

**Estudio de la diversidad genética de dos especies simpátricas de aves del género
Ramphocelus presentes en el departamento de santander a partir de marcadores
microsatélites heterólogos**

Daniel Fernando Calero Rubio

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo

Director

Fernando Rondón González

Doctor en Ciencias-Biología

Codirector

Fabricio Rodrigues Dos Santos

Doctor en Bioquímica e Inmunología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2017

Agradecimientos

A mis padres por la confianza, paciencia, amor y apoyo brindado en todo este tiempo.

A mi hermano que a pesar de la distancia, siempre ha sido un ejemplo a seguir y me ha impulsado en continuar con mis estudios.

A mi familia que sin importar mis decisiones, han estado allí para apoyarme.

A Liz que por su gran amor y apoyo brindado fue y ha sido de gran ayuda tanto a nivel personal como académico.

A Fernando Rondón, mi profesor y director de trabajo de grado, por aceptarme en el laboratorio, enseñarme sobre genética de poblaciones y confiar en mi para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros del LGPC-UIS, en especial a Liz, Daniela y Camila, por la amistad y el apoyo brindado en las salidas de campo.

Al Profesor Fabricio Rodrigues, que desde un inicio tuvo el interés por trabajar con nosotros, y me abrió las puertas de su laboratorio en Brasil.

A Jean Oliveira por su acompañamiento con el trabajo de microsatélites, y a los demás miembros del LBEM en Brasil, que con su experiencia y proyectos de investigación en postgrado tuvieron paciencia conmigo, me enseñaron y enriquecieron con sus destrezas académicas y personales.

A las personas que hicieron amena mi estadía en Brasil, en especial a Karen y a Luis Martínez que me apadrinó y enseñó algunas costumbres brasileras que me facilitaron mi permanencia en el vecino país.

A la UIS, en especial a la VIE por el financiamiento de este proyecto de investigación, y a la Dirección de Relaciones Exteriores por su programa de movilidad académica.

A los propietarios de las fincas que permitieron realizar los muestreos y quienes de paso se enriquecieron con lo interesante que es la ornitología.

A José Pinzón por su amistad y compañerismo, en gran parte de mi carrera. A todas las demás personas que quizá no menciono, pero aportaron algo de ellos para mi formación.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Marco Teórico	14
1.1. Fragmentación de bosque y sus consecuencias genéticas	14
1.2. Generalidades de las especies de estudio	15
1.3. Microsatélites	17
1.4. Estudios de diversidad genética en <i>Ramphocelus</i>	18
2. Materiales y métodos	21
2.1. Fase de campo	21
2.1.1. Área de estudio.	21
2.1.2. Toma y almacenamiento de muestras.	22
2.2. Fase de laboratorio	23
2.2.1. Extracción de DNA genómico.	23
2.2.2. Estandarización del método de amplificación.	23
2.2.3. Genotipado de amplicones.	24
2.3. Análisis de datos	24
3. Resultados	26
3.1. Amplificación y genotipado de loci microsatélites	26
3.2. Frecuencias alélicas y estimadores poblacionales	29

3.2.1 Locus RcAAT11.	29
3.2.2. Locus RcAAAG14.	30
3.2.3. Locus RcAAAG406.	30
3.2.4. Locus RcAAAG410.	34
3.2.5. Locus RcGT257.	34
3.2.6. Locus Asp15.	35
3.3. Flujo y estructura genética	38
4. Discusión	42
4.1. Estandarización de loci microsatélites heterólogos y asignación alélica	42
4.2. Diversidad genética y parámetros poblacionales en <i>R. Dimidiatus</i> y <i>R. icteronotus</i>	45
4.3. Estructura genética de especies simpátricas de <i>Ramphocelus</i>	52
5. Conclusiones	56
6. Recomendaciones	57
Referencias Bibliográficas	59
Apéndices	70

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1. Localidades de estudio. : localidades simpátricas de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*; :
 localidad alopátrica de *R. dimidiatus*; SB: San Benito; LP: Llano de palmas; EA: El Aburrido;
 LT: La Tagua; LJ: La Judía; ED: El Diviso.....22

Figura 2. Condiciones de amplificación por PCR de loci microsatélites heterólogos en especies del género *Ramphocelus*. A. Krueger & Williams (2006); B. Presente trabajo. Ta: Temperatura de hibridación (annealing); Ta1: Temperatura de hibridación 1; Ta2: Temperatura de hibridación 2. min: Minutos; s: Segundos; °C: Grados centígrados.27

Figura 3. Heterocigocidad esperada (H_e) vs altitud de localidades simpátricas donde coexisten *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* en el departamento de Santander. A. Todas las localidades simpátricas; B. Localidades mayormente representadas; Para todos los casos, en cada grupo de barras por especie, la altitud por localidad aumenta de izquierda a derecha; Radi: *Ramphocelus dimidiatus*; Raic: *Ramphocelus icteronotus*.....36

Figura 4. Estructura genética en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* a partir de cinco loci STR's heterólogos. A. Estructura poblacional ($K=2$); LP: Llano de palmas (localidad no simpátrica en *R. dimidiatus*). B. ΔK calculado a partir del método de Evanno et al., (2005). El mayor valor de la gráfica corresponde al mejor K^* , en este caso 2 grupos genéticos.40

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Temperaturas de hibridación empleadas en el esquema de amplificación de los loci microsatélites del presente estudio.....	27
Tabla 2. Número de alelos por locus (\hat{A}), porcentaje (%) de alelos privados, compartidos y nullos y rango alélico (número de repeticiones) tipificado en <i>Ramphocelus dimidiatus</i> y <i>R. icteronotus</i>	28

Tabla 3. Frecuencias alélicas y parámetros poblacionales estimados a partir de seis loci
microsatélites heterólogos en *Ramphocelus dimidiatus*. 31

Tabla 4. Frecuencias alélicas y parámetros poblacionales estimados a partir de seis loci
microsatélites heterólogos en *Ramphocelus icteronotus*. 33

Tabla 5. Estimadores de diversidad genética (H_o y H_e) y coeficiente de endogamia (F_{IS}) por
localidad en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*. 37

Tabla 6. Valores estimados del índice de diferenciación genética R_{ST} a partir de diferentes
hipótesis de agrupamiento de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*. 39

Tabla 7. Distancias genéticas basadas en R_{ST} y Número efectivo de migrantes por generación
(N_m) por parejas de localidades en *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* a partir de cinco loci
microsatélites. 41

Tabla 8. Valores estimados de coeficientes del test de mantel y su significancia. 42

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Rango de distribución de <i>Ramphocelus dimidiatus</i> Y <i>R. icteronotus</i> .	70
Apéndice B. Cebadores utilizados para amplificar loci microsatélites en las especies de <i>Ramphocelus</i> bajo estudio.	71
Apéndice C. Productos amplificados de loci str's en <i>R. dimidiatus</i> Y <i>R. icteronotus</i> .	72

Apéndice D. Electroferogramas de los seis loci microsatélites heterólogos tipificados en *R.*

dimidiatus Y *R. icteronotus*.

73

Resumen

TÍTULO: ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE DOS ESPECIES SIMPÁTRICAS DE AVES DEL GÉNERO *Ramphocelus* PRESENTES EN EL DEPARTAMENTO DE SANTANDER A PARTIR DE MARCADORES MICROSATÉLITES HETERÓLOGOS. *

AUTOR: Daniel Fernando Calero Rubio**

PALABRAS CLAVES: Diversidad genética, Estructura genética, Microsatélites, STR's heterólogos, *Ramphocelus*.

DESCRIPCIÓN:

La alteración del hábitat natural debido a la deforestación como causa de la expansión ganadera, agrícola y otros eventos antrópicos, ha generado interacciones entre especies que estaban geográficamente aisladas. En el departamento de Santander, por ejemplo, se ha evidenciado el contacto secundario entre *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus*, esta última históricamente distribuida en el Chocó biogeográfico, lo cual puede afectar la diversidad genética de *R. dimidiatus* por causa de flujo génico intraespecífico reducido y la posible hibridación interespecífica. Con el objetivo de analizar la diversidad y el grado de estructura genética de estas especies de *Ramphocelus*, se genotiparon seis loci microsatélites heterólogos, mediante la adición de una cola M13 fluoromarcada en uno de los iniciadores de cada loci, en 53 individuos de *R. dimidiatus* y 28 de *R. icteronotus*, distribuidos en seis localidades del departamento de Santander, de las cuales cinco son simpátricas. Los genotipos obtenidos fueron editados y ajustados. Los resultados reflejan que la diversidad genética promedio en las dos especies es alta, siendo mayor en *R. dimidiatus* ($\hat{H}_e=0,898\pm 0,062$) y en *R. icteronotus* disminuye a medida que incrementa la altitud. La diferenciación genética fue moderada en *R. icteronotus* ($R_{ST}=0,08556$), especie que presenta un patrón de aislamiento por distancia. Un análisis Bayesiano asumiendo mezcla, destaca que cada especie tiene una base genética diferencial ($K=2$; $\Delta K=99,48417$). Se concluye que la diversidad genética en *R. dimidiatus* no se ve afectada, actualmente, por la presencia de *R. icteronotus*, soportado en el alto grado de estructura genética interespecífica ($R_{ST}=0,19692$). No se debe descartar que a futuro se pueda presentar hibridación, dado que *R. icteronotus* continúa expandiéndose hacia la Cordillera Oriental colombiana.

* Trabajo de grado

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

Abstract

TITLE: STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF TWO SYMPATRIC SPECIES OF BIRDS OF GENUS *Ramphocelus* PRESENT IN THE DEPARTMENT OF SANTANDER FROM HETEROLOGOUS MICROSATELLITES MARKERS. *

AUTHOR: Daniel Fernando Calero Rubio**

KEYWORDS: Genetic diversity, Genetic structure, Microsatellites, heterologous STRs, *Ramphocelus*.

DESCRIPTION:

The alteration of natural habitat due to deforestation as a cause of cattle expansion, agricultural and other anthropic events has generated interactions between species that were geographically isolated. For example, in the department of Santander, the secondary contact between *Ramphocelus dimidiatus* and *R. icteronotus* has been evidenced, this last one historically distributed in the Chocó biogeographic, which may affect the genetic diversity of *R. dimidiatus* because of reduced intraspecific gene flow and possible interspecific hybridization. In order to analyze the diversity and degree of genetic structure of these *Ramphocelus* species, six heterologous microsatellite loci were genotyped by the addition of a M13 tail fluorescence-labeled in one of the primers of each loci in 53 individuals of *R. dimidiatus* and 28 of *R. icteronotus*, distributed in six localities of the department of Santander, of which five are sympatric. The genotypes obtained were edited and adjusted. The results reflect that the average genetic diversity values in the two species is high, being higher in *R. dimidiatus* ($\hat{H}_e=0.898\pm 0.062$) and *R. icteronotus* decreases as the altitude increases. Genetic differentiation was moderate in *R. icteronotus* ($R_{ST}=0.08556$), species with an isolation by distance pattern. A Bayesian analysis assuming mixture, emphasizes that each species has a differential genetic base ($K=2$; $\Delta K=99.48417$). It is concluded that the genetic diversity in *R. dimidiatus* is not currently affected in the presence of *R. icteronotus*, supported in the high degree of interspecific genetic structure ($R_{ST}=0.19692$). It should not be discard that hybridization can occurs in the future, due to *R. icteronotus* continues to expand towards the Colombian Eastern Cordillera.

* Degree work

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

Introducción

En Colombia desde mediados del siglo XX, zonas de bosque se han visto afectadas a causa del incremento de cultivos ilícitos, ganadería, agricultura y el conflicto armado (Fjeldsa et al., 2005), influyendo en las dinámicas naturales de poblaciones nativas y generando parches fragmentados de bosque (Gallo-Cajiao & Idrobo-Medina, 2004). Lo anterior produce un desplazamiento en los patrones de distribución, por lo cual se hace posible evidenciar zonas de contacto secundario entre especies espacialmente aisladas (Confer, 2006).

El fenómeno de contacto secundario se ha evidenciado en aves del género *Ramphocelus*, donde *R. icteronotus* (Lafresnaye, 1846), ha aumentado su rango de distribución desde la costa pacífica de Panamá, Colombia y el norte de Ecuador (Hilty & Brown, 1986), hasta el valle del río Magdalena, estableciendo poblaciones simpátricas con *R. dimidiatus* en las zonas montañosas del departamento de Santander (McMullan et al., 2011). Esta interacción podría posibilitar el proceso de introgresión (Allendorf et al., 2001) y la mezcla de distintos acervos genéticos (Rhymer & Simberloff, 1996), lo cual puede disminuir gradualmente la variabilidad genética de la especie residente (Dowling & Secor, 1997), en este caso *R. dimidiatus*.

A causa de lo anterior en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación de la Universidad Industrial de Santander, se han adelantado investigaciones orientadas a evaluar la diversidad genética de estas especies a partir de secuencias presentes en el DNA mitocondrial (Carreño, 2013; Archila, 2014; Vargas, 2017), así como, la estandarización de las condiciones de amplificación de loci microsatélites (Noriega, 2015; Cornejo, 2016).

De esta forma, se puso a prueba la hipótesis que la diversidad genética de *R. dimidiatus* es inferior a la de *R. icteronotus* en la zona de simpatría en Santander. Lo anterior a causa de la expansión de esta última, la cual al entrar en contacto secundario podría afectar en términos de disminución la diversidad genética de *R. dimidiatus*. Para esto se analizó la diversidad genética en estas especies, a partir del uso de marcadores moleculares microsatélites (STR's) heterólogos.

1. Marco Teórico

1.1. Fragmentación de bosque y sus consecuencias genéticas

La deforestación y la fragmentación de hábitat (bosques), son las principales amenazas para poblaciones naturales de aves en el neotrópico (Gallo-Cajiao & Idrobo-Medina, 2004). En fragmentos de bosque, con el paso del tiempo, debido al contacto con la matriz de vegetación y a la intervención antrópica, se reduce la diversidad de especies y se torna un hábitat más heterogéneo (Watson, 2002).

Las áreas fragmentadas generan áreas propensas para la colonización por especies no residentes que alteran la estructura de la comunidad (Gallo-Cajiao & Idrobo-Medina, 2004) y, aumentan la probabilidad de evidenciar contacto secundario y zonas de hibridación entre poblaciones naturales anteriormente aisladas (Confer, 2006).

Muchas especies de organismos, especialmente aves, se han visto afectadas por la fragmentación, la deforestación y el cambio climático en primera medida (Fjeldsa et al., 2005;

González, 2009), conllevando en algunas situaciones a la ampliación del rango de distribución, lo que redundaría en el solapamiento y la coexistencia con especies geográficamente separadas, (Bedoya & Murillo, 2012; Morales-Rozo et al., 2014), evidenciando procesos de hibridación, entre otros.

Arnold (1997) define hibridación como entrecruzamientos de individuos de dos poblaciones naturales diferenciadas en uno o más caracteres heredables. El flujo genético entre poblaciones diferenciadas como resultado de continuos eventos de hibridación y retrocruzamiento, es conocido como introgresión genética (Allendorf et al., 2001), fenómeno que gradualmente puede reemplazar los genotipos de las especies parentales a causa de una habilidad competitiva mayor de los híbridos (Dowling & Secor, 1997). Lo anterior, afecta en mayor proporción la integridad genética de la especie con un rango de distribución restringido (especie residente), en comparación a la especie que está aumentando su rango de distribución (Rhymer & Simberloff, 1996; Bedoya & Murillo, 2012), como estaría ocurriendo en *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus*, respectivamente (Obs. per).

1.2. Generalidades de las especies de estudio

Las Tangaras (Familia: Thraupidae) son uno de los taxa de aves más diverso y abundante del Neotrópico (Skutch, 1989). La mayor parte de especies incluidas en este grupo tienen plumajes de color brillante o presentan parches de plumas brillantes (Krueger & Williams, 2006) y muchas de estas exhiben dimorfismo sexual para el color del plumaje (Isler & Isler, 1999).

El género de tangara neotropical *Ramphocelus* (Thraupidae: Passeriformes) se caracteriza por presentar pico de color plateado, un amplio gradiente de coloración y preferencias de hábitat

(Sibley, 1958; Hackett, 1996). Este género posee cerca de nueve especies distribuidas desde México hasta el sur de Brasil (Isler & Isler, 1999), de las cuales se han registrado poblaciones de cinco especies (*R. flammigerus*, *R. icteronotus*, *R. dimidiatus*, *R. nigrogularis*, *R. carbo*) para Colombia (McMullan et al., 2011).

La especie *R. dimidiatus* (Lafresnaye, 1853) usualmente habita zonas húmedas en claros con matorrales, áreas cultivadas y bordes de selva desde el centro al norte de Colombia (Hilty & Brown, 2009), en un rango altitudinal hasta 2200m (McMullan et al., 2011). Machos y hembras poseen diferencias en el color del pico y plumaje; los machos presentan pico blanco plateado y plumaje rojo marrón a carmesí brillante con alas negras; entretanto las hembras tienen pico negruzco y plumaje más opaco en tonalidades de rojo (Olson & Violani, 1995; Hilty & Brown, 2009).

