizó la prueba de neutralidad propuesta por Fu y este mostró valores negativos del parámetro F_s propuesta por Fu (1997) (Apéndice c). Lo anterior indica un exceso en el número de haplotipos (Holsinger, 2012), lo cual se soporta en el hecho de la presencia de mutaciones raras que a su vez también son indicadoras de una reciente expansión poblacional (De Jong et al., 2011).

Es importante resaltar el valor que pueden llegar a tener los agroecosistemas en las localidades estudiadas, ya que estos pueden tener impactos importantes en el crecimiento poblacional de *E. lanirostris* y, posiblemente, de otras especies de aves. En el sentido expuesto, la Hacienda El Roble se caracteriza por presentar cafetales sembrados en zonas aledañas a arbustos y árboles nativos que mantienen la estructura de la vegetación y pueden ofrecer un

hábitat con buena oferta de alimento, nutrientes y refugio, además de generar un menor impacto de la agricultura (Batary et al., 2010; Hernández et al., 2013; González et al., 2014), por lo que puede ser considerado como un agroecosistema que brinda aportes positivos en el mantenimiento de la fauna allí presente.

Finalmente, es importante incentivar la puesta en marcha de estudios encaminados a cuantificar la diversidad genética en aves para programas de conservación, no solo en especies que presenten niveles de amenaza sino en aquellas donde se desconoce el grado de estructura de sus poblaciones.

6. Conclusiones

A partir de las secuencias ND2 analizadas en *E. laniirostris* se concluye que esta especie de jilguero constituye una metapoblación, con ligera diferenciación genética en las localidades estudiadas, debido a la falta de haplotipos compartidos, distintos sitios privados y nueve sitios polimórficos que aportan a la misma.

Las secuencias ND2 obtenidas en *E. laniirostris* presentan 21,4% de sitios polimórficos que, mayoritariamente, son mutaciones silenciosas que no afectan el producto proteico de dicho gen.

E. laniirostris se encuentra expandiendo su población en las localidades consideradas como lo evidencia el importante número de haplotipos ND2 tipificados, los valores altos de diversidad nucleotídica y haplotípica estimados y los resultados de los distintos test de neutralidad realizados.

7. Recomendaciones

Realizar estudios de esta índole en distintas localidades del área de distribución de *E. laniirostris*, que incluyan muestras de las subespecies de este jilguero, a objeto de rastrear la procedencia de los haplotipos descritos en el presente estudio, cuantificar su diversidad genética, establecer el grado de diferenciación poblacional, verificar la idea de expansión propuesta y resaltar la importancia de conservar los distintos agroecosistemas en los que esté presente la especie, ya que pueden evidenciar una importante diversidad de haplotipos en estos.

Referencias Bibliográficas

- Akiyama, T., Chizuko N., Kunikazu M, Manabu O., Kazutoshi T., y Ryuichi M. (2017). Gene duplication and concerted evolution of mitochondrial DNA in crane species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 106 (Supplement C): 158-63. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2016.09.026>.
- Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. *Ecología molecular*, 541-566.
- Arango, C. (2013). Wiki Aves Colombia. (C. Arango, Editor). Universidad ICESI. Cali. Colombia. Fecha de consulta 4 de septiembre de 2018. Disponible en <http://www.icesi.edu.co>.
- Arbeláez-Cortés, E., Nyári, Á. S., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2010). The differential effect of lowlands on the phylogeographic pattern of a Mesoamerican montane species (*Lepidocolaptes affinis*, Aves: Furnariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 658-668.
- Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 574p.
- Avendaño, J., Bohórquez C., Rosselli L., Arzuza-Buelvas D., Estela F., Cuervo A., Stiles F., y Renjifo L. (2017). Lista de chequeo de las aves de Colombia: Una síntesis del estado del conocimiento desde Hilty & Brown (1986). *Ornitología Colombiana* 16 (octubre): eA01.
- Ayerbe, F. (2018). Guía ilustrada de la avifauna colombiana. Wildlife Conservancy Society.
- Batary, P., Matthiesen, T., Tschardtke, T. (2010). Landscape-moderated importance of hedges in conserving farmland bird diversity of organic vs. conventional croplands and grasslands. *Biological Conservation*, 143, 2020–2027.
- Bollmer, J. L., Hull, J.M., Ernest, H.B., Sarasola, J.H., y Parker, P.G. (2011). Reduced MHC and neutral variation in the Galápagos hawk, an island endemic. *BMC Evolutionary Biology* 11 (mayo): 143. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-143>.
- Boulet, M., Potvin, C., Shaffer, F., Breault, A., & Bernatchez, L. (2006). Conservation genetics of the threatened horned grebe (*Podiceps auritus* L.) population of the Magdalen Islands,

