

**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**

**Lizeth Carolina Vargas Núñez**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga**

**Director**

**Fernando Rondón González**

**Doctor en Ciencias-Biología**

**Codirector**

**Fernando Rodriguea Dos Santos**

**Doctor en Bioquímica e Inmunología**

**Universidad Industrial de Santander**

**Facultad de Ciencias**

**Escuela de Biología**

**Bucaramanga**

**2017**

### Agradecimientos

A mis padres y hermanos por su apoyo, amor, comprensión y compañía incondicional.

A mis demás familiares, en especial, a mi tía, abuela y Andre, que me han acompañado en todo momento.

A Daniel quien me animó e hizo de esta última etapa de mi formación algo asombroso.

A Tati por su apoyo, compañía y complicidad.

A mi director y profesor, Fernando Rondón, por aportar su conocimiento, por su paciencia, confianza y apoyo a lo largo de mi formación y por su completo respaldo en la realización de la tesis.

A mis compañeros del LGPC, en especial, a los Danis y Cami, quienes estuvieron presentes durante el desarrollo del trabajo e hicieron más amena la culminación de la carrera.

A todos los que hicieron parte de mi estadía en Brasil, en especial a la menina y Luis.

A Fabricio Rodrigues por su acogida y aceptación en el LBEM.

A los integrantes del LBEM, especialmente a Davidson, quienes con su paciencia y colaboración aportaron a mi aprendizaje e hicieron de la pasantía una experiencia muy enriquecedora, tanto personal como intelectualmente.

A la Dirección de Relaciones Exteriores UIS y su programa de movilidad.

A los propietarios de las fincas por permitir la realización de muestreos y por su hospitalidad.

A todas las personas que de cualquier forma estuvieron presentes durante mi formación.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	12
1. Marco Teórico.....	13
1.1. Consecuencias genéticas de fragmentación y modificación de hábitat .....	13
1.2. Generalidades de las especies de estudio.....	15
1.3. Generalidades del DNA mitocondrial de aves.....	16
1.4. Gen mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) .....	17
1.5. Estudios moleculares realizados en <i>Ramphocelus</i> .....	18
2. Materiales y Métodos.....	19
2.1. Fase de campo.....	19
2.1.1. Área de estudio. ....	19
2.1.2. Toma y Almacenamiento de muestras.....	21
2.2. Fase de laboratorio.....	21
2.2.1. Extracción de DNA.....	21
2.2.2. Amplificación del gen ND2 por PCR. ....	22
2.2.3. Secuenciación de fragmentos del gen ND2. ....	22

---

2.3. Análisis de datos .....	23
3. Resultados .....	24
3.1. Amplificación y secuenciación del gen ND2.....	24
3.2. Análisis de secuencias del gen ND2 .....	25
3.2.1. Diversidad haplotípica y nucleotídica en <i>Ramphocelus dimidiatus</i> . .....	25
3.2.2. Diversidad haplotípica y nucleotídica en <i>Ramphocelus icteronotus</i> . .....	29
3.2.3. Estructura genética y flujo poblacional en <i>R. dimidiatus</i> . .....	32
3.2.4. Estructura genética y flujo poblacional en <i>R. icteronotus</i> . .....	34
3.2.5 Estructura y flujo genético entre especies del género <i>Ramphocelus</i> consideradas en el estudio. ....	36
4. Discusión.....	38
5. Conclusiones .....	48
6. Recomendaciones .....	49
Referencias Bibliográficas .....	50
Apéndices.....	66

### Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Mapa de distribución de las localidades en estudio en el departamento de Santander. LP: Llano de Palmas; ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; SB: San Benito; EA: El Aburrido.....	20
Figura 2. Distribución de haplotipos ND2 presentes en <i>R. dimidiatus</i> de seis localidades del departamento de Santander. ....	27
Figura 3. Distribución de haplotipos ND2 presentes en <i>R. icteronotus</i> de cinco localidades del departamento de Santander. ....	31
Figura 4. Red de haplotipos del gen ND2 en <i>R. dimidiatus</i> generada bajo el criterio Median- Joining. Los círculos son proporcionales a la frecuencia de cada haplotipo. ....	34
Figura 5. Red de haplotipos del gen ND2 en <i>R. icteronotus</i> generada bajo el criterio Median- Joining. Los círculos son proporcionales a la frecuencia de cada haplotipo. ....	36
Figura 6. Red de haplotipos para el gen ND2 en <i>Ramphocelus dimidiatus</i> y <i>R. icteronotus</i> bajo el criterio Median-Joining. Los círculos son proporcionales a las frecuencias de los haplotipos. En amarillo <i>R. icteronotus</i> y en rojo <i>R. dimidiatus</i> . ....	38

## Lista de Tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Sitios polimórficos de haplotipos del gen ND2 tipificados en <i>Ramphocelus dimidiatus</i> en seis localidades del departamento de Santander. ....	26
Tabla 2. Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica ( $\pi$ ) de <i>R. dimidiatus</i> en seis localidades del departamento de Santander. ....	27
Tabla 3. Sitios polimórficos de 10 haplotipos del gen ND2 tipificados en <i>Ramphocelus icteronotus</i> de cinco localidades del departamento de Santander. ....	30
Tabla 4. Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica ( $\pi$ ) de <i>R. icteronotus</i> en cinco localidades del departamento de Santander. ....	31
Tabla 5. AMOVA a partir del contenido alélico y las frecuencias de haplotipos ND2 de <i>R. dimidiatus</i> presentes en seis localidades del departamento de Santander. ....	33
Tabla 6. Parejas de valores de $\phi_{ST}$ y $N_m$ a partir de frecuencias haplotípicas del gen ND2 dentro de localidades y entre <i>R. dimidiatus</i> y <i>R. icteronotus</i> . ....	33
Tabla 7. AMOVA a partir del contenido alélico y las frecuencias de haplotipos ND2 de <i>R. icteronotus</i> presentes en cinco localidades del departamento de Santander. ....	35
Tabla 8. AMOVA a partir del contenido alélico y las frecuencias de haplotipos del gen ND2 presentes en poblaciones simpátricas de <i>Ramphocelus dimidiatus</i> y <i>R. icteronotus</i> del departamento de Santander. ....	37

**Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Visualización de producto amplificado del gen ND2.....	66
Apéndice B. Electroferograma parcial de una secuencia del gen nd2 en una muestra de <i>R. dimidiatus</i> .....	67
Apéndice C. Composición nucleotídica del gen nd2 en dos especies del género <i>Ramphocelus</i> ..	68

## Resumen

**TÍTULO:** 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.\*

**AUTOR:** Lizeth Carolina Vargas Núñez\*\*

**PALABRAS CLAVES:** Diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, estructura genética, ND2, *Ramphocelus*.

### DESCRIPCIÓN:

La progresiva degradación ambiental por causas antrópicas, pueden afectar la biodiversidad de la avifauna colombiana. Esta degradación ha posibilitado la ampliación del rango distribucional de *Ramphocelus icteronotus*, especie presente, actualmente, en el departamento de Santander, Colombia. Como consecuencia, dicha especie se encuentra actualmente en simpatría con *R. dimidiatus*, posibilitando la alteración de la diversidad genética en esta, dado que podría dificultar el flujo génico y conducir a su pérdida de variabilidad de presentarse hibridación. Con el objetivo de evaluar la diversidad y el grado de estructura genética, se secuenció el gen NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) del DNA mitocondrial (mtDNA) en 47 muestras de *R. dimidiatus* y 25 muestras de *R. icteronotus*, presentes en cinco localidades de Santander. Las secuencias resultantes fueron analizadas y alineadas con base en secuencias ND2 de cada especie registradas en el GenBank. Los resultados obtenidos a partir de 983pb genotipados en *R. dimidiatus* y 920pb en *R. icteronotus*, permitieron caracterizar 19 y 10 haplotipos, respectivamente. En las dos especies se detectó un patrón de elevada diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, además de baja diferenciación genética en *R. dimidiatus* ( $\Phi_{ST}=0,0254$ ) y moderada en *R. icteronotus* ( $\Phi_{ST}=0,0584$ ). El flujo génico entre las dos especies fue restringido ( $Nm<0,256$ ), soportado por la ausencia de haplotipos compartidos entre ellas. A partir de los resultados se concluye que, pese a la simpatría, existe un elevado grado de diferenciación genética entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* ( $\Phi_{ST}= 0,9421$ ), sin alteración de la diversidad haplotípica y nucleotídica de la especie históricamente residente en Santander, la cual es mayor que en la especie en expansión; esto no conduce a ubicar a *R. dimidiatus* en un status especial de conservación

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director Fernando Rondón González Doctor en Ciencias-Biología  
Codirector Fabricio Rodrigues Dos Santos Doctor en Bioquímica e Inmunología

### Abstract

**TITLE:** EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY FROM SEQUENCES OF ND2 GENE IN SYMPATRIC POPULATIONS OF *Ramphocelus dimidiatus* AND *R. icteronotus* PRESENT IN THE DEPARTMENT OF SANTANDER, COLOMBIA. \*

**AUTHOR:** Lizeth Carolina Vargas Núñez\*\*

**KEYWORDS:** Haplotype diversity, nucleotide diversity, genetic structure, ND2, *Ramphocelus*.

#### DESCRIPTION:

The progressive environmental degradation due to anthropic causes, can affect the biodiversity of Colombian avifauna. This degradation has made it possible to expand the distributional range of *Ramphocelus icteronotus*, a species currently present in the department of Santander, Colombia. Consequently, this species currently is in sympatry with *R. dimidiatus*, allowing the alteration of the genetic diversity in this species, because could hinder the gene flow and lead to its loss of variability, if them present hybridization. In order to evaluate the diversity and degree of genetic structure, the gene NADH dehydrogenase 2 (ND2) of mitochondrial DNA (mtDNA) was sequenced in 47 samples of *R. dimidiatus* and 25 samples of *R. icteronotus* present in five localities of Santander. The resulting sequences were analyzed and aligned based on ND2 sequences from each species recorded on GenBank. The results obtained from 983pb genotyped in *R. dimidiatus* and 920pb in *R. icteronotus* allowed to characterize 19 and 10 haplotypes respectively. In both species were detected a pattern of high haplotype diversity and low nucleotide diversity, as well as low genetic differentiation in *R. dimidiatus* ( $\Phi_{ST}=0,0254$ ) and moderate in *R. icteronotus* ( $\Phi_{ST}=0,0584$ ). The gene flow among the two species was restricted ( $Nm<0.256$ ), supported by the absence of haplotypes shared between them. From the results, it is concluded that despite the sympatry, there is a high degree of genetic differentiation between *R. dimidiatus* and *R. icteronotus* ( $\Phi_{ST}=0,9421$ ), without alteration of the haplotype and nucleotide diversity of the historically resident species in Santander, which is greater than the expanding species; this does not lead to locate *R. dimidiatus* in a special conservation status.

---

\* Degree work

\*\* Science Faculty. School of Biology. Director Fernando Rondón González PhD in Sciences-Biology Codirector Fabricio Rodrigues Dos Santos PhD. in Biochemistry and Immunology

## Introducción

En las últimas décadas la modificación y la consecuente pérdida de hábitat en los Andes colombianos, ocasionada por la deforestación, (Armenteras & Rodríguez, 2007), la expansión de las fronteras agrícola y ganadera y los cultivos ilícitos (Alvarez, 2002; Fjeldsa et al., 2005), ha sido devastadora, representando un riesgo para la biodiversidad de un sinnúmero de especies, especialmente de Aves (Bregman et al., 2014). Dicha destrucción de hábitat sumada al cambio en las condiciones ambientales, ha causado el desplazamiento, disminución y hasta la ampliación en la distribución de algunas especies del mismo grupo, pues han sido forzadas a colonizar otros ambientes, invadiendo así, los ecosistemas de especies residentes (Marvier et al., 2004; Santos & Tellería, 2006).

Un ejemplo de lo planteado anteriormente, lo constituye *Ramphocelus icteronotus*, especie que se establecía al oeste de los Andes, en el Chocó biogeográfico (Hilty & Brown, 1986) y según Isler e Isler (1999) desde la región Caribe de Panamá a lo largo de la vertiente pacífica colombiana hasta Ecuador. En la actualidad, ha llegado a expandirse hasta la cordillera oriental, en Santander, presentando un posible contacto secundario con *Ramphocelus dimidiatus*, especie residente en este departamento (McMullan et al., 2011).

En este sentido, el contacto entre especies que anteriormente se encontraban aisladas puede tener efecto sobre la diversidad, variabilidad y divergencia genética intra e interpoblacional, debido a la posible mezcla del pool génico como consecuencia de su estrecha relación filogenética (Amos & Harwood, 1998). Por tal razón, la diversidad genética de *R. dimidiatus* y

*R. icteronotus*, ha sido tópico de investigación del Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación adscrito a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander (LGPC-UIS), a causa de la expansión de rango de esta última (Carreño 2013; Archila 2014), la cual puede alterar la diversidad genética de *R. dimidiatus* por encontrarse en simpatría con esta.

Así, el presente trabajo pretendió contribuir al estudio de la genética poblacional de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*, estimando la diversidad y estableciendo el grado de estructura genética, a partir del análisis de secuencias del gen ND2 presentes en el mtDNA de ambas especies, partiendo de la hipótesis que la especie históricamente residente presentará menor diversidad genética, a nivel de haplotipos y nucleótidos, en comparación con la especie en expansión dentro de la zona de simpatría.

## 1. Marco Teórico

### 1.1. Consecuencias genéticas de fragmentación y modificación de hábitat

Los ecosistemas colombianos albergan una alta riqueza endémica tanto de flora como de fauna, siendo una prioridad global de conservación (Stattersfield et al., 1998; Myers et al., 2000). En particular, los ecosistemas andinos colombianos reflejan una enorme biodiversidad, siendo altamente representativos pues conforman el 24,52% del territorio nacional emergido (Armenteras & Rodríguez, 2007). Sin embargo, han sufrido procesos de transformación debido a la acción antrópica y sus efectos (Rudel, 2007; Morris, 2010).

Entre estas acciones se encuentra la remoción de bosques para cultivos ilícitos (Alvarez, 2002; Fjeldsa et al., 2005), además del uso del suelo para explotación agrícola, pecuaria y minera que trae consigo la deforestación y modificación de hábitat (Palminteri & Powell, 2001). Adicionalmente la erradicación de cultivos ilícitos por aspersión aérea mediante pesticidas, puede causar un redireccionamiento en la colonización de especies (Cavelier & Etter, 1995), especialmente de la avifauna, afectando la diversidad a nivel genético (Athrey et al., 2012).