El taxa *R. icteronotus* (Lafresnaye, 1846) es uno de los más comunes en claros con maleza y bordes de selva con matorrales, históricamente distribuido por la costa pacífica desde Panamá, hasta el norte de Ecuador (Hilty & Brown, 2009), o Chocó biogeográfico (Morrone, 2014). Los machos se caracterizan por presentar pico azulado pálido y plumaje negro con rabadilla amarillo limón brillante; por su parte, las hembras evidencian la misma coloración del pico que los machos y su plumaje es café grisáceo en el dorso con rabadilla y partes inferiores amarillo pálido claro (Sibley, 1958; Hilty & Brown, 2009).

Actualmente en Colombia, *R. icteronotus* ha conseguido ampliar su distribución hasta el valle medio del río Magdalena, e igualmente establecer poblaciones en las zonas montañosas del departamento de Santander (Anexo A), en altitudes inferiores a los 1500m (McMullan et al., 2011; Obs. per). Además, esta especie coexiste con otras especies de su mismo género (*R. dimidiatus* y *R. flammigerus*) por la vertiente Pacífica y el valle geográfico del río Cauca

(McMullan et al., 2011), generando zonas de contacto secundario entre algunas ellas (Sibley, 1958), ocurriendo fenómenos de hibridación (Bedoya & Murillo, 2012; Morales-Rozo et al., 2014).

1.3. Microsatélites

Desde finales del siglo XX, los avances en técnicas de biología molecular han permitido ampliar los estudios dirigidos a genética de poblaciones, a partir de investigaciones enfocadas a la detección y medición de la variación genética (Schlötterer, 2004; Aranguren-Méndez et al., 2005).

Marcadores de tipo microsatélite también llamados *short tandem repeats* (STR's), son fragmentos de DNA con repeticiones en tándem de uno a seis pares de bases de longitud y se encuentran con una frecuencia alta en el genoma de la mayoría de organismos (Selkoe & Toonen, 2006). El tipo de STR (Mono-, di-, tri-, tetra-, penta- y hasta hexanucleotídico) va a ser definido por el número de nucleótidos en la secuencia repetida (fragmento) (Ellegren, 2004). Así, la longitud de la cadena de repetición de un locus STR es la encargada de determinar los diferentes tamaños de los alelos, la cual varía aproximadamente de cinco a 40 repeticiones (Li et al., 2002), aunque se ha llegado a detectar cadenas con un número mayor de repeticiones (Ellegren, 2004).

En sentido expuesto, los STR's son marcadores moleculares muy polimórficos, debido a que presentan altas tasas de mutación en comparación a las tasas de mutación en loci codificantes (Aranguren-Méndez et al., 2005). Estos, son considerados como marcadores selectivamente neutros, co-dominantes y con distribución al azar o casi al azar en el genoma (Li et al., 2002).

Los STR's evidencian un alto contenido de información y pueden evidenciar leves diferencias en la genealogía, como consecuencia de la recombinación, la selección y la deriva genética que actúan sobre el genoma de interés (Selkoe & Toonen, 2006). Por eso confiar en una sola región génica o en un solo locus STR, generará una alta tasa de error; para ello la mejor solución es aumentar el análisis a múltiples loci STR's, que proveerán datos (diferentes muestras del genoma) más robustos, para el posterior análisis genético a nivel individual y poblacional (Pearse & Crandall, 2004; Selkoe & Toonen, 2006).

Análisis genéticos a partir de STR's heterólogos ponen a prueba el uso de cebadores descritos para loci microsatélites en especies filogenéticamente cercanas (Juárez et al., 2010; Mejía et al., 2015), donde ha sido eficaz la amplificación cruzada entre especies debido a que las regiones flanqueantes de los cebadores son conservadas (Primmer et al., 2005; Canales-Aguirre et al., 2010).

1.4. Estudios de diversidad genética en *Ramphocelus*

Los estudios de diversidad genética en Aves del género *Ramphocelus* tienen como punto de partida la caracterización realizada por Sibley (1958), en la cual a partir de la cualificación de fenotipos a través de una zona de contacto entre especies del género, determinó que no hay una aparente barrera genética entre *R. flammigerus* y *R. icteronotus*, hipotetizando además que los individuos de coloración intermedia son híbridos.

ambién el análisis de relaciones filogenéticas y biogeográficas realizado por Hackett (1996) a partir de secuencias de los genes citocromo b (*Cyt b*) y NADH deshidrogenasa dos (ND2), generó información que contribuye a comprender la alta diferenciación genética entre dos

subespecies de *Ramphocelus passerinii* (*R. p. passerinii* y *R. p. costaricensis*) y, de los clados que se agrupaban a partir de las áreas de distribución de los taxa.

El primer reporte del uso de microsatélites en alguna especie del género fue dado a conocer por Krueger & Williams (2006), quienes aislaron seis loci STR's en *R. costaricensis* y probaron un STR heterólogo de *Ammodramus savannarum* (Bulgin et al., 2003). Dentro de los resultados obtenidos se destaca el hecho que todos los loci detectaron altos niveles de polimorfismo y heterocigosidad, lo cual ha sido útil al momento de realizar pruebas de paternidad en esta especie (Krueger et al., 2008).

Por su parte, Nogueira et al., (2014) utilizó ocho STR's heterólogos para estudiar la estructura genética presente en poblaciones de *R. bresilius*. Estos investigadores encontraron que una barrera de 2 km de océano restringe el flujo de genes entre poblaciones continentales e insulares de Rio de Janeiro (Brasil).

En Colombia, pocos estudios morfológicos y genéticos se han realizado en *Ramphocelus* y la gran mayoría han sido enfocados en especies endémicas que actualmente hibridan con especie hermanas. Es el caso de los estudios de Bedoya (2007) y Bedoya & Murillo (2012), quienes encontraron que individuos con coloración intermedia a la típica de *R. flammigerus* y *R. icteronotus*, presentaban una alta similitud en cuanto a forma y tamaño con los individuos simpátricos, apoyando un posible proceso de hibridación entre estas.

Pese a no ser estudios publicados en revistas indexadas, Ocampo (2008) y González (2009) adelantaron el primer esfuerzo dirigido a estudiar la estructura genética presente en las poblaciones simpátricas de *R. flammigerus* y *R. icteronotus*. En el estudio de Ocampo (2008), se consiguió genotipar tres loci STR's heterólogos encontrando altos niveles de polimorfismo en cada uno y altos índices de diversidad genética. Por su parte González (2009), logró secuenciar

un fragmento del gen *Cyt b* y genotipar dos STR's heterólogos y a partir de los resultados concluye que el tiempo de divergencia entre *R. flammigerus* y *R. icteronotus* no es el suficiente para generar mecanismos de aislamiento reproductivo.

Morales-Rozo et al., (2014) a partir de modelos de distribución histórica potencial basados en datos climáticos y señales genéticas obtenidas a partir de fragmentos secuenciados del gen *Cyt b*, sugirieron que las zonas híbridas de *R. flammigerus* y *R. icteronotus* se originaron después del contacto secundario a causa de una ampliación de distribución en el cuaternario, hecho corroborado por la no estructuración geográfica de la variación genética debido a una probable divergencia reciente de las poblaciones híbridas.

Precisamente el hecho de la ampliación de rango de *R. icteronotus*, hacía Santander y otras localidades de la cordillera oriental, motivó a los miembros del LGPC-UIS a realizar estudios genético poblacionales en esta especie y la reportada como residente de este género (*R. dimidiatus*). En el sentido expuesto, Carreño (2013) secuenció 1006 pares de base (pb) del gen *Cyt b* en ambas especies, los resultados evidencian la ausencia de haplotipos compartidos y de flujo génico restringido entre estas especies. En un estudio realizado en *R. icteronotus*, Archila (2014) secuenció dos dominios de la región control (D-loop) del DNA mitocondrial (mtDNA), concluyendo que no hay estructura genética poblacional, pero si diversidad genética típica de una especie en expansión.

Noriega (2015) y Cornejo (2016) realizaron una estandarización, en muestras de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*, de las condiciones de amplificación y visualización del polimorfismo de cuatro de los siete loci STR's reportados en el estudio de Krueger & Williams (2006), requerimiento necesario para el logro de los objetivos de la presente propuesta de trabajo de grado.

2. Materiales y métodos

2.1. Fase de campo

2.1.1. Área de estudio. El área de estudio incluyó seis localidades del departamento de Santander, ubicadas en la vertiente occidental de la Cordillera Oriental de los Andes colombianos. En cinco de estas coexisten en simpatría las especies bajo estudio, siendo: (1) Vereda El Aburrido (EA, 1132msnm), municipio de Bucaramanga; (2) Vereda La Colorada (ED, 1064msnm), municipio de San Vicente de Chucurí; (3) Vereda Los Helechales (LJ, 1818msnm), municipio de Floridablanca; (4) Vereda San Benito (SB, 902msnm), municipio de Rionegro; (5) Vereda San Bernardo la Cuchilla (LT, 966msnm), municipio de Lebrija. Adicionalmente, se incluyeron muestras de *R. dimidiatus* pertenecientes a la (6) Vereda Llano de Palmas (LP, 783msnm), municipio de Rionegro, donde no hubo indicios de simpatría de esta especie con *R. icteronotus* (Obs. per).

Dentro de las localidades, la matriz de vegetación estuvo compuesta principalmente por remanentes de bosque secundario y cultivos de cítricos (*Citrus sp.*), plátano (*Musa paradisiaca*), aguacate (*Persea americana*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y cacao (*Theobroma cacao*) (Carreño, 2013; Archila, 2014; Obs. per).

El muestreo se realizó en cada localidad a través de áreas cultivadas, claros y bordes de bosque con matorrales, a partir del uso de diez redes de niebla con extensiones de 9 y 12m, completando 12 horas (hrs) de muestreo por día (5:30-17:30 hrs).



Figura 1. Localidades de estudio. : localidades simpátricas de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*; : localidad alopátrica de *R. dimidiatus*; SB: San Benito; LP: Llano de palmas; EA: El Aburrido; LT: La Tagua; LJ: La Judía; ED: El Diviso.

2.1.2. Toma y almacenamiento de muestras. Se muestreó un total de 53 individuos para *R. dimidiatus* y 28 individuos para *R. icteronotus*. Luego de su captura, se extrajo 50 microlitros (μ l) de sangre de la vena braquial del ave, mediante el uso de jeringas desechables con agujas de 1 milímetro (mm) de espesor. La muestra de sangre fue almacenada en tubos vacutainer con 50 μ l de etanol absoluto y conservada a 4°C hasta su posterior uso en el Laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación de la Escuela de Biología en la Universidad Industrial de Santander (LGPC-UIS).

Cada tubo con muestra de sangre fue rotulado en el siguiente orden: (1) las dos iniciales del género, (2) las dos iniciales del epíteto específico y (3) el número consecutivo al orden de colecta del LGPC-UIS. Además, los individuos capturados fueron anillados en el tarso izquierdo, a fin de evitar replicas en el muestreo y mantener un control de seguimiento para futuros estudios.

2.2. Fase de laboratorio

Esta fase se realizó en dos complejos diferentes. Lo referente a extracción de DNA genómico, amplificación y visualización de productos de PCR se llevó a cabo en LGPC-UIS y, el genotipado de los productos de PCR se desarrolló en el Laboratorio de Biodiversidad y Evolución Molecular (LBEM) del Departamento de Biología General de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG) en Brasil.

2.2.1. Extracción de DNA genómico. La extracción de DNA genómico se hizo a partir de muestras de sangre previamente colectadas, mediante el uso del protocolo de extracción y purificación de DNA total con fenol cloroformo (Green & Sambrook, 2012). Igualmente, se efectuó la cuantificación de la concentración y pureza del DNA, para constatar la calidad de la extracción por espectrofotometría, a partir de la medición de absorbancias.

2.2.2. Estandarización del método de amplificación. La amplificación de los microsatélites heterólogos para las especies en estudio se hizo mediante el uso de los loci RcAAT11, RcAAT12, RcAAAG14, RcAAAG406, RcAAAG410, RcGT257 (Krueger & Williams, 2006) y Asp15 (Bulgin et al., 2003). En todos los casos se adicionó a la secuencia de algunos de los cebadores una cola M13 fluoromarcada (Oetting et al., 1995; Schuelke, 2000; Leal et al., 2014) (Anexo B), a objeto que el amplicon fuera reconocido por un analizador genético.

Las condiciones de amplificación por PCR se basaron según lo propuesto por Wu (2006), Noriega (2015) y Cornejo (2016), con las modificaciones necesarias para el LGPC-UIS. La PCR fue realizada en un termociclador ABI 2720 (Applied Biosystems), donde la concentración de los

reactivos para cada reacción consistió de 1X buffer, 1,5mM MgCl₂, 0,25mM dNTPs, 0,25μM cebador con cola para anclaje de M13, 0,75μM cebador sin cola, 0,3μM cebador M13-FAM fluoromarcado, 0,05 U/μL Taq Platinum (Thermo Fisher Scientific) y 40 ng/μl DNA total, para un volumen final de 10μL.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% y para su visualización se tiñeron con GelRed® (Biotium). El tamaño de los fragmentos amplificados fue comparado con un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Fisher Scientific).

2.2.3. Genotipado de amplicones. El genotipado de los productos amplificados se realizó en un analizador genético 3130xl (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial, mediante el uso de GeneScan™-500 LIZ® Size Standard y Hi-Di™ Formamide. Las reacciones de genotipado se llevaron a cabo en el LBEM-UFMG.

2.3. Análisis de datos

Los genotipos obtenidos fueron editados en GENEIOUS v10.0.2 (Kearse et al., 2012), revisados y ajustados en MICRO-CHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) con el fin de corregir los posibles errores de genotipado presentes, como: i) alelos nulos, ii) amplificación predominante de alelos pequeños (dropout) y iii) asignación alélica a bandas stutter.

Para todos los loci que exhibieron polimorfismo se estimaron las frecuencias alélicas, se evaluó la hipótesis de equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) y se calculó el índice de Garza-Williamson (M) para detectar reducciones poblacionales o posibles cuellos de botella, tal como

se encuentra implementado en ARLEQUIN v3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Mediante el uso de este mismo software, se efectuó el cálculo de los estimadores de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), así como el estadístico F de Wright: F_{IS} (coeficiente de endogamia), el R_{ST} (análogo al F_{ST} , parámetro de diferenciación genética), la estimación del porcentaje de variación en y entre cada una de las especies estudiadas por medio de AMOVA sugerido por Excoffier et al., (1992) y la evaluación de la hipótesis de aislamiento por distancia, a partir del test de mantel. Además, se realizaron comparaciones de la diversidad genética con muestras de *R. dimidiatus* que se encuentran por fuera de la zona de simpatria recolectadas en la localidad LP. En todos los loci se estimó el contenido de información polimórfica (PIC) con el programa MOLKIN v3.0 (Gutiérrez et al., 2005).

Finalmente, se agruparon los individuos y se asignaron probabilísticamente a grupos genéticos inferidos por una metodología Bayesiana con el uso del software STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2010); para esto, se evaluó el modelo de mezcla con K 1 a 10 poblaciones en 10 iteraciones cada una de 50.000 pasos de burn-in y 200.000 Cadenas de Markov Monte Carlo. De igual manera se estimó el mejor valor K (número de grupos genéticos) siguiendo el método implementado por Evanno et al., (2005), con el software STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt, 2012).

3. Resultados

3.1. Amplificación y genotipado de loci microsatélites

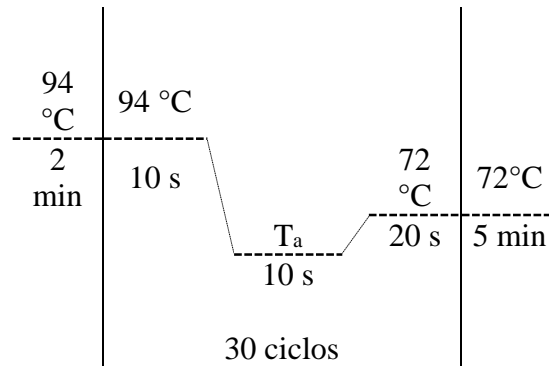
En la obtención de productos de PCR en muestras de las especies *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus*, se empleó la técnica de amplificación cruzada a partir del uso de los 14 cebadores diseñados e implementados en muestras de *R. costaricensis* por Krueger & Williams (2006). Las condiciones de amplificación por PCR teniendo en cuenta la adición de la cola M13, se basó según lo propuesto por Wu (2006), y la temperatura de hibridación de los loci RCAAAG410 y Asµ15, fueron las estandarizadas en los trabajos de grado de Noriega (2015) y Cornejo (2016), respectivamente, siguiendo las modificaciones propias del LGPC-UIS.

La estandarización de las concentraciones de los reactivos de PCR utilizados en la amplificación de los loci microsatélites heterólogos, mostró valores diferentes a los reportados por Krueger & Williams (2006) en las concentraciones de todos los reactivos usados, excepto el Buffer. También, se detectaron diferencias en las condiciones de amplificación para las temperaturas (T_a) y los tiempos de hibridación, principalmente (Figura 2, Tabla 1).