- Québec. *Conservation Genetics*, 6(4), 539-550. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9008-6>.
- Brennan, I. G., Bauer, A. M., Tri, N. V., Wang, Y., Wang, W., Zhang, Y.-P., & Murphy, R. W. (2017). Barcoding utility in a mega-diverse, cross-continental genus: keeping pace with *Cyrtodactylus* geckos. *Scientific Reports*, 7(1), 5592. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05261-9>
- Burns, K. J. (1997). Molecular systematics of tanagers (Thraupinae): evolution and biogeography of a diverse radiation of neotropical birds. *Molecular phylogenetics and evolution*, 8(3), 334-348.
- Bush, K. L., Dyte, C. K., Moynahan, B. J., Aldridge, C. L., Sauls, H. S., Battazzo, A. M., Coltman, D. W. (2011). Population structure and genetic diversity of greater sage-grouse (*Centrocercus urophasianus*) in fragmented landscapes at the northern edge of their range. *Conservation Genetics*, 12(2), 527-542. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0159-8>.
- Canal, D., Roques, S., Negro, J. J., & Sarasola, J. H. (2017). Population genetics of the endangered Crowned Solitary Eagle (*Buteogallus coronatus*) in South America. *Conservation Genetics*, 18(1), 235-240. <https://doi.org/10.1007/s10592-016-0878-6>.
- Carantón-Ayala, D., Avendaño, J. E., y Cadena, C. 2018. Hybridization in Brushfinches (*Atlapetes*, Emberizidae) from the Southeast Andes of Colombia: A Consequence of Habitat Disturbance. *Journal of Ornithology* 159 (3): 713-22. <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1544-1>.
- Chen, W., Zhang, C., Pan, T., Liu, W., Li, K., Hu, C., & Chang, Q. (2018). The mitochondrial genome of the Kentish Plover *Charadrius alexandrinus* (Charadriiformes: Charadriidae) and phylogenetic analysis of Charadrii. *Genes & Genomics*, 40(9), 955-963. <https://doi.org/10.1007/s13258-018-0703-3>.
- Coetzer, W. G., Downs, C. T., Perrin, M. R., & Willows-Munro, S. (2017). Testing of microsatellite multiplexes for individual identification of Cape Parrots (*Poicephalus robustus*): paternity testing and monitoring trade. *PeerJ*, 5. <https://doi.org/10.7717/peerj.2900>.
- Collinson, J. M., Päckert, M., Lawrie, Y., Gatter, W., Töpfer, T., Phalan, B., & Fishpool, L. (2018). Taxonomic status of the Liberian Greenbul *Phyllastrephus leucolepis* and the conservation importance of the Cavalla Forest, Liberia. *Journal of Ornithology*, 159(1), 19-27. <https://doi.org/10.1007/s10336-017-1477-0>.

