

Análisis de Diversidad Genética de *Phaethornis anthophilus* en el Valle Medio del Río
Magdalena

Danilo Viviescas Ortiz

Trabajo de Grado para Optar al Título de Biólogo

Director

Enrique Arbeláez Cortés

Doctor en Ciencias Biológicas

Codirector

Fernando Rondón González

Doctor en Ciencias Biológicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Bucaramanga

2025

Dedicatoria

Le dedico este trabajo a mi madre, Rosa, a sus lágrimas, que me despidieron con amor y nostalgia cada vez que partí de casa; a mi padre, Néstor, cuya resiliencia y persistencia me enseñan a seguir adelante; a mis hermanas Diana, Tatiana y Andrea, y a mi hermano Mauricio, que siempre me hacen sentir parte esencial de nuestra familia; y a mis amigos, simplemente por ser y por estar.

*Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar.*

— Antonio Machado

Agradecimientos

Expreso mi sincero agradecimiento a mi director y profesor Enrique Arbeláez Cortés, por su constante disposición para orientarme y transmitirme conocimientos. Haber aprendido de él, y de la serendipia que acompañó este proceso, ha sido una experiencia enriquecedora.

Agradezco a mi profesor y codirector Fernando Rondón González, por su disposición para facilitarme los equipos de laboratorio, por su orientación y por el apoyo brindado en la corrección de este documento.

También agradezco a todos los colectores de los especímenes utilizados en este trabajo, en especial a Socorro Sierra, por sus importantes aportes de muestras en la Orinoquía.

Por último, agradezco a la Escuela de Biología y a la Universidad Industrial de Santander, por facilitar los espacios, materiales y recursos necesarios para culminar este proceso académico, y por brindarme oportunidades que en otro momento pensaba como posibilidades muy lejanas.



Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	11
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos	15
2. Competencias Desarrolladas	16
3. Materiales y Metodología	17
3.1 Obtención de muestras	17
3.2 Extracción de ADN	17
3.3 Amplificación por PCR y electroforesis	18
3.4 Edición de secuencias y generación de alineamientos	21
3.5 Análisis de diversidad genética	22
3.5.1 Redes de haplotipos	22
3.5.2 Diversidad y estructura genética	23
3.6 Inferencia bayesiana	23
4. Resultados	24
4.1 Obtención y características de las secuencias	24
4.2 Diversidad y estructura genética de las poblaciones	25
4.2.1 Relaciones entre haplotipos	25

4.2.2 Diversidad genética y estructura poblacional	28
4.3 Relaciones filogenéticas en <i>Phaethornis anthophilus</i>	29
5. Discusión	30
5.1 La cordillera oriental como barrera geográfica	30
5.2 El rol del valle medio del río Magdalena como corredor genético	34
5.3 Tiempo de divergencia y posibles procesos	37
5.4 Limitaciones de los marcadores mitocondriales	40
6. Conclusiones	42
7. Recomendaciones	43
Referencias Bibliográficas	44
Apéndices	55

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Protocolo de termociclado bifásico para la amplificación de los genes ND2 y COI.	20
Tabla 2. Índices de diversidad genética de <i>Phaethornis anthophilus</i> en las tres regiones de estudio para los genes ND2 y COI.....	29

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Distribución de las muestras de <i>Phaethornis anthophilus</i> en Colombia.....	19
Figura 2. Distribución geográfica, red de haplotipos y filogenia datada de <i>Phaethornis anthophilus</i>	26

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Datos de localidad y colecta de especímenes de <i>Phaethornis anthophilus</i>	55
Apéndice B. Protocolo de PCR modificado para los genes ND2 y COI.	58
Apéndice C. Electroforesis de los amplicones de los genes COI y ND2.....	58
Apéndice D. Muestras de <i>Phaethornis anthophilus</i> utilizadas en los análisis genéticos.	58
Apéndice E. Registro fotográfico de la extracción de ADN y trabajo en el laboratorio.	59
Apéndice F. Registro de bitácora de laboratorio.	59

Resumen

Título: Análisis de Diversidad Genética de *Phaethornis anthophilus* en el Valle Medio del Río Magdalena*

Autor: Danilo Viviescas Ortiz**

Palabras Clave: Ermitaño, Filogeografía; Cordillera oriental; Valle del Magdalena; Subespecie.

Descripción:

Phaethornis anthophilus es un colibrí semiendémico con distribución en tierras bajas hacia el norte y oriente de Colombia y a lo largo del valle del Magdalena. Esta especie es considerada un modelo adecuado para evaluar la relación filogeográfica de poblaciones cis- y transandinas separadas por la Cordillera oriental, ya que en ambas vertientes han sido propuestas subespecies morfológicamente diferentes. El objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética y la filogeografía de *P. anthophilus* en Colombia usando genes mitocondriales. Se analizaron 53 muestras provenientes de 34 localidades, depositadas en colecciones biológicas (UIS-CT/IAvH-CT). Se extrajo ADN y se amplificaron dos genes mitocondriales (ND2 y COI) mediante PCR. Las secuencias fueron verificadas y editadas para generar los alineamientos. La diversidad y estructura genética se estimaron con los programas DnaSP6 y R. Adicionalmente, se construyeron redes de haplotipos en Network y filogenias en BEAST para describir el patrón filogeográfico de la especie. Se obtuvieron 25 secuencias para el gen ND2 y 46 para COI, generando un alineamiento concatenado de 1.299 pares de bases ($n = 22$). La red de haplotipos mostró dos haplogrupos principales: 1) la población de la Orinoquía (cisandina), altamente diferenciada de 2) las poblaciones del Caribe y del valle medio del Magdalena (transandinas). El árbol filogenético recuperó dos clados (cis- y transandino), cuya divergencia fue estimada en ~ 0.31 Ma. Los resultados respaldan la existencia de dos linajes evolutivos principales en *P. anthophilus*, que podrían corresponder a *P. a. fuscicapillus* (Orinoquía) y a *P. a. anthophilus* (Caribe y Magdalena medio). Estos resultados sugieren que la Cordillera oriental ha funcionado como una barrera vicariante, probablemente por la desconexión de los bosques al norte de la cordillera debido a cambios climáticos y marinos pasados.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Programa académico. Director: Enrique Arbeláez Cortés. Doctor en Ciencias Biológicas. Codirector: Fernando Rondón González. Doctor en Ciencias Biológicas.

Abstract

Title: Genetic Diversity Analysis of *Phaethornis anthophilus* in the Middle Magdalena River Valley*

Author(s): Danilo Viviescas Ortiz¹

Key Words: Hermit; Phylogeography; Eastern Cordillera; Magdalena Valley; Subspecies.