En las dos especies de estudio se amplificaron los siete loci microsatélites heterólogos. En todos los casos, las bandas presentaron una buena resolución (Anexo C). Pese a esto, únicamente se logró realizar la tipificación adecuada (asignación alélica) en seis de los loci (Anexo D). Los diferentes electroferogramas de amplicones del locus RcAAT12, mostraron de

forma constante patrones ilegibles que impidieron la adecuada asignación alélica de este y, por tanto, se excluyó al momento de realizar las estimaciones de diferentes parámetros.

A



B

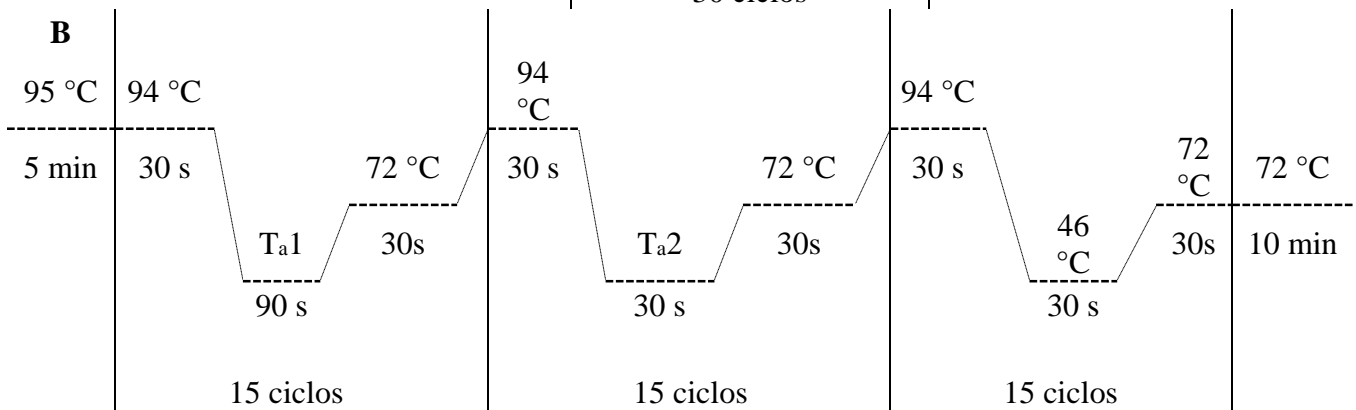


Figura 2. Condiciones de amplificación por PCR de loci microsatélites heterólogos en especies del género *Ramphocelus*. A. Krueger & Williams (2006); B. Presente trabajo. Ta: Temperatura de hibridación (annealing); Ta1: Temperatura de hibridación 1; Ta2: Temperatura de hibridación 2. min: Minutos; s: Segundos; °C: Grados centígrados.

Tabla 1. Temperaturas de hibridación empleadas en el esquema de amplificación de los loci microsatélites del presente estudio.

RcAAT11	60	56	54
RcAAT12	55	58	57
RcAAAG14	55	54	53
RcAAAG406	50	52	51
RcAAAG410	50	52	50 [†]
RcGT257	50	52	50
Asp15	55	53	52 [‡]

Ta: Temperatura de hibridación (annealing); Ta1: Temperatura de hibridación 1; Ta2: Temperatura de hibridación 2. †: Ta reportado por Noriega (2015). ‡: Ta reportado por Cornejo (2016).

En *R. dimidiatus* se observó un elevado número de alelos por cada locus tipificado, siendo el locus RCAAAG14 el más polimórfico (29 alelos) y el locus RCAAAG410 el menos polimórfico (11 alelos). Adicionalmente, los alelos privados en los seis loci genotipados están por encima del 44,8%, con una media del 56,4% (Tabla 2).

En *R. icteronotus* se observó una relación entre el rango alélico y el número de alelos, es decir, los loci con mayor número de alelos presentaron mayor rango alélico y los loci con menor número de alelos presentaron menor rango alélico. Se destaca también que, en promedio, esta especie mostró menor porcentaje de alelos privados comparada con *R. dimidiatus*; asimismo, *R. icteronotus* exhibió un porcentaje igual o superior al 75% de alelos compartidos con *R. dimidiatus* en todos los loci excepto RCAAAG410 (Tabla 2).

A partir del análisis realizado en MICRO-CHECKER, se encontró que para los loci considerados, *R. dimidiatus* evidenció el promedio más alto de alelos nulos. De igual manera, el locus RcGT257 fue el único que presentó alelos nulos en *R. icteronotus* y mostró altos porcentajes de estos en las dos especies de estudio (Tabla 2).

Tabla 2. Número de alelos por locus (\hat{A}), porcentaje (%) de alelos privados, compartidos y nulos y rango alélico (número de repeticiones) tipificado en *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus*.

Locus	\hat{A}	Alelos privados	Alelos compartidos	Alelos nulos*	Rango alélico
<i>Ramphocelus dimidiatus</i>					
RcAAT11	14	50,00	50,00	0	16
RCAAAG14	29	44,83	55,17	14,05	38
RCAAAG406	15	80,00	20,00	6,92	14
RCAAAG410	11	63,64	36,36	16,34	28
RcGT257	17	47,06	52,94	29,28	23
Asu15	19	52,63	47,37	1,70	24
Media	17,50	56,36	43,64	11,38	23,83
D.E.	6,25	13,31	13,31	10,91	8,68

Locus	\hat{A}	Alelos privados	Alelos compartidos	Alelos nulos*	Rango alélico
<i>Ramphocelus icteronotus</i>					
RcAAT11	8	12,50	87,50	0	8
RcAAAG14	20	20,00	80,00	0	40
RcAAAG406	4	25,00	75,00	0	6
RcAAAG410	8	50,00	50,00	0	10
RcGT257	10	10,00	90,00	39,83	20
Asu15	10	10,00	90,00	0	15
Media	10,00	21,25	78,75	6,64	16,50
D.E.	5,37	15,31	15,31	16,26	12,58

D.E.: Desviación estándar; *: En todos los casos el valor fue estimado siguiendo lo recomendado por Brookfield (1996).

3.2. Frecuencias alélicas y estimadores poblacionales

A partir de la asignación alélica realizada con base en el cálculo del número de repeticiones de los productos amplificados, se estimaron las frecuencias alélicas y diferentes parámetros poblacionales dependientes de estas, tanto para *R. dimidiatus* (Tabla 3) como para *R. icteronotus* (Tabla 4).

3.2.1 Locus RcAAT11. En *Ramphocelus dimidiatus* se detectaron 14 alelos siendo el más frecuente el de 15 repeticiones ($f=0,18868$) (Tabla 3), el cual no se tipificó en *R. icteronotus*, especie en la que se obtuvo ocho alelos, donde el de 11 repeticiones fue el más frecuente ($f=0,25000$) (Tabla 4). Adicionalmente, este locus se caracterizó por ser uno de los menos polimórficos para las especies bajo estudio.

En las dos especies este locus exhibió valores superiores al 84% de heterocigosidad esperada y observada, siendo mayor estos valores en *R. dimidiatus*. El test de HW para este locus, mostró en ambas especies, diferencias significativas por exceso de heterocigotos; complementado por

los valores positivos para cada especie del coeficiente de endogamia (F_{IS}), los cuales presentaron diferencias significativas. Por su parte, los valores estimados del parámetro M en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* (0,82353 y 0,88889, respectivamente) no soportan la idea de un cuello de botella reciente (Garza & Williamson, 2001) con base en este locus (Tablas 3 y 4).

3.2.2. Locus RCAAAG14. Para este locus en *R. dimidiatus* se encontraron 29 alelos, donde el más frecuente fue el de 36 repeticiones ($f=0,10377$) (Tabla 3); mientras que en *R. icteronotus* se detectaron 20 alelos siendo el de 30 repeticiones el más frecuente ($f=0,32143$) (Tabla 4). De todos los loci genotipados, este locus fue el más polimórfico y el que presentó el mayor número de alelos compartidos entre las dos especies de *Ramphocelus* (Tablas 3 y 4).

Precisamente estas especies mostraron para este locus, valores superiores al 70% de heterocigosidad esperada y observada, siendo mayor en *R. icteronotus* (>87%). El test de HW solo mostró diferencias significativas en *R. dimidiatus*, posiblemente por déficit de heterocigotos, a diferencia del posible exceso de heterocigotos presente en *R. icteronotus*. Lo anterior, corroborado por los valores positivos en *R. dimidiatus* y negativos en *R. icteronotus* del F_{IS} , el cual no presentó diferencias significativas en esta última. Por su parte el valor de $M=0,7436$ en *R. dimidiatus*, no soporta la idea de un cuello de botella reciente (Garza & Williamson, 2001) en esta especie, contrario a lo que ocurre en *R. icteronotus* ($M=0,4878$) (Tablas 3 y 4).

3.2.3. Locus RCAAAG406. Se tipificaron 15 alelos en *R. dimidiatus* y el más frecuente fue el de 17 repeticiones ($f=0,16038$) (Tabla 3), el cual no se encontró en *R. icteronotus*, especie en la que se hallaron cuatro alelos, incluido el de 12 repeticiones que fue el más frecuente ($f=0,50000$) (Tabla 4). Asimismo, este locus se distinguió por ser el menos polimórfico en *R. icteronotus* y

por presentar frecuencias superiores a 0,0566 en más del 65% de los alelos privados tipificados en *R. dimidiatus* (Tablas 3 y 4).

En las especies de estudio se evidenciaron valores iguales o superiores, para la heterocigosidad esperada y observada, al 80% en *R. dimidiatus* y al 65% en *R. icteronotus*. El test de HW no mostró diferencias significativas en ninguna de las especies, asimismo en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* se detectó déficit y exceso de heterocigotos, respectivamente, ratificado por los valores estimados del F_{IS} , los cuales no presentaron diferencias significativas. Adicionalmente, el valor de $M=1,0000$ en *R. dimidiatus* no sustenta la idea de un cuello de botella reciente (Garza & Williamson, 2001) en esta especie, lo que no sucede en *R. icteronotus* ($M=0,57143$) (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Frecuencias alélicas y parámetros poblacionales estimados a partir de seis loci microsatélites heterólogos en *Ramphocelus dimidiatus*.

Alelo	RcAAT11	RcAAAG14	RcAAAG406	RcAAAG410	RcGT257	Asu15
5					0,01887	
8	0,01887					
9				0,00943	0,15094	
10	0,01887				0,10377	
11	0,00943		0,01887		0,04717	
12	0,05660	0,00943	0,02830		0,04717	
13	0,04717	0,05660	0,04717		0,03774	
14	0,08491		0,04717		0,08491	
15	0,18868		0,02830	0,12264	0,03774	
16	0,15094		0,02830		0,02830	
17	0,11321		0,16038		0,03774	
18	0,17925		0,06604		0,01887	
19	0,07547	0,00943	0,08491	0,13208	0,01887	
20			0,11321	0,34906		
21	0,00943	0,05660	0,13208	0,05660		
22	0,02830	0,02830	0,06604			
23		0,02830	0,07547		0,00943	
24	0,01887	0,03774	0,05660		0,02830	0,00943

Alelo	RcAAT11	RcAAAG14	RcAAAG406	RcAAAG410	RcGT257	Asμ15
25		0,01887	0,02830		0,03774	
26		0,01887				
27		0,00943			0,00943	0,00943
28		0,01887			0,00943	
29		0,03774		0,02830		0,22642
30		0,02830		0,02830		0,01887
31		0,00943				0,01887
32		0,04717				0,11321
33		0,01887				0,02830
34				0,00943		0,07547
35		0,05660		0,02830		0,08491
36		0,10377		0,00943		0,02830
37		0,00943		0,04717		0,04717
38		0,02830				0,06604
39		0,04717				0,06604
40		0,04717				0,02830
41		0,06604				
42		0,02830				0,03774
43		0,02830				0,01887
44		0,00943				
45		0,01887				0,06604
46						0,04717
48						0,00943
49		0,01887				
50		0,01887				

Parámetros							Media	D.E.
Ho	0,88679	0,70213	0,80392	0,62162	0,65385	0,86792	0,75604	0,11254
He	0,88464	0,95962	0,91654	0,76771	0,90977	0,90889	0,89120	0,06523
HW	0,00029*	0,00000*	0,18594	0,00185*	0,00087*	0,24091	0,07164	0,11119
M	0,82353	0,74359	1,00000	0,37931	0,70833	0,76000	0,73579	0,20297
F _{IS}	0,53819*	0,27162*	0,22629	0,40090*	-0,07065	0,31158*	0,27966	0,20405
PIC	0,86410	0,94750	0,90060	0,73470	0,89010	0,89330	0,87172	0,07241

Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; HW: Valor de *p* prueba de Hardy-Weinberg; *M*: Índice Garza-Williamson; F_{IS}: Coeficiente de endogamia; PIC: Contenido de Información Polimórfica; D.E.: Desviación estándar; **p*<0,05.

Tabla 4. Frecuencias alélicas y parámetros poblacionales estimados a partir de seis loci microsatélites heterólogos en *Ramphocelus icteronotus*.

Alelo	RcAAT11	RcAAAG14	RcAAAG406	RcAAAG410	RcGT257	Asμ15
8					0,03571	
9	0,12500		0,05357		0,07143	
10	0,01786				0,19643	
11	0,25000				0,03571	
12	0,12500	0,01786	0,50000			
13	0,19643	0,01786			0,07143	
14	0,17857		0,16071		0,07143	
15		0,01786	0,28571	0,03571		
16	0,05357				0,03571	
17	0,05357			0,01786	0,03571	
18				0,07143		
19		0,01786		0,23214	0,03571	
20				0,26786		
21		0,03571		0,30357		
24				0,03571		0,03571
25		0,05357		0,03571		0,03571
26		0,01786				
28					0,01786	
29		0,03571				0,07143
30		0,32143				
31		0,08929				
32		0,05357				0,17857
33		0,01786				0,25000
34		0,03571				0,08929
35		0,08929				0,01786
36		0,07143				0,28571
37		0,01786				
38						0,01786
39						0,01786
40		0,01786				
41		0,01786				
51		0,03571				
52		0,01786				

Parámetros							Media	D.E.
Ho	0,85714	0,92857	0,75000	0,92857	0,50000	0,85714	0,80357	0,16249
He	0,84481	0,87727	0,65130	0,78701	0,86096	0,82208	0,80724	0,08264
HW	0,00045*	0,82578	0,92030	0,69278	0,00973*	0,84925	0,54972	0,42825
M	0,88889	0,48780	0,57143	0,72727	0,47619	0,62500	0,62943	0,15736
F _{IS}	0,44415*	-0,13055	-0,04912	0,01809	-0,19453	-0,06617	0,00365	0,22768
PIC	0,80760	0,85330	0,57970	0,73800	0,82020	0,78200	0,76347	0,09798

Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; HW: Valor de p prueba de Hardy-Weinberg; M : Índice Garza-Williamson; F_{IS} : Coeficiente de endogamia; PIC: Contenido de Información Polimórfica; D.E.: Desviación estándar; * $p < 0,05$.

3.2.4. Locus RcAAAG410. *R. dimidiatus* exhibió 11 alelos donde el más frecuente fue el de 20 repeticiones ($f=0,34906$) (Tabla 3) y en *R. icteronotus* se detectaron ocho alelos, donde el de 21 repeticiones fue el más frecuente ($f=0,30357$) (Tabla 4). Este locus se destacó por: i) ser el menos polimórfico en *R. dimidiatus*, ii) presentar los alelos más frecuentes de cada especie como compartidos y iii) tener frecuencias superiores a 0,12264 en el 75% de los alelos compartidos (Tablas 3 y 4).

En *R. dimidiatus* la heterocigosidad observada es baja (0,6216) comparada con la estimada para este parámetro en *R. icteronotus* (0,9286). El test HW solo mostró diferencias significativas en *R. dimidiatus*, quizá a causa del déficit de heterocigotos corroborado por el alto valor del F_{IS} (0,40090; $p < 0,05$); por el contrario, en *R. icteronotus* se evidenció exceso de heterocigotos ($F_{IS}=0,01809$; $p > 0,05$). El valor de $M=0,37931$ para este locus en *R. dimidiatus*, soporta la idea de un cuello de botella reciente (Garza & Williamson, 2001) en esta especie, aspecto que no ocurre con *R. icteronotus* ($M=0,72727$) (Tablas 3 y 4).

3.2.5. Locus RcGT257. Para este locus en *R. dimidiatus* se obtuvo 17 alelos, en los que el más frecuente fue el de nueve repeticiones ($f=0,15094$) (Tabla 3). A su vez, *R. icteronotus*

mostró 10 alelos, todos compartidos excepto el de ocho repeticiones, donde el de 10 repeticiones es el más frecuente ($f=0,19643$) (Tabla 4).