- Contina, A., Alcantara, J. L., Bridge, E. S., Ross, J. D., Oakley, W. F., Kelly, J. F., & Ruegg, K. C. (2018). Genetic structure of the Painted Bunting and its implications for conservation of migratory populations. *Ibis*.
- De Jong, M. A., Wahlberg, N., Van Eijk, M., Brakefield, P. M., Zwaan, B. J. (2011). Mitochondrial DNA Signature for Range-Wide Populations of *Bicyclus anynana* Suggests a Rapid Expansion from Recent Refugia. *Plos One* 6, e21385.
- Desjardins, P., y Réjean, M. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: A novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology* 212 (4): 599-634. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90225-B](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90225-B).
- Dohms, K. M., & Burg, T. M. (2013). Molecular Markers Reveal Limited Population Genetic Structure in a North American Corvid, Clark's Nutcracker (*Nucifraga columbiana*). *Plos One*, 8(11), e79621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079621>
- Dove, C. J., Dahlan, N. F., & Drovetski, S. V. (2013). MtDNA ND2 sequence identifies Streaked Horned Lark (*Eremophila alpestris strigata*) from bird strike to US Air Force F-15 at Portland International Airport, Oregon. *Conservation Genetics Resources*, 5(4), 997-999. <https://doi.org/10.1007/s12686-013-9952-2>.
- Ericson, Per G. P., y Ulf S. Johansson. (2003). Phylogeny of Passerida (Aves: Passeriformes) Based on Nuclear and Mitochondrial Sequence Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (1): 126-38.
- Escobar-Gutiérrez, A., Soudeyns, H., Larouche, A., Carpio-Pedroza, J.C., MartinezGuarneros, A., Vazquez-Chacon, C.A., Fonseca-Coronado, S., Yamasaki, L.H., Ruiz-Tovar, K., Cruz-Rivera, M. (2013). Vertical transmission of hepatitis C virus: a tale of multiple outcomes. *Infect. Genet. Evol.* 20, 465–470.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Eco.* 10: 564V567.
- Excoffier, L., Smouse, P., Quatro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479-491.
- Fassbinder-Orth, C. A., Wilcoxon, T. E., Tran, T., Boughton, R. K., Fair, J. M., Hofmeister, E. K., Owen, J. C. (2016). Immunoglobulin detection in wild birds: effectiveness of three secondary anti-avian IgY antibodies in direct ELISAs in 41 avian species. *Methods in ecology and evolution*, 7(10), 1174-1181. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12583>

- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Garza, J. C., & Williamson, E. G. (2001a). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10(2), 305-318. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01190.x>
- Gawin, D. F., Mustafa, A. R., Mohamad, F. S. R., Tilston Smith B., Haw Chuan L., Moyle R. G., y Sheldon F. H. (2014). Patterns of avian diversification in Borneo: The case of the endemic Mountain Black-eye (*Chlorocharis emiliae*). *The Auk* 131 (1): 86-99. <https://doi.org/10.1642/AUK-13-190.1>.
- Gbif. (s. f.). *Euphonia laniirostris* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837. Recuperado 30 de septiembre de 2017, de <https://www.gbif.org/species/2487998>
- Godoy, J. A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Revista Ecosistemas* 18 (1). <https://doi.org/10.7818/73>.
- González, D., Solari, M., Cerezo, A., Zaccagnini, M., Gavier-Pizarro, G. (2014). *Conservación en agroecosistemas: Importancia de remanentes de vegetación de escala espacial fina para aves insectívoras de la región pampeana y espinal*. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires.
- Green, M. R., Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Guo, H. W., C. Li, X. N. Wang, Z. J. Li, G. R. Sun, G. X. Li, X. J. Liu, X. T. Kang, y R. L. Han. (2017). Genetic diversity of mtDNA D-loop sequences in four native Chinese chicken breeds. *British Poultry Science* 0 (0): 1-8. <https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1332403>.
- Hackett, S. J. (1996). Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus* (Aves). *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 368-382.
- Haddrath, O., y A. J. Baker. (2001). Complete mitochondrial DNA genome sequences of extinct birds: ratite phylogenetics and the vicariance biogeography hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268 (1470): 939-45. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1587>.
- Haffey, William R., Michael De Lea, y Brian Walker. (2017). Observations of birds feeding on the fruit of a successional tree, *Topobea multiflora*, in southwestern Costa Rica. *Ornitología Neotropical* 28 (0): 209-12. <http://journals.sfu.ca/ornneo/index.php/ornneo/article/view/200>.

- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). London: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. (2007). Principles of Population Genetics (Sinauer, Sunderland, MA). 4 th Ed.
- Haworth, E. S., Cunningham, M. J., & Calf Tjorve, K. M. (2018). Population diversity and relatedness in Sugarbirds (*Promeropidae: Promerops spp.*). *PeerJ*, 6. <https://doi.org/10.7717/peerj.5000>
- Hedrick, Philip W. (2011). Genetics of Populations. Jones & Bartlett Learning.
- Hernández-Soto, M., Licona-Vera, Y., Lara, C., & Ornelas, J. F. (2018). Molecular and climate data reveal expansion and genetic differentiation of Mexican Violet-ear *Colibri thalassinus thalassinus* (Aves: Trochilidae) populations separated by the Isthmus of Tehuantepec. *Journal of Ornithology*, 159(3), 687-702. <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1540-5>
- Herr, C. A., Sykes, P. W., & Klicka, J. (2011). Phylogeography of a vanishing North American songbird: the Painted Bunting (*Passerina ciris*). *Conservation Genetics*, 12(6), 1395-1410.
- Hilty, S. L., & Brown, B. (1986). A Guide to the Birds of Colombia. Princeton University Press.
- Holsinger, K. (2012). *Lecture Notes in Population Genetics*. Department of Ecology & Evolutionary Biology, U-3043. University of Connecticut. CT 06269-3043
- Hwang, Ui-Wook, y Won Kim. (1999). General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematics. *The Korean Journal of Parasitology* 37 (4): 215-28. <https://doi.org/10.3347/kjp.1999.37.4.215>.
- Jimenez, A. G., Van Brocklyn, J., Wortman, M., & Williams, J. B. (2014). Cellular Metabolic Rate Is Influenced by Life-History Traits in Tropical and Temperate Birds. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087349>
- Johnson, K. P., Sorenson, M. D. (1998). Comparing molecular evolution in two mitochondrial genes (cytochrome b and ND2) in the dabbling ducks (Tribe: Anatinae). *Mol Phylogenet Evol* 10: 82–94.

- Johnson, Kevin P., y Dale H. Clayton. (2000). A molecular phylogeny of the dove genus *Zenaida*: mitochondrial and nuclear DNA sequences. *The Condor* 102 (4): 864-70. [https://doi.org/10.1650/0010-5422\(2000\)102\[0864:AMPOTD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1650/0010-5422(2000)102[0864:AMPOTD]2.0.CO;2).
- Kingston, S. E., Navarro-Sigüenza, A. G., García-Trejo, E. A., Vázquez-Miranda, H., Fagan, W. F., & Braun, M. J. (2014). Genetic differentiation and habitat connectivity across towhee hybrid zones in Mexico. *Evolutionary Ecology*, 28(2), 277-297. <https://doi.org/10.1007/s10682-013-9673-8>
- Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). *Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86(16), 6196-6200.
- Krzemińska, U., Morales, H. E., Greening, C., Nyári, Á. S., Wilson, R., Song, B. K., Rahman, S. (2018). Population mitogenomics provides insights into evolutionary history, source of invasions and diversifying selection in the House Crow (*Corvus splendens*). *Heredity*, 120(4), 296-309. <https://doi.org/10.1038/s41437-017-0020-7>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Society for Molecular Biology and Evolution.
- Kummer, E., Leibundgut, M., Rackham, O., Lee, R. G., Boehringer, D., Filipovska, A., & Ban, N. (2018). Unique features of mammalian mitochondrial translation initiation revealed by cryo-EM. *Nature*, 560(7717), 263-267. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0373-y>
- Küpper, C., Edwards, S. V., Kosztolányi, A., Alrashidi, M., Burke, T., Herrmann, P., Argüelles-Tico, A., Amat, J. A., Amezian, M., Rocha, A. (2012). High gene flow on a continental scale in the polyandrous Kentish plover *Charadrius alexandrinus*. *Mol. Ecol.* 21, 5864–5879.
- Lacerda, D. R., Marini, M. A., & Santos, F. R. (2007). Mitochondrial DNA corroborates the species distinctiveness of the Planalto (*Thamnophilus pelzelni* Hellmayr, 1924) and the Sooretama (*T. ambiguus* Swainson, 1825) Slaty-antshrikes (Passeriformes: Thamnophilidae). *Revista Brasileira de Biología*, pág 873-882.
- Lambertucci, S. A. (2007). Biología y conservación del Cóndor Andino (*Vultur gryphus*) en Argentina. *El hornero*, 22(2), 149-158.
- Li, W. H., Sadler, L. A. (1991). Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129:513– 523.