Es así como la deforestación genera fragmentos en la matriz del paisaje, que a su vez, conlleva a la conexión entre regiones que anteriormente se encontraban aisladas (Taylor, 1993; Pauls et al., 2013). Lo anterior posibilita la expansión de rango de especies de aves a quienes su hábitat fue retraído, permitiendo la colonización hacia nuevas zonas (Lampila et al., 2005), lo cual podría generar contacto secundario de especies que presentaban distribuciones independientes (Confer, 2006), con la consecuente hibridación e introgresión, fenómenos que afectan negativamente la diversidad genética, de producirse progenie poco viable (Allendorf, 2001), o incrementando los niveles de endogamia dentro de las subpoblaciones (Cruzan, 2001; Frankham et al., 2002; Cobben et al., 2011). De esta manera, la actividad antrópica puede generar una disminución de la diversidad genética en poblaciones naturales debido al aumento de la deriva génica (Nowak et al., 2009), causado por la reducción en el tamaño efectivo poblacional, el cual puede ser generado por la disminución de las tasas de fecundidad y el incremento de la mortalidad (Lande, 1988; Reed, 2005).

Del mismo modo, el cambio climático sobre especies de aves tiene como efecto principal la variación en su rango distribucional, lo cual puede ocurrir en periodos cortos, dado que algunas especies responden rápidamente (Gillings et al., 2015). Una rápida ampliación de rango permite la colonización de nuevos ambientes (Excoffier et al., 2009), a pesar de esto, trae como

consecuencia la ocurrencia de un cuello de botella para los genomas colonizadores, produciendo una tendencia a la homocigosidad y por tanto pérdida de la diversidad genética, aspecto que va aumentando a medida que la expansión continúa (Hewitt, 1996).

## 1.2. Generalidades de las especies de estudio

Las tangaras (Familia: Thraupidae) conforman el grupo de avifauna con mayor abundancia y diversidad en el Neotrópico, en cuanto a su morfología, comportamiento y plumajes (Burns et al., 2014). Generalmente las especies contenidas en este grupo poseen colores brillantes y vistosos, además que muchas de ellas presentan dimorfismo sexual (Fjeldsa & Rahbek, 2006). Dentro de esta familia se encuentra el género *Ramphocelus* que comprende nueve especies (Isler e Isler, 1999) distribuidas a través de zonas bajas neotropicales (Hackett, 1996), cinco de las cuales han sido reportadas en Colombia (Hilty & Brown, 1986; McMullan et al., 2011).

*Ramphocelus dimidiatus* se encuentra distribuido en tierras bajas de Panamá, en las inclinaciones del Caribe y Pacífico, al nordeste de Venezuela y al norte de Colombia, encontrándose también en elevaciones de los Andes orientales colombianos (Isler e Isler, 1999). Los machos adultos de esta especie, se caracterizan por presentar plumaje carmesí brillante con alas negras y pico plateado, mientras que las hembras y machos juveniles lucen coloraciones más opacas (Olson & Violani, 1995).

*Ramphocelus icteronotus* se ha registrado al oeste de los Andes, desde la región Caribe de Panamá a lo largo del Chocó de Colombia hasta Ecuador, (McMullan et al., 2011). Recientemente se ha evidenciado una ampliación de rango, con reportes de presencia en la región oeste de la cordillera oriental de los Andes, más específicamente, en el departamento de

Santander (Avendaño, 2006), zona donde se encuentra en simpatria con *R. dimidiatus* (Archila, 2014). En cuanto a la coloración del plumaje, los machos adultos son negros, con rabadillas color amarillo limón. Las hembras y machos juveniles, presentan tonalidades grisáceas y marrones, con una rabadilla y vientre amarillo pálido (Hilty & Brown, 1986; Isler e Isler, 1999).

Estas especies de *Ramphocelus* se encuentran dentro de un clado monofilético, donde *R. dimidiatus* se agrupa junto a *R. nigrogularis*, *R. bresilius*, *R. melanogaster* y *R. carbo*, mientras que *R. icteronotus*, considerada subespecie de *R. flammigerus* (Isler e Isler, 1999; Bedoya, 2007; Bedoya & Murillo, 2012), se encuentra junto a *R. costaricensis* y *R. passerinii* (Burns et al., 2014).

### 1.3. Generalidades del DNA mitocondrial de aves

El avance de la biología molecular, ha incrementado el impacto de la genética poblacional debido al desarrollo de marcadores moleculares que permiten dar respuesta a cuestiones genéticas, evolutivas y de conservación (Sunnucks, 2000; Faria & Miyaki, 2006), algunos de ellos desarrollados a partir de la información contenida en el DNA mitocondrial (mtDNA).

El mtDNA es una molécula circular de doble cadena que posee características que hacen de esta una herramienta de gran utilidad en estudios a nivel genético (Wilson et al., 1985; Birley & Croft, 1986; Harrison, 1989; Avise, 1991; Moore, 1995). Entre estas se encuentra su haploidía, carencia de recombinación, elevado número de copias, herencia maternal (reflejando únicamente historia matrilineal) y una rápida evolución a nivel de la secuencia de nucleótidos, debido a su alta tasa mutacional (Pereira, 2000; Pakendorf & Stoneking, 2005; Tsaousis, 2005).

Adicionalmente la estructura, el tamaño y la disposición de los genes a lo largo del genoma mitocondrial es conservado en vertebrados (Awise & Ellis, 1986), siendo un poco variable en aves, lo cual posiblemente confiere ventajas selectivas en la propagación y expresión de genes del mtDNA aviar (Desjardins & Morais, 1990).

Asimismo, análisis realizados con información presente en esta molécula, pueden reflejar el tiempo del último evento de selección, por esta razón, linajes con reducida diversidad mitocondrial deberían ser objeto de conservación, pues dicha diversidad corresponde a los haplotipos que fueron recientemente seleccionados (Bazin, 2006).

#### **1.4. Gen mitocondrial NADH deshidrogenasa subunidad 2 (ND2)**

El gen D2 consta de 1041 pares de bases, se encuentra ubicado en la cadena pesada (H-strand) del mtDNA y localizada entre los genes que codifican el tRNA<sup>Met</sup> y el tRNA<sup>Trp</sup> (Desjardins & Morais, 1990). Este ha sido ampliamente empleado como marcador molecular para resolver cuestiones y aspectos evolutivos (Cheviron et al., 2005), genético-poblacionales (Guerrini et al., 2014; Licon-Vera & Ornelas, 2014; Campbell et al., 2016), filogenéticos (Rocha et al., 2015) y filogeográficos (Zink et al., 2006; Van Els et al., 2012), especialmente en aves.

Barker et al., (2012) destacaron la importancia del gen ND2, al realizar análisis comparativos entre la información contenida y ofrecida por el mismo, y la región control del mtDNA (CR), sugiriendo que los parámetros poblacionales estimados a partir de secuencias ND2, son muy uniformes a través del mismo. Adicionalmente, estos investigadores propusieron que las secuencias ND2 resuelven con mayor robustez, las relaciones entre haplotipos y pese al hecho que CR es más polimórfica, el ND2 exhibe mayor diferenciación genética entre especies.

### 1.5. Estudios moleculares realizados en *Ramphocelus*

Estudios filogenéticos han sido desarrollados con el fin de estimar las relaciones entre las especies de este género. Hackett (1996), analizó secuencias del gen citocromo b (*Cyt b*) y el gen ND2, sugiriendo algunas áreas geográficas hermanas en la reconstrucción filogenética presentada y un alto grado de diferenciación genética entre especies. Más ampliamente, Burns et al., (2014), realizaron un análisis de la diversificación de la familia Thraupidae, incluyendo al género *Ramphocelus* y agrupándolo en un clado monofilético, siendo además los estudios de relaciones filogenéticas más recientes para dicho género.

En la especie *R. costaricensis* se ha estudiado la selección sexual, describiendo sistemas de apareamiento genético (Krueger et al., 2008) y de paternidad mediante la caracterización de loci microsatélites polimórficos (Krueger & Williams, 2006). Dichos loci también fueron usados por Nogueira et al., (2014), para examinar la estructura genética en *R. bresilius*.

Por otra parte, se ha evidenciado hibridación a nivel morfológico entre especies de *Ramphocelus*, tópico que ha sido ampliado para comprender más a fondo dicho fenómeno. Análisis de caracteres morfológicos detectaron híbridos entre *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* (Olson & Violani, 1995) y *R. icteronotus* y *R. flammigerus* (Sibley, 1958), debido a la existencia de una zona de contacto, a causa de la modificación del hábitat, aspecto que recientemente fue corroborado con información proveniente de datos, entre otros, moleculares (Morales-Rozo et al., 2014).

En Colombia, más específicamente en la cordillera occidental, estudios comparativos realizados a nivel morfológico y ecológico entre *R. icteronotus* y *R. flammigerus*, revelaron diferencias fenotípicas como coloración y comportamiento (Bedoya, 2007; Bedoya & Murillo,

2012). A su vez, análisis poblacionales generados a partir de marcadores moleculares microsatélites, mostraron que la diversidad genética en poblaciones de dichas especies presuntamente no se ha visto afectada por la fragmentación (Ocampo, 2008). Asimismo, González (2009) empleó el gen *Cyt b* y evidenció estructura genética moderada entre estas especies. A partir del uso de secuencias del mismo gen, Morales-Rozo et al., (2014), examinaron la historia biogeográfica y caracterizaron zonas de hibridación entre *R. icteronotus* y *R. flammigerus*, encontrando baja divergencia genética entre muestras y una limitada estructura entre las zonas híbridas y otras áreas objeto del estudio.

En Santander, estudios poblacionales en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* han sido realizados a partir de secuencias de genes del mtDNA. Carreño (2013), analizó secuencias de *Cyt b* y obtuvo elevada diferenciación y flujo génico restringido entre las especies, indicando que a pesar de su simpatria aún no ha ocurrido contacto secundario entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*. Por su parte, Archila (2014), estudió la diversidad genética en *R. icteronotus* a partir del análisis de secuencias de la región control del mtDNA, hallando una ausencia de estructura genética, alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, posible producto de la ampliación de rango distribucional y de la evidente fragmentación de hábitat que la especie experimenta.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Fase de campo

**2.1.1. Área de estudio.** El área de estudio estuvo comprendida por seis localidades del departamento de Santander ubicadas en la Cordillera Oriental de los Andes colombianos, a saber:

1). Finca Casa Blanca, Vereda San Benito del municipio de Rionegro (SB); 2). Finca El Diviso, Vereda La Colorada del municipio de San Vicente de Chucurí (ED); 3). Finca Tierra Buena, Vereda San Bernardo la Cuchilla del municipio de Lebrija (LT); 4). Fincas La Victoria y La Playita, Vereda Los Helechales, municipio de Floridablanca (LJ); 5). Finca Villa Vista, Vereda El Aburrido, municipio de Bucaramanga (EA); 6). Finca Club Rhinos, Vereda Llano de Palmas, municipio de Rionegro (LP), siendo esta última una localidad donde no se encuentra *R. icteronotus* (Figura 1).

Dentro de la matriz de los sitios incluidos predominan diferentes tipos de plantaciones frutales, así como también parches de bosque secundario, hábitat característico de las especies en estudio. En cada una de las localidades se dispusieron 10 redes de niebla a lo largo de los cultivos y el ecotono de bosque, las cuales fueron extendidas y abiertas entre las 05:30 y las 17:30 horas. En promedio el esfuerzo de muestreo fue de 2405 horas-red en cada localidad. El muestreo para todas las localidades se realizó entre junio del 2010 y diciembre del 2012, excepto EA y SB cuyo muestreo se realizó entre diciembre del 2014 y marzo del 2016.

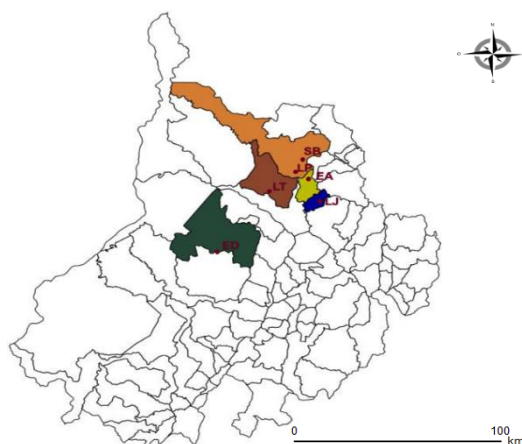


Figura 1. Mapa de distribución de las localidades en estudio en el departamento de Santander. LP: Llano de Palmas; ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; SB: San Benito; EA: El Aburrido.

**2.1.2. Toma y Almacenamiento de muestras.** En total se tomaron 47 muestras de *R. dimidiatus* y 25 de *R. icteronotus*. A cada individuo se le extrajo 50 µl de sangre a partir de la vena braquial, empleando jeringas estériles desechables con agujas de 1 mm de calibre. La sangre extraída se almacenó en 50 µl de etanol absoluto contenido en tubos Eppendorf y se mantuvo a 4°C hasta su procesamiento en el LGPC-UIS.

Cada muestra fue rotulada con las dos iniciales del género seguido de las dos iniciales del epíteto específico y añadiendo el número correspondiente al orden de colecta del laboratorio LGPC-UIS. Asimismo, los individuos capturados se anillaron en el tarso izquierdo con el fin de evitar réplicas en el muestreo y realizar futuros seguimientos a los mismos.

## **2.2. Fase de laboratorio**

Esta fase se llevó a cabo en el LGPC-UIS y en el Laboratorio de Biodiversidad y Evolución Molecular, adscrito al Departamento de Biología General de la Universidad Federal de Minas Gerais-Brasil (LBEM-UFGM).

**2.2.1. Extracción de DNA.** El DNA genómico fue extraído a partir de 10µl de sangre usando el protocolo de extracción y purificación de DNA total con fenol cloroformo propuesto por Green & Sambrook, (2012). A objeto de verificar la calidad de la extracción, se realizó la cuantificación de la concentración y pureza del DNA mediante la medición de su absorbancia por espectrofotometría.

**2.2.2. Amplificación del gen ND2 por PCR.** El gen ND2 se amplificó mediante PCR empleando los cebadores L5215 (Helm-Bychowski & Cracraft, 1993) y H6313 (Johnson & Sorenson, 1998). Las condiciones de reacción de PCR fueron adaptadas y modificadas según lo propuesto por Woltmann et al., (2014). De esta forma, la PCR se llevó a cabo en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems). Cada reacción para un volumen de 10 µl, consistió de 1,08X buffer, 1,65 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µM de dNTPs, 0,65 µM de cada cebador, 0,05U de Taq Platinum (Thermo Fisher Scientific) y 40 ng/µl de DNA total.