Para el locus RcGT257, las especies estudiadas exhibieron $H_o < 0,66$ y $H_e > 0,86$. Por su parte el test HW evidenció diferencias significativas, probablemente a causa del alto porcentaje de alelos nulos que presentó este locus en las dos especies de *Ramphocelus*; precisamente en estas, el coeficiente de endogamia estimado fue negativo y no mostró diferencias significativas. En *R. dimidiatus* el estimado de $M=0,70833$, no sustenta la idea de un cuello de botella reciente (Garza & Williamson, 2001) en esta especie, mientras que el estimado en *R. icteronotus* ($M=0,47619$) si lo sugiere (Tablas 3 y 4).

3.2.6. Locus Asp15. En la especie *R. dimidiatus* se hallaron 19 alelos, siendo el más frecuente el de 29 repeticiones ($f=0,22642$) (Tabla 3). Por su parte, en *R. icteronotus* se encontraron 10 alelos, de los cuales el de 36 repeticiones fue el más frecuente ($f=0,28571$) (Tabla 4). En las dos especies, este locus se distinguió por ser el segundo más polimórfico de los seis loci trabajados, donde los alelos más frecuentes se localizaron dentro de los compartidos en los que más de la mitad exhibieron $f > 0,06604$ (Tablas 3 y 4).

Las especies de *Ramphocelus* estudiadas mostraron para este locus valores de H_o y $H_e > 0,82$. El test de HW no mostró diferencias significativas en ninguna de las dos especies; no obstante, se evidenció diferencias en torno al F_{IS} en *R. dimidiatus*. Asimismo, el valor de $M=0,62500$ en *R. icteronotus*, sostiene la idea de un cuello de botella reciente (Garza & Williamson, 2001) en esta especie, aspecto que no se evidencia en *R. dimidiatus* ($M=0,76000$) (Tablas 3 y 4).

En general, con base en los seis loci heterólogos tipificados en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*, se evidenció que:

A. La diversidad genética promedio en las dos especies es alta ($\hat{H}_o > 0,756 \pm 0,113$ y $\hat{H}_e > 0,807 \pm 0,083$) y no presenta diferencias significativas entre ellas (Tablas 3 y 4). *R. dimidiatus* exhibe la mayor diversidad genética promedio ($\hat{H}_e = 0,898 \pm 0,062$) en la zona de simpatría (datos no mostrados), con lo cual se desvirtúa la hipótesis nula.

B. La diversidad genética (H_e) en *R. icteronotus* disminuye a medida que aumenta la altitud de las localidades donde las dos especies de *Ramphocelus* coexisten, aspecto que no se evidencia en *R. dimidiatus* donde el patrón sugiere un comportamiento bimodal (Figura 3).

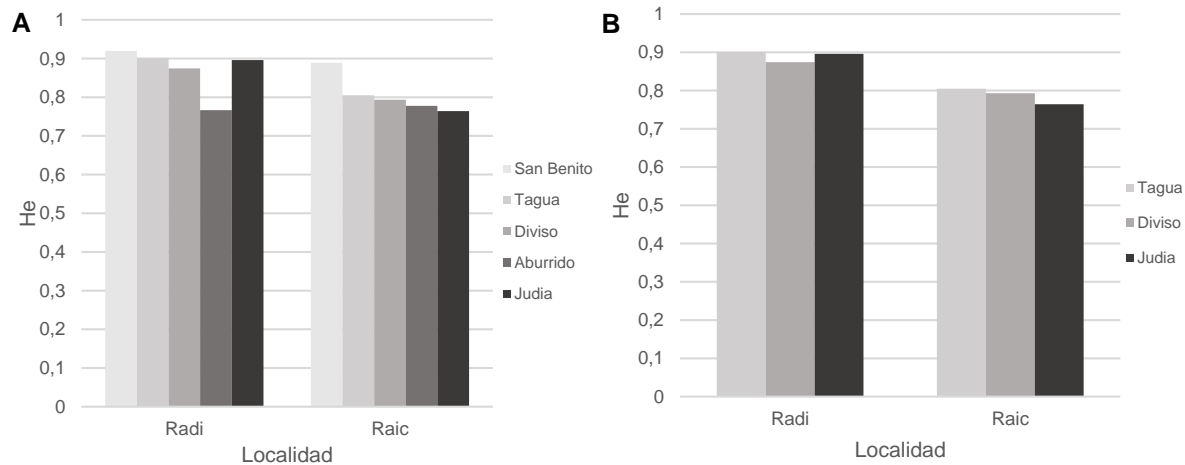


Figura 3. Heterocigocidad esperada (H_e) vs altitud de localidades simpátricas donde coexisten *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* en el departamento de Santander. A. Todas las localidades simpátricas; B. Localidades mayormente representadas; Para todos los casos, en cada grupo de barras por especie, la altitud por localidad aumenta de izquierda a derecha; Radi: *Ramphocelus dimidiatus*; Raic: *Ramphocelus icteronotus*.

C. Entre las dos especies de estudio, la endogamia promedio más alta se apreció en *R. dimidiatus* cuando se consideraron: i) todas las localidades dentro de la misma unidad genético reproductiva ($F_{IS} = 0,279$; $p > 0,05$) (Tabla 3) y ii) únicamente las localidades de la zona de simpatría ($F_{IS} = 0,206$; $p < 0,05$) (datos no mostrados).

D. No ha ocurrido eventos que generen una disminución drástica del tamaño poblacional en *R. dimidiatus* ($M=0,73579$), comparado con lo detectado en *R. icteronotus* ($M=0,62943$) (Tablas 3 y 4).

E. Todos los loci estudiados son altamente informativos ($PIC>0,5$) (Botstein et al., 1980) en las dos especies de *Ramphocelus* consideradas (Tablas 3 y 4).

F. *Ramphocelus dimidiatus* en las localidades de simpatria presenta mayores valores de H_e comparado con *R. icteronotus*, excepto en la localidad El Aburrido (EA), y el valor de H_e de *R. dimidiatus* en la localidad no simpátrica (LP), hace parte del rango en el que se distribuye dicho parámetro en las localidades simpátricas ($0,76407>H_e<0,91958$) de ambas especies; mientras que la heterocigosidad observada en dicha localidad exhibe el menor valor estimado ($H_o=0,60000\pm 0,30459$) de este parámetro entre todos los sitios muestreados para las dos especies de *Ramphocelus* consideradas (Tabla 5).

Tabla 5. Estimadores de diversidad genética (H_o y H_e) y coeficiente de endogamia (F_{IS}) por localidad en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*.

Localidad	H_o	H_e	F_{IS}
<i>Ramphocelus dimidiatus</i>			
ED	$0,79234 \pm 0,07237$	$0,87445 \pm 0,07760$	0,12760
LT	$0,74282 \pm 0,16060$	$0,90051 \pm 0,05577$	0,18751
LJ	$0,75218 \pm 0,20990$	$0,8961 \pm 0,048210$	0,29791
EA	$0,80000 \pm 0,44721$	$0,76667 \pm 0,14907$	0,35789
SB	$0,90000 \pm 0,16733$	$0,91958 \pm 0,03458$	0,47114*
LP	$0,60000 \pm 0,30459$	$0,80261 \pm 0,09057$	0,06418
<i>Ramphocelus icteronotus</i>			
ED	$0,69444 \pm 0,36004$	$0,79329 \pm 0,14669$	-0,23250
LT	$0,75000 \pm 0,37639$	$0,80483 \pm 0,06320$	0,27936
LJ	$0,86111 \pm 0,12546$	$0,76407 \pm 0,07174$	-0,09685
EA	$1,00000 \pm 0,00000$	$0,77778 \pm 0,13608$	-1,18660
SB	$0,83333 \pm 0,25820$	$0,88889 \pm 0,08607$	-0,09756

Para todos los casos ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; EA: El Aburrido; SB: San Benito; LP: Llano de Palmas; * $p<0,05$.

G. El coeficiente de endogamia entre las localidades simpátricas mostró valores $F_{IS} > 0,1276$ en *R. dimidiatus* y $F_{IS} < -0,0968$ en *R. icteronotus*; pese a esto en La Tagua esta especie presentó el mayor coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0,279$), mientras que, en Llano de Palmas, *R. dimidiatus* exhibió el menor valor de F_{IS} de esta especie (Tabla 5).

3.3. Flujo y estructura genética

El AMOVA y las estimaciones de flujo génico se realizaron considerando los genotipos y las frecuencias alélicas de cinco loci microsatélites genotipados en las dos especies de estudio. Se excluyó la información del locus RcGT257 debido a los altos porcentajes de alelos nulos exhibidos por este locus STR. Adicionalmente, con el fin de conocer el grado de estructura genética presente en las poblaciones, se evaluaron diferentes hipótesis de agrupamiento, en las cuales se consideró que *R. dimidiatus* se encuentra en localidades no simpátricas y simpátricas con *R. icteronotus* en el departamento de Santander. Para este análisis se contempló el hecho de evaluar las distintas hipótesis, teniendo en cuenta los cinco loci considerados en la AMOVA y los seis loci tipificados en el estudio.

Con base en lo anterior, se evidenció un bajo valor del estimador de diferenciación genética en *R. dimidiatus* en las localidades de simpatría ($R_{ST} = 0,03513$) y cuando se incluyó la localidad no simpátrica ($R_{ST} = 0,05918$). Este resultado indica que *R. dimidiatus* se comporta como una única unidad genética en las localidades donde se realizó el muestreo. Por su parte, *R. icteronotus* mostró un mayor grado de diferenciación genética, dado por el valor $R_{ST} = 0,08556$, comparado con *R. dimidiatus* (Tabla 6).

Tabla 6. Valores estimados del índice de diferenciación genética R_{ST} a partir de diferentes hipótesis de agrupamiento de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*.

Hipótesis de agrupamiento	R_{ST} (5 loci)	R_{ST} (6 loci)
1. Radi-simp	0,03513	0,03366
2. Radi-simp+LP	0,05918	0,06178
3. Raic-simp	0,08556	0,07610
4. Radi-simp vs Raic-simp	0,19507*	0,17948*
5. Radi-simp+LP vs Raic-simp	0,19692*	0,17947*

Radi: *Ramphocelus dimidiatus*; *Raic*: *Ramphocelus icteronotus*; simp: Simpatria (incluye las localidades: El Diviso, La Tagua y La Judía); LP: Llano de palmas (localidad no simpátrica); * $p < 0,05$.

Por su parte, el Análisis Molecular de Varianza basado en las medias de las varianzas del número de repeticiones al cuadrado (R_{ST}), mostró que el 65,85% de la variación se encuentra dentro de los individuos y que la variación entre las dos especies es del 19,69% (datos no mostrados). Asimismo, se calculó un $R_{ST}=0,197$ ($p < 0,05$), lo cual es indicativo de la alta diferenciación genética (Slatkin, 1995; Hartl & Clark, 2007) presente entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* (Tabla 6).

Este resultado se corrobora con lo hallado en un análisis basado en inferencia bayesiana a partir de los genotipos individuales, realizado en el software STRUCTURE, el cual muestra dos grupos genéticamente distinguibles ($K=2$) que corresponden a cada especie considerada en el estudio (Figura 4A), soportado por el estadístico *ad hoc* “ ΔK ” (Figura 4B) estimado a partir de lo propuesto por Evanno et al., (2005).

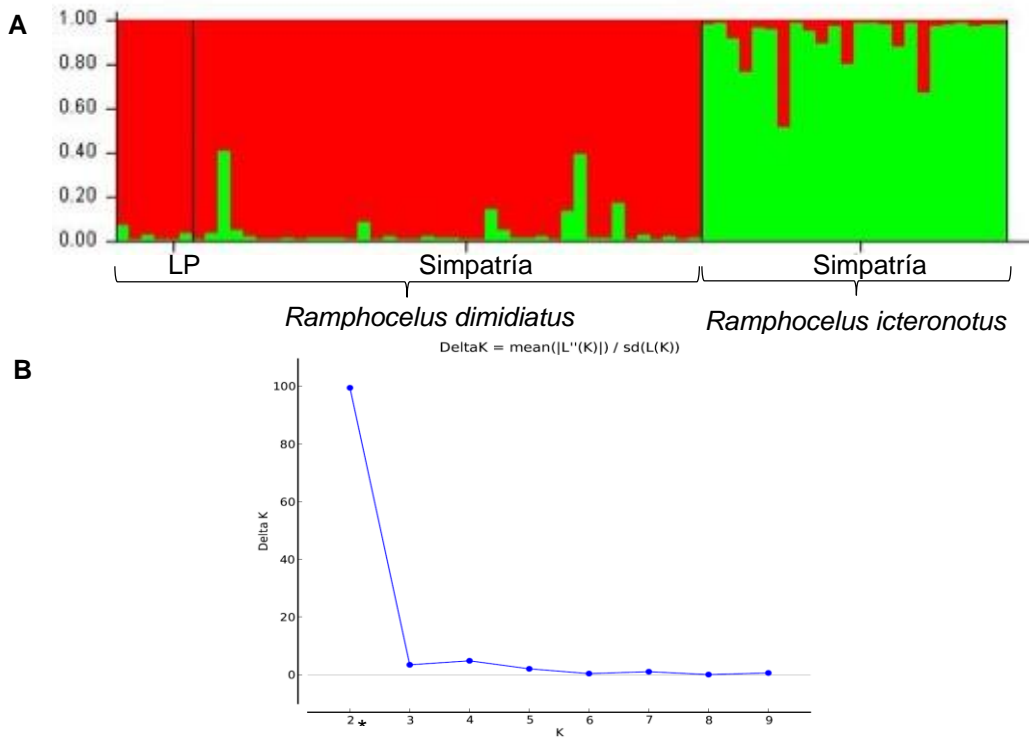


Figura 4. Estructura genética en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* a partir de cinco loci STR's heterólogos. A. Estructura poblacional (K=2); LP: Llano de palmas (localidad no simpátrica en *R. dimidiatus*). B. ΔK calculado a partir del método de Evanno et al., (2005). El mayor valor de la gráfica corresponde al mejor K^* , en este caso 2 grupos genéticos.

En la Figura 4A, cada individuo está representado por una delgada línea vertical que se divide en varios segmentos de colores. Estos segmentos representan la fracción estimada de que un individuo pertenezca a uno de los diferentes grupos K. El mejor K se estimó a partir del método propuesto por Evanno et al., (2005), estadístico basado en la tasa de cambio en la probabilidad logarítmica de los datos entre sucesivos valores de K. En este caso, el mejor K corresponde al valor modal o más alto mostrado en la Figura 4B (K=2; $\Delta K=99,48417$). La probabilidad de asignación para cada población predefinida en el número de grupos genéticos (K=2), es $p=0,97$ y $p=0,95$ para *R. dimidiatus* en LP y en las localidades de simpatría, respectivamente (color rojo, Fig. 4A), mientras que en *R. icteronotus* $p=0,924$ (color verde, Fig. 4A).

El análisis pareado de distancias genéticas basadas en R_{ST} (Slatkin, 1995), cuando se consideraron las localidades donde las dos especies se encuentran en simpatría, exhibió los valores más bajos de diferenciación poblacional en las parejas LJ – LT ($R_{ST}=-0,03786$) para *R. dimidiatus*, y LJ – ED ($R_{ST}=0,04254$) en *R. icteronotus* (Tabla 7). Estos resultados se corroboran con los más altos valores de la tasa efectiva de migrantes por generación (N_m), estimados en estas parejas de localidades para cada especie (Tabla 7). Por otro lado, los valores pareados de R_{ST} donde se incluye las muestras de *R. dimidiatus* de la localidad de no simpatría, denotan un mayor grado de diferenciación genética con las muestras poblacionales de las dos especies consideradas, excepto la pareja *Radi*-LP – *Radi*-LT ($R_{ST}=0,027$) (Tabla 7).

El análisis entre especies, mostró que todas las parejas presentan diferencias significativas ($p<0,05$) de los valores pareados de R_{ST} , además de evidenciar alta diferenciación genética (Slatkin, 1995), presente entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*, corroborada con bajos valores de N_m . Sin embargo, este parámetro se estableció entre uno (1) a cerca de tres (3) individuos migrantes efectivos por generación, en las parejas simpátricas de La Judía y El Diviso, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Distancias genéticas basadas en R_{ST} y Número efectivo de migrantes por generación (N_m) por parejas de localidades en *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* a partir de cinco loci microsatélites.

	<i>Radi</i> -LP	<i>Radi</i> -ED	<i>Radi</i> -LT	<i>Radi</i> -LJ	<i>Raic</i> -ED	<i>Raic</i> -LT	<i>Raic</i> -LJ
<i>Radi</i> -LP	-	2,08588	17,87262	4,47574	0,67299	1,27473	0,61304
<i>Radi</i> -ED	0,19336*	-	6,20510	10,95683	2,78402	2,03773	2,18799
<i>Radi</i> -LT	0,02721	0,07457*	-	inf	1,51162	2,55205	1,47498
<i>Radi</i> -LJ	0,10049	0,04364	-0,03786	-	1,44565	1,81702	1,00741
<i>Raic</i> -ED	0,42626*	0,15225*	0,24856*	0,25698*	-	4,41393	11,25313
<i>Raic</i> -LT	0,28173*	0,19703*	0,16382*	0,21579*	0,10175	-	6,26120
<i>Raic</i> -LJ	0,44922*	0,18601*	0,25317*	0,33169*	0,04254	0,07395	-

Debajo de la diagonal: Índice de diferenciación poblacional (R_{ST}); Encima de la diagonal: Número efectivo de migrantes (N_m); *Radi*: *Ramphocelus dimidiatus*; *Raic*: *Ramphocelus icteronotus*; LP: Llano de palmas (localidad no simpátrica); ED: El Diviso; LT: La Tagua; LJ: La Judía; * $p<0,05$.