- MADS, M. D. (2012). Política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (PNGIBSE). Política nacional para la gestión integral de la biodiversidad y sus servicios ecosistémicos (PNGIBSE).
- Martínez-Gómez, J. E., Matías-Ferrer, N., & Escalante-Pliego, P. (2017). Phylogeny and taxonomy of the Socorro parakeet (*Psittacara holochlorus brevipes*): recent speciation with minor morphological differentiation. *Journal of Ornithology*, 158(4), 965-978.
- Martinsen, E. S., McFarland, K. P., & Rimmer, C. C. (2018). Documentation of a hybrid Bicknell's Thrush (*Catharus bicknelli*) × Veery (*C. fuscescens*) using vocalization and genetic data. *The Wilson Journal of Ornithology*, 130(1), 70-80. <https://doi.org/10.1676/16-061.1>
- McCracken, K. G., Wilson, R. E., Peters, J. L., Winker, K., Martin, A. R., (2013). Late Pleistocene colonization of South Georgia by yellow-billed pintails pre-dates the Last Glacial Maximum. *J. Biogeogr.* 40, 2348–2360.
- McMullan, M., Donegan, T. M., Quevedo, A., & Quevedo. (2011). Guía de Campo de las Aves de Colombia. ProAves.
- McMullan, M., Thomas, M. D., Killery, T., Bartels, A., & Avery, B. (2016). Field Guide to the Birds of Colombia – 2nd Edition.
- Miller, M. P., Mullins, T. D., Haig, S. M., Takano, L., & Garcia, K. (2015). Genetic structure, diversity, and interisland dispersal in the endangered Mariana Common Moorhen (*Gallinula chloropus guami*). *The Condor*, 117(4), 660-669. <https://doi.org/10.1650/CONDOR-15-42.1>
- Morales, A. A., González, H. A. G., & Pineda, E. V. (2017). Relaciones de parentesco en híbridos F 1 de cacao (*Theobroma cacao* L.) por marcadores moleculares. *Acta Universitaria*, 27(6), 66-77.
- Neotropical Birds. (2017). Thick-billed *Euphonia* - Introduction | Neotropical Birds Online. Recuperado 30 de septiembre de 2017, de <https://neotropical.birds.cornell.edu/Species-Account/nb/species/thbeup1/overview>
- Nunes, G. T., Efe, M. A., Freitas, T. R. O., & Bugoni, L. (2017). Conservation genetics of threatened Red-billed Tropic birds and White-tailed Tropicbirds in the southwestern Atlantic Ocean. *The Condor*, 119(2), 251-260. <https://doi.org/10.1650/CONDOR-16-141.1>
- Núñez-Zapata, J., Townsend Peterson, A., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2016). Pleistocene diversification and speciation of White-throated Thrush (*Turdus assimilis*; Aves:

- Turdidae). *Journal of Ornithology*, 157(4), 1073-1085. <https://doi.org/10.1007/s10336-016-1350-6>
- Olah, G., Heinsohn, R. G., Brightsmith, D. J., & Peakall, R. (2017). The application of non-invasive genetic tagging reveals new insights into the clay lick use by macaws in the Peruvian Amazon. *Conservation Genetics*, 18(5), 1037-1046. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-0954-6>
- Ortiz-Ramírez, M. F., Sánchez-González, L. A., Castellanos-Morales, G., Ornelas, J. F., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2018). Concerted Pleistocene dispersal and genetic differentiation in passerine birds from the Tres Marías Archipiélago, México. *The Auk*, 135(3), 716-732. <https://doi.org/10.1642/AUK-17-190.1>
- Pavlova, A., Gan, H. M., Lee, Y. P., Austin, C. M., Gilligan, D. M., Lintermans, M., & Sunnucks, P. (2017). Purifying selection and genetic drift shaped Pleistocene evolution of the mitochondrial genome in an endangered Australian freshwater fish. *Heredity*, 118(5), 466-476. <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.120>
- Payevsky, V. A. (2015). Taxonomy of true finches (Fringillidae, Passeriformes): A review of problems. *Biology Bulletin*, 42(8), 713-723. <https://doi.org/10.1134/S1062359015080051>
- Pereira, S. L. (2000). Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4), 745-752. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400008>
- Perfectti, F., Picó, F. X., & Gómez, J. M. (2009). La huella genética de la selección natural. *Revista Ecosistemas*, 18(1).
- Price, M. R., Person, C., & Hayes, W. K. (2015). Geographic variation and genetic structure in the Bahama Oriole (*Icterus northropi*), a critically endangered synanthropic species. *PeerJ*, 3. <https://doi.org/10.7717/peerj.1421>
- Price, R. D., & Johnson, K. P. (2009). Five new species of *Myrsidea waterston* (Phthiraptera: Menoponidae) from tanagers (Passeriformes: Thraupidae) in Panama. *Zootaxa*, (2200), 61-68.
- Proaves. (2014, diciembre). Listado de las Aves de Colombia. Proaves. Fecha de consulta: 30 de septiembre de 2017, de <http://www.proaves.org/listado-de-las-aves-de-colombia/>
- Pruett, C. L., Wan, L., Li, T., Sperr, C., Lance, S. L., Glenn, T., Winker, K. (2015). Development and characterization of microsatellite loci for common raven (*Corvus corax*) and cross species amplification in other Corvidae. *BMC Research Notes*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1643-5>

- Puebla-Olivares, F., Bonaccorso, E., De Los Monteros, A. E., Omland, K. E., Llorente-Bousquets, J. E., Peterson, A. T., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2008). Speciation in the Emerald Toucanet (*Aulacorhynchus Prasinus*) Complex. *The Auk*, 125(1), 39-50. <https://doi.org/10.1525/auk.2008.125.1.39>
- Remsen, J. V., Jr., K. J. Zimmer, C. D. Cadena, S. Claramunt, A. Jaramillo, J. F. Pacheco, D. F. Stotz. (2017). A classification of the bird species of South America. Recuperado 30 de septiembre de 2017, de <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.htm>
- Restall, R. L., Rodner, C., Lentino, M., & R, M. L. (2006). Birds of Northern South America: An Identification Guide. Christopher Helm.
- Restrepo-Cardona, J. S., Marín-C, D., Sánchez-Bellaizá, D. M., Rodríguez-Villamil, D. R., Berrio, S., Vargas, L., & Mikkola, H. (2018). Diet of barn owl (*Tyto alba*), spectacled owl (*Pulsatrix perspicillata*) and rufous-banded owl (*Strix albitarsis*) in the western Andes of Colombia. *Ornitología Neotropical*, 29(1), 193-198. Recuperado de <http://journals.sfu.ca/ornneo/index.php/ornneo/article/view/293>
- Rhett, B. (2016). The top 10 most biodiverse countries. Recuperado 30 de septiembre de 2017, de <https://news.mongabay.com/2016/05/top-10-biodiverse-countries/>.
- Rodrigues, P., Lopes, R. J., Resendes, R., Ramos, J. A., & Cunha, R. T. (2016). Genetic Diversity of the Azores Blackbirds *Turdus merula* Reveals Multiple Founder Events. *Acta Ornithologica*, 51(2), 221-234. <https://doi.org/10.3161/00016454AO2016.51.2.008>
- Ruegg, K. C., Smith, T. B. (2002). Not as the crow flies: a historical explanation for circuitous migration in Swainson's thrush (*Catharus ustulatus*). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 269, 1375–1381.
- Shakya, S. B., Haryoko, T., Burner, R. C., Prawiradilaga, D. M., & Sheldon, F. H. (2018). Preliminary assessment of community composition and phylogeographic relationships of the birds of the Meratus Mountains, south-east Borneo, Indonesia. *Bulletin of the British Ornithologists' Club*, 138(1), 45-66. <https://doi.org/10.25226/bboc.v138i1.2018.a6>
- Shields, G. F., & Helm-Bychowski, K. M. (1988). Mitochondrial DNA of Birds. En *Current Ornithology* (pp. 273-295). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6787-5_6
- SiB Colombia. (2016). SiB Colombia. Recuperado 30 de septiembre de 2017, de <https://www.sibcolombia.net/biodiversidad-en-cifras/>
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76.