Description:

Phaethornis anthophilus, the Pale-bellied Hermit, is a semi-endemic hummingbird distributed in the lowlands of northern and eastern Colombia and along the Magdalena valley. This species is considered a suitable model for assessing the phylogeographic relationship between cis- and trans-Andean populations separated by the eastern Cordillera, as morphologically distinct subspecies have been proposed on both slopes. The objective of this study was to analyze the genetic diversity and phylogeography of *P. anthophilus* in Colombia using mitochondrial genes. Fifty-three samples from 34 localities, housed in biological collections (UIS-CT/IAvH-CT), were analyzed. DNA was extracted, and two mitochondrial genes (ND2 and COI) were amplified via PCR. The sequences were verified and edited to generate alignments. Genetic diversity and structure were estimated using DnaSP6 and R software. Additionally, haplotype networks were constructed in Network and phylogenies in BEAST to describe the species' phylogeographic pattern. We obtained 25 sequences for the ND2 gene and 46 for COI, generating a concatenated alignment of 1,299 base pairs (n = 22). The haplotype network revealed two main haplogroups: 1) the Orinoquía population (cis-Andean), which was highly differentiated from 2) the Caribbean and middle Magdalena valley populations (trans-Andean). The phylogenetic tree recovered two clades (cis- and trans-Andean), with an estimated divergence time of ~0.31 Ma. These results support the existence of two main evolutionary lineages in *P. anthophilus*, which could correspond to *P. a. fuscicapillus* (Orinoquía) and *P. a. anthophilus* (Caribbean and middle Magdalena). These findings suggest that the eastern Cordillera has acted as a vicariant barrier, likely due to the disconnection of forests north of the mountain range driven by past climatic and marine changes.

* Degree Work

¹Faculty of Sciences. School of Biology. Academic Program. Director: Enrique Arbeláez Cortés, Ph.D. in Biological Sciences. Co-director: Fernando Rondón González, Ph.D. in Biological Sciences.

Introducción

Los bosques húmedos y secos tropicales de tierras bajas en Colombia constituyen ecosistemas de gran riqueza biológica y alto endemismo, enmarcados dentro de los gradientes de diversidad más notables del neotrópico (Galeano et al., 1998; Kattan et al., 2004). Estos ambientes de estructura heterogénea sostienen una gran variedad de comunidades animales y vegetales. Su compleja composición, que incluye sotobosques densos, claros ribereños y parches de vegetación, favorece la coexistencia de especies estrechamente asociadas a los estratos bajos del bosque, como los colibríes ermitaños. Este grupo funcional de aves (subfamilia Phaethornithinae) se caracteriza por estar mayormente limitado al sotobosque de tierras bajas, donde sus especies se especializan en la polinización de flores de monocotiledóneas grandes, como las del género *Heliconia* (Duque et al., 2002; Stiles, 2004).

Estos ecosistemas han estado sujetos a ciclos de fragmentación y reconexión recurrentes, condicionando la distribución y diferenciación de numerosas especies del sotobosque (Haffer, 1969; Caro et al., 2013). En este contexto, la familia de los colibríes (Trochilidae) protagonizó una de las radiaciones adaptativas más rápidas y diversas del neotrópico (McGuire et al., 2014). Mientras numerosos colibríes no ermitaños aprovecharon la aparición de gradientes altitudinales para colonizar ecosistemas montañosos, los ermitaños conservaron una fuerte asociación con los bosques húmedos de tierras bajas, mostrando menor capacidad de diversificación en ambientes de mayor elevación (Stiles, 2004).

Dentro de este linaje, *Phaethornis anthophilus* (Bourcier, 1843) destaca por ser un colibrí semiendémico de Colombia, Panamá y Venezuela, cuya distribución se extiende a tres regiones contrastantes: la costa Caribe, el valle del Magdalena y la Orinoquía (Stiles, 1993). Estas

poblaciones habitan ambientes que difieren en su cobertura y régimen climático, desde el bosque seco tropical en el Caribe, hasta mosaicos de bosque seco y húmedo en el Magdalena medio, y sabanas con parches de bosque en la Orinoquía (González-M et al., 2018; Castaño et al., 2024). La distribución de la especie en ambos lados de la cordillera oriental plantea interrogantes sobre el papel de esta barrera en la diferenciación genética, en relación con la posibilidad de conectividad histórica facilitada por corredores pleistocénicos (Cadena et al., 2016; Haffer, 1969).

En Colombia, la cordillera oriental marca una barrera indiscutible para algunas poblaciones de especies de tierras bajas orientales (cisandinas) y occidentales (transandinas) (Rodríguez-Muñoz et al., 2022). Este patrón de vicarianza ha sido documentado ampliamente en diversos taxones, desde anfibios hasta aves de sotobosque (Avendaño et al., 2017; Rodríguez-Muñoz et al., 2022). No obstante, la visión de los Andes como una barrera absolutamente infranqueable ha sido matizada por estudios que evidencian episodios de flujo génico facilitados por pasos de baja elevación o por la dispersión rodeando su extremo norte (Cadena et al., 2016; Haffer, 1969; Nores, 2004). En este contexto histórico, los ciclos climáticos del Pleistoceno habrían favorecido procesos recurrentes de aislamiento y reconexión, dando lugar a patrones filogeográficos complejos (Miller et al., 2008).

De manera complementaria, los ríos interandinos han funcionado como barreras para especies de montaña o como corredores para el flujo de genes, dependiendo del taxón (Hurtado-Gómez et al., 2024; Sandoval-H., 2017). En particular, el río Magdalena, delimitado por las cordilleras central y oriental, ha sido interpretado como una barrera en reptiles, como lo evidencia la diferenciación genética en la serpiente semiacuática *Helicops danieli* (Hurtado-Gómez et al., 2024). Sin embargo, también se ha documentado su papel como corredor biológico; por ejemplo,

Sandoval-H (2017) detectó ausencia de estructura genética asociada al valle del Magdalena en cuatro especies de aves de tierras bajas. De manera similar, en el mono araña marrón (*Ateles hybridus*) se registró ausencia de diferenciación genética entre poblaciones de ambas vertientes del río Magdalena (Link et al., 2015).

Los estudios morfológicos preliminares de *P. anthophilus* sugieren la existencia de diferencias poblacionales que podrían corresponder a linajes divergentes (Stiles, 1993). Aunque aún se carece de evidencia genética que lo confirme, la presencia de divergencias crípticas documentadas en otras especies del mismo género (McGuire et al., 2014; do Nascimento et al., 2025) hace plausible que este patrón también ocurra en *P. anthophilus*. Esto resalta la necesidad de evaluar su diversidad genética dentro de un marco filogeográfico para esclarecer su historia evolutiva.