Adicionalmente, se evaluó la hipótesis de aislamiento por distancia para las dos especies de *Ramphocelus* estudiadas, a partir de un test de mantel como lo propone (Excoffier & Lischer, 2010). Este test se realizó en las localidades simpátricas de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*, y entre las simpátricas y no simpátricas de esta última. En general, para cada especie en las localidades simpátricas se evidenció correlación positiva, siendo más fuerte la proximidad geográfica con la genética (Smouse et al., 1986) en *R. icteronotus* que en *R. dimidiatus* incluido el agrupamiento con la localidad no simpátrica (Tabla 8).

Tabla 8. *Valores estimados de coeficientes del test de mantel y su significancia.*

Agrupamiento	rho (<i>r</i>)	R ²	<i>p</i>
<i>Radi-simp</i>	0,59311	0,35178	0,16741
<i>Radi-simp+LP</i>	0,55288	0,30568	0,10842
<i>Raic-simp</i>	0,70235	0,49330	0,08382

Rho (*r*): Coeficiente de correlación; R²: Coeficiente de determinación; *p*: significancia estadística; *Radi*: *Ramphocelus dimidiatus*; *Raic*: *Ramphocelus icteronotus*; simp: Simpatría; LP: Llano de palmas (localidad no simpátrica).

4. Discusión

4.1. Estandarización de loci microsatélites heterólogos y asignación alélica

Krueger & Williams (2006) reportaron el diseño de seis loci microsatélites a partir de *Ramphocelus costaricensis* y recomendaron el uso de esos loci para evaluar la diversidad genética de diferentes especies, principalmente de Thraupidae. En LGPC-UIS se estandarizaron cuatro de los loci utilizados en *R. costaricensis* (Noriega, 2015; Cornejo, 2016), pese a ser un

avance importante, el presente estudio incluyó la adición de una cola M13 fluoromarcada en alguno de los dos cebadores de todos los loci STR's (Anexo B), con el objetivo de detectar el grado de polimorfismo presente en muestras de *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*, y así estimar la diversidad genética y evaluar el grado de estructura en localidades simpátricas de estas especies en el departamento de Santander, Colombia.

La adición de la cola M13 fluoromarcada, generó variaciones en las condiciones de amplificación y los tiempos de ciclado reportados por Krueger & Williams (2006) para cada loci y para los loci RcAAAG410 y Asp15 descritos por Noriega (2015) y Cornejo (2016), respectivamente (Figura 2, Tabla 1). La estandarización fue necesaria dado que las condiciones descritas en la literatura, generan bandas inespecíficas que dificultan analizar el polimorfismo de los loci STR's, lo cual puede conducir a alguno de los tres tipos de errores de genotipado: i) presencia de alelos nulos, ii) asignación alélica de bandas Stutter y iii) preferencia de amplificación de alelos pequeños (Dewoody et al., 2006).

La amplificación de los loci microsatélites en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus* mostró un alto grado de polimorfismo (Botstein et al., 1980; Mateescu et al., 2005) en ellos; lo cual permite inferir que las regiones flanqueantes de los cebadores son conservadas (Primmer et al., 2005; Canales-Aguirre et al., 2010) a nivel de género para los loci aislados en *R. costaricensis*, y a nivel de orden para el locus de *Ammodramus savannarum*, implementados por Krueger & Williams (2006). Los resultados obtenidos evidenciaron patrones ilegibles en los electroferogramas generados a partir de los amplicones del locus RcAAT12 (Anexo C); por lo que se determinó excluirlo en la estimación de los parámetros genético-poblacionales.

Ocampo (2008) y González (2009) utilizaron los loci microsatélites RcAAT11, RCAAAG14, Asp15 y RcAAAG406, RcAAAG410, respectivamente, para evaluar la diversidad genética en

muestras poblacionales de *R. flammigerus* y *R. icteronotus* de la Cordillera Occidental y el Pacífico Colombiano. Los resultados obtenidos por estos investigadores no son comparables con los del presente estudio, debido a que su método de asignación alélica consistió en el uso de imágenes digitalizadas de geles de poliacrilamida; a diferencia de este trabajo, en donde se realizó electroforesis capilar en un analizador genético y posterior análisis de los electroferogramas con el software GENEIOUS, incrementándose la sensibilidad, especificidad y precisión de la asignación alélica, aspectos que según Fitarelli-Kiehl et al., (2016) pueden variar en dependencia del método de tipificación que se utilice.

Pese a lo descrito anteriormente, el número de alelos por locus (\hat{A}) reportados en tres de los loci estudiados en *R. icteronotus* por Ocampo (2008) y González (2009), presentan un mayor número de alelos en los loci RcAAT11 (16 alelos), As μ 15 (17 alelos) y RcAAAG406 (seis alelos). En estos loci \hat{A} fue menor en muestras poblacionales de la misma especie del departamento de Santander, posiblemente a causa de la distribución histórica de *R. icteronotus* en la costa pacífica desde Panamá hasta el norte de Ecuador (Hilty & Brown, 1986), o Chocó biogeográfico (Morrone, 2014), donde se esperaría encontrar la mayor diversidad alélica de esta especie. Adicional a esto, se tiene evidencia molecular que *R. icteronotus* continúa expandiéndose (Morales-Rozo et al., 2014) hacia la Cordillera Oriental (Carreño, 2013; Archila, 2014; Vargas, 2017).

En cuanto al porcentaje de alelos privados, este fue mayor en *R. dimidiatus* mientras que en *R. icteronotus* fue mayor el porcentaje de alelos compartidos (Tabla 2). Esto puede deberse a que el tamaño muestral (N) de cada especie fue diferente (Kalinowski, 2004), dado que *R. dimidiatus* (especie residente) (Noriega, 2015; Cornejo, 2016) se encuentra mejor representada que *R. icteronotus*, pues esta última a causa de su expansión en el rango distribucional puede manifestar

bajos efectivos poblacionales (Carreño, 2013) en las localidades muestreadas. Dicha relación en los porcentajes de alelos no debería cambiar sustancialmente, si se implementan métodos de ajuste para tamaños de muestra desigual (Leberg, 2002), como la rarefacción, debido a que la frecuencia promedio de los alelos privados en *R. dimidiatus* ($f=0,04187$) indica que estos alelos posiblemente llevan cierto tiempo en la población y, por tanto, algunos de ellos podrían llegar a identificarla (Arbeláez, 2003). Es importante aclarar que, aunque en un locus el valor de alelos privados o compartidos sea el mismo para las dos especies, no significa que este vaya a tener la misma relación en cada una, dado que el porcentaje va estar en dependencia de \hat{A} por especie (Leberg, 2002).

Con el propósito de obtener genotipos consistentes en cada individuo muestreado, corregir los posibles errores de genotipado y disminuir asignaciones alélicas a bandas stutter (Dewoody et al., 2006), se reamplificaron la mayoría de muestras de *Ramphocelus* utilizadas en esta investigación; para esto se incluyeron todas las muestras de individuos homocigotos (independiente del tamaño del alelo) para mitigar la preferencia de amplificación de alelos pequeños (Björklund, 2005) y también, se ajustaron las frecuencias alélicas (asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg) en los loci que presentaron alelos nulos, a través del método propuesto por Brookfield (1996), en el software MICRO-CHECKER.

4.2. Diversidad genética y parámetros poblacionales en *R. Dimidiatus* y *R. icteronotus*

Los índices de diversidad genética se estimaron considerando la información generada a partir de seis loci tipificados (Anexo D), a saber: RcAAT11, RCAAAG14, RCAAAG406, RCAAAG410, RcGT257, As μ 15, y contemplando las frecuencias alélicas ajustadas para aquellos que

evidenciaban altos niveles de alelos nulos (Brookfield, 1996). El no tener en cuenta el efecto de alguno de los tres tipos de errores de genotipado (anteriormente mencionados), puede resultar en malas interpretaciones de los datos al evaluar hipótesis ecológicas, evolutivas (Dewoody et al., 2006) y genético-poblacionales.

En estudios de esta naturaleza, es importante contar con loci STR's altamente informativos, aspecto que se evidenció en todos los loci estudiados para las dos especies de *Ramphocelus* consideradas, cuando se evaluó el contenido de información polimórfica (PIC) de cada STR (Botstein et al., 1980). Según estos investigadores valores de $PIC > 0,5$ de un STR particular, deben considerarse como altamente informativos. El valor estimado de PIC del locus RcAAAG406 (Tabla 4) en *R. icteronotus*, sería razonablemente informativo bajo la propuesta de Mateescu et al., (2005). Los resultados muestran valores de PIC mayores en *R. dimidiatus* comparado con *R. icteronotus* (Tablas 3 y 4).

Ramphocelus dimidiatus presentó cuatro loci por fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), posiblemente por déficit de heterocigotos, corroborado por el valor del coeficiente de endogamia ($F_{IS} > 0,27$) en tres de estos loci (Tabla 3). El locus RcGT257 evidencia déficit de heterocigotos, pese al valor negativo estimado del coeficiente de endogamia ($F_{IS} = -0,07065$); este hecho se puede sustentar en el alto porcentaje de alelos nulos evidenciados para este locus, dado que dichos alelos al no generar un producto visible (Dakin & Avise, 2004), sobreestiman las frecuencias alélicas y disminuyen la heterocigosidad observada (Dewoody et al., 2006). Sin embargo, el ajuste realizado a las frecuencias alélicas de este locus, exhibe una reducción en el valor de F_{IS} estimado para este locus.

En *R. dimidiatus* la presencia de alelos nulos afecta, principalmente, la estimación de F_{IS} . Un análisis adicional en el que se excluyó este locus, mostró que $F_{IS} = 0,34972$ en promedio (datos no

mostrados). Estos resultados indican que en esta especie el nivel de endogamia incrementa como consecuencia de la ocurrencia de apareamientos preferenciales entre individuos emparentados o con genotipos idénticos. A largo plazo, este tipo de apareamientos causarían pérdida importante de la diversidad genética (Jamieson, 2011), afectando la integridad y el fitness de la población (Frankham et al., 2002). Adicionalmente, Ocampo (2008) evidenció un patrón similar, al detectado para *R. dimidiatus*, atribuible a la estructura social de la especie *R. flammigerus* descrito por Bedoya (2007).

Por su parte, *R. icteronotus* mostró dos loci por fuera de HWE, siendo el locus RcGT257 el único que presentó alelos nulos (Tabla 2), y déficit de heterocigotos (Tabla 4). En esta especie la presencia de alelos nulos afecta negativamente la heterocigosidad observada promedio ($\hat{H}_o=0,80357$), debido a que en todos los loci (excepto RcGT257) fue evidente un exceso de heterocigotos; soportado por el coeficiente de endogamia. Un análisis adicional en el que se excluyó el locus RcGT257, estimó que $\hat{H}_o=0,86429$ (datos no mostrados). El exceso de heterocigotos es característico de poblaciones que evidencian procesos de selección a favor de individuos heterocigotos (Hartl & Clark, 2007). La estructura social de esta especie, se basa en que los machos cuando alcanzan la etapa de madurez, generalmente se marchan de su núcleo familiar y buscan pareja en otras localidades (Bedoya, 2007), lo que favorece la mezcla con individuos genéticamente no emparentados, incrementando la variabilidad genética de la especie (Lockwood et al., 2005; Suh et al., 2014).

En las dos especies estudiadas de *Ramphocelus* se encontró que hay equilibrio HW pese a la existencia de loci por fuera del mismo. Las desviaciones de HWE encontradas pueden deberse principalmente a: i) errores de genotipado por el aparente exceso de genotipos homocigotos que varían las frecuencias alélicas y simulan tener un déficit de heterocigotos (Morin et al., 2009); ii)

un posible efecto Wahlund sumado a los errores de genotipado, que genera una reducción en la heterocigosidad causada por subestructuración poblacional (Karlsson & Mork, 2005) y iii) elevados niveles de endogamia (Van Oosterhout et al., 2006). Adicionalmente, otros factores que pueden influir en las desviaciones de HWE son los apareamientos aleatorios entre los individuos, errores de muestreo y distorsiones en la contribución de gametos en la progenie (Hammond et al., 1994).

En cuanto a los errores de genotipado, estos se relacionan con modificaciones en los sitios de anclaje de los cebadores, lo cual provocaría un fallo de amplificación en algunos alelos en particular (Dakin & Avise, 2004; Van Oosterhout et al., 2006). Lo anterior puede deberse a la cercanía filogenética que tienen las especies bajo estudio con *R. costaricensis*, especie de la cual se aislaron seis de los loci STR's (Krueger & Williams, 2006). En este sentido, *R. dimidiatus* se encuentra filogenéticamente más alejada que *R. icteronotus* de *R. costaricensis* (Burns et al., 2016).

La reducción del tamaño poblacional puede ser interpretada a partir del parámetro M propuesto por Garza & Williamson (2001). Estos investigadores reportan que valores de $M < 0,7$, evidencian reducción en el tamaño censal de las poblacionales consideradas y lo contrario ocurre cuando $M > 0,82$. En el sentido expuesto los resultados evidencian reducción poblacional ($M = 0,62943$) en *R. icteronotus*, comparada con *R. dimidiatus* ($M = 0,73579$).

Lo anterior se sustenta en la distribución histórica de cada especie (Hilty & Brown, 1986), mientras *R. dimidiatus* es residente en el departamento de Santander, con poblaciones distribuidas desde el centro al norte de Colombia (McMullan et al., 2011), por su parte *R. icteronotus* ha ampliado su rango de distribución hasta el valle medio del río Magdalena y las zonas montañosas del departamento de Santander (McMullan et al., 2011). Adicionalmente, de

una especie residente se esperarían tamaños poblacionales grandes en su rango de distribución, contrario a una especie en expansión, la cual presentará tamaños poblacionales reducidos (De Jong et al., 2011; De la Rosa, 2012) con afectación de la diversidad genética.

Por otro lado en todas las localidades, excepto El Aburrido (EA), *R. dimidiatus* mostró déficit de heterocigotos debido, posiblemente, al bajo tamaño muestral en algunas localidades y a otros aspectos relacionados con su estructura social, la presencia de alelos nulos, el nivel de endogamia detectado en esta especie y al efecto Wahlund; dado que las localidades analizadas no componen el total de los individuos de la población y, por tanto, esa información faltante puede conllevar a reducir la heterocigosidad, a causa de la estructura de las subpoblaciones (Dharmarajan et al., 2013).

El comportamiento de H_o y F_{IS} en la zona de simpatría, puede deberse a la actual coexistencia de las dos especies de *Ramphocelus* en la misma, dado que la expansión geográfica de *R. icteronotus*, pudo influir en la estructura social de la especie residente, causando mayores niveles de endogamia (Grant & Grant, 2009)

en ella. El referido comportamiento de H_o y F_{IS} , no se manifiesta en la localidad no simpátrica (LP) donde se encontró *R. dimidiatus* (Tabla 5). Por su parte *R. icteronotus* presentó valores negativos de F_{IS} en la mayoría de las localidades simpátricas (Tabla 5); este exceso de heterocigotos se puede deber a la proporción desigual del número de individuos de cada sexo (Fontdevila & Moya, 1999), el cual puede tener influencia en la estructura social de la especie (por lo general hay menos machos que hembras en los grupos observados; Obs. per); así como a un posible flujo de migrantes que genere heterogamia (Hartl & Clark, 2007) y favorezca, como ya se indicó, la mezcla con individuos genéticamente no emparentados (Suh et al., 2014).

En general se encontró, a partir de los seis loci STR's heterólogos descritos anteriormente, que la mayor diversidad genética promedio la exhibe *R. dimidiatus* ($\hat{H}_e=0,898\pm 0,062$; datos no mostrados) en la zona de simpatría, desvirtuando la Hipótesis nula. De igual forma, las dos especies de *Ramphocelus* consideradas, según lo propuesto por Hammond et al., (1994), no presentan diferencias significativas entre ellas en cuanto a los parámetros \hat{H}_o y \hat{H}_e (Tablas 3 y 4).

La diversidad genética promedio estimada para *R. icteronotus* ($\hat{H}_e=0,807\pm 0,083$) es menor respecto a la reportada para la misma especie por Ocampo (2008) y González (2009). Anteriormente, se hizo mención de las diferencias en los métodos de asignación alélica por esos autores, adicional a esto se presentan diferencias con respecto al número de loci analizados (tres y dos, respectivamente) y el número de individuos muestreados (15 y 14, respectivamente). Pese a estas diferencias, el valor de \hat{H}_e en *R. icteronotus* fue mayor en la región donde esta especie se distribuye históricamente. Lo anterior brinda soporte adicional al hecho que *R. icteronotus* se encuentra aún en un proceso de expansión hacia la Cordillera Oriental (Vargas, 2017).