El protocolo de ciclaje consistió en 94°C por 2min seguido por 35 ciclos de 94°C por 30s, 54°C por 40s, 72°C por 90s y extensión final a 72°C por 10min. Los productos amplificados (1041pb) fueron teñidos con buffer de carga GelRed® (Biotium) y visualizados por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, corrida durante 15min/40V, seguido de 30min/100V. El tamaño de los fragmentos fue estimado con un marcador de peso molecular de 1000 pb (Thermo Fisher Scientific).

**2.2.3. Secuenciación de fragmentos del gen ND2.** Cada producto de PCR se purificó siguiendo el protocolo descrito por Sambroock & Russell (2001). La secuenciación se realizó en un analizador genético 3130xl (Applied Biosystems), utilizando los cebadores referenciados. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en LBEM-UFGM.

### 2.3. Análisis de datos

Las secuencias fueron editadas en SeqScape v2.6 (Kosman et al., 2001), alineadas manualmente usando como referencia las accesiones del Genbank JN810504 para *Ramphocelus icteronotus* (Burns et al., 2014) y JN810503 para *Ramphocelus dimidiatus* (Burns et al., 2014). Las secuencias alineadas fueron analizadas en el software Mega v7.0 (Kumar et al., 2016), con el fin de determinar y comparar la composición nucleotídica del gen ND2 de cada muestra, así como estimar el porcentaje de homología con base en los sitios polimórficos.

Mediante el software DNAsp v5.0 (Rozas et al., 2009), se detectaron los sitios polimórficos, el número y frecuencia de haplotipos y los parámetros poblacionales tales como diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ). Además, se construyeron redes de haplotipos con el software Network v4.6 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)), con el fin de observar la relación y distribución entre los haplotipos tipificados.

El análisis de estructura genética poblacional y la estimación del porcentaje de variación en cada una de las especies estudiadas por medio de AMOVA (Excoffier et al., 1992), fueron realizados en el programa Arlequin v3.51.3 (Excoffier & Lischer, 2010). Se evaluó la hipótesis de considerar a las dos especies como una misma metapoblación, asimismo, se evaluó la hipótesis que los componentes subpoblacionales de cada especie hacen parte de la misma metapoblación. Además, se calcularon los valores pareados de  $\phi_{ST}$  y  $N_m$  como estimadores de flujo genético en este mismo software.

### 3. Resultados

#### 3.1. Amplificación y secuenciación del gen ND2

Este estudio reporta por primera vez el uso del gen mitocondrial ND2 para realizar análisis genético poblacionales en las especies *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus*.

En la obtención de productos de PCR se utilizaron los cebadores L5215 (Helm-Bychowski & Cracraft, 1993) y H6313 (Johnson & Sorenson, 1998), con estos se amplificó un fragmento de 1041pb correspondiente al gen ND2 (Anexo A). Las condiciones de reacción de PCR fueron adaptadas según lo propuesto por Woltmann et al., (2014), con modificaciones realizadas en LGPC-UIS consistentes en incrementar: el número de ciclos (35x), la temperatura y el tiempo de hibridación (54°C/40s), el tiempo de extensión de los ciclos (72°C/90s) y el tiempo de extensión final (72°C/10min).

A partir de los productos amplificados del gen ND2 se obtuvo secuencias con picos definidos (Anexo B) en 47 muestras de *R. dimidiatus* y 25 de *R. icteronotus*. Posterior a la edición de las secuencias de *R. dimidiatus* se encontró que estas tienen una extensión de 983pb, comprendidas entre las posiciones 5268 y 6250 del mtDNA de referencia (Desjardins & Morais, 1990); por su parte en *R. icteronotus*, las secuencias constan de 920pb comprendidas entre las posiciones 5312 y 6231 del mtDNA de referencia. La composición nucleotídica de las secuencias del gen ND2 fue similar en las dos especies de estudio, evidenciando mayor proporción de citosinas y adeninas (Anexo C).

### 3.2. Análisis de secuencias del gen ND2

**3.2.1. Diversidad haplotípica y nucleotídica en *Ramphocelus dimidiatus*.** En las secuencias obtenidas para esta especie, se identificaron 26 cambios nucleotídicos, en su totalidad sustituciones, los cuales representan un 2,64% de sitios segregantes. En promedio las secuencias presentan un 97,35% de similitud con respecto a la secuencia JN810503, reportada por Burns et al., (2014).

En *R. dimidiatus* se detectaron un total de 19 haplotipos (Tabla 1; Figura 2), de los cuales el 68,42% (13) son únicos dentro de las localidades.

La diversidad haplotípica estimada fue  $h=0,895\pm 0,026$  y la diversidad nucleotídica fue  $\pi=0,00462\pm 0,002$  (Tabla 2), siendo el haplotipo HND\_Rd5 el más frecuente en todas las localidades (21,28 %).

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica presentes en individuos de *R. dimidiatus* de las diferentes localidades consideradas en el estudio se reportan en la tabla 2.

Tabla 1.

Sitios polimórficos de haplotipos del gen ND2 tipificados en *Ramphocelus dimidiatus* en seis localidades del departamento de Santander.

	Sitios polimórficos																												F	sd	Localidad			
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6				6	6	6
*JN810503	T	G	C	A	G	A	T	A	G	G	A	G	G	A	T	C	T	A	A	G	A	A	G	A	C	C	A	A	T	T				
HND_Rd1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0,170	0,055	LP-ED-LJ-SB
HND_Rd2	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0,191	0,058	LP-ED-LT-EA-LJ
HND_Rd3	.	.	T	.	A	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	LP
HND_Rd4	.	.	T	G	A	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	LP
HND_Rd5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	0,213	0,060	ED-LT-LJ-SB
HND_Rd6	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	G	.	.	.	.	0,043	0,030	ED-LT
HND_Rd7	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	ED
HND_Rd8	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	C	.	.	A	.	.	A	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0,043	0,030	ED-SB
HND_Rd9	.	.	.	.	G	C	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	LT
HND_Rd10	.	.	.	.	A	.	.	.	A	A	.	.	.	C	.	.	G	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	0,043	0,030	ED
HND_Rd11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	0,021	0,021	ED
HND_Rd12	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	G	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	0,043	0,030	ED
HND_Rd13	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	ED-LT
HND_Rd14	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	LT
HND_Rd15	.	.	.	.	G	.	.	.	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	T	.	.	.	0,021	0,021	LT
HND_Rd16	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	0,021	0,021	LT
HND_Rd17	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	C	.	.	.	.	.	A	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	LJ
HND_Rd18	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0,021	0,021	SB
HND_Rd19	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	G	.	.	.	.	.	0,021	0,021	SB

F: Frecuencia relativa; sd: desviación estándar; (.): mismo nucleótido; \*: secuencia de referencia Burns et al., (2014); LP: Llano de Palmas; ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; SB: San Benito; EA: El Aburrido.

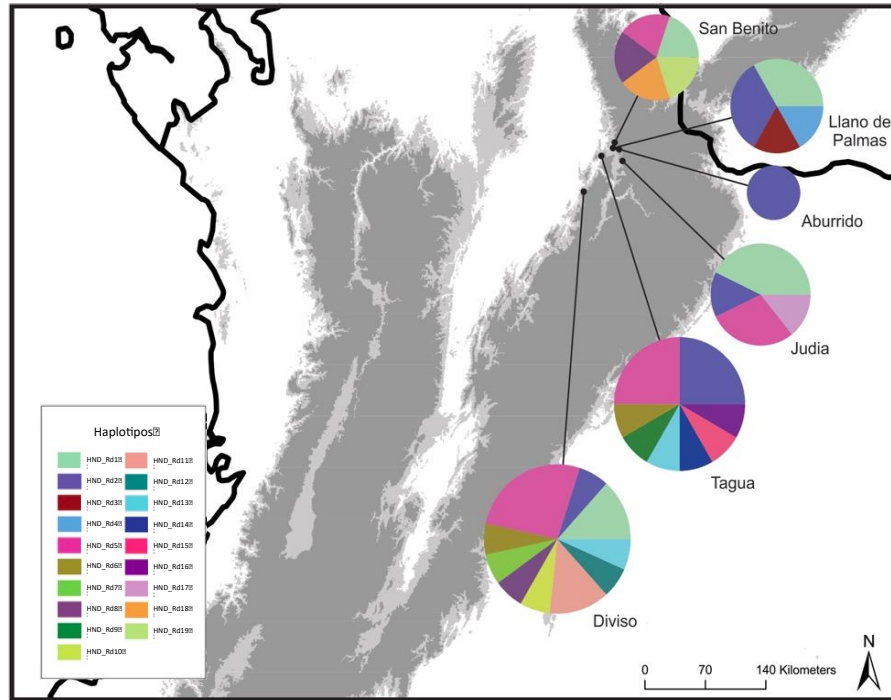


Figura 2. Distribución de haplotipos ND2 presentes en *R. dimidiatus* de seis localidades del departamento de Santander.

Tabla 2.

Diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) de *R. dimidiatus* en seis localidades del departamento de Santander.

Localidad	$h$	$sd$	$\pi$	$sd$
LP	0,809	0,129	0,00468	0,003
ED	0,924	0,053	0,00531	0,003
LT	0,909	0,065	0,00419	0,002
LJ	0,809	0,139	0,00329	0,002
SB	1,000	0,126	0,00559	0,004
EA	0,000	-	0,00000	-
<b>Global - LP</b>	<b>0,901</b>	<b>0,028</b>	<b>0,00450</b>	<b>0,002</b>
<b>Global</b>	<b>0,895</b>	<b>0,026</b>	<b>0,00485</b>	<b>0,003</b>

LP: Llano de Palmas; ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; SB: San Benito; EA: El Aburrído; Global – LP: Análisis excluyendo la localidad LP; sd: desviación estándar.

En LP se detectaron nueve eventos mutacionales, entre ellos, una transversión y ocho transiciones. En total se detectaron cuatro haplotipos, dos de los cuales presentan una frecuencia

del 33,3% (HND\_Rd1, HND\_Rd2). El haplotipo HND\_Rd1 se caracteriza por la sustitución A5953G y en una muestra se encontró la sustitución G5983A; mientras que el haplotipo HND\_Rd2 presenta los eventos mutacionales G5636A, G5983A y G6068C. También se destaca la presencia de los haplotipos exclusivos HND-Rd3 y HND-Rd4, los cuales comparten, entre otras, la sustitución C5299T, mutación no detectada en ningún otro haplotipo; adicionalmente, la sustitución A5422G del haplotipo HND-Rd4 es única para dicha localidad.

En las secuencias ND2 de *R. dimidiatus* en ED se evidenciaron 19 sitios polimórficos, dentro de los cuales se presentan tres transversiones y los demás eventos son transiciones. Esta localidad se caracterizó por presentar la mayor riqueza haplotípica (52,6%) y el mayor número de haplotipos exclusivos entre las localidades (HND-Rd7, HND-Rd10, HND-Rd11, HND-Rd12). En total se detectaron 10 haplotipos, entre estos el HND-Rd5 es el más frecuente (26,66%) y presenta las mutaciones A5953G y C6154T; el haplotipo HND-Rd8 se caracteriza por seis transiciones y una transversión, además del sitio A5929G en una de las muestras; los haplotipos HND-Rd10 y HND-Rd11 presentan los eventos mutacionales T5791C y T5875C, respectivamente, siendo únicos para esta localidad.

En LT se detectaron 11 eventos mutacionales en ocho haplotipos, 10 transiciones y dos transversiones, una de estas exclusivas para esta localidad (A6227T). De los haplotipos se destacan HND\_Rd2 y HND\_Rd5, por ser los más frecuentes (25%), y presenta cuatro haplotipos únicos (HND\_Rd9, HND\_Rd14, HND\_Rd15, HND\_Rd16), de los cuales se encuentran las mutaciones únicas T5517C (HND\_Rd9) y A6227T (HND\_Rd15).

En la localidad LJ se detectaron ocho sitios polimórficos (dos transversiones y seis transiciones) en las secuencias ND2. Se encontraron cuatro haplotipos de los cuales el más

frecuente es el HND\_Rd1 (42,85%) y el HND-Rd17 (G5536A, G5659A, G5758C, G5983A, A6031G, G6068C) es único para esta localidad.

En las secuencias de *R. dimidiatus* provenientes de SB se detectaron 10 eventos mutacionales (siete transiciones y 3 transversiones). Se caracterizaron cinco haplotipos con igual frecuencia, dos de los cuales son exclusivos (HND\_Rd18 y HND\_Rd19). Dentro de los eventos mutacionales se destacan tres no compartidos con otras localidades (A5566G, A5737G, C6112G).

En la localidad de EA se identificaron los tres sitios polimórficos del haplotipo HND\_Rd2, siendo la localidad menos diversa.

Con base en el total de secuencias analizadas, se obtuvo  $D=-0,757$  (Tajima, 1989), cuyo valor no presentó diferencias significativas; mientras que  $F_s=-25,685$  y  $p<0,02$  (Fu, 1997).

**3.2.2. Diversidad haplotípica y nucleotídica en *Ramphocelus icteronotus*.** En esta especie se identificaron 15 cambios nucleotídicos, en su totalidad sustituciones, los cuales representan un 1,63% de sitios segregantes. En promedio las secuencias estudiadas presentan un 98,37% de similitud con respecto a la secuencia JN810504 de *Ramphocelus flammigerus*, reportada por Burns et al., (2014). En total se identificaron 10 haplotipos (Tabla 3; Figura 3) de los cuales el 60% son únicos dentro de las localidades.

La diversidad haplotípica estimada fue  $h= 0,89\pm 0,035$  y la diversidad nucleotídica fue  $\pi= 0,00261\pm 0,002$  (Tabla 4), siendo el haplotipo HND\_Ri6 (C5365A, C5526T, C6145T, G6196A) el más frecuente (24%), además de estar presente en todas las localidades (Tabla 3; Figura 3). Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica estimados de *R. icteronotus* en cinco localidades se reportan en la tabla 4.

En ED se detectaron 11 eventos mutacionales, entre ellos, una transversión y los demás son transiciones. No se detectaron inserciones ni deleciones. En total hay seis haplotipos, tres de los cuales presentan una frecuencia del 22,22% (HND\_Ri2, HND\_Ri3, HND\_Ri4). Esta localidad presenta la mayor riqueza haplotípica, encontrándose en la misma el 60% de todos los haplotipos caracterizados en la especie. También se destaca la presencia de los haplotipos exclusivos HND-Ri3 y HND-Ri7 (Tabla 3).

Tabla 3. Sitios polimórficos de 10 haplotipos del gen ND2 tipificados en *Ramphocelus icteronotus* de cinco localidades del departamento de Santander.