- Slager, D. L., McDermott, M. E., & Rodewald, A. D. (2012). Kleptoparasitism of nesting material from a red-faced spine tail (*Cranioleuca erythrops*) nest site. *Wilson Journal of Ornithology*, 124(4), 812-815. <https://doi.org/10.1676/1559-4491-124.4.812>
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 393- 430.
- Sullivan, B.L., C.L. Wood, M.J. Iliff, R.E. Bonney, D. Fink, & S. Kelling. 2009. eBird: a citizen-based bird observation network in the biological sciences. *Biological Conservation* 142: 2282-2292.
- Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tajima, F., & Nei, M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1:269-285.
- UICN, U. (2016). Bird Life International. 2016. *Euphonia laniirostris*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e. T22722724A94780525. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22722724A94780525.en>. Downloaded on 24 May 2018.
- Vähä, J. P., Erkinaro, J., Niemelä, E., Primmer, C. R. (2008). Temporally stable genetic structure and low migration in an Atlantic salmon population complex: implications for conservation and management: Temporally stable genetic structure in Atlantic salmon. *Evol. Appl.* 1, 137–154.
- Valan, M., Sychra, O., & Literak, I. (2016). Redescriptions and new host records of chewing lice of the genus *Ricinus* (Phthiraptera: Ricinidae) from the Neotropical Region. *Zootaxa*, 4154(2), 179-189.
- Vargas, L. (2017). *Evaluación de la diversidad genética a partir de secuencias del gen ND2 en poblaciones simpátricas de Ramphocelus dimidiatus y R. icteronotus presentes en el departamento de Santander, Colombia*. Tesis de pregrado, Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander.
- Villareal, H. M., Álvarez, M., Córdoba-Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., & Umaña, A. M. (2004). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad.
- Wetmore, A. (1914). The Development of the Stomach in the Euphonias. *The Auk*, 31(4), 458-461. <https://doi.org/10.2307/4072007>

- Whiteman, N. K., Matson, K. D., Bollmer, J. L., & Parker, P. G. (2006). Disease ecology in the Galápagos Hawk (*Buteo galapagoensis*): host genetic diversity, parasite load and natural antibodies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1588), 797-804. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3396>
- Wiersma, P., Muñoz-Garcia, A., Walker, A., & Williams, J. B. (2007). Tropical birds have a slow pace of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), 9340-9345. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702212104>
- Withrow, J. J., Sealy, S. G., & Winker, K. (2014). Genetics of divergence in the Northern Saw-whet Owl (*Aegolius acadicus*). *The Auk*, 131(1), 73-85. <https://doi.org/10.1642/AUK-13-187.1>
- Woltmann, S., Stouffer, P. C., Bergeon Burns, C. M., Woodrey, M. S., Cashner, M. F., & Taylor, S. S. (2014). Population Genetics of Seaside Sparrow (*Ammodramus maritimus*) Subspecies along the Gulf of Mexico. *PLoS ONE*, 9(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112739>
- Wu, L., Sun, Y., Li, J., Li, Y., Wu, Y., & Li, D. (2015). A phylogeny of the Passerida (Aves: Passeriformes) based on mitochondrial 12S ribosomal RNA gene. *Avian Research*, 6. <https://doi.org/10.1186/s40657-015-0010-5>.
- Yuri, T., & Mindell, D. P. (2002). Molecular phylogenetic analysis of Fringillidae, New World nine-primaried oscines (Aves: Passeriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(2), 229-243. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00012-X](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00012-X)
- Zink, R. M., Pavlova, A., Drovetski, S., & Rohwer, S. (2008). Mitochondrial phylogeographies of five widespread Eurasian bird species. *Journal of Ornithology*, 149(3), 399-413.
- Zuccon, D., Prÿs-Jones, R., Rasmussen, P. C., & Ericson, P. G. P. (2012). The phylogenetic relationships and generic limits of finches (Fringillidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(2), 581-596. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.10.002>

Apéndices

Apéndice a. Análisis de las variaciones encontradas en los individuos de *E. laniirostris*.