Los valores de \hat{H}_o y \hat{H}_e estimados en *R. icteronotus* y *R. dimidiatus*, son comparables a los reportados por Krueger & Williams (2006) y Krueger et al., (2008) para *R. costaricensis*. Estos investigadores estimaron, para siete loci STR's, $\hat{H}_o=0,82000$, $\hat{H}_e=0,82571$ y PIC promedio=0,81143, siendo \hat{H}_o mayor que la reportada en las dos especies de estudio, mientras que \hat{H}_e y PIC promedio fueron menores a los detectados en *R. dimidiatus*, indicando que, pese a los cebadores no haber sido diseñados para esta especie mostraron un mayor nivel de polimorfismo que para *R. costaricensis*. Estos resultados se soportan con la idea que las regiones flanqueantes de los cebadores son conservadas (Primmer et al., 2005; Canales-Aguirre et al., 2010), mientras que, en las regiones repetidas con el paso del tiempo, han ocurrido cambios que

se explican por las altas tasas mutacionales de los STR's (Aranguren-Méndez et al., 2005) y la distancia filogenética de las especies implicadas (Burns et al., 2016).

Otro hecho destacable lo constituye los bajos valores de H_o , H_e y PIC estimados en *R. costaricensis* para el locus RcGT257 (Krueger et al., 2008). Tanto en *R. dimidiatus* como en *R. icteronotus* estos parámetros fueron más altos pese al porcentaje de alelos nulos detectados en este locus y pese a la cercana relación filogenética que guarda *R. costaricensis* con *R. flammigerus* (Burns et al., 2016), subespecie estrechamente relacionada con *R. icteronotus* (Hackett, 1996). Una posible explicación de este patrón (mayor H_o y H_e) en las especies de *Ramphocelus* consideradas, se centra en que al ajustar los genotipos que presentan alelos nulos se sobreestiman las frecuencias alélicas al exhibir dichos alelos en estado heterocigoto (Dewoody et al., 2006).

En el departamento de Santander *R. icteronotus* presentó una clina altitudinal en términos de la diversidad genética, dado que a medida que incrementa la altitud disminuye la diversidad genética (Figura 3). Según Antoniazza et al., (2010) este tipo de variación clinal se debe, posiblemente, a la adaptación de los diferentes genotipos a las condiciones locales a lo largo de un gradiente ambiental; aunque, también puede ser el resultado de evolución neutral, generada por expansión geográfica de la población (Klopfstein et al., 2006; Excoffier & Ray, 2008).

El fenómeno de expansión que sigue *R. icteronotus*, puede guardar relación con el aparente exceso de heterocigotos sesgado por la presencia de alelos nulos, y la reducción poblacional evidenciada con el valor $M=0,62943$ (Tabla 4). Esto se puede explicar considerando que reducciones poblacionales o cuellos de botella, pueden inducir un exceso transitorio de heterocigosidad (Cornuet & Luikart, 1996; Dallas et al., 1999; Pierson et al., 2000), algo que podría ser característico de esta especie en el departamento Santander; complementado por una

rápida expansión demográfica en este periodo, con bajos tamaños efectivos poblacionales (De Jong et al., 2011; De la Rosa, 2012).

En su conjunto, los resultados obtenidos evidencian la transferibilidad de los loci propuestos por Krueger & Williams (2006) en *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*, además de mostrar altos valores de diversidad genética. En *R. bresilius*, por ejemplo, se evaluó y utilizaron loci STR's heterólogos aislados y diseñados a partir de especies de seis familias diferentes de Passeriformes que no incluyeron a Thraupidae; los resultados del estudio realizado por Nogueira et al., (2014), denotan valores de $\hat{H}_o < 0,4$ y $\hat{H}_e < 0,49$, evidenciando la falta de relación filogenética entre la especie de estudio y los loci implementados en la evaluación de su diversidad genética.

4.3. Estructura genética de especies simpátricas de *Ramphocelus*

El análisis de estructura genética es igual o más sensible que, el HWE a errores de genotipado (Morin et al., 2009); la presencia de individuos homocigotos con alelos raros puede conducir a una evaluación de la diferenciación poblacional basada en un conjunto de datos erróneos (Dewoody et al., 2006). Una alternativa sustentada en la literatura, para no afectar negativamente los resultados, es eliminar de los análisis de diferenciación poblacional, la información de los loci que presenten muchos genotipos alterados por errores de genotipado (Morin et al., 2009). Con base en esto, para realizar el análisis de estructura genética se optó por retirar, la información del locus RcGT257 obtenida para las dos especies bajo estudio. Adicionalmente, cuando se estimaron, por parejas de localidades en las dos especies de *Ramphocelus*, las distancias genéticas basadas en R_{ST} y la tasa efectiva de migrantes por generación (N_m), no se incluyeron las localidades EA y SB por tener un bajo muestreo, debido a

que se puede sobreestimar los referidos estadísticos en las comparaciones pareadas con las otras localidades.

También se decidió, que el estimador de diferenciación poblacional a evaluar fuera el R_{ST} ; parámetro basado en la media de cuadrados de las varianzas del número de repeticiones entre alelos en cada locus microsatélite (Holsinger & Weir, 2009), debido a que los loci STR's presentaron variantes alélicas intermedias, que se pueden explicar a partir del modelo mutacional por pasos (SMM) (Valdes et al., 1993; Slatkin, 1995; Rousset, 1996).

Los resultados denotan que la diferenciación genética en *R. dimidiatus* fue baja (Slatkin, 1995; Hartl & Clark, 2007) tanto en las localidades en simpatria ($R_{ST}=0,03513$) como en la localidad no simpátrica ($R_{ST}=0,05918$), corroborado por altos valores de Nm entre parejas de localidades (Tabla 7), sugiriendo un elevado flujo génico entre individuos de las distintas localidades (Lee et al., 2001). Lo anterior indica que los individuos de *R. dimidiatus* muestreados en las distintas localidades de Santander, hacen parte de la misma unidad genética reproductiva (Hartl & Clark, 2007), hecho corroborado con la información obtenida a partir del análisis realizado con STRUCTURE (Figura 4A).

En *R. icteronotus* se encontró diferenciación genética moderada ($R_{ST}=0,08556$) (Slatkin, 1995; Hartl & Clark, 2007), característica común en muchas especies de aves con altas tasas de dispersión (Crochet, 2000); soportado por valores medios de Nm entre las parejas de localidades simpátricas donde se encuentra esta especie (Tabla 7). Lo anterior se puede explicar debido a un posible efecto fundador, seguido de la expansión de la especie desde su área de distribución histórica hacia la Cordillera Oriental (Vargas, 2017), a partir de bajos tamaños efectivos poblacionales (De Jong et al., 2011; De la Rosa, 2012; Carreño, 2013). No obstante, el grado de diferenciación genética determinado para *R. icteronotus* constituye una misma unidad genética

reproductiva (Hartl & Clark, 2007), corroborado con la información obtenida a partir del análisis realizado con STRUCTURE (Figura 4A).

El valor estimado del parámetro de diferenciación poblacional para las dos especies de *Ramphocelus* consideradas fue $R_{ST}=0,197$ ($p<0,05$), el cual indica alta diferenciación genética entre ellas (Slatkin, 1995; Hartl & Clark, 2007); esto se corrobora con $Nm=2,01010$ (datos no mostrados). Este resultado sugiere que, en la diferenciación de estas dos especies filogenéticamente distanciadas (Burns et al., 2016), ha sido importante el establecimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo que evitan la formación de híbridos entre ellas (Mayr, 1963; Rabosky, 2015). Adicionalmente, la evidencia aportada por el análisis realizado con STRUCTURE, permite pensar que entre estas especies ha ocurrido flujo génico debido a la ancestría compartida (Atzmon et al., 2010) de las mismas.

El Análisis con el software STRUCTURE mostró dos grupos genéticamente distinguibles ($K=2$) que corresponden a cada una de las especies bajo estudio (Figura 4A), soportado por el estadístico *ad hoc* “ ΔK ” (Figura 4B) estimado según lo propuesto por Evanno et al., (2005).

Las barras con colores mezclados (Figura 4A), pueden ser explicadas por los porcentajes de alelos compartidos (Tabla 2) a causa de la ancestría compartida (Tishkoff et al., 2009) de las especies de *Ramphocelus* bajo estudio, siendo mayor el porcentaje compartido para *R. icteronotus*. Lo anterior guardó relación inversa con la probabilidad de asignación, debido a que altos porcentajes de alelos compartidos en las poblaciones predefinidas de cada especie, evidencian disminución en el valor de la probabilidad de asignación en alguno de los grupos genéticos inferidos. Además, las barras con diferentes colores podrían ser mal interpretadas como posibles eventos de introgresión génica; y para ello, habría sido útil el uso de loci monomórficos en una especie y polimórficos en la otra, que demostraran mezcla entre ellas

(Muñoz-Fuentes et al., 2005); lo cual no ocurrió, a causa de que en ambas especies todos los loci tipificados fueron altamente polimórficos, evidenciado en los altos valores de PIC (Tablas 3 y 4).

Adicionalmente, se realizó test de mantel con el objetivo de evaluar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las distintas localidades predefinidas para cada especie considerada. La prueba arrojó correlación positiva entre moderada y fuerte (Martínez et al., 2009) para las localidades en simpatria de *Ramphocelus icteronotus* y *R. dimidiatus*, e incluso, cuando se añadió la localidad no simpátrica en esta última (Tabla 8).

El mayor valor de correlación obtenido para el test de mantel se presentó en *R. icteronotus* ($r=0,70235$; $p=0,08382$) (Smouse et al., 1986). Este valor y $M=0,62943$, pueden ayudar a explicar la clina altitudinal que se presenta en la evaluación de la diversidad genética, constituyendo una hipótesis adicional a la descrita en términos de la rápida expansión demográfica poblacional (Klopfstein et al., 2006; Excoffier & Ray, 2008) después de un período con bajos efectivos poblacionales (De Jong et al., 2011; De la Rosa, 2012); ya que dicha hipótesis es dada por la influencia de la deriva genética en las poblaciones generadas a partir del aislamiento por distancia, a través del flujo de genes espacialmente limitado (Endler, 1977), aspecto que no sucede en *R. dimidiatus*.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de correlación que evalúen hipótesis de aislamiento por distancia, se pueden relacionar con la variación clinal, dado que estos análisis tienen en cuenta una escala espacial (Antoniazza et al., 2010) y un estimador de la diversidad genética. Se ha reportado que muchos factores ambientales varían a grandes escalas espaciales constituyéndose como agentes selectivos probables, donde la adaptación local a estas escalas puede parecer inevitable (Huey et al., 2000). Es por esto que, patrones claros de aislamiento por distancia sobre rasgos genéticos pueden surgir fácilmente, dado que se considera a la distancia

geográfica como un buen indicador de la variación ambiental (Antoniazza et al., 2010) y genética (Manel et al., 2003; Eckert et al., 2008).

En su conjunto los resultados evidencian mínimo flujo genético entre las especies consideradas, altos niveles de diversidad genética intraespecífica y alta estructuración interespecífica en la zona de simpatría. Estos hallazgos soportan la idea que, en la actualidad, la diversidad genética de *R. dimidiatus* no es menor que la de *R. icteronotus*, pese a la expansión de esta última hacia Santander. Sin embargo, no se debe descartar que las dos especies puedan iniciar procesos de introgresión (Allendorf et al., 2001) e hibridación (Confer, 2006), como lo evidenciaron Olson & Violani (1995) en Panamá.

5. Conclusiones

Los seis loci microsatélites heterólogos tipificados en *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus*, bajo el método de adición de una cola M13 fluoromarcada, fueron altamente polimórficos con base en los valores de PIC hallados, demostrando su utilidad en especies filogenéticamente emparentadas, bajo la consideración de no incluir marcadores que detecten un porcentaje importante de alelos nulos que sobreestimarían algunos parámetros genético-poblacionales.

La diversidad genética en *R. dimidiatus* fue mayor a la de *R. icteronotus*, posiblemente como consecuencia de la estructura social y el tamaño poblacional de cada especie, así como por la expansión del rango distribucional de *R. icteronotus* hacia la Cordillera Oriental. Estos aspectos guardan relación con la diferenciación genética intrapoblacional detectada y dan validez al hecho

que la integridad genética de *R. dimidiatus*, actualmente, no se ve afectada por la presencia de *R. icteronotus* en las localidades simpátricas estudiadas.

En Santander, *Ramphocelus icteronotus* exhibe reducción poblacional posiblemente por causa de una rápida expansión demográfica después de un período con bajos efectivos poblacionales, evidenciada en la disminución de su diversidad genética a medida que incrementa la altitud y el aislamiento por distancia detectado. Lo descrito redundante en el grado de diferenciación genética moderada que se evidenció en esta especie.

Se presenta un alto grado de estructura genética entre *R. dimidiatus* y *R. icteronotus*, debido a las bases genéticas diferenciadas y los bajos efectivos de migrantes por generación, producto de la ancestría compartida de estas especies.

6. Recomendaciones

Se recomienda diseñar loci microsatélites propios de cada una de las especies bajo estudio, a objeto de reducir el porcentaje de alelos nulos que suele sobreestimar las frecuencias alélicas y pueden generar apreciaciones erradas al no ser considerados; así como evaluar más loci STR's con los que se pueda obtener mayor información genómica.

Se sugiere ampliar el estudio hacia otras localidades de la Cordillera Oriental, donde se evidencie el contacto secundario entre estas especies filogenéticamente cercanas, dado que pueden generar híbridos como los reportados por Olson & Violani (1995) en Panamá.

Asimismo, sería relevante evaluar la diversidad y el grado de estructura genética en localidades donde las dos especies se encuentren en alopatría, para así realizar comparaciones con las localidades simpátricas y dilucidar aún más las consecuencias de la coexistencia de estas especies.

Referencias Bibliográficas

- Allendorf, F. W., Leary, R. F., Spruell, P., Wenburg, J. K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *TRENDS Ecol. Evol.* 16, 613–622.
- Antoniazza, S., Burri, R., Fumagalli, L., Goudet, J., Roulin, A. 2010. Local adaptation maintains clinal variation in melanin-based coloration of european barn owls (*Tyto alba*). *Evolution*.
- Aranguren-Méndez, J.A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión.
- Arbeláez, E. 2003. Análisis de la diversidad y la estructura genética de dos poblaciones naturales del árbol de manglar *R. mangle* (Rizophoraceae) de la Costa Pacífica colombiana mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites de ADN. Tesis de pregrado, Universidad del Valle, Cali.
- 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. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Arnold, M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press.
- Atzmon, G., Hao, L., Pe'er, I., Velez, C., Pearlman, A., Palamara, P. F., Morrow, B., Friedman, E., Oddoux, C., Burns, E., Ostrer, H. 2010. Abraham's children in the genome era: major Jewish diaspora populations comprise distinct genetic clusters with shared Middle Eastern Ancestry. *Am J Hum Genet* 86:850–859.
- 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.
- Björklund, M. 2005. A method for adjusting allele frequencies in the case of microsatellite allele drop-out. *Mol. Ecol. Notes* 5, 676–679.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314.
- Brookfield, J. F. Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5, 453–455.
- Bulgin, N. L., Gibbs, H. L., Vickery, P., Baker, A. J. 2003. Ancestral polymorphisms in genetic markers obscure detection of evolutionarily distinct populations in the endangered Florida grasshopper sparrow (*Ammodramus savannarum floridanus*). *Mol. Ecol.* 12, 831–844.
- Burns, K. J., Unitt, P., Mason, N. A. 2016. A genus-level classification of the family Thraupidae (Class Aves: Order Passeriformes). *Zootaxa* 4088, 329.
- Canales-Aguirre, C. B., Ferrada, S., Hernández, C. E., Galleguillos, R. 2010. Usefulness of heterologous microsatellites obtained from *Genypterus blacodes* (Schneider 1801) in species *Genypterus* off the Southeast Pacific/Utilidad de microsatélites heterólogos de *Genypterus blacodes* (Schneider 1801) en especies de *Genypterus* del Pacífico suroriental. *Gayana* 74, 74–77.
- Carreño, M. F. 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 pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Confer, J. L. 2006. Secondary contact and introgression of Golden-winged warblers (*Vermivora chrysoptera*): documenting the mechanism. *The Auk* 123, 958–961.