Posición Haplotipo	Sitios polimórficos																F	sd	Localidad
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6			
	3	3	3	3	4	5	5	5	5	7	0	0	1	1	1	1	2	2	
	1	1	6	6	0	1	2	2	4	4	6	9	4	5	7	9	2	3	
	2	7	5	8	7	7	1	6	5	3	7	8	5	1	2	6	7	1	
*JN810504	C	A	C	A	T	T	C	C	T	A	A	C	C	C	T	G	A	T	
**U15710	C	A	A	A	T	T	C	T	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
HND_Ri1	.	.	A	G	.	.	.	T	.	G	T	T	T	.	.	A	.	.	
HND_Ri2	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	T	T	.	.	A	.	.	
HND_Ri3	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	T	T	.	C	A	.	.	
HND_Ri4	.	.	A	G	.	.	.	T	.	.	T	T	T	.	.	A	.	.	
HND_Ri5	.	.	A	.	C	.	.	T	C	.	.	T	T	.	.	A	.	.	
HND_Ri6	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	
HND_Ri7	.	.	A	.	.	C	.	T	.	.	.	.	T	T	.	A	.	.	
HND_Ri8	.	.	A	G	.	.	.	T	.	.	T	T	T	.	.	A	.	.	
HND_Ri9	.	.	A	G	.	.	.	T	.	.	.	T	T	.	.	A	.	.	
HND_Ri10	.	.	A	.	.	.	T	T	.	.	.	.	T	.	.	A	.	.	

Frecuencia relativa; sd: desviación estándar; (.): mismo nucleótido; \*: secuencia de *R. flammigerus* de referencia Burns et al., (2014); \*\*: secuencia de *R. icteronotus* de referencia Hackett (1996); ED: El Diviso, LT: La Tagua, LJ: La Judía, SB: San Benito, EA: El Aburrido.

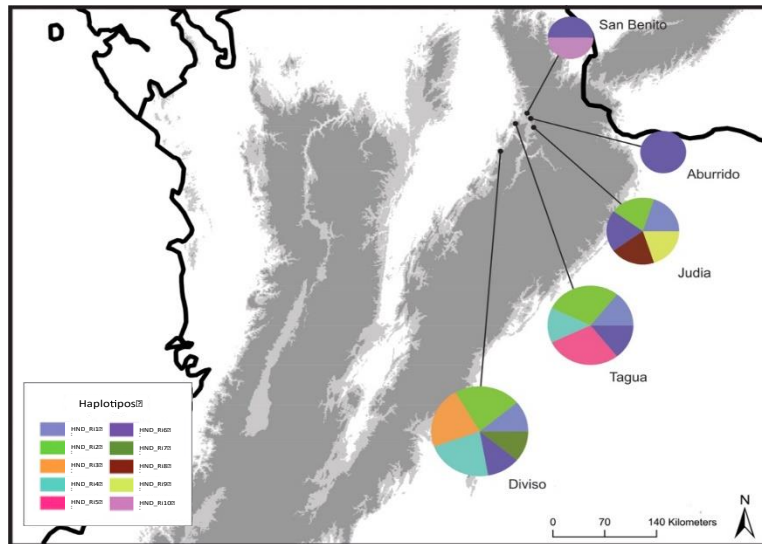


Figura 3. Distribución de haplotipos ND2 presentes en *R. icteronotus* de cinco localidades del departamento de Santander.

En la localidad LT se identificaron 10 sitios polimórficos, de los cuales uno es una transversión. Asimismo, se encontraron cinco haplotipos, siendo los más frecuentes el haplotipo HND\_Ri2 y el haplotipo HND\_Ri5; este último es exclusivo y presenta las mutaciones T5407C y T5545C, únicas para dicha localidad (Tabla 3).

Tabla 4.

Diversidad haplotípica ( $h$ ) y nucleotídica ( $\pi$ ) de *R. icteronotus* en cinco localidades del departamento de Santander.

Localidad	$h$	sd	$\pi$	sd
ED	0,917	0,052	0,00266	0,002
LT	0,905	0,076	0,00269	0,002
LJ	1,000	0,126	0,00282	0,002
SB	1,000	0,500	0,00108	0,001
EA	0,000	-	0,00000	-
<b>Global</b>	<b>0,890</b>	<b>0,035</b>	<b>0,00261</b>	<b>0,002</b>

LP: Llano de Palmas; ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; SB: San Benito; EA: El Aburrído; sd: desviación estándar.

En las secuencias de ND2 de esta especie en LJ se detectaron ocho eventos mutacionales. Además, se encontraron cinco haplotipos con igual frecuencia y los haplotipos HND\_Ri8 y HND\_Ri9 son exclusivos y comparten entre otros, el sitio A5329G también exclusivo para esta localidad (Tabla 3).

En SB se evidenciaron cinco sitios polimórficos, en su totalidad transiciones, en los dos haplotipos encontrados (HND\_Ri6 y HND\_Ri10), los cuales presentan igual frecuencia y comparten todos los sitios a excepción de la sustitución C5521T, presente en el haplotipo HND\_Ri10, exclusivo en esta localidad (Tabla 3).

En la localidad EA se identificaron los cuatro sitios polimórficos del haplotipo HND\_Ri6, siendo la localidad menos diversa.

Con base en el total de secuencias analizadas se obtuvo  $D = -0,591$  y  $F_s = -26,701$ . Estos resultados presentaron el mismo comportamiento que *R. dimidiatus*, en cuanto a la significancia estadística.

**3.2.3. Estructura genética y flujo poblacional en *R. dimidiatus*.** El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) reveló que el 97,46% de la variación genética se encuentra en los individuos de *R. dimidiatus*, mientras que el 2,54% se debe a diferencias entre las localidades, corroborado con el valor estimado del parámetro de estructura genética ( $\phi_{ST} = 0,0254$ ), el cual evidenció poca diferenciación genética (Hartl & Clark, 2007) y no tuvo diferencias significativas (Tabla 5).

Tabla 5.

AMOVA a partir del contenido alélico y las frecuencias de haplotipos ND2 de *R. dimidiatus* presentes en seis localidades del departamento de Santander.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	% de variación	$\phi_{ST}$	<i>p</i>
<b>Entre localidades</b>	5	13,254	2,54	0,0254	0,25
<b>Dentro de localidades</b>	41	91,214	97,46		

GL: Grados de libertad.

Los valores pareados de  $\phi_{ST}$  muestran baja diferenciación entre las localidades, excepto la pareja LJ y EA, las cuales evidenciaron la tasa efectiva de migrantes por generación más baja ( $Nm=1,075$ ). Entre los demás sitios de muestreo, el flujo génico fue elevado (Tabla 6).

Tabla 6.

Parejas de valores de  $\phi_{ST}$  y  $Nm$  a partir de frecuencias haplotípicas del gen ND2 dentro de localidades y entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*.

Especie / Localidad	<i>R. dimidiatus</i>						<i>R. icteronotus</i>					
	LP	ED	LT	LJ	EA	SB	ED	LT	LJ	EA	SB	
<i>R. dimidiatus</i>	LP	-	$\infty$	5,895	4,205	$\infty$	18,683	0,256	0,027	0,029	0,029	0,030
	ED	-0,001	-	13,461	$\infty$	9,704	$\infty$	0,035	0,037	0,039	0,042	0,042
	LT	0,094	0,036	-	4,628	2,040	10,189	0,029	0,030	0,031	0,032	0,033
	LJ	0,115	-0,057	0,097	-	1,075	$\infty$	0,023	0,237	0,025	0,023	0,024
	EA	-0,105	0,049	0,002	0,317	-	4,090	0,018	0,017	0,017	0,000	0,004
	SB	0,035	-0,074	0,047	-0,132	0,109	-	0,029	0,031	0,034	0,039	0,039
<i>R. icteronotus</i>	ED	0,951*	0,934*	0,946*	0,956*	0,965*	0,945*	-	$\infty$	$\infty$	4,352	2,452
	LT	0,943*	0,931*	0,944*	0,955*	0,966*	0,942*	-0,026	-	145,943	2,657	1,877
	LJ	0,946*	0,928*	0,941*	0,953*	0,967*	0,936*	-0,029	0,003	-	1,646	1,404
	EA	0,946*	0,923*	0,939*	0,955*	1,000	0,931*	0,103	0,158	0,233	-	$\infty$
	SB	0,943*	0,921*	0,936*	0,953*	0,992	0,928*	0,169	0,210	0,263	0,000	-

Por debajo de la diagonal: parejas de valores  $\phi_{ST}$ . Por encima de la diagonal: valores  $Nm$ . \* $p < 0,05$ . LP: Llano de Palmas; ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; SB: San Benito; EA: El Aburrido.

A partir de la información obtenida por el software Network, la red evidencia seis haplotipos compartidos entre las localidades, corroborando el flujo génico entre individuos de las mismas.

Dentro de estos el haplotipo HND\_Rd2 es el más común y el segundo más frecuente, encontrándose en cinco de las seis localidades donde se llevaron a cabo muestreos de *R. dimidiatus* (Figura 4). El haplotipo HND\_Rd5 es el más frecuente y se diferencia del HND\_Rd1 por un evento mutacional (Tabla 1).

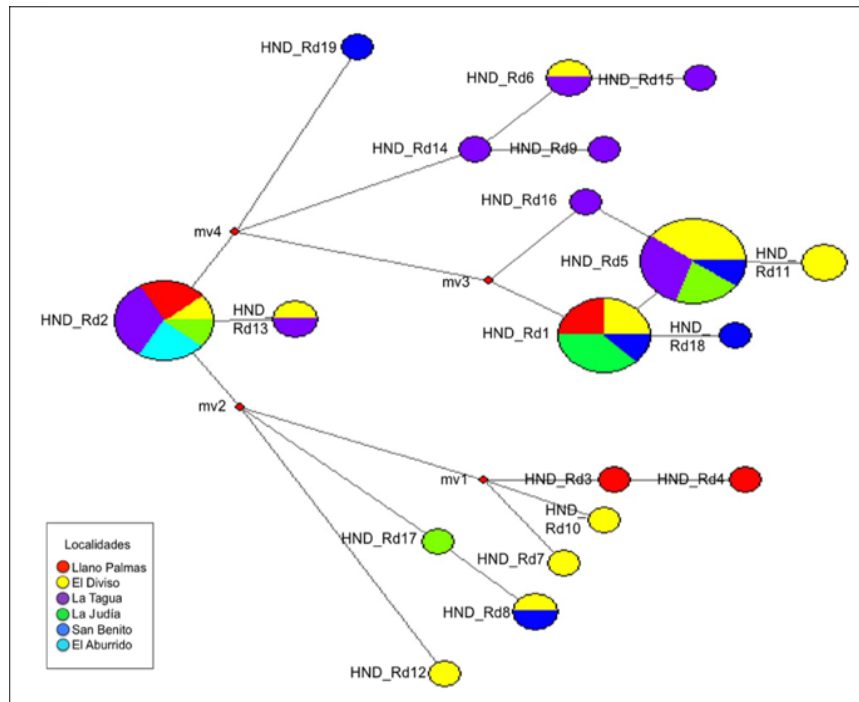


Figura 4. Red de haplotipos del gen ND2 en *R. dimidiatus* generada bajo el criterio Median-Joining. Los círculos son proporcionales a la frecuencia de cada haplotipo.

La red denota la presencia de 13 haplotipos únicos, la mayoría de ellos encontrados en ED y LT, lo cual refleja la importancia que tienen estas localidades en la diversificación de haplotipos ND2 de *R. dimidiatus*. Adicionalmente, se observa que los haplotipos únicos en LT se encuentran más agrupados en comparación con los de otras localidades (Figura 4).

**3.2.4. Estructura genética y flujo poblacional en *R. icteronotus*.** El AMOVA reveló que el 94,16% de la variación genética se debe a los individuos de *R. icteronotus*, mientras que el

5,84% se debe a diferencias entre las localidades, corroborado con el valor estimado del parámetro de estructura genética ( $\phi_{ST}=0,0584$ ), el cual denota diferenciación genética moderada (Hartl & Clark, 2007) y no presenta diferencias significativas (Tabla 7).

Tabla 7.

*AMOVA a partir del contenido alélico y las frecuencias de haplotipos ND2 de R. icteronotus presentes en cinco localidades del departamento de Santander.*

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	% de variación	$\phi_{ST}$	<i>P</i>
<b>Entre localidades</b>	4	5,894	5,84	0,0584	0,21
<b>Dentro de localidades</b>	20	22,906	94,16		

GL: Grados de libertad.

Los valores pareados de  $\phi_{ST}$  muestran gran diferenciación ( $\phi_{ST} > 0,15$ ; Hartl & Clark, 2007) entre las parejas de localidades EA-LJ, EA-LT, SB-ED, SB-LT y SB-LJ, las cuales evidencian los valores más bajos de la tasa efectiva de migrantes por generación (Tabla 6).

La red obtenida bajo el criterio de Median-joining, muestra a los haplotipos HND\_Ri2 y HND\_Ri6 como los más frecuentes; estos se diferencian por un único evento mutacional (Tabla 3). Adicionalmente el HND\_Ri6 está presente en todas las localidades de estudio (HND\_Ri6). La red también exhibe que los haplotipos únicos de esta especie en LJ se encuentran agrupados (Figura 5).

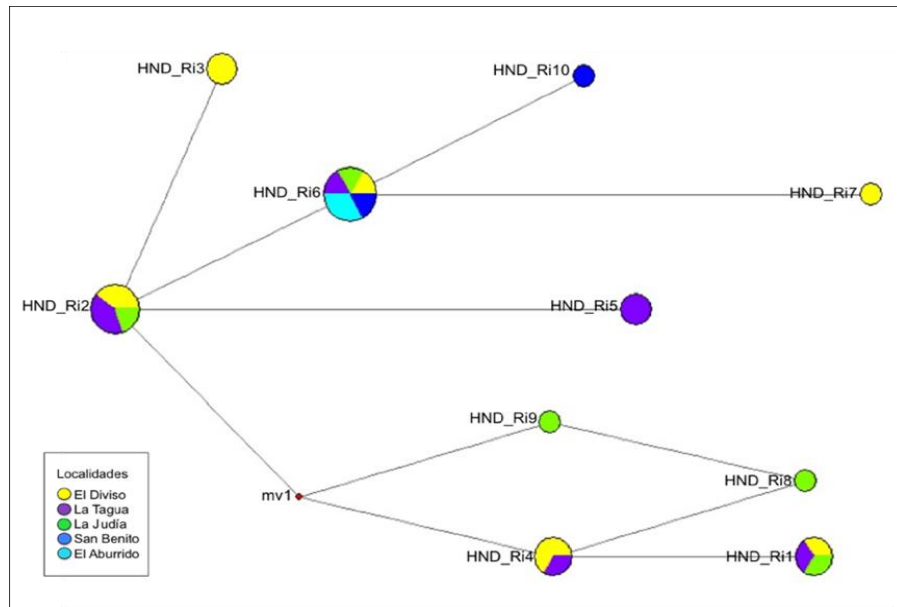


Figura 5. Red de haplotipos del gen ND2 en *R. icteronotus* generada bajo el criterio Median-Joining. Los círculos son proporcionales a la frecuencia de cada haplotipo.