Para llevar a cabo este tipo de análisis, las colecciones biológicas son fundamentales. Estas resguardan especímenes con datos de procedencia que permiten integrar información genética, morfológica y geográfica en un contexto espacial y temporal (Suarez y Tsutsui, 2004). Gracias a que los especímenes preservados constituyen registros permanentes y verificables, es posible comparar muestras históricas y actuales para evaluar la variación entre poblaciones, reconstruir cambios en los patrones de biodiversidad y generar evidencia clave para la delimitación taxonómica y el diseño de estrategias de conservación (Arbeláez-Cortés et al., 2017; Clemann et al., 2014; Arengo et al., 2017; Cuervo et al., 2023).

Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar la diversidad genética de las poblaciones de *P. anthophilus* en el valle del río Magdalena y la Orinoquía, mediante el uso de los marcadores mitocondriales ND2 y COI. Se buscó identificar patrones de variación y

diferenciación poblacional, así como reconstruir la historia filogeográfica de la especie en una región marcada por importantes barreras geográficas.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Analizar la diversidad genética de las poblaciones de *Phaethornis anthophilus* en el valle medio del río Magdalena mediante el estudio de la variabilidad en la región mitocondrial mtND2 y mtCOI.

1.2 Objetivos Específicos

1. Obtener secuencias de ADN mitocondrial (mtND2 y mtCOI) de *P. anthophilus* mediante extracción de ADN, amplificación por PCR y secuenciación por el método de Sanger.
2. Evaluar la diversidad genética en las poblaciones de *P. anthophilus* del valle medio del río Magdalena y determinar posibles patrones filogeográficos mediante reconstrucción filogenética.

2. Competencias Desarrolladas

1. El pasante gestionó, procesó y curó muestras biológicas en colecciones científicas.
2. El pasante aplicó métodos de extracción y amplificación de ADN a partir de muestras de tejidos depositados en una colección científica.
3. El pasante utilizó herramientas y softwares bioinformáticos para el análisis genético.
4. El pasante analizó e interpretó los resultados genéticos en un contexto filogeográfico.
5. El pasante elaboró un informe y presentación con los resultados obtenidos.

3. Materiales y Metodología

3.1 Obtención de muestras

Para este trabajo de investigación se analizaron 53 muestras de tejido y ADN de ejemplares de *Phaethornis anthophilus* procedentes de 10 departamentos de Colombia (Figura 1). De las muestras totales, 22 correspondieron a tejidos (músculo pectoral, hígado o corazón) preservados en congeladores a -130 °C y depositados en la Colección de Tejidos de la Universidad Industrial de Santander (UIS-CT), asociada a la Colección Ornitológica (UIS-AV) (Arbeláez-Cortés, 2024) del Museo de Historia Natural de la UIS (MHN-UIS). La mayoría de ellas provenían de Santander, de los municipios de San Vicente de Chucurí, El Guacamayo y Puerto Wilches, y de Bolívar con una localidad en Cantagallo; estas muestras representaron ambas márgenes del río Magdalena. Las 31 muestras restantes se obtuvieron en calidad de préstamo de la Colección de Tejidos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH-CT) (Borja-Acosta y Leyton-Ramos, 2024) y ya contaban con ADN extraído. Estas muestras procedieron principalmente de dos regiones: los llanos orientales, en departamentos como Arauca y Casanare, y la costa Caribe, en Cesar y Sucre, aunque también incluyeron material de otros departamentos como Chocó, Antioquia, Caldas y Cundinamarca (Apéndice A).

3.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de cortes de fragmentos de tejidos criopreservados depositados en UIS-CT; para esto se siguieron estrictamente los protocolos de manejo establecidos para la Colección. Posteriormente, los fragmentos fueron procesados mediante el kit comercial BioBasic EZ-10 Spin Column Genomic, siguiendo las recomendaciones del fabricante para la extracción en tejidos como músculo, hígado y corazón. El protocolo fue modificado únicamente

en la etapa de digestión del tejido, prolongando la acción de la proteinasa K a 56 °C durante 15 horas para garantizar una lisis completa (Apéndice E). El ADN obtenido, con concentraciones aproximadas entre 100 y 200 ng/μL, fue almacenado a -20 °C en tubos Eppendorf en refrigeradores del Laboratorio de Biología Evolutiva y fue rotulado con el número de colección. La extracción exitosa y cantidad del ADN fue verificada cualitativamente mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) preparado en buffer TAE al 1X y teñido con HydraGreen®, y finalmente fue visualizado en una cámara de luz ultravioleta.

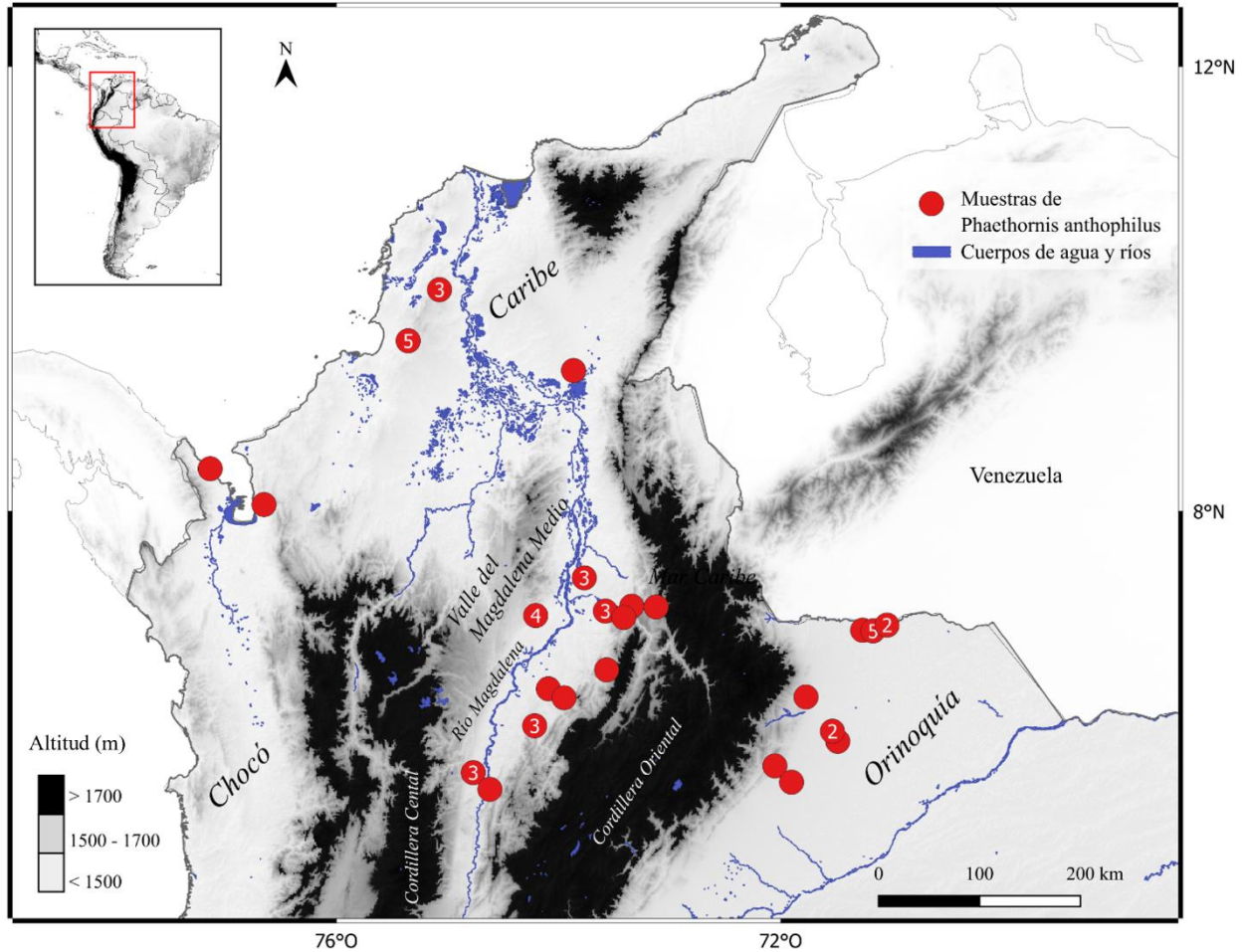
3.3 Amplificación por PCR y electroforesis