- Cornejo, J. P. 2016. Estandarización de la amplificación por PCR de los sistemas microsatélites RcAAAG14 y Asμ15 en Aves del género *Ramphocelus* en el departamento de Santander, Colombia. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Cornuet, J. M., Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001–2014.
- Crochet, P. A. 2000. Genetic structure of avian populations-allozymes revisited. *Mol. Ecol.* 9, 1463–1469.
- Dakin, E. E., Avise, J. C. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93, 504–509.
- Dallas, J. F., Bacon, P. J., Carss, D. N., Conroy, J. W. H., Green, R., Jefferies, D. J., Kruuk, H., Marshall, F., Piertney, S. B., Racey, P. A. 1999. Genetic diversity in the Eurasian otter, *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism. *Biol. J. Linn. Soc.* 68, 73–86.
- 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.
- Dewoody, J., Nason, J. D., Hipkins, V. D. 2006. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations: REVIEW. *Mol. Ecol. Notes* 6, 951–957.
- Dharmarajan, G., Beatty, W. S., Rhodes, O. E. 2013. Heterozygote deficiencies caused by a Wahlund effect: Dispelling unfounded expectations. *J. Wildl. Manag.* 77, 226–234.
- Dowling, T. E., Secor, C.L. 1997. The Role of Hybridization and Introgression in the Diversification of Animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 593–619.

- Earl, D. A., vonHoldt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* *4*, 359–361.
- Eckert, C. G., Samis, K. E., Loughheed, S. C. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol. Ecol.* *17*, 1170–1188.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* *5*, 435–445.
- Endler, J. A. 1977. *Geographic variation, speciation, and clines* (No. 10). Princeton University Press.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* *14*, 2611–2620.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* *10*, 564–567.
- Excoffier, L., Ray, N. 2008. Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends Ecol. Evol.* *23*, 347–351.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genet. Soc. Am.* *131*, 479–491.
- Fitarelli-Kiehl, M., Macedo, G. S., Schlatter, R. P., Koehler-Santos, P., Matte, U. da S., Ashton-Prolla, P., Giacomazzi, J. 2016. Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p.R337H in TP53. *Genet. Mol. Biol.* *39*, 203–209.
- Fjeldsa, J., Alvarez, M. D., Lazcano, J. M., León, B. 2005. Illicit crops and armed conflict as constraints on biodiversity conservation in the Andes region. *AMBIO J. Hum. Environ.* *34*, 205–211.

- Fontdevila, A., Moya, A. 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Editorial Síntesis, Madrid.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gallo-Cajiao, E., Idrobo-Medina, C. J. 2004. Fragmentos de bosque y conservación de aves: un estudio de caso en los Andes de Colombia. Mem. Manejo Fauna Silv. En Amazon. Latinoam. 178–185.
- Garza, J. C., Williamson, E. G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. Mol. Ecol. 10, 305–318.
- González, F. L. 2009. Caracterización genética de las subespecies de *Ramphocelus flammigerus* (Aves: Thraupidae) del Valle del Cauca y Cauca, mediante secuencias de ADN mitocondrial y microsatélites. Tesis de pregrado. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Grant, P. R., Grant, B. R. 2009. The secondary contact phase of allopatric speciation in Darwin's finches. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 20141–20148.
- Green, M. R., Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Gutiérrez, J. P., Royo, L. J., Álvarez, I., Goyache, F. 2005. MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. Journal of Heredity, 96: 718-721.
- Hackett, S.J. 1996. Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus* (Aves). Mol. Phylogenet. Evol. 5, 368–382.
- Hammond, H. A., Jin, L., Zhong, Y., Caskey, C. T., Chakraborty, R. 1994. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. Am. J. Hum. Genet. 55, 175.
- Hartl, D. L., Clark, A. G. 2007. Principles of Population Genetics (Sinauer, Sunderland, MA), 4th Ed.

- Hilty, S. L., Brown, W. L. 1986. A guide to the birds of Colombia. Princeton University Press. Princeton; New Jersey.
- Hilty, S. L., Brown, W. L. 2009. Guía de Aves de Colombia (Traducción por Humberto Álvarez-López). Cali, Colombia: American Bird Conservancy. 2a Edición. 1030pp.
- Holsinger, K. E., Weir, B. S. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nat. Rev. Genet.* 10, 639–650.
- Huey, R. B., Gilchrist, G. W., Carlson, M. L., Berrigan, D., Serra, L. 2000. Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science* 287, 308–309.
- Isler, M. L., Isler, P. R. 1999. The Tanagers: Natural history, Distribution, and Identification. Smithsonian Institution Press. Pp. 406.
- Jamieson, I. G. 2011. Founder Effects, Inbreeding, and Loss of Genetic Diversity in Four Avian Reintroduction Programs. *Conserv. Biol.* 25, 115–123.
- Juárez, O. E., Rosas, C., Arena, L. 2010. Heterologous microsatellites reveal moderate genetic structure in the *Octopus maya* population. *Fish. Res.* 106, 209–213.
- Kalinowski, S. T. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genet.* 5, 539–543.
- Karlsson, S., Mork, J. 2005. Deviation from Hardy–Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES J. Mar. Sci.* 62, 1588–1596.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Peter Meintjes, P., Drummond, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649.
- Klopfstein, S., Currat, M., Excoffier, L. 2006. The Fate of Mutations Surfing on the Wave of a Range Expansion. *Mol. Biol. Evol.* 23, 482–490.

- 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.
- Lafresnaye, D. E. 1846. Sur le *Ramphocelus icteronotus* du prince Bonaparte. *Revue Zoologique par la Société Cuvérienne*. 365-368.
- Lafresnaye, D. E. 1853. Sur le genre *Ramphocelus*, desm, et trois nouvelles especes Qui lui appartiennent. *Rev Et Jiagr*. 2001. 5: 242-246.
- Leal, B. S. S., Tannure, M. P., Santos, F. R. dos, Lovato, M. B., Ribeiro, R. A. 2014. Isolation and characterization of microsatellite markers for the endangered *Comanthera elegans* (Eriocaulaceae) and cross-species amplification within the family. *Biochem. Syst. Ecol.* 55, 305–309.
- Leberg, P. L. 2002. Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Mol. Ecol.* 11, 2445–2449.
- Lee, P. L. M., Bradbury, R. B., Wilson, J. D., Flanagan, N. S., Richardson, L., Perkins, A. J., Krebs, J. R. 2001. Microsatellite variation in the yellowhammer *Emberiza citrinella*: population structure of a declining farmland bird. *Mol. Ecol.* 10, 1633–1644.
- Li, Y.-C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453–2465.
- Lockwood, J. L., Cassey, P., and Blackburn, T. 2005. The role of propagule pressure in explaining species invasions. *Trends Ecol. Evol.* 20, 223–228.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., Taberlet, P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18, 189–197.
- Martínez, R. M., Tuya, L. C., Martínez, M., Pérez, A., Cánovas, A. M. 2009. El coeficiente de correlación de los rangos de Spearman caracterización. *Rev. Habanera Cienc. Médicas* 8.

- Mateescu, R. G., Zhang, Z., Tsai, K., Phavaphutanon, J., Burton-Wurster, N.I., Lust, G., Quaas, R., Murphy, K., Acland, G. M., Todhunter, R.J. 2005. Analysis of Allele Fidelity, Polymorphic Information Content, and Density of Microsatellites in a Genome-Wide Screening for Hip Dysplasia in a Crossbreed Pedigree. *J. Hered.* 96, 847–853.
- Mayr, E. 1963. *Animal species and evolution*. Harvard University Press, Cambridge.
- McMullan, M., Donegan, T. M., Quevedo, A. 2011. *Field guide to the Birds of Colombia*. Fundación ProAves. Bogotá, Colombia.
- Mejía, L. G., Hernández, R. A., Rosero, C. Y., Solarte, C. E. 2015. Análisis de la diversidad genética de ganado bovino lechero del trópico alto de Nariño mediante marcadores moleculares heterólogos de tipo microsatélite. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec.* 62, 18–33.
- Morales-Rozo, A., Tenorio, E. A., Carling, M. D., Cadena, C. D. 2014. Origin and cross-century dynamics of an avian hybrid zone.
- Morin, P. A., Leduc, R. G., Archer, F. I., Martien, K. K., Huebinger, R., Bickham, J. W., Taylor, B. L. 2009. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 498–504.
- Morrone, J. J. 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782, 1.
- Muñoz-Fuentes, V., Gyllenstrand, N., Negro, J. J., Green, A. J., Vilà, C. 2005. Microsatellite markers for two stiff-tail ducks: the white-headed duck, *Oxyura leucocephala*, and the ruddy duck, *O. jamaicensis*. *Mol. Ecol. Notes* 5, 263–265.
- Nogueira, D. M., Pope, L. C., Burke, T., Alves, M. A. S. 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.
- Noriega, L. Y. 2015. Estandarización del genotipado de marcadores moleculares microsatélites para estudios poblacionales de Aves del género *Ramphocelus* en el departamento de Santander, Colombia. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

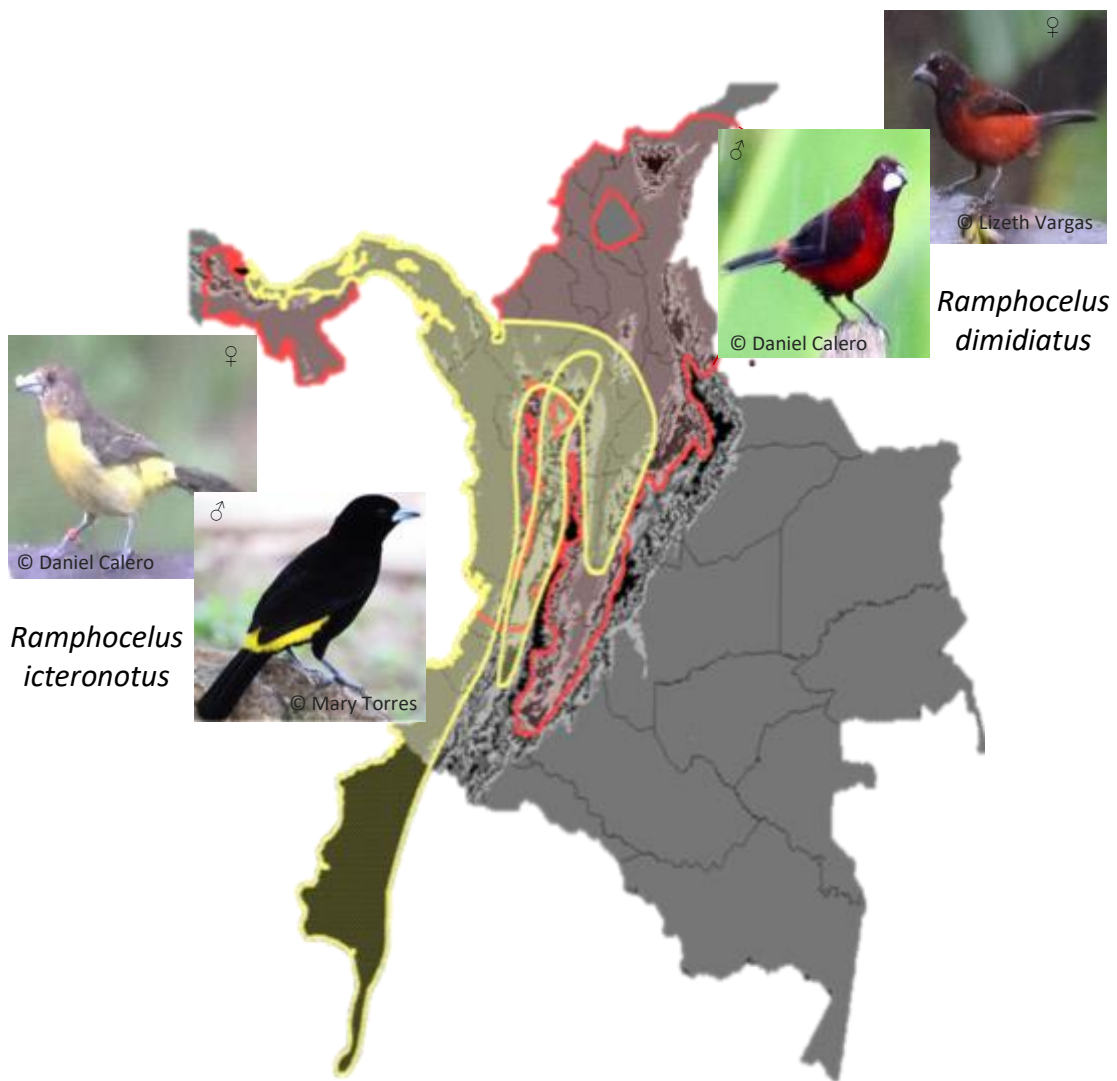
- Ocampo, I. C. 2008. Caracterización de dos subespecies de *Ramphocelus flammigerus* a partir de marcadores moleculares microsátélites. Tesis de pregrado. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- Oetting, W. S., Lee, H. K., Flanders, D. J., Wiesner, G. L., Sellers, T. A., King, R. A. 1995. Linkage Analysis with Multiplexed Short Tandem Repeat Polymorphisms Using Infrared Fluorescence and M13 Tailed Primers. *Genomics* 30, 450–458.
- Olson, S. L., Violani, C. 1995. Some unusual hybrids of *Ramphocelus*, with remarks on evolution in the genus (Aves: Thraupinae). *13*, 297–312.
- Pearse, D. E., Crandall, K. A. 2004. Beyond FST: analysis of population genetic data for conservation. *Conserv. Genet.* 5, 585–602.
- Pierson, B. J., Pearce, J.M., Talbot, S. L., Shields, G. F., Scribner, K. T. 2000. Molecular Genetic Status of Aleutian Canada Geese from Buldir and the Semidi Islands, Alaska. *The Condor* 102, 172.
- Primmer, C. R., Painter, J. N., Koskinen, M. T., Palo, J. U., Merilä, J. 2005. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. *J. Avian Biol.* 36, 348–360.
- Pritchard, J. K., Wen, X., Falush, D. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3 (University of Chicago, Chicago, IL).
- Rabosky, D. L. 2015. Reproductive isolation and the causes of speciation rate variation in nature. *Biol. J. Linn. Soc.*
- Rhymer, J. M., Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 27, 83–109.
- Ridgely, R. S., BirdLife International. 2012. Digital Distribution Maps of the Birds of the Western Hemisphere, version 5.0. In: BirdLife International and NatureServe. Bird species distribution maps of the world. *Ramphocelus dimidiatus* y *Ramphocelus icteronotus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1.

- Rousset, F. 1996. Equilibrium Values of Measures of Population Subdivision for Stepwise Mutation Processes. *Genet. Soc. Am.* 142, 1357–1362.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genet.* 5, 63–69.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat. Biotechnol.* 18, 233–234.
- Selkoe, K. A., Toonen, R. J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9, 615–629.
- Sibley, C. G. 1958. Hybridization in some colombian tanagers, avian genus *Ramphocelus*. *Proc. Am. Philos. Soc.* 102, 448–453.
- Skutch, A. F. 1989. *Life of the Tanager*. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139, 457–462.
- Smouse, P. E., Long, J. C., Sokal, R. R. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Syst. Zool.* 35, 627–632.
- Suh, S., Sharma, A., Lee, S., Cho, C.-Y., Kim, J.-H., Choi, S.-B., Kim, H., Seong, H.-H., Yeon, S.-H., Kim, D.-H., Seong, H.-H., Yeon, S. H., Kim, D.-H., Ko, Y. G. 2014. Genetic Diversity and Relationships of Korean Chicken Breeds Based on 30 Microsatellite Markers. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 27, 1399–1405.
- Tishkoff, S. A., Reed, F. A., Friedlaender, F. R., Ehret, C., Ranciaro, A., Froment, A., Hirbo, J. B., Awomoyi, A. A., Bodo, J.-M., Doumbo, O., Ibrahim, M., Juma, A., Kotze, M., Lema, G., Moore, J., Mortensen, H., Nyambo, T., Omar, S., Powell, K., Pretorius, G., Smith, M., Thera, M., Wambebe, C., Weber, J., Williams, S. 2009. The Genetic Structure and History of Africans and African Americans. *Science* 324, 1035–1044.
- Valdes, A. M., Slatkin, M., Freimer, N. B. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genet. Soc. Am.* 133, 737–749.

- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.
- Van Oosterhout, C., Weetman, D., Hutchinson, W. F. 2006. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Mol. Ecol. Notes* 6, 255–256.
- Vargas, L. C. 2017. Evaluación de la diversidad genética a partir de secuencias del gen ND2 en poblaciones simpátricas de *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* presentes en el departamento de Santander, Colombia. Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Watson, D. M. 2002. A conceptual framework for studying species composition in fragments, islands and other patchy ecosystems. *J. Biogeogr.* 29, 823–834.
- Wu, C. A. 2006. Characterization of microsatellite loci in *Ipomopsis* (Polemoniaceae) wildflowers. *Mol. Ecol. Notes* 6, 921–923.

Apéndices

Apéndice A. Rango de distribución de *Ramphocelus dimidiatus* Y *R. icteronotus*.



Mapa modificado de Ridgely & BirdLife International (2012); En rojo: distribución *R. dimidiatus*; En amarillo: distribución *R. icteronotus*.