**.2.5 Estructura y flujo genético entre especies del género *Ramphocelus* consideradas en el estudio.** El AMOVA resultante considerando a cada especie como poblaciones diferentes evidenció: 1. Elevada diferenciación entre estas soportada en el valor del índice  $\phi_{CT}= 0,9414$ ; 2. Elevada diferenciación genética entre las subpoblaciones simpátricas de las dos especies corroborada por  $\phi_{ST}=0,9421$ ; 3. Los índices  $\phi_{CT}$  y  $\phi_{ST}$  presentan diferencias significativas ( $p<0,05$ ) y 4. Muy poca diferenciación dentro de cada especie refrendado por  $\phi_{SC}= 0,0115$  (Tabla 8).

Estos resultados ayudan a corroborar la distribución de la variación genética con base en el gen ND2 y, soportan las diferencias estadísticas encontradas al momento de realizar el análisis pareado, en las localidades simpátricas, de cada subpoblación de las especies de *Ramphocelus* consideradas (Tabla 6).

Tabla 8.

AMOVA a partir del contenido alélico y las frecuencias de haplotipos del gen ND2 presentes en poblaciones simpátricas de *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* del departamento de Santander.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	% de variación	Índices de fijación	<i>p</i>
<b>Entre especies</b>	1	927,385	94,14	$\phi_{CT} = 0,9414$	0,0075
<b>Entre poblaciones dentro de especies</b>	8	15,692	0,07	$\phi_{SC} = 0,0115$	0,2487
<b>Dentro de poblaciones</b>	56	102,621	5,79	$\phi_{ST} = 0,9421$	0,0000

GL: Grados de libertad.

Asimismo, la tasa efectiva de migrantes por generación ( $N_m$ ) evidencia flujo génico restringido entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* con menos de un individuo efectivo ( $N_m < 0,256$ ), en cada una de las parejas de localidades estudiadas (Tabla 6).

La red obtenida en Network no exhibe haplotipos compartidos entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* dentro de las localidades de estudio (Figura 6); pese a esto, las dos especies comparten el evento mutacional T5517C y el sitio polimórfico 5743, el cual presenta una mutación diferente en cada especie (G->A en *R. dimidiatus* y A->G en *R. icteronotus*) (Tabla 1 y 3). Estos eventos mutacionales corresponden al 4,9% del total de sitios polimórficos caracterizados en las dos especies.

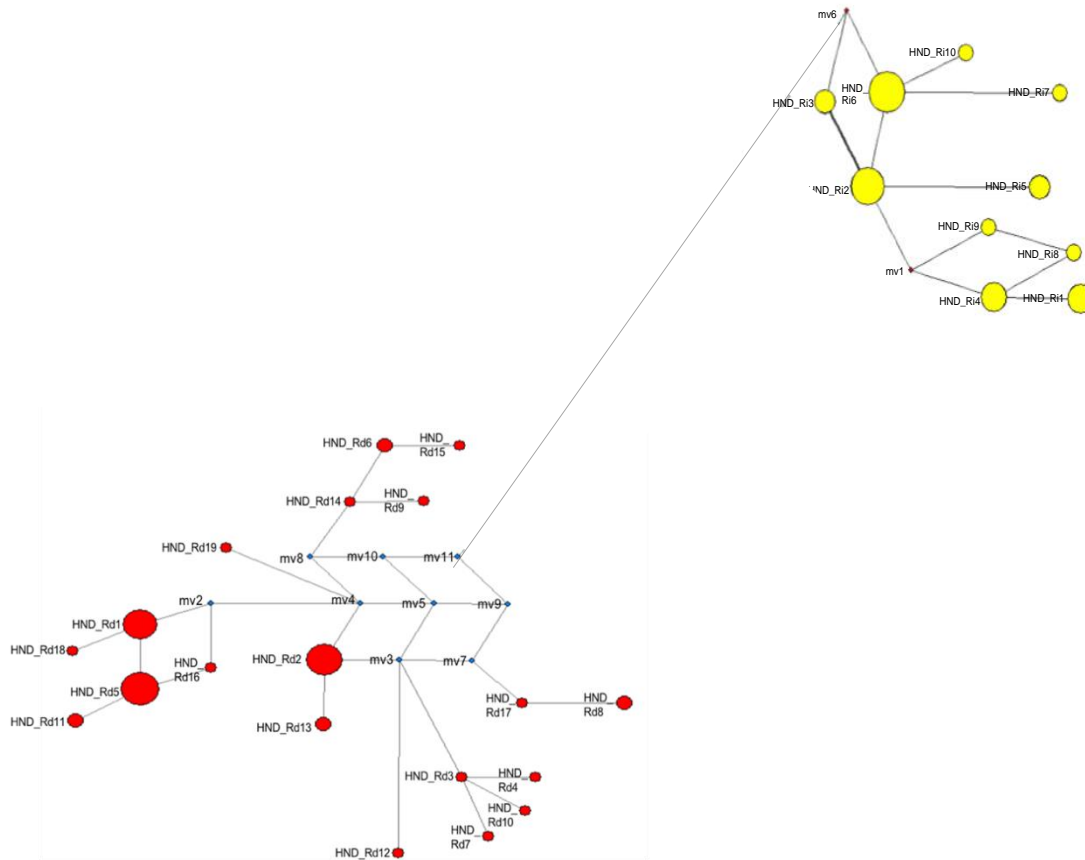


Figura 6. Red de haplotipos para el gen ND2 en *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* bajo el criterio Median-Joining. Los círculos son proporcionales a las frecuencias de los haplotipos. En amarillo *R. icteronotus* y en rojo *R. dimidiatus*.

#### 4. Discusión

El mtDNA es una molécula en la cual se han desarrollado marcadores moleculares (principalmente secuencias, RFLP's y SNP's), utilizados en el estudio de la diversidad genética en muchas especies animales (Galtier et al., 2009; Nabholz et al., 2009), entre ellas Aves (Forcina et al., 2014; Dolman & Joseph, 2015; Craig et al., 2016; Van Oosten et al., 2016).

Dentro de estos marcadores, el uso de secuencias del gen citocromo b (*Cyt b*) ha permitido examinar la historia biogeográfica y algunas zonas de hibridación (Morales-Rozo et al., 2014), así como analizar la diferenciación y estructura genética en el género *Ramphocelus* (Nogueira et al., 2014) en Colombia (González 2009; Carreño 2013). Por su parte, Archila (2014) diseñó cebadores con los que amplificó y secuenció la región control del mtDNA (D-loop) en poblaciones de *R. icteronotus* presentes en el departamento de Santander, a objeto de contribuir con la información contenida en este tipo de secuencias en el análisis de la diversidad genética de esta especie.

Otra fuente que genera información útil para responder preguntas en estudios poblacionales son las secuencias presentes en el gen mitocondrial ND2. Esta permite la tipificación de haplotipos y cuantificación de su frecuencia, la estimación de diversidad nucleotídica y haplotípica (Cadena et al., 2011; Engel et al., 2014), y entre otras, la detección del grado de estructura y flujo genético presente entre poblaciones de Aves (Price et al., 2015; Ramos et al., 2016). Por tanto, el uso de este gen posibilita generar respuestas a preguntas como las planteadas en este estudio y ayuda a complementar la información existente a nivel genético poblacional de las especies simpátricas *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* en el departamento de Santander.

En la presente investigación, la definición de haplotipos y la caracterización de sitios polimórficos en *R. icteronotus* se realizó a partir de la secuencia JN810504 de *R. flammigerus* (Burns et al., 2014). Lo anterior debido a que las secuencias ND2 presentes en el GenBank para esta especie, no superan los 330pb abarcando las posiciones 5240 a 5569; de hecho, al tener como referencia la secuencia U15710 de *R. icteronotus*, se obtienen seis haplotipos, aspecto que no ocurre cuando las secuencias analizadas para esta especie se compararon con la secuencia

JN810504 (Tabla 3). Además de lo expuesto, *R. flammigerus* y *R. icteronotus* conforman un grupo monofilético, del que también hace parte *R. passerinii* (Hackett 1996; Burns et al., 2014). Mediante este análisis fue posible comparar un fragmento de 920pb (posiciones 5312 a 6231), incrementando el número de haplotipos tipificados con los cuales se realizó la estimación de parámetros de diversidad genética para *R. icteronotus*.

En las dos especies de estudio, los valores estimados de diversidad haplotípica cercanos a uno, reflejan un número importante de haplotipos exclusivos detectados en cada una de ellas (60% en *R. icteronotus* y 68% en *R. dimidiatus*), lo cual incrementaría el éxito de las poblaciones (Zalewski et al., 2011). Lo anterior constituye una evidencia de crecimiento poblacional acelerado, principalmente, en la especie que se encuentra ampliando su rango de distribución, en este caso *R. icteronotus*, lo cual conduce al surgimiento y al incremento de nuevas mutaciones y su consecuente afectación de la diversidad genética (Keinan & Clark, 2012; Lohmueller, 2014).

Los bajos valores de diversidad nucleotídica observados en ambas especies son indicativos de baja tasa mutacional, tamaño efectivo poblacional reducido o cuellos de botella severos en un pasado reciente (Li & Sadler, 1991; Ruegg & Smith, 2002). Sin embargo, el hecho que una población presente diversidad nucleotídica baja no significa que amerite asignársele un estatus de conservación (De la Roza, 2012). A su vez, al comparar  $\pi$  en las especies de estudio, en *R. icteronotus* el valor es inferior, quizás, debido al reducido tamaño de muestras tomadas (Gutiérrez-Pinto et al., 2012).

Teniendo en cuenta ambos índices de diversidad evaluados, la elevada diversidad haplotípica y la baja diversidad nucleotídica presentada en las especies de estudio, indican pequeñas diferencias entre los haplotipos caracterizados (Tabla 1 y 3) (De Jong et al., 2011) y pueden ser evidencia de una rápida expansión demográfica a partir de pequeños tamaños poblacionales

(Grant & Grant, 1997; Avise, 2000), lo cual se corrobora con los valores estimados de los índices D (Tajima, 1989) y  $F_s$  (Fu, 1997) para ambas especies del género *Ramphocelus*. Precisamente los valores negativos mostrados por estos índices estarían reflejando un reciente crecimiento poblacional (D) y un exceso del número de haplotipos ( $F_s$ ) (Holsinger, 2012), procesos evidenciados en el exceso de mutaciones raras en las poblaciones que podrían indicar reciente expansión poblacional (De Jong et al., 2011). Además, el valor no significativo de D sugiere que la selección no está operando (Küpper et al., 2012) en el gen ND2 de las dos especies de *Ramphocelus* presentes en Santander.

El patrón de altos valores de diversidad haplotípica y bajos valores de diversidad nucleotídica hallado en el presente estudio, es similar y consistente con lo obtenido por González (2009) en poblaciones de *R. flammigerus* y *R. icteronotus* en la cordillera occidental, por Carreño (2013) en poblaciones de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* en la cordillera oriental y Archila (2014) en *R. icteronotus* en el departamento de Santander. En *R. dimidiatus* los valores de  $h$  y  $\pi$  son más altos respecto a los estimados en *R. icteronotus*. Este patrón es similar al reportado por Carreño (2013), sin embargo, el número de haplotipos y la cantidad de mutaciones detectadas fue mayor en las secuencias *Cyt b* comparado con las secuencias ND2, lo cual está a favor de la idea de que cada marcador molecular (en este caso cada gen mitocondrial) posee dinámicas evolutivas independientes (Saccone et al., 2000; Neiman & Taylor, 2009), en donde la selección actuaría de forma disímil por poseer diferentes funciones fisiológicas (Holsinger, 2012).

tro aspecto que puede indicar el referido patrón que siguen los valores de los índices  $h$  y  $\pi$  se puede atribuir a los hábitats fuertemente fragmentados (Balmford et al., 2003; Fjeldsa et al., 2005) en los que coexisten las dos especies de estudio. Según McCauley (1991), las poblaciones de especies en áreas fragmentadas podrían sufrir cierta probabilidad de extinción local, a causa

de la estocasticidad ambiental asociada a reducidos tamaños poblacionales. Lo anterior puede estar en dependencia de la respuesta de cada especie ante la fragmentación y permitiría prever que *R. icteronotus* se expande con el proceso.

Sumado a lo referido anteriormente no se detectaron procesos de introgresión de genomas mitocondriales entre las dos especies simpátricas de *Ramphocelus*, debido a la ausencia de haplotipos compartidos (Vollmer & Palumbi, 2002; Alves et al., 2003; Currat et al., 2008; Carling et al., 2010; Rheindt & Edwards, 2011), pese a la detección de un único evento mutacional semejante. El hecho de no presentarse introgresión se sustenta, adicionalmente, en la baja tasa de migrantes efectivos por generación entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* ( $Nm=0,031$ ), la cual es producto de la elevada diferenciación genética entre estas ( $\Phi_{ST}=0,9421$ ). Este valor de  $Nm$  podría ser resultado de la ancestría compartida (Keller et al., 2013) entre estas especies; esto no significa que en un futuro no puedan ocurrir eventos de cruce entre ellas, pues se han descrito híbridos morfológicos entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* en Panamá, definidos en el taxón *R. dunstalli* (Olson & Violani 1995). Además, dentro del género hay evidencia de contacto secundario y se han descrito híbridos a partir de datos morfométricos y la detección de coloraciones intermedias en poblaciones de especies simpátricas en la cordillera occidental (Bedoya & Murillo 2012), corroborados por datos moleculares (Morales-Rozo et al., 2014).