Para el análisis genético, se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dos fragmentos de genes mitocondriales: la subunidad 2 del NADH deshidrogenasa (ND2) y la subunidad I del citocromo C oxidasa (COI). La amplificación del gen ND2 se llevó a cabo utilizando los cebadores L5215 (5'-TATCGGGCCCATAACCCCGAAAAT-3') y H6313 (5'-ACTCTTRTTTAAGGCTTTGAAGGC-3') (Sorenson et al., 1999). Para el gen COI se emplearon los cebadores COIbirdF1 (5'-TTCTCGAACCAGAAAGACATTGGCAC-3') y COIbirdR2 (5'-ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTGG-3') (Kerr et al., 2007).

Las reacciones de PCR se estandarizaron en un volumen final de 15 μL con un mastermix de reacción que contenía buffer de reacción a una concentración de 1X, MgSO₄/MgCl₂ a 1.5 mM, dNTPs a 0.2 μM, cada cebador a 0.4 μM, entre 0.6 y 0.8 U de Taq ADN polimerasa y entre 30 y 50 ng de ADN molde. Para el termociclado se aplicó un protocolo para los dos genes (Tabla 1). Adicionalmente, con el objetivo de estandarizar las condiciones de PCR para cada gen, para ello, se probaron dos protocolos alternativos (Apéndice B), comparando de forma cualitativa la intensidad de las bandas para verificar un posible aumento en el rendimiento de la amplificación.

Figura 1

Distribución de las muestras de Phaethornis anthophilus en Colombia.



Nota. Distribución de las 53 muestras de *P. anthophilus* disponibles para obtener información genética. Cada punto representa un individuo y, en el caso de los puntos con números, indica la cantidad de muestras ubicadas en el área correspondiente. En color azul se señalan los principales ríos de Colombia, mientras que la escala de grises representa la elevación en metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.).

La verificación de los productos de PCR o amplicones se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % (p/v) en buffer TAE 1X, teñidos con HydraGreen®. En cada corrida

se incluyeron 1.5 μ L del marcador de peso molecular 1 kb DNA Ladder (New England Biolabs) para estimar el tamaño de los fragmentos mitocondriales amplificados. Los geles fueron visualizados en el equipo Enduro™ GDS y en cámara de luz ultravioleta, y se generó un registro fotográfico y documental de los resultados con el objetivo de garantizar la trazabilidad (Apéndice F). Se consideraron satisfactorios aquellos resultados que presentaron bandas nítidas, con intensidad adecuada y con el tamaño esperado para cada gen; en caso contrario, se repitieron las PCR de las muestras que no mostraron resultados. Finalmente, se prepararon 106 muestras correspondientes a los dos genes mitocondriales ND2 y COI, las cuales fueron enviadas al Servicio de Secuenciación y Análisis Molecular (SSiGMoL) de la Universidad Nacional de Colombia para su procesamiento mediante secuenciación automática por electroforesis capilar.

Tabla 1

Protocolo de termociclado bifásico para la amplificación de los genes ND2 y COI.

Etapa	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicial	Desnaturalización	94 °C	1 min	1
	Desnaturalización	94 °C	15 s	
Fase ciclos A	Hibridación	55 °C	30 s	15
	Extensión	72 °C	30 s	
	Desnaturalización	94 °C	15 s	
Fase ciclos B	Hibridación	50 °C	30 s	40
	Extensión	72 °C	30 s	
Final	Extensión final	72 °C	7 min	1

Nota. Se empleó un protocolo de PCR en dos fases para garantizar la amplificación eficiente de ambos genes, considerando las diferencias en la temperatura de fusión (T_m) de sus cebadores. Durante la primera fase (Ciclos A), se utilizó una temperatura de hibridación elevada de 55 °C, favoreciendo la unión específica de los cebadores con mayor T_m (L5215, $T_m = 64.7$ °C;

COIbirdF1/R2, $T_m = 66.3$ °C). En la segunda fase (Ciclos B), la temperatura de hibridación se redujo a 50°C, permitiendo la amplificación del cebador con T_m más baja (H6313, $T_m = 60.1$ °C).

3.4 Edición de secuencias y generación de alineamientos

Las secuencias de ADN recibidas fueron verificadas y editadas en varios pasos: inicialmente, se utilizó el software SeqTrace v0.9.0 (Stucky, 2021) para inspeccionar visualmente los cromatogramas de cada secuencia y evaluar la calidad de las bases nucleotídicas detectadas, con el fin de determinar posibles errores de lectura. Las secuencias fueron empalmadas por agrupación automática, indicando los nombres de los primers *forward* y *reverse* para cada gen y posteriormente fueron agrupadas por número de colecta o ID de las muestras, generando así un set de secuencias alineadas y un consenso para cada una de ellas. Después se aplicó un filtro de calidad estricto, estableciendo un umbral de confianza Phred score de 20 (Ewing et al., 1998; Ewing y Green, 1998). Cualquier base cuya puntuación fuera inferior a este valor ($\text{score} < 20$) fue automáticamente marcada como ambigua y representada con la letra “N”. Las discrepancias entre las lecturas *forward* y *reverse* fueron resueltas manualmente, contrastando las bases en conflicto con sus respectivos picos en los cromatogramas.