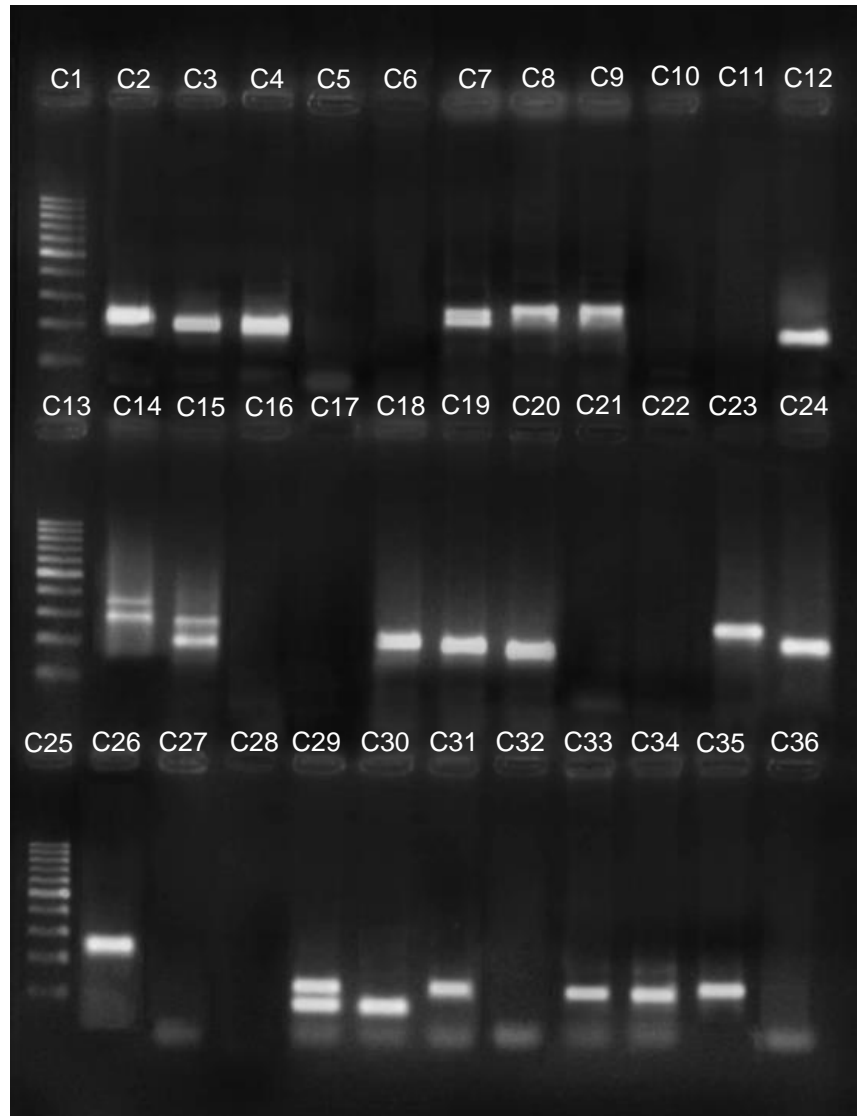
Apéndice B. Cebadores utilizados para amplificar loci microsatélites en las especies de

Ramphocelus bajo estudio.

Locus		Secuencia (5'– 3')
RcAAT11	F:	M13-6-FAM /CCTGGGAATGTTGCAAAATAATA
	R:	CAGGCTGCTAACAAAAATGTGA
RcAAT12	F:	GGGCACATCTGAGCTGAC
	R:	M13-6-FAM /TCCAATACTTCAATTTTGTAACT
RcAAAG14	F:	M13-6-FAM /AAAGGACCAGAGAAAAAGAGAA
	R:	TCAGAACTGCTAAATCAAAGTGT
RcAAAG406	F:	M13-6-FAM /ATGGGCAGATTGATTTGTGA
	R:	AAATGTCATTAGTTGCTCAAGTAAA
RcAAAG410	F:	M13-6-FAM /CCACTGATTCCAAACACACT
	R:	TTTTTCTTTTGTTCTTTCTCTCT
RcGT257	F:	GGCTGTTCTCTCATATACTGAACT
	R:	M13-6-FAM /ACCCACGCCATTTTTTA
A μ 15	F:	M13-6-FAM /AATAGATTCAGGTGCTTTTTC
	R:	TAGCACATGTTGGTTTTTG

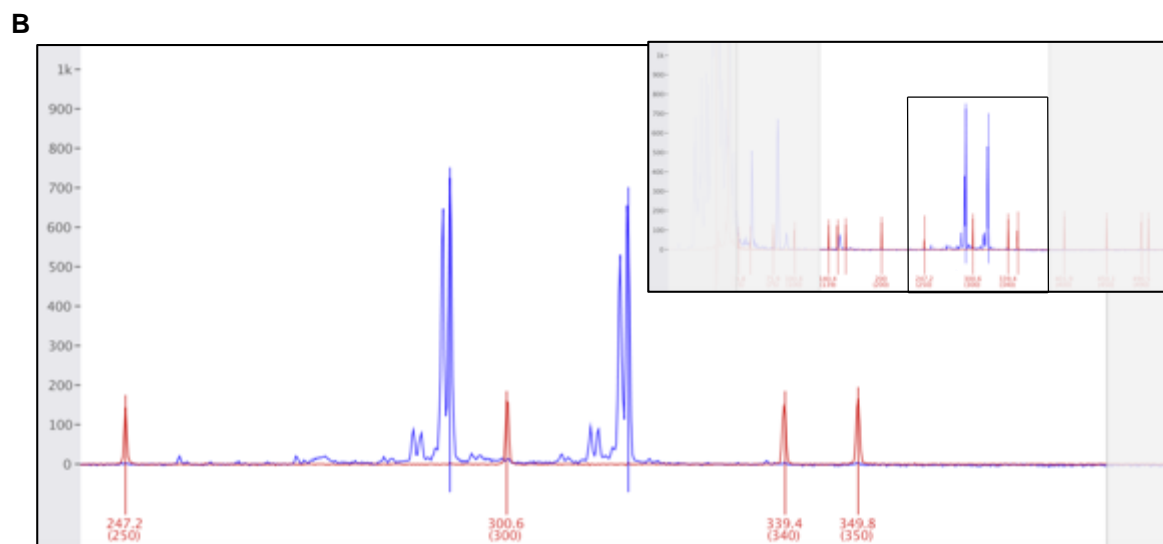
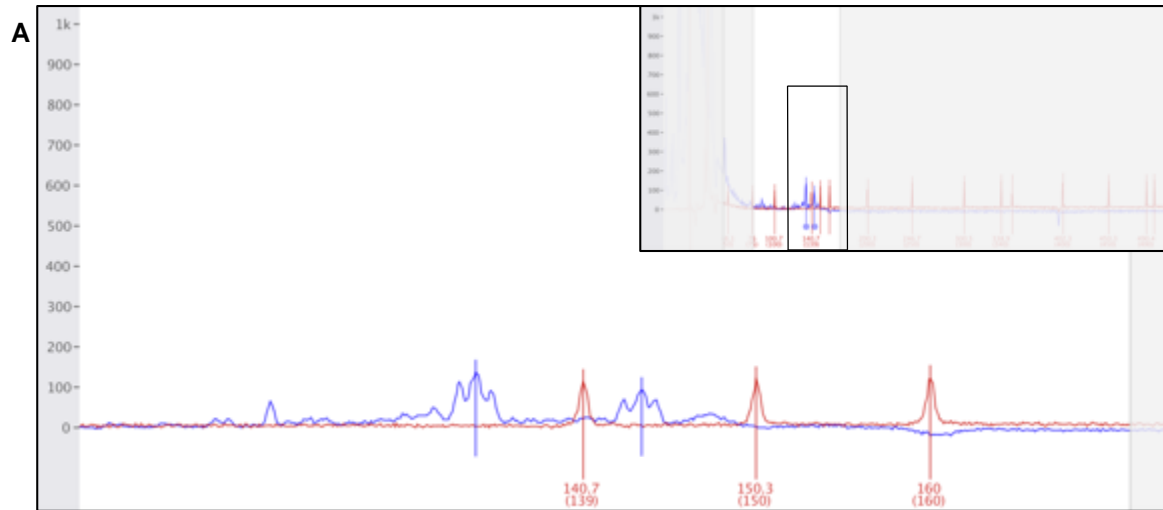
M13-6-FAM	Cola	TTTTCCCAGTCACGAC
------------------	------	------------------

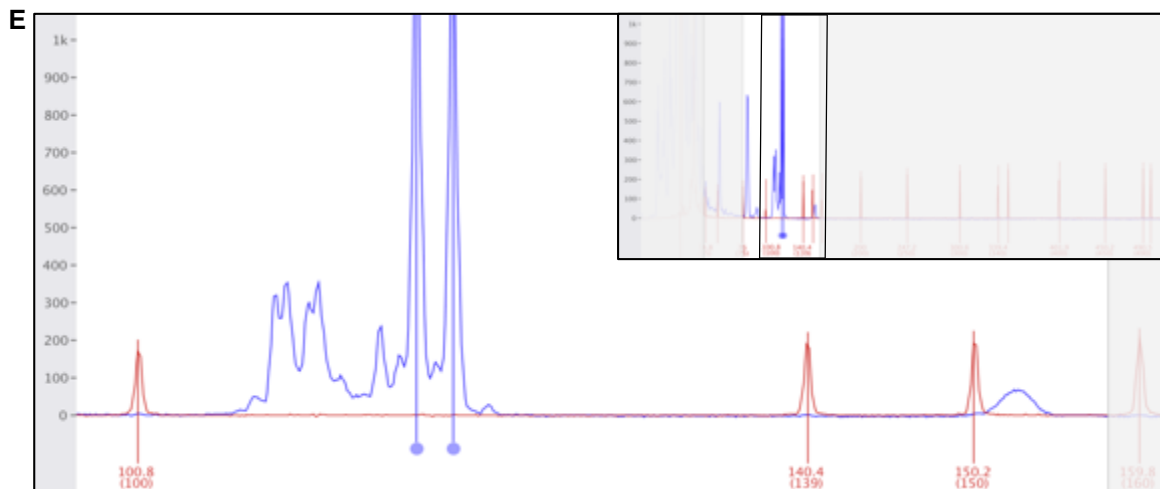
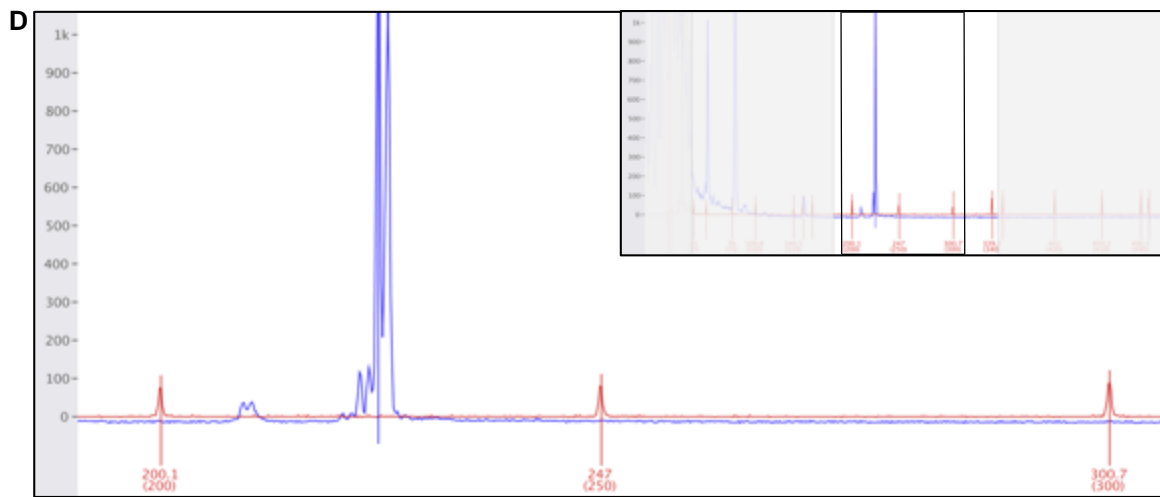
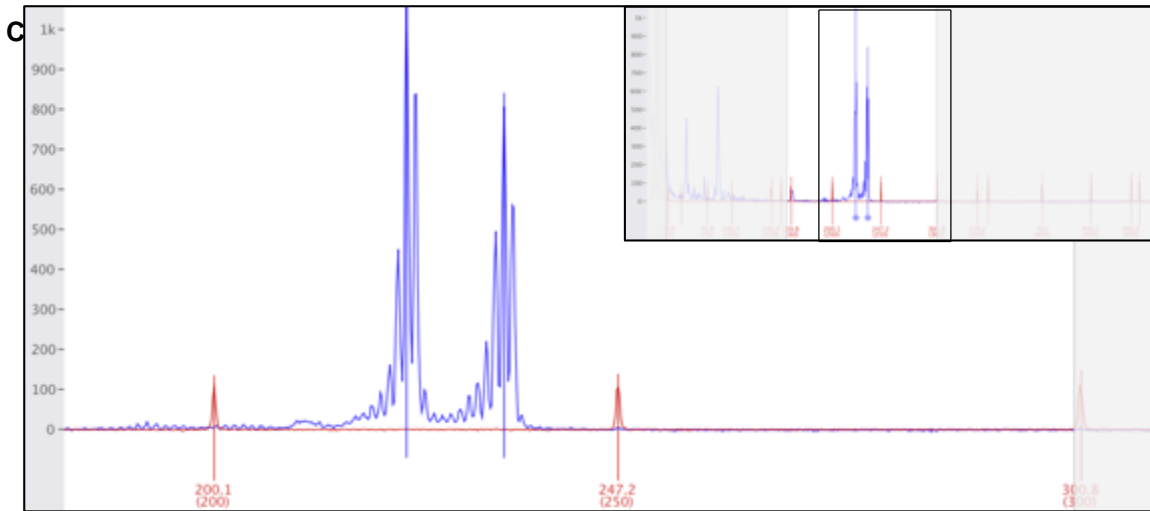
F: Forward; R: Reverse.

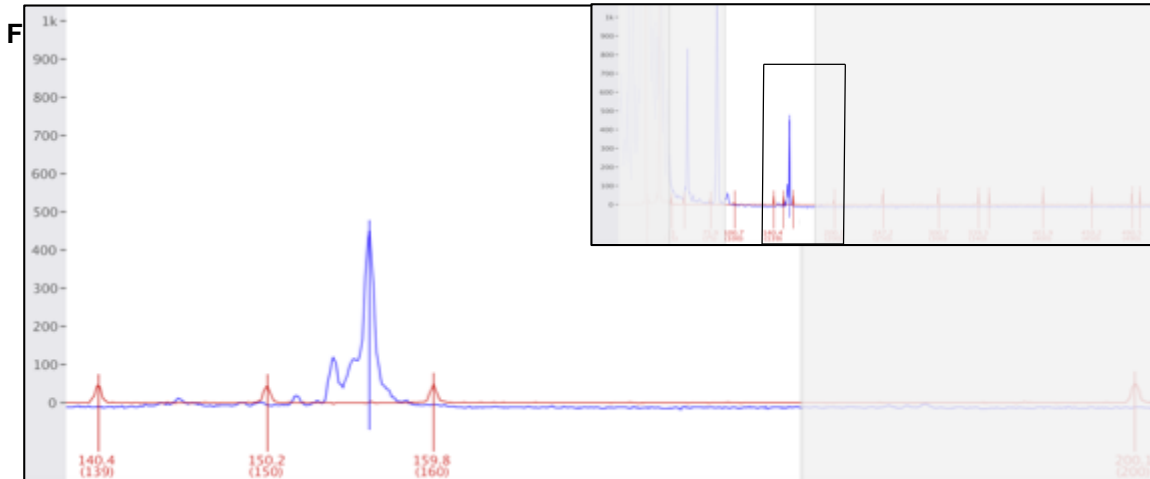
Apéndice C. Productos amplificados de loci str's en *R. dimidiatus* Y *R. icteronotus*.

C1,C13,C25: Marcador de peso molecular de 100pb (Thermo Fisher Scientific);
C5,C10,C16,C21,C27,C32,C36: Controles negativos; C2-C4: Amplicones locus RcAAT11;
C7-C9: Amplicones locus RcAAT12; C12,C14,C15: Amplicones locus RcAAAG14; C18-C20:
Amplicones locus RcAAAG406; C23,C24,C26: Amplicones locus RcAAAG410; C29-C31:
Amplicones locus RcGT257; C33-C35: Amplicones locus As μ 15; C6,C11,C17,C22,C28:
Carriles vacíos.

Apéndice D. Electroferogramas de los seis loci microsatélites heterólogos tipificados en *R. dimidiatus* Y *R. icteronotus*.







A. Locus RcAAT11; **B.** Locus RcAAAG14; **C.** Locus RcAAAG406; **D.** Locus RcAAAG410; **E.** Locus RcGT257; **F.** Locus *Asμ15*; A,B,C,E: individuos heterocigotos; D,F: individuos homocigotos. Para todos los casos: eje Y: Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU); eje X: tamaño en pares de bases (pb); en rojo: GeneScanTM-500 LIZ® Size Standard; en azul: amplicon fluoromarcado con picos acotados (indicador de los alelos); recuadro superior derecho: electroferograma completo mostrando la región observada; recuadros en blanco: rango alélico estimado para cada locus.