Cabe señalar que los niveles de introgresión en el mtDNA en zonas de hibridación de aves frecuentemente son bajos o nulos (Vallender et al., 2007; Carling & Brumfield, 2008; Rush et al., 2009), comparado con lo detectado mediante el DNA nuclear (Brumfield et al., 2001, Gay et al., 2009, Rheindt et al., 2009), siendo otra explicación a la posible ausencia de introgresión que se indica en este estudio. Además, lo anterior puede estar sustentado en que las hembras y machos de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* prefieren aparearse con individuos de su misma especie pues

asegurarían una progenie fértil (Edwards et al., 2005; Pozo, 2009), aumentando el éxito reproductivo y la viabilidad de su descendencia (Andersson, 1994; Waitt et al., 2003). Esto se soporta con los valores altos de  $N_m$  entre las parejas de localidades a nivel intraespecífico, en contraste con los bajos valores de este estimador a nivel interespecífico (Tabla 6). Asimismo, hembras de poblaciones que recientemente han colonizado una nueva área, como es en el caso de *R. icteronotus*, deberían ser menos selectivas en sus conductas de apareamiento en relación a hembras de poblaciones estables y de mayor tamaño (Kaneshiro, 1983; Horton et al., 2000).

Diferentes investigadores como Slatkin (1985), De Jong et al., (2011) y Harvey & Brumfield (2015) han planteado que un elevado flujo génico entre subpoblaciones, podría retardar o limitar el proceso de diferenciación genética y evidenciar pequeña estructura poblacional en las áreas de mayor tamaño. De forma contraria, si el número de migrantes fuese reducido y provinieran de sólo una de las localidades, podría potenciar el nivel de diferenciación entre las subpoblaciones (Harrison & Hastings, 1996). Con respecto a esto, en el presente trabajo ambas especies presentaron bajos valores de  $\phi_{ST}$  (Tabla 5 y 7) y altos valores de  $N_m$  entre las parejas de localidades consideradas (Tabla 6), observándose elevado flujo génico intraespecífico, el cual causa similitud entre las subpoblaciones de una misma especie; por consiguiente, la migración actúa como una fuerza homogeneizadora limitando la divergencia en las localidades (Vähä et al., 2008).

En adición, los bajos y no significativos valores de  $\phi_{ST}$  entre las parejas de localidades, al analizar cada especie por separado, indican que las subpoblaciones de estas se encuentran estrechamente relacionadas. Pese a esto, los valores  $\phi_{ST} > 0,103$  estimados para algunas parejas de localidades en *R. icteronotus* (Tabla 6), pueden ser efecto de tamaños de muestra pequeños, especialmente en SB y EA (2 individuos cada una), lo cual podría repercutir en la estimación del

parámetro de estructura genética global en dicha especie. En contraste, *R. dimidiatus* presentó baja diferenciación genética como consecuencia de un elevado flujo intrapoblacional ( $1,075 < Nm < \infty$ ), aspectos que han sido previamente visualizados en estudios con otras especies de aves (Funk et al., 2007; Küpper et al., 2012; Verkuil et al., 2012; Tang et al., 2016). Todos estos resultados son consistentes y confirman lo evidenciado en el estudio de Carreño (2013), sin embargo, dicho trabajo no involucró individuos muestreados de *R. dimidiatus* en las localidades SB, EA y LP e individuos muestreados de *R. icteronotus* en SB y EA, lo cual permitiría soportar el hecho de encontrar valores disímiles de  $h$ ,  $\pi$ , pareados de  $\Phi_{ST}$  y pareados de  $Nm$ , además de mostrar grados diferenciales de estructura genética (moderada en *R. dimidiatus* y baja en *R. icteronotus*), con el marcador utilizado por esa investigadora.

Hewitt (2000) & Küpper et al., (2012), notaron que la baja estructura genética y la presencia de haplotipos compartidos entre las localidades, tal como se evidenció en el presente trabajo, es común en muchas especies que han sufrido cuellos de botella recientes y han desplazado sus distribuciones geográficas en respuesta a las oscilaciones climáticas como la última máxima glaciación. Para el caso de las especies consideradas, el análisis con información proveniente de marcadores microsatélites (adelantado en nuestro laboratorio), refleja la idea de cuello de botella en *R. dimidiatus* (datos sin mostrar). Precisamente en esta especie, el AMOVA se realizó incluyendo y no incluyendo las muestras de individuos provenientes de Llano de Palmas (LP), localidad donde no hay simpatría con *R. icteronotus*. El resultado de los dos análisis fue equivalente ( $\Phi_{ST}=0,0196$ , sin LP;  $\Phi_{ST}= 0,0254$ , incluido LP), indicando que el grado de estructura genética es bajo y que la diversidad genética en esta especie no presenta diferencias significativas en los parámetros globales de  $h$  y  $\pi$  al momento de excluir y/o considerar a Llano de Palmas (Tabla 2).

Los resultados de la estructura genética también se reflejan en las redes de haplotipos obtenidas para ambas especies, dado que estas no evidencian estructura geográfica debido al elevado flujo génico entre las subpoblaciones y, exhiben: 1. Haplotipos distribuidos a través de los sitios en estudio; 2. Pocos cambios mutacionales entre los haplotipos (1 a 3) y 3. Ausencia de estructura genética definida intraespecíficamente (De la Roza, 2012). Es importante precisar que todas las redes se obtuvieron mediante el criterio de Median-joining, el cual ha sido empleado en el análisis de estructura poblacional (Escobar-Gutiérrez et al., 2013) y de visualización de diversidad haplotípica (McCracken et al., 2013), confiriéndole a este criterio el hecho de ser útil en estudios genético-poblacionales (Kong et al., 2015), tal como lo es el presente.

En este estudio se detectó una importante cantidad de haplotipos totales y un gran número de polimorfismos en las dos especies (29 haplotipos y 39 sitios polimórficos). Esto es indicativo de la diversidad que las especies del género *Ramphocelus* en el departamento de Santander tienen en términos de secuencias ND2, al menos en el área de estudio. Hallazgos similares fueron reportados en el estudio de secuencias *Cyt b* obtenidas por Carreño (2013); lo cual brinda sustento adicional del uso de estos genes en el análisis de la diversidad genética en Aves.

Como se ha denotado, *R. icteronotus* en Santander se encuentran por fuera del rango de distribución histórica (McMullan et al., 2011). Esta circunstancia implicaría bajos valores de diversidad, al igual que del efectivo poblacional (Avise et al., 1984; Avise 2000). Sin embargo, en esta especie  $h$  tiene un valor alto posiblemente como consecuencia del número de haplotipos y de polimorfismos tipificados en las secuencias ND2 analizadas.

Según lo propuesto por Harrison & Hastings (1996), acerca de las características que definen una metapoblación (tamaño desigual e interconexión entre subpoblaciones mediante flujo

genético) y a la luz de los resultados hallados con base en el marcador analizado, *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* en Santander deberían ser consideradas como tal, cada una de ellas por separado (Figura 5), pues las subpoblaciones se encuentran relacionadas mediante flujo genético considerable, corroborado por el Nm y el nivel de estructura genética detectado en ambas especies (bajo a moderado) (Tero et al., 2003; Fields & Taylor, 2014). En adición, el rol de las actividades antropogénicas en la estructuración de la actual variabilidad genética de *Ramphocelus* en Santander no puede ser excluido, debido a la sobreutilización del suelo (IGAC, 2012), la intensiva deforestación y agricultura en este departamento (Cárdenas-Torres, 2006; Castellanos et al., 2011; Acosta, 2015), además de que el 60% de todo el territorio departamental está destinado a la actividad ganadera (IGAC, 2003).

Mooney & Cleland (2001) propusieron que una vez establecidas las poblaciones en expansión de una especie no nativa, se afecta negativamente la especie residente a través de exclusión competitiva, cambio comportamental, desplazamiento de nicho u otras interacciones. Con base en la ausencia de haplotipos compartidos y el hecho que *R. dimidiatus* tiene mayores valores de  $h$  y  $\pi$  con respecto a *R. icteronotus*, permite suponer que el contacto secundario presentado entre las dos especies no afecta la integridad genética de la especie residente, además de considerar que *R. icteronotus* no se comporta como una especie ecológicamente invasora (Ehrlich, 1989; Sakai et al., 2001; Le Roux & Wiczorek, 2009). En el sentido expuesto, comprender los patrones de colonización de una especie en expansión puede ser particularmente importante en: i) la predicción de los efectos de estas en poblaciones nativas (Eraud et al., 2007) y ii) al momento de identificar las áreas que tienen una alta probabilidad de futura colonización. El conocimiento de estos aspectos es fundamental para mitigar las interacciones, potencialmente negativas, entre las especies en expansión y las residentes (Bonter et al., 2010).

Por último y no siendo menos importante, dentro de los sitios de muestreo LT y ED mostraron la riqueza haplotípica más representativa en las especies consideradas (Figuras 2 y 3), por lo que se deberían considerar dentro de futuros planes de manejo y conservación de especies de Aves, preservando la integridad de los agroecosistemas allí presentes. Precisamente, diferentes autores han llamado la atención sobre los agroecosistemas, debido a que estos proveen sitios de reproducción, refugio y forrajeo, fundamentales para la conservación de la biodiversidad (Sparks et al., 1996; Benton et al., 2003; Batary et al., 2010; González et al., 2014).

## 5. Conclusiones

El análisis de las secuencias del gen ND2 en la presente investigación, constituye la primera evaluación de la diversidad genética con dicho gen en las especies bajo estudio, y permitió estimar la diversidad y el grado de estructura genética en poblaciones simpátricas de *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* en el departamento de Santander y posibilitó complementar estudios anteriores de dichas especies. A partir de los resultados se concluye que:

1. *R. dimidiatus* presentó mayor diversidad haplotípica y nucleotídica que *R. icteronotus*, lo cual permite prever que la diversidad genética de la especie históricamente distribuida en Santander, hasta el momento, no se ha visto comprometida, pese a la simpatría y el contacto secundario con la especie que se encuentra ampliando su rango de distribución. Adicionalmente, ambas especies presentan un mismo patrón de elevada diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, debido a la presencia de varios haplotipos exclusivos y a pequeñas diferencias detectadas entre los haplotipos tipificados en cada especie particular.

2. Existe una reducida diferenciación genética intrapoblacional en cada especie debido a: i) los altos valores de diversidad haplotípica y ii) la presencia de haplotipos compartidos. Estos hechos se explican por la alta tasa efectiva de hembras migrantes por generación detectada en las distintas localidades.

3. Se presenta elevado grado de diferenciación y estructura genética interespecífica, evidenciada en valores bajos de Nm, además de la ausencia de haplotipos compartidos entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*.

## 6. Recomendaciones

Para futuros estudios genéticos poblaciones relacionados con las especies de estudio, se recomienda analizar regiones tanto nucleares como mitocondriales de sus genomas, para complementar el conocimiento que existe en este aspecto. De igual forma, se recomienda ampliar el muestreo hacia otras zonas donde las especies de estudio no se encuentren en simpatria, lo anterior con el fin de intentar dilucidar el patrón de expansión que ha seguido *R. icteronotus* y corroborar el grado de estructura genética que presentan estas especies.

### Referencias Bibliográficas

- Acosta, J. A. 2015. Correlación entre deforestación departamental y ocurrencia de eventos de inundación sequía y deslizamiento en Colombia. B.S. thesis. Universidad Militar Nueva Granada.
- Allendorf, F. W., Leary R. F., Spruell P., Wenburg J. K. 2001. The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(11), pp.613–622.
- Alvarez, M. D. 2002. Illicit crops and bird conservation priorities in Colombia. *Conserv. Biol.* 16, 1086–1096.
- Alves, P. C., Ferrand, N., Suchentrunk, F., Harris, D. J. 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 27, 70–80.
- Amos, W., Harwood, J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philos. Trans.-R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* 353, 177–186.
- Andersson, M. 1994. *Sexual Selection*. Princeton University Press. 559pp. Princeton, New Jersey.
- Archila, J. E. 2014. Estudio de la Diversidad Genética de *Ramphocelus icteronotus* (Aves: Thraupidae) presente en el Departamento de Santander, implementando cebadores diseñados para el análisis de la Región control del ADN Mitocondrial [Tesis de pregrado] [Santander (Colombia)]: Universidad Industrial de Santander.
- Armenteras, D., Rodríguez, L. 2007. Monitoreo de los ecosistemas andinos 1985-2005: síntesis (Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt).
- Athrey, G., Barr, K. R., Lance, R. F., Leberg, P. L. 2012. Birds in space and time: genetic changes accompanying anthropogenic habitat fragmentation in the endangered black-

- capped vireo (*Vireo atricapilla*): Temporal genetics of an endangered bird. *Evol. Appl.* 5, 540–552.
- Avendaño, C. J. 2006. Estado de la Diversidad de la Avifauna de la Subcuenca Lebrija Alto, Santander, Colombia. Informe Final. Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga.
- Avise, J. C., Neigel, J. E., Arnold, J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20(2), 99–105.
- Avise, J. C., Ellis, D. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 312:325–42.
- Avise, J. C. 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population-genetic findings on mitochondrial DNA. *Annual Review of Genetics*, 25, 45–69.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press. 447.
- Balmford, A., Green, R. E., Jenkins, M. 2003. Measuring the changing state of nature. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(7), pp.326–330.
- Barker, F. K., Benesh, M. K., Vandergon, A. J., Lanyon, S. M. 2012. Contrasting Evolutionary Dynamics and Information Content of the Avian Mitochondrial Control Region and ND2 Gene. *PLoS ONE* 7, e46403.
- 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.
- Bazin, E. 2006. Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals. *Science* 312, 570–572.
- Bedoya, M. J. 2007. Comparación morfológica y ecológica de las subespecies de *Ramphocelus*

- flammigerus* (Aves: Emberizidae: Thraupinae) en el Valle del Cauca. Tesis de pregrado. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Bedoya, M. J., Murillo, O. E. 2012. Evidencia morfológica de hibridación entre las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Passeriformes: Thraupidae) en Colombia. *Rev Biol Trop* 60, 75–85.
- Benton, T. G., Vickery, J. A., Wilson, J. D. 2003. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends in Ecology & Evolution*, 18(4), 182–188.
- Birley, A. J., Croft, J. H. 1986. Mitochondrial DNAs and phylogenetic relationships. In *DNASystematics*, ed. S. K. Dutta, pp. 107–37. Boca Raton, FL: CRC.
- Bonter, D. N., Zuckerberg, B., Dickinson, J. L. 2010. Invasive birds in a novel landscape: habitat associations and effects on established species. *Ecography*.
- Bregman, T. P., Sekercioglu, C. H., Tobias, J. A. 2014. Global patterns and predictors of bird species responses to forest fragmentation: Implications for ecosystem function and conservation. *Biol. Conserv.* 169, 372–383.
- Brumfield, R. T., Jernigan, R. W., McDonald, D. B., Braun., M. J. 2001. Evolutionary implications of divergent clines in an avian (*Manacus*: Aves) hybrid zone. *Evolution* 55:2070–2087.
- Burns, K. J., Shultz, A. J., Title, P. O., Mason, N. A., Barker, F. K., Klicka, J., Lanyon, S. M., Lovette, I. J. 2014. Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Mol. Phylogenet. Evol.* 75, 41–77.
- Cadena, C. D., Gutiérrez-Pinto, N., Dávila, N., Chesser, R. 2011. No population genetic structure in a widespread aquatic songbird from the Neotropics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 58, 540–545.
- Campbell, K. K., Braile, T., Winker, K. 2016. Integration of Genetic and Phenotypic Data in 48 Lineages of Philippine Birds Shows Heterogeneous Divergence Processes and Numerous Cryptic Species. *PLOS ONE* 11, e0159325.

- Cárdenas-Torres, M. A. 2006. Estimación de la deforestación por cultivos ilícitos en la zona de reserva forestal del río Magdalena. *Colomb. For.* 9, 136–154.
- Carling, M. D., Brumfield, R. T. 2008. Haldane's rule in an avian system: Using cline theory and divergence population genetics to test for differential introgression of mitochondrial, autosomal, and sex-linked loci across the *Passerina* bunting hybrid zone. *Evolution* 62:2600–2615.
- Carling, M. D., Lovette, I. J., Brumfield, R. T. 2010. Historical divergence and gene flow: coalescent analyses of mitochondrial, autosomal and sex-linked loci in *Passerina* buntings. *Evolution*, 64, 1762–1772.
- Carreño, M. 2013. Evaluación de la diversidad genética en poblaciones de *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* (Thraupidae) co-existentes en dos localidades del Departamento de Santander empleando secuencias del gen Citocromo b. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander.
- Castellanos, C., Chamarravi, N., Castañeda, E., Galvis, F., Cepeda, E. 2011. Variación espacio temporal de la cobertura vegetal en la Microcuenca el llanito, Santander, Colombia. *Bol. Científico Cent. Mus.* ISSN 0123–3068.
- Cavelier, J., Etter, A. 1995. Deforestation of montane forests in Colombia as a result of illegal plantations of opium (*Papaver somniferum*). Pages 125-137 in: S. P.
- Cheviron, Z. A., Hackett, S. J., Capparella, A. P. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 36, 338–357.
- Cobben, M. M., Verboom, J., Opdam, P. F. M., Hoekstra, R. F., Jochem, R., Arens, P., Smulders, M. J. M. 2011. Projected climate change causes loss and redistribution of genetic diversity in a model metapopulation of a medium-good disperser. *Ecography*, 34, 920–932.
- Confer, J. L. 2006. Secondary contact and introgression of Golden-winged warblers (*Vermivora chrysoptera*): documenting the mechanism. *The Auk* 123, 958–961.

- Craig, E. H., Adams, J. R., Waits, L. P., Fuller, M. R., Whittington, D. M. 2016. Nuclear and Mitochondrial DNA Analyses of Golden Eagles (*Aquila chrysaetos canadensis*) from Three Areas in Western North America; Initial Results and Conservation Implications. *PLOS ONE* 11, e0164248.
- Cruzan, M. B. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evol.* 55: 1569-1580.
- Curat, M., Ruedi, M., Petit, R. J., Excoffier, L. 2008. The hidden side of invasions: Massive introgression by local genes. *Evolution* 62: 1908-1920.
- 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.
- De la Rosa, C. L. 2012. Estructura genética y conectividad migratoria de las agregaciones invernantes de *Caladris mauri* (Charadriiformes: Scolopacidae) en México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada. México.
- Desjardins, P. Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.* 212: 599-634.
- Dolman, G., Joseph, L. 2015. Evolutionary history of birds across southern Australia: structure, history and taxonomic implications of mitochondrial DNA diversity in an ecologically diverse suite of species. *Emu*.
- Edwards, S. V., Kingan, S. B., Calkins, J. D., Balakrishnan, C. N., Jennings, W. B., Swanson, W. J., Sorenson, M. D. 2005. Speciation in birds: genes, geography, and sexual selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 6550–6557.
- Ehrlich P. R. 1989. Attributes of invaders and the invading processes: vertebrates. See Drake et al. 1989, pp. 315–28.
- Escobar-Gutiérrez, A., Soudeyns, H., Larouche, A., Carpio-Pedroza, J.C., Martinez-Guarneros, 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.
- Engel, J. I., Byamana, K., Kahindo, C., Bates, J. M., Fjeldsa, J. 2014. Genetic structure offers insights into the evolution of migration and the taxonomy of the Barred Long-tailed Cuckoo *Cercococcyx montanus* species complex. *Ibis* 156, 330–340.
- Eraud, C., Boutin, J.-M., Roux, D., Faivre, B. 2007. Spatial dynamics of an invasive bird species assessed using robust design occupancy analysis: the case of the Eurasian collared dove (*Streptopelia decaocto*) in France. *J. Biogeogr.* 34, 1077–1086.
- 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.
- Excoffier, L., Foll, M., Petit, R.J. 2009. Genetic consequences of range expansions. *Ann Rev Ecol Evol Syst.* 40: 481–501.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Eco.* 10: 564-567.
- Faria, P. J., Miyaki, C. Y. 2006. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae (Psittaciformes, Aves). *Genet. Mol. Biol.* 29, 231–240.
- Fields, P. D., Taylor, D. R. 2014. Determinants of Genetic Structure in a Nonequilibrium Metapopulation of the Plant *Silene latifolia*. *PLoS ONE* 9, e104575.
- Fjeldsa, J., Rahbek. 2006. Diversification of tanagers, a species rich bird group, from lowlands to montane regions of south america. *Integr. Comp. Biol.* 46, 72–81.
- Fjeldsa, J., Alvarez, M. D., Lazcano, J. M., Leon, B. 2005. Illicit crops and armed conflict as constraints on biodiversity conservation in the Andes region. *J. Hum. Environ.* 34, 205–211.
- Forcina, G., Panayides, P., Kassinis, N., Guerrini, M., Barbanera, F. 2014. Genetic characterization of game bird island populations: The conservation of the black francolin (*Francolinus francolinus*) of Cyprus. *J. Nat. Conserv.* 22, 15–22.

- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2002. Introduction to conservation genetics Cambridge University Press.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147:915-925.
- Funk, W. C., Mullins, T. D., Haig, S. M. 2007. Conservation genetics of snowy plovers (*Charadrius alexandrinus*) in the Western Hemisphere: population genetic structure and delineation of subspecies. *Conserv. Genet.* 8, 1287–1309.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G. D. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* 18, 4541–4550.
- Gay, L., Neubauer, G., Zagalska-Neubauer, M. J., Pons, M., Bell, D. A., Crochet, P. A. 2009. Speciation with gene flow in the large white-headed gulls: Does selection counterbalance introgression? *Heredity* 102:133–146.
- Gillings, S., Balmer, D. E., Fuller, R. J. 2015. Directionality of recent bird distribution shifts and climate change in Great Britain. *Glob. Change Biol.* 21, 2155–2168.
- 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.
- González, F. 2009. Caracterización genética de las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Aves: Thraupidae) del Valle del Cauca y Cauca, mediante secuencias de ADN mitocondrial y microsátélites. Tesis de pregrado. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Grant, P. R., Grant, B. R. 1997. Genetics and the origin of bird species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 7768–7775.
- Green, M. R., Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Guerrini, M., Gennai, C., Panayides, P., Crabtree, A., Zuberogoitia, I., Copland, A. S., Babushkina, O., Politi, P. M., Giunchi, D., Barbanera, F. 2014. Large-Scale Patterns of Genetic Variation in a Female-Biased Dispersing Passerine: The Importance of Sex-Based Analyses. *PLoS ONE* 9, e98574.
- Gutiérrez-Pinto, N., Cuervo, A. M., Miranda, J., Pérez-Emán, J. L., Brumfield, R. T., Cadena, C. D. 2012. Non-monophyly and deep genetic differentiation across low-elevation barriers in a Neotropical montane bird (*Basileuterus tristriatus*; Aves: Parulidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 64, 156–165.
- Hackett, S. J. 1996. Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus*(Aves). *Mol. Phylogenet. Evol.* 5, 368–382.
- Harrison, R. G. 1989. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 4, 6–11.
- Harrison, S., Hastings, A. 1996. Genetic and evolutionary consequences of metapopulation structure. Elsevier Science. *Tree* vol 11. No. 4.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. 2007. *Principles of Population Genetics* (Sinauer, Sunderland, MA). 4<sup>th</sup> Ed.
- Harvey, M. G., Brumfield, R. T. 2015. Genomic variation in a widespread Neotropical bird (*Xenops minutus*) reveals divergence, population expansion, and gene flow. *Mol. Phylogenet. Evol.* 83, 305–316.
- Helm-Bychowski, K., Cracraft, J. 1993. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: Relationships within the corvine assemblage (Class Aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA cytochrome-b gene. *Mol. Biol. Evol.* 10: 1196–1214.
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247–276.
- Hewitt, G. M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.

- Horton, D., Hinojosa, T. Lewis, T. 2000. Mating preferente, mating propensity, and reproductive traits in *Anthocoris nemoralis* (Heteroptera: Anthocoridae): a comparison of California and United Kingdom populations. *Annals of the Entomological Society of America* 93: 663-672.
- Holsinger, K. 2012. *Lecture Notes in Population Genetics*. Department of Ecology & Evolutionary Biology, U-3043. University of Connecticut. CT 06269-3043.
- Hilty, S. L., Brown, B. 1986. *A Guide to the Birds of Colombia* (Princeton University Press).
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi, IGAC. 2003. *Estudio general de suelos y zonificación de tierras*. Departamento de Santander. Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC).
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi, IGAC. 2012. *Conflictos de uso del territorio colombiano*. Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC).
- Isler, M. L., Isler, P. R. 1999. *The Tanagers: Natural history, Distribution, and Identification*. Smithsonian Institution Press. Pp. 406.
- 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.
- Kaneshiro, K. Y. 1983. Sexual selection and direction of evolution in the biosystematics of Hawaiian Drosophilidae. *Ann. Rev. Entomol.* 28:161-78
- Keinan, A., Clark, A. G. 2012. Recent Explosive Human Population Growth Has Resulted in an Excess of Rare Genetic Variants. *Science* 336, 740–743.
- Keller, I., Wagner, C.E., Greuter, L., Mwaiko, S., Selz, O.M., Sivasundar, A., Wittwer, S., Seehausen, O. 2013. Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. *Mol. Ecol.* 22, 2848–2863.
- Kong, S., Sánchez-Pacheco, S. J., Murphy, R. W. 2015. On the use of median-joining networks in evolutionary biology. *Cladistics* 32, 691–699.

- Kosman, C., Breu, H., Chappell, G., Kumar, S., Iasnopolski, B., Kshirsargar, B., Suri, P., Paul, R., Brown, L., Mason, G., Siu, D., Sword, E., Schoppe, M., Pronyaev, A., Bawge, V., Johnston-Dow., L. 2001. Design and Performance Overview of SeqScape® Software for Comparative Sequencing Analysis and mutation Detection.
- Krueger, T. R., Williams, D. A. 2006. Microsatellite loci for Cherrie's tanager (*Ramphocelus costaricensis*). *Mol. Ecol. Notes* 6, 853–855.
- Krueger, T. R., Williams, D. A., Searcy, W. A. 2008. The genetic mating system of a tropical tanager. *The Condor* 110, 559–562.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Society for Molecular Biology and Evolution.
- 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.
- Lampila, P., Monkkonen, M., Desrochers, A. 2005. Demographic Responses by Birds to Forest Fragmentation. *Conserv. Biol.* 19, 1537–1546.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science*, 241, 1455–1460.
- Le Roux, J., Wieczorek, A. M. 2009. Molecular systematics and population genetics of biological invasions: towards a better understanding of invasive species management: Systematics and population genetics of biological invasions. *Ann. Appl. Biol.* 154, 1–17.
- Li, W. H., Sadler, L. A. 1991. Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129:513–523.
- Licona-Vera, Y., Ornelas, J. F. 2014. Genetic, Ecological and Morphological Divergence between Populations of the Endangered Mexican Sheartail Hummingbird (*Doricha eliza*). *PLoS ONE* 9, e101870.

- Lohmueller, K. E. 2014. The Impact of Population Demography and Selection on the Genetic Architecture of Complex Traits. *PLoS Genet.* 10, e1004379.
- Marvier, M., Kareiva, P., Neubert, M. G. 2004. Habitat Destruction, Fragmentation, and Disturbance Promote Invasion by Habitat Generalists in a Multispecies Metapopulation. *Risk Anal.* 24, 869–878.
- McCauley, D. E. 1991. Genetic Consequences of Local Population Extinction and Recolonization. *TREE* vol. 6, no. 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. 2011. Field guide to the Birds of Colombia. Fundación ProAves. Bogotá, Colombia.
- Mooney, H. A., Cleland, E. E. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5446–5451.
- Moore, W. S. 1995. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. *Evolution* 49, 718.
- Morales-Rozo, A., Tenorio, E. A., Carling, M. D., Cadena, C. D. 2014. Origin and cross-century dynamics of an avian hybrid zone.
- Morris, R. J. 2010. Anthropogenic impacts on tropical forest biodiversity: a network structure and ecosystem functioning perspective. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 3709–3718.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853–858.
- Nabholz, B., Glémin, S., Galtier, N. 2009. The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evolutionary Biology* 9: 54.

- Neiman, M., Taylor, D. R. 2009. The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 1201–1209.
- Nogueira, D. M., Pope, L. C., Burke, T., Alves, M. A. 2014. Genetic differentiation over a short water barrier in the Brazilian tanager, *Ramphocelus bresilius* (Passeriformes: Thraupidae) an endemic species of the Atlantic forest, Brazil. *Conserv. Genet.* 15, 1151–1162.
- Nowak, C., Vogt, C., Pfenninger, M., Schwenk, K., Oehlmann, J., Streit, B., Oetken, M. 2009. Rapid genetic erosion in pollutant-exposed experimental chironomid populations. *Environmental Pollution*, 157, 881–886.
- Ocampo, I. C. 2008. Caracterización de dos subespecies de *Ramphocelus flammigerus* a partir de marcadores moleculares microsátélites. Tesis de pregrado. Universidad del Valle, Cali.
- Olson, S. L., Violani, C. 1995. Some unusual hybrids of *Ramphocelus*, with remarks on evolution in the genus (Aves: Thraupinae). *13*, 297–312.
- Pakendorf, B., Stoneking, M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 6, 165–183.
- Palminteri, S., Powell, G. 2001. Visión de conservación de la biodiversidad en los Andes del Norte. Cali, Colombia: WWF, FUDENA, y Fundación Natura.
- Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., Pfenninger, M. 2013. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Mol. Ecol.* 22, 925–946.
- Pereira, S. L. 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genet. Mol. Biol.* 23, 745–752.
- Pozo, R. A. 2009. Selección de pareja en *Octodon degus* provenientes de dos poblaciones contrastantes de diferente distribución geográfica.
- 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, e1421.

- Ramos, R., Song, G., Navarro, J., Zhang, R., Symes, C. T., Forero, M. G., Lei, F. 2016. Population genetic structure and long-distance dispersal of a recently expanding migratory bird. *Mol. Phylogenet. Evol.* 99, 194–203.
- Reed, D. H. 2005. Relationship between population size and fitness. *Conservation Biology*, 19, 563–568.
- Rheindt, F. E., Christidis, L., Norman, J. A. 2009. Genetic introgression, incomplete lineage sorting and faulty taxonomy create multiple cases of polyphyly in a montane clade of tyrant- flycatchers (*Elaenia*, Tyrannidae). *Zoologica Scripta* 38:143-153.
- Rheindt, F. E., Edwards, S. V. 2011. Genetic Introgression: An Integral but neglected component of speciation in birds. *The Auk* 128, 620–632.
- Rocha, T. C., Sequeira, F., Aleixo, A., Rêgo, P. S., Sampaio, I., Schneider, H., Vallinoto, M. 2015. Molecular phylogeny and diversification of a widespread Neotropical rainforest bird group: The Buff-throated Woodcreeper complex, *Xiphorhynchus guttatus/susurrans* (Aves: Dendrocolaptidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 85, 131–140.
- Rozas, J., Sanchez-Delbarrio, J. C., Rozas, R. 2009. DnaSP, DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Rudel, T. K. 2007. Changing agents of deforestation: From state-initiated to enterprise driven processes, 1970–2000. *Land Use Policy* 24, 35–41.
- Rush, A. C., Cannings, R. J., Irwin, D. E. 2009. Analysis of multilocus DNA reveals hybridization in a contact zone between *Empidonax* flycatchers. *Journal of Avian Biology* 40:614–624.
- 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.
- Saccone, C., Gissi, C., Lanave, C., Larizza, A., Pesole, G., Reyes, A. 2000. Evolution of the mitochondrial genetic system: an overview. *Gene* 261, 153–159.

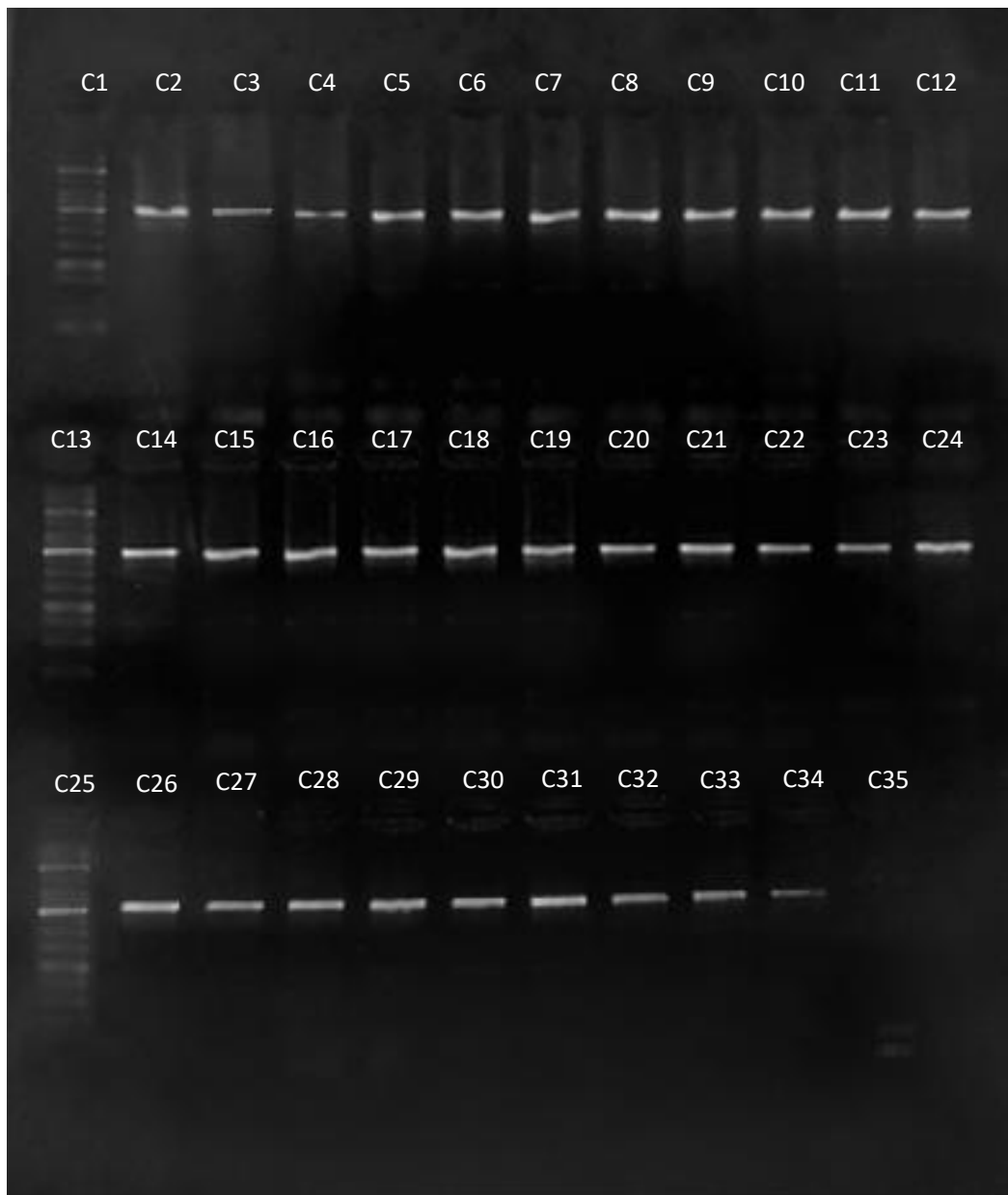
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A., Baughman, S., Cabin, R. J., Cohen, J. E., Ellstrand, N. C. 2001. The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32, 305–332.
- Sambrook J. F., Russell D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santos, T., Tellería, J. L. 2006. Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Rev. Ecosistemas* 15.
- Sibley, C. G. 1958. Hybridization in Some Colombian Tanagers, Avian Genus *Ramphocelus*. *American Philosophical Society*.102(5), pp.448–453.
- Slatkin, M. 1985. Gene Flow in natural populations. *Annu. Rev. Ecol.Syst.* 16, 393-430.
- Sparks, T. H., Parish, T., Hinsley, S. A. 1996. Breeding birds in field boundaries in an agricultural landscape. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 60, 1–8.
- Stattersfield, A. J., Crosby, M. J., Long, A. J., Wege D. C. 1998. *Endemic Bird Areas of the World: Priorities for Biodiversity Conservation*. Cambridge: BirdLife International.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers <sup>[1]</sup>for population biology. *Trends Ecol. Evol.* <sup>[1]</sup>15, 199–203.
- Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tang, X. T., Ji, Y., Chang, Y. W., Shen, Y., Tian, Z. H., Gong, W. R., Du, Y. Z. 2016. Population genetic structure and migration patterns of *Liriomyza sativae* in China: moderate subdivision and no Bridgehead effect revealed by microsatellites. *Bull. Entomol. Res.* 106, 114–123.
- Taylor, P. D. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos* 68(3): 571-573.

- Tero, N., Aspi, J., Siikamäki, P., Jakalaniemi, A., Tuomi, J. 2003. Genetic structure and gene flow in a metapopulation of an endangered plant species, *Silene tatarica*. *Mol. Ecol.* 12, 2073–2085.
- saousis, A. D. 2005. Widespread Recombination in Published Animal mtDNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22, 925–933.
- Vallender, R., Robertson, R. J., Friesen, V. L., Lovette, I. J. 2007. Complex hybridization dynamics between Golden-winged and Blue-winged warblers (*Vermivora chrysoptera* and *Vermivora pinus*) revealed by AFLP, microsatellite, intron and mtDNA markers. *Molecular Ecology* 16:2017–2029.
- Van Els, P., Cicero, C., Klicka, J. 2012. High latitudes and high genetic diversity: Phylogeography of a widespread boreal bird, the gray jay (*Perisoreus canadensis*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 63, 456–465.
- Van Oosten, H. H., Mueller, J. C., Ottenburghs, J., Both, C., Kempenaers, B. 2016. Genetic structure among remnant populations of a migratory passerine, the Northern Wheatear *Oenanthe oenanthe*. *Ibis* 158, 857–867.
- 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.
- Verkuil, Y., Piersma, T., Jukema, J., Zwarts, L.; Baker, A. J., Hooijmeijer, J. C. 2012. The interplay between habitat availability and population differentiation: a case study on genetic and morphological structure in an inland wader (Charadriiformes). *Biological Journal of the Linnean Society*, 106(3), 641-656.
- Vollmer, S. V., Palumbi, S. R. 2002. Hybridization and the Evolution of Reef Coral Diversity. *Science* 296, 2023–2025.
- Waite, C., Little, A., Wolfensohn, S., Honess, P., Brown, A., Buchanan-Smith, H., Perrett, D. 2003. Evidence from rhesus macaques suggests that male coloration plays a role in female primate mate choice. *Proceedings of the Royal Society of London* 270: 144-146.

- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D., Stoneking, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* *26*, 375–400.
- 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*, e112739.
- Zalewski, A., Michalska-Parda, A., Ratkiewicz, M., Kozakiewicz, M., Bartoszewicz, M., and Brzeziński, M. 2011. High mitochondrial DNA diversity of an introduced alien carnivore: comparison of feral and ranch American mink *Neovison vison* in Poland: Genetic diversity of introduced alien American mink. *Divers. Distrib.* *17*, 757–768.
- Zink, R. M., Drovetski, S. V., Rohwer, S. 2006. Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europaea*. *Mol. Phylogenet. Evol.* *40*, 679–686.

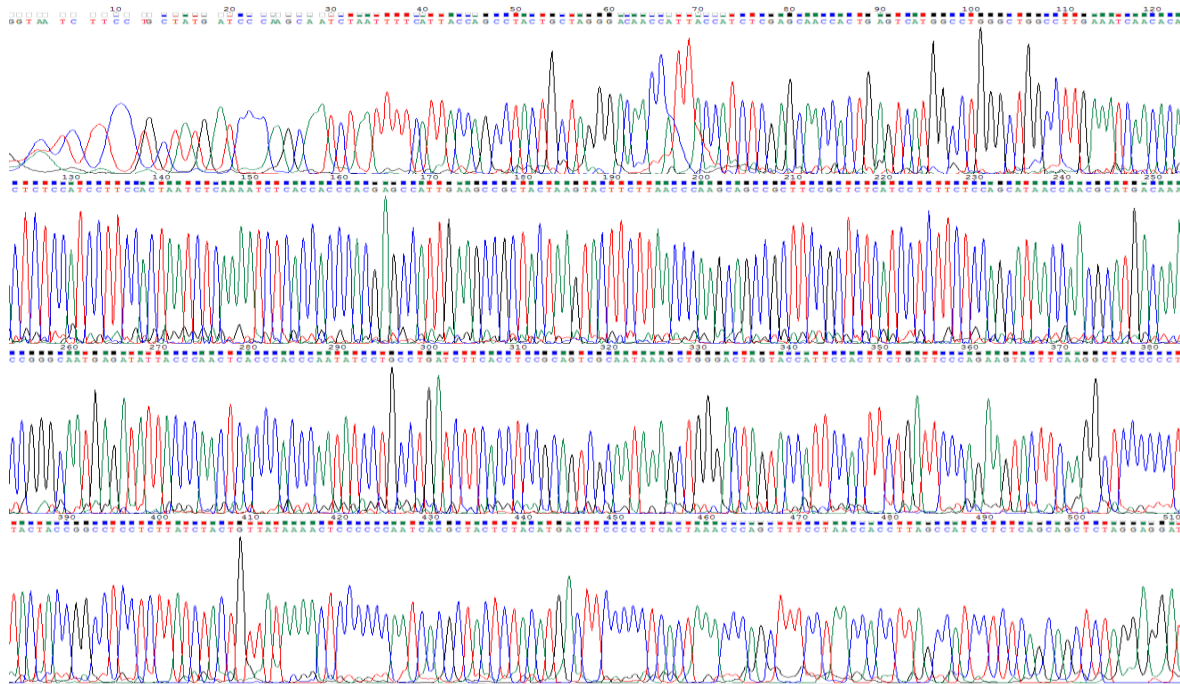
## Apéndices

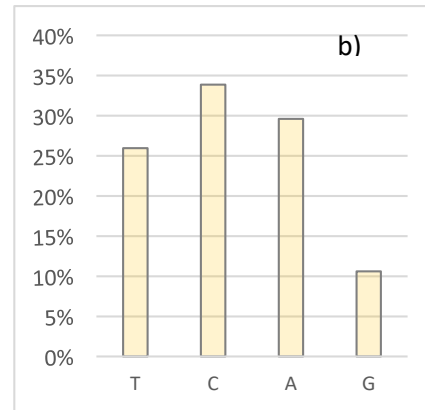
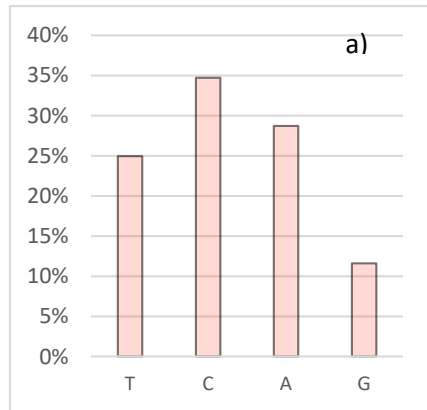
## Apéndice A. Visualización de producto amplificado del gen ND2



C1, C13, C25: Marcador de peso molecular de 1000pb (Thermo Fisher Scientific); C2-C12: Producto amplificado de *R. icteronotus*; C14-C24: Producto amplificado de *R. dimidiatus*; C26-C34: Producto amplificado de *R. flammigerus*; C35: Negativo.

Apéndice B. Electroferograma parcial de una secuencia del gen *nd2* en una muestra de *R. dimidiatus*.



**Apéndice C. Composición nucleotídica del gen nd2 en dos especies del género *Ramphocelus*.**

a) *R. dimidiatus*; b) *R. icteronotus*. A: Adenina, G: Guanina, C: Citosina y T: Timina