Posteriormente, las secuencias consenso de cada gen (ND2 y COI) fueron alineadas por separado utilizando el software BioEdit v5.0.9 (Hall, 1999). Para el gen ND2, el alineamiento se realizó tomando como referencia la secuencia de *P. anthophilus* disponible en GenBank (número de acceso: EU042574) (McGuire et al., 2014). En el caso del gen COI, al no existir reportes previos en GenBank para *P. anthophilus*, se utilizó como referencia la secuencia más cercana obtenida mediante una búsqueda BLAST, la cual correspondió a *Phaethornis griseogularis* (número de acceso: PV403453), con un 94.77 % de coincidencia.

Para la etapa final de edición de las secuencias, se revisó cuidadosamente todo el alineamiento y cada sitio variable fue comprobado nuevamente en los cromatogramas para asegurar que se tratara de polimorfismos reales y no de errores de lectura o ambigüedades. Además, se recortaron los extremos 5' y 3', tanto al inicio como al final del producto secuenciado, donde generalmente se presentan errores. Así, se obtuvo un conjunto de datos editados y alineados de 667 pares de bases (pb) para el gen ND2 y de 632 pb para el COI, listo para los análisis de diversidad genética y filogeográficos.

3.5 Análisis de diversidad genética

3.5.1 Redes de haplotipos

Se generaron las redes de haplotipos en Network v10.2 (Fluxus Technology Ltd, 2019) a partir de las matrices de alineamiento de cada gen mitocondrial (ND2 y COI). Para los análisis del ND2 se incluyó la secuencia reportada de *P. anthophilus* en GenBank (Número de Acceso: EU042574) (McGuire et al., 2014). Se evaluaron las relaciones genéticas entre haplotipos mediante la construcción de redes utilizando el algoritmo Median-Joining (Bandelt et al., 1999), el cual agrupa haplotipos estrechamente relacionados e incorpora nodos hipotéticos que representan haplotipos “ancestrales”, conectando los observados en una red parsimoniosa. Se fijó el parámetro ϵ en cero para maximizar la parsimonia de la reconstrucción.

Posteriormente, las redes obtenidas fueron editadas y representadas gráficamente, manteniendo las proporciones entre el tamaño de cada haplotipo y el número de individuos, lo que permitió visualizar la distribución de los haplotipos, así como la cantidad de pasos mutacionales que los separan. En este caso, y siguiendo a Stiles (1993), se definieron como poblaciones tres áreas de distribución de *P. anthophilus*: la población de la Orinoquía (cisandina) y las del Caribe

junto con las del valle medio del Magdalena (transandinas). Para el gen COI se revisaron las secuencias correspondientes a haplotipos compartidos entre las tres poblaciones y aquellas relacionadas con la Orinoquía, con el fin de verificar que la secuencia consenso estuviera completamente respaldada por valores de calidad superiores a 20 (Score > 20) en ambas direcciones (*forward* y *reverse*).

3.5.2 Diversidad y estructura genética

A partir de las secuencias depuradas y alineadas, se evaluó la variabilidad genética y la diferenciación entre poblaciones para cada gen (ND2 y COI). Se calculó la diversidad haplotípica (H_d), la diversidad nucleotídica (π), el número de haplotipos (h) y de sitios polimórficos (S), así como el estadístico Φ_{st} , que cuantifica la fracción de variación atribuible a diferencias entre localidades. Las estimaciones se realizaron en R v4.3.0 (R Core Team, 2023) y DnaSP v6.12.03 (Rozas et al., 2017), considerando tanto el conjunto total de individuos como cada población por separado, utilizando la misma definición de agrupamientos poblacionales establecida para las redes de haplotipos. La magnitud de Φ_{st} fue interpretada siguiendo los criterios de Wright (1978), lo que permitió contrastar la variación genética intra e interpoblacional e identificar posibles patrones de estructura genética.

3.6 Inferencia bayesiana

La reconstrucción filogenética se realizó en el software BEAST v2.7.7 (Bouckaert et al., 2019), considerando dos particiones independientes correspondientes a los genes mitocondriales ND2 y COI. El modelo de sustitución óptimo para cada gen fue determinado en jModelTest v2.1.10 (Darriba et al., 2012) mediante el criterio de información de Akaike (AICc) (El mejor modelo para cada gen fue HKY). Las secuencias fueron combinadas en un único archivo de alineamiento y las particiones fueron definidas manualmente en el archivo de entrada NEXUS, configurando modelos

de sitios no enlazados (*unlink site models*) y un reloj molecular independiente para cada gen, a fin de obtener la estimación de tasas de sustitución específicas. La calibración temporal se estableció con base en tasas evolutivas para aves paseriformes reportadas por Lerner et al. (2011), aplicando un modelo de reloj molecular estricto con valores de 2.9×10^{-2} sustituciones/sitio/Ma para el gen ND2 y 1.6×10^{-2} sustituciones/sitio/Ma para el gen COI.

Las búsquedas MCMC se ejecutaron durante 20 millones de generaciones, con muestreo cada 1.000 generaciones. La convergencia de las cadenas fue verificada en Tracer v1.7.2 (Rambaut et al., 2018), confirmando valores de tamaño efectivo de muestra (ESS) > 200 para los parámetros estimados. El árbol consenso fue obtenido con TreeAnnotator v2.7.7, aplicando un *burn-in* del 10%. Finalmente, el árbol fue visualizado y editado en FigTree v1.4.5 (Rambaut, 2018), resaltando los intervalos de credibilidad en las estimaciones nodales para facilitar su interpretación.

4. Resultados

4.1 Obtención y características de las secuencias

Al comparar los resultados de los dos protocolos de termociclado, se observaron diferencias en la intensidad de las bandas obtenidas: mientras que el protocolo uno generó bandas más tenues, el protocolo dos produjo bandas más definidas e intensas cualitativamente, por lo que se seleccionó el segundo protocolo de termociclado para la amplificación de los productos PCR de los dos genes (Apéndice B). Se verificaron la calidad de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa, y se observaron bandas nítidas de la longitud esperada para los genes ND2 y COI (Apéndice C).

De las 106 muestras que se procesaron y enviaron para secuenciación (53 por cada gen), se obtuvieron exitosamente 25 secuencias del gen ND2 y 46 secuencias del gen COI (Apéndice D). Todas las secuencias están almacenadas en los computadores del Laboratorio de Biología Evolutiva de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander y serán depositadas en el repositorio público GenBank una vez el manuscrito sea aceptado para publicación.

Tras ensamblar, editar y depurar las secuencias, la longitud final de los fragmentos alineados fue de 667 pares de bases (pb) para el gen ND2 y 632 pb para el gen COI. Para el análisis de genes concatenados, se utilizaron las 22 muestras que presentaron secuencias completas para ambos genes (ND2 y COI). Con estas muestras, se generó una matriz de datos de alineamiento con una longitud total de 1.299 pb (Apéndice D).

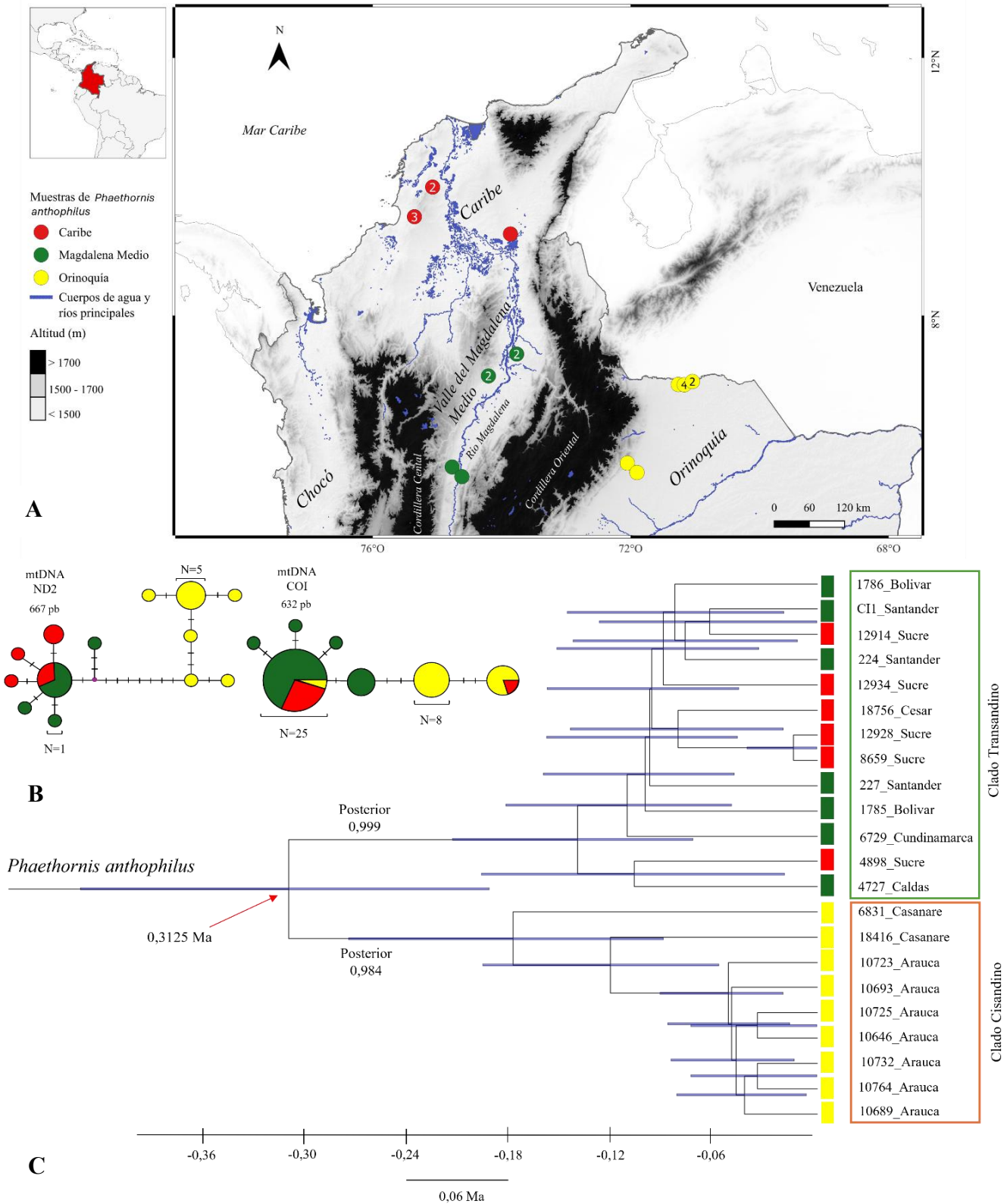
4.2 Diversidad y estructura genética de las poblaciones

4.2.1 Relaciones entre haplotipos

La red del gen ND2 ($n = 26$ muestras; 667 pb) mostró una estructura genética marcada. Los haplotipos de la población de la Orinoquía formaron un grupo claramente diferenciado, separado por un total de ocho pasos mutacionales del haplogrupo más cercano, conformado por los haplotipos de las poblaciones del Caribe y del Magdalena medio (Figura 2B). Para este análisis se incluyó una secuencia de referencia de GenBank procedente de Caracas, Venezuela (Número de Acceso: EU042574), la cual se agrupó con los haplotipos de la Orinoquía, ampliando así la distribución geográfica de este linaje.

Figura 2

Distribución geográfica, red de haplotipos y filogenia datada de Phaethornis anthophilus.



Nota. (A) Mapa de distribución de las localidades muestreadas, con los colores correspondientes a cada región. (B) Redes de haplotipos obtenida mediante el método *Median-Joining*: la red de la izquierda corresponde al gen ND2, construida a partir de 26 secuencias ($n = 26$) de 667 pares de bases (pb). El tamaño de cada haplotipo es proporcional a su frecuencia, y los colores representan las tres poblaciones de origen: Caribe (rojo), Magdalena medio (verde) y Orinoquía (amarillo). La red de la derecha corresponde al gen COI, construida a partir de 46 secuencias ($n = 46$) de 632 pb. (C) Árbol filogenético obtenido en BEAST a partir de secuencias concatenadas de ND2 y COI, calibrado con tasas evolutivas estimadas para genes mitocondriales en aves (ND2: 2.9×10^{-2} y COI: 1.6×10^{-2} sustituciones/sitio/Ma). Las barras azules representan intervalos de credibilidad del 95% para las fechas de divergencia. La escala horizontal indica el tiempo en millones de años (Ma).

Por su parte, la red del gen COI ($n = 46$; 632 pb) presentó una menor estructura filogeográfica. El patrón estuvo dominado por un haplotipo central y frecuente, compartido por individuos de las tres regiones (Orinoquía, Magdalena medio y Caribe) (Figura 2B). Adicionalmente, se detectó un haplotipo secundario compartido exclusivamente por individuos de las poblaciones del Caribe y la Orinoquía. En esta red se incorporó una muestra del norte del Chocó (Reserva Integral Sasardí), que presentó un haplotipo propio, pero cercanamente relacionado con el haplotipo predominante del Magdalena medio.

En conjunto, los análisis de ambos genes mostraron una diferenciación entre la población de la Orinoquía y las poblaciones transandinas (Caribe y Magdalena medio), aunque difirieron en el grado de resolución. Este contraste podría explicarse por las distintas tasas de mutación de cada gen (ver Lerner et al., 2011). El ND2, con una tasa evolutiva más rápida, reveló una estructura

poblacional más reciente mientras que el COI, de tasa de evolución más lenta, reflejó patrones de conexión más antigua.

4.2.2 Diversidad genética y estructura poblacional

Se analizaron de forma independiente los marcadores mitocondriales ND2 y COI para evaluar la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *P. anthophilus* de la región Caribe, Magdalena medio y Orinoquía. Para el gen ND2, el análisis reveló un total de 21 sitios polimórficos que definieron 12 haplotipos. La diversidad haplotípica (H_d) fue alta en la población de la región Caribe ($H_d = 0.809$) y moderada en las del Magdalena medio ($H_d = 0.642$) y Orinoquía ($H_d = 0.755$), mientras que la diversidad nucleotídica (π) fue baja en general (Tabla 2). En cuanto a la estructura poblacional, se mostró una diferenciación genética baja pero significativa entre las poblaciones del Caribe y el Magdalena medio ($\Phi_{st} = 0.105$; $p = 0.04$). Por el contrario, se encontró una diferenciación muy alta y significativa entre la población de Orinoquía y las otras dos poblaciones (Caribe vs. Orinoquía, $\Phi_{st} = 0.851$, $p < 0.01$; Magdalena medio vs. Orinoquía, $\Phi_{st} = 0.843$, $p < 0.01$).

Por su parte, el análisis del gen COI detectó 8 sitios polimórficos que conformaron 7 haplotipos. La diversidad haplotípica más alta se encontró en la población del Magdalena medio ($H_d = 0.564$), seguida por la del Caribe ($H_d = 0.513$), mientras que la población de Orinoquía presentó la diversidad más baja ($H_d = 0.25$). La diversidad nucleotídica se mantuvo baja en todas las poblaciones (Tabla 2). Los valores de Φ_{st} para este marcador también indicaron una fuerte estructura poblacional, con una diferenciación muy alta entre Magdalena medio y Orinoquía ($\Phi_{st} = 0.737$; $p < 0.01$) y moderadamente alta entre Caribe y Orinoquía ($\Phi_{st} = 0.579$; $p < 0.01$).

Tabla 2

Índices de diversidad genética de Phaethornis anthophilus en las tres regiones de estudio para los genes ND2 y COI.

ND2 / Población	N (sec.)	S (sitios polim.)	h (haplotipos)	Hd (div. haplotípica)	π (div. nucleotídica)
Caribe	7	3	4	0,80952	0,00171
Magdalena medio	8	5	4	0,64286	0,00187
Orinoquía	10	6	5	0,75556	0,00300
Total	25	21	12	0,88333	0,00932
COI / Población	N (sec.)	S (sitios polim.)	h (haplotipos)	Hd (div. haplotípica)	π (div. nucleotídica)
Caribe	8	5	2	0.51333	0,00198
Magdalena medio	25	4	5	0.56410	0,00091
Orinoquía	13	5	3	0.25000	0,00219
Total	46	8	7	0,66377	0,00292

Nota. N corresponde al número de secuencias analizadas; S, al número de sitios polimórficos; h es el número total de haplotipos; Hd indica la diversidad haplotípica, es decir, la probabilidad de que dos secuencias elegidas al azar difieran; π representa la diversidad nucleotídica, calculada como la proporción promedio de diferencias por sitio entre dos secuencias.

4.3 Relaciones filogenéticas en *Phaethornis anthophilus*

La reconstrucción filogenética por inferencia bayesiana, basada en el conjunto concatenado (ND2 y COI; n = 22; 1.299 pb), resolvió con alta certidumbre las relaciones dentro de *P. anthophilus* (Figura 2C). El árbol de máxima credibilidad recuperó dos clados bien definidos: el primero reunió las muestras de la región Caribe y del Magdalena medio al norte y occidente de la cordillera oriental, mientras que el segundo correspondió a las poblaciones de la Orinoquía al este de la cordillera (Figura 2A), ambos con soporte posterior alto (pp = 0.999 y pp = 0.984, respectivamente).

La composición de estos dos clados resultó congruente con la estructura geográfica y con los haplogrupos de la red de datos concatenados. El clado I (cisandino) agrupó de forma exclusiva a los individuos de la Orinoquía, mientras que el clado II (transandino) reunió todas las muestras provenientes del Caribe y del valle del Magdalena medio. La baja diferenciación interna dentro del clado II Caribe/Magdalena medio fue consistente con la baja estructura genética entre estas dos regiones ($\Phi_{st} \approx 0.105$, $p = 0.31$), en contraste con la alta estructura de Orinoquía, respecto a las demás poblaciones ($\Phi_{st} = 0.793$ y 0.819 , $p < 0.01$).

Finalmente, el análisis de datación molecular calibrado con tasas de sustitución específicas de paseriformes para cada gen permitió estimar la escala temporal de la divergencia o el tiempo al ancestro común más reciente para los clados cis y transandinos, siendo aproximadamente hace 312 mil años, con intervalos de credibilidad del 95% (HPD) entre los 194 mil y 435 mil años.

5. Discusión

5.1 La cordillera oriental como barrera geográfica

A diferencia de la visión tradicional que consideraba a la cordillera de los Andes como una barrera responsable de vicarianza generalizada en diferentes especies, hoy en día existen estudios que documentan cruces episódicos a través de la cordillera en especies con distribución en ambas vertientes (Avendaño et al., 2013; Miller et al., 2008; Cadena et al., 2016). Los resultados obtenidos para *Phaethornis anthophilus* muestran evidencia de una separación clara a ambos lados de la cordillera oriental; sin embargo, la estimación de divergencia entre los clados cis y transandinos, ocurrida hace aproximadamente 312 mil años, sugiere que este patrón no se relacionaría con la orogenia andina, ya que las montañas alcanzaron sus elevaciones actuales hace aproximadamente

2.7 millones de años, ni tampoco correspondería a un evento de cruce reciente (Gregory-Wodzicki, 2000; Hoorn et al., 2010).

Si bien los datos mitocondriales muestran que la cordillera oriental actúa como una barrera para el flujo de genes entre las poblaciones cis y transandinas y que, en parte, ha facilitado el aislamiento de estas poblaciones, por ejemplo, debido a la altura de sus montañas, también se ha demostrado que la cordillera no siempre funciona como una barrera infranqueable, sino más bien como un filtro semipermeable cuya efectividad varía según el relieve, el clima y la ecología de cada taxón (Cadena et al., 2016; Avendaño et al., 2013). En reptiles, el estudio de Arteaga et al. (2024) evidenció que la diversificación de la víbora de pestañas *Bothriechis schlegelii* ha sido impulsada por el aislamiento geográfico en los Andes, donde la cordillera central y oriental de Colombia separan a especies recientemente descritas como *Bothriechis khwargi* y *Bothriechis klebbai*, confinadas a valles interandinos específicos como el del río Cauca y el río Magdalena.

En el colibrí *Polytmus guainumbi*, la presencia transandina se explica por expansiones de pastizales durante el Pleistoceno que facilitaron la colonización desde el oriente, manteniendo la conectividad entre las poblaciones cis y transandinas, sin requerir un evento vicariante (Avendaño et al., 2013). De igual modo, se observa un patrón filogeográfico comparable en *Premnoplex brunnescens* (Valderrama et al., 2014), *Henicorhina leucophrys* (Caro et al., 2013) y *Myiothlypis coronata* (Prieto-Torres et al., 2018), donde la diferenciación genética coincide igualmente con divergencias acústicas o morfológicas. Por otro lado, en el complejo *Turdus ignobilis*, Avendaño et al. (2017) mostraron que la cordillera oriental también delimita linajes y que incluso en especies con mayor tolerancia altitudinal y ecológica pueden presentarse linajes claramente delimitados por la cordillera oriental. Esto sugiere que *P. anthophilus* podría presentar diferencias morfológicas entre ambas vertientes, como lo documenta Stiles (1993), las cuales podrían corresponder con los

resultados obtenidos y estar impulsadas por limitaciones fisiológicas que restringen a la especie a tierras bajas (Stiles, 2004), manteniendo a estas poblaciones en Colombia con diferenciación genética y morfológica.

Todos estos casos indican que el patrón cis/trans es recurrente en aves y que el quiebre filogeográfico detectado para *P. anthophilus* forma parte de una tendencia más amplia de diversificación de aves neotropicales. Por ejemplo, en algunas especies como *Dendrocincla fuliginosa* y *Xenops minutus*, Arbeláez-Cortés (2020) documentó linajes cis y transandinos, aunque se encontró que la mayor parte de la ruptura filogeográfica ocurría entre las poblaciones cisandinas de la Amazonía y la Orinoquía, más que entre aquellas separadas por la cordillera oriental, es decir, entre las poblaciones cis y transandinas, donde *D. fuliginosa* incluso comparte haplotipos.

Los resultados son similares a los de la red de haplotipos del gen COI de *P. anthophilus*, donde también se identificaron haplotipos compartidos. En este caso, se identificaron dos haplotipos: uno compartido por las tres poblaciones y otro exclusivo de cinco individuos de las poblaciones de la región Caribe (4) y de la Orinoquía (1), en localidades como Hato Corozal y Pore en Casanare, y San Onofre en Sucre. Esto indica que probablemente existió una conexión entre la población de la Orinoquía cisandina y la de la región Caribe más que con las del valle del Magdalena. Por su parte, esto no se aprecia en la red del gen ND2, la cual muestra una estructura ya diferenciada entre poblaciones, es decir, sin haplotipos compartidos, mostrando una mayor resolución filogeográfica en similitud con lo encontrado por diferentes estudios (Main et al., 2024; Weitemier et al., 2021). Esto podría explicarse por las diferentes tasas de mutación calculadas para cada uno de estos genes (ver Lerner et al., 2011).

Ahora bien, estos haplotipos compartidos en el gen COI y el análisis filogenético evidencian que la cordillera oriental fue atravesada o rodeada por su parte norte durante el

Pleistoceno. Existen estudios que apoyan la hipótesis de que individuos de *P. anthophilus* pudieron haber atravesado la cordillera oriental por pasos bajos, como lo documentan Avendaño et al. (2013), quienes registraron extensiones de rango de especies típicamente cisandinas hacia el occidente de los Andes colombianos. De manera complementaria, Cadena et al. (2016) y Rodríguez-Muñoz et al. (2022) señalaron que la cordillera oriental incluye zonas o pasos de baja elevación, como el que separa la cordillera oriental y los Andes de Mérida conocido como la depresión del Táchira, además de pasos al sur de la cordillera como el de Andalucía y los valles de Suaza-Pescado en la unión de la cordillera central y oriental.

Una eventual dispersión rodeando por las tierras bajas del norte de la cordillera oriental, bien fuera a través de la depresión del Táchira o rodeando toda la cordillera por Mérida y la costa norte de Venezuela, podría explicar cómo las poblaciones se establecieron en la Orinoquía, más que por pasos bajos en el sur a lo largo del valle del Magdalena, como cruzar por los pasos de Andalucía y el valle de Suaza-Pescado, que están a mayor altura (Cadena et al., 2016). Esta hipótesis cobra más fuerza al compararla con las dos subespecies reportadas por Stiles (1993) en su análisis de morfometría y coloración en *P. anthophilus*, las cuales podrían coincidir con los dos linajes detectados en los resultados. Según Stiles (1993), las poblaciones al este de los Andes, entre la Serranía del Perijá y el sur de Norte de Santander, cerca de la depresión del Táchira, hasta la Orinoquía, son similares en el largo del pico y en la coloración, por lo que las agrupó en una sola subespecie; sin embargo, concluyó que posiblemente las poblaciones venezolanas de los llanos corresponderían a la subespecie de la Orinoquía, mientras que las de la costa norte serían poblaciones afines con las presentes en la región Caribe y, por ende, con las del valle medio del Magdalena. En este contexto, resulta relevante profundizar en la estructura filogeográfica de los bosques de Norte de Santander.

En este sentido, se analizó la secuencia del gen ND2 de un individuo de *P. anthophilus* del Distrito Federal de Venezuela (Caracas) (Número de Acceso: EU042574; McGuire et al., 2014), la cual en la red de haplotipos se agrupó con las de la Orinoquía cisandina, apoyando así la posible relación entre las poblaciones de los llanos orientales de Colombia y Venezuela. No obstante, se reconoce que son necesarias más muestras al este de la cordillera oriental en Venezuela para determinar la estructura poblacional en esta región. Asimismo, resulta útil obtener muestras al oeste, en la costa norte, para poner a prueba las relaciones poblacionales entre ambas vertientes de la cordillera oriental por Mérida y evaluar cómo se relacionan con las poblaciones cis y transandinas en Colombia.

5.2 El rol del valle medio del río Magdalena como corredor genético