ESTADÍSTICOS	LC	HR	SB	MEDIA	S.D
No. de individuos	11	11	17	13	3.4640
No. de haplotipos	10	11	15	12	-
No. de loci usados	949	947	947	947.667	1.1550
No. de loci polimórficos	64	90	71	75	13.4540
No. de sitios privados	31	48	37	38.667	8.6220
No. de transiciones	37	55	43	45	9.1650
No. de transversiones	30	44	33	35.667	7.3710
No. of indels	*2	0	0	0.667	1.1550
Pi	14.9640	22.3270	12.9630	16.7514	4.9314

Nota: *Inserciones en la secuencia LC11.

Apéndice b. Traducción de las secuencias del gen ND2 en *E. laniirostris*.

*JN715449	KLVFIISLLMGSTITMSSNHWIMAWAGLEINTLAILPLISKSHHPRAIEAATKYFLTQSAASALVLFSSMTNAWYTGQW
HR67	KLVFTTSLLLGSTITMSSNHWIMAWAGLEINTLAILPLISKSHHPRAIEAATKYFLTQSAASALVLFSSMTNAWHTGQW
HR68	KLVFTTSLLLGSTITMSSNHWIMAWAGLEINTLAILPLISKSHHPRAIEAATKYFLTQSAASALVLFSSMTNAWHTGQW
*JN715449	LGGWMGLNQTQIRKILAFSSISHLGWMAIILVYNPKLTLLNFYLYVTMTATVFLTLNSIKVLKLSLMTAWTKVPALNA
HR67	LGGWMGLNQTQIRKILAFSSISHLGWMAIILVYNPKLTLLNFYLYATMTATVFLTLNSAKVLKLSLMTAWAKVPALDA
HR68	LGGWMGLNQTQIRKILAFSSISHLGWMAIILVYNPKLTLLNFYLYATMTATVFLTLNSAKVLKLSLMTAWTKVPALNA
*JN715449	DITQLSHPVSGVLVLTSAIAMKLGVLVPFHFWFPEVLQGSTLTITGLLLSTIMKLPPITLLYMTSQSLNPITLLTTMAILSTA
HR67	DITQLSHPVSGVLVLTSAIAMKLGVLVPFHFWFPEVLQGSTLTITGLLLSTVMKLPPITLLYMTSQSLNPITLLTTMAILSTA
HR68	DITQLSHPVSGVLVLTSAIAMKLGVLVPFHFWFPEVLQGSTLTITGLLLSTVMKLPPITLLYMTSQSLNPITLLTTMAILSTA
*JN715449	MLLLTLLSLAGLPPLTGFLPKWLI IQELTKQEMALTATLMSLLSLLSLFFYLRLAYCTTITLPPHTTNHMKQWRTNKP-
HR67	MLLFTLLSLAGLPPLTGFLP*WLI IQELTKQDMALTATLMSLLSLLSLFFYLRLAYCTTITLPPHTTNHMKQWRTIKP-
HR68	MLLLTLLSLAGLPPLTGFLPKWLI IQELTKQEMALTATLMSLLSLLSLFFYLRLAYCTTITLPPHTTNHMKQWRTNQP-

Apéndice c. Valores del estadístico Fs (Fu, 1997) a partir de secuencias ND2 de *E. laniirostris*.

ESTADISTICO	LC	HR	SB	Media	sd
Fs de Fu	-1,2316	-2,0242	-3,5249	-2,2602	1,1647
p (Fs de Fu)	0,2040	0,0850	0,0540	0,1143	0,0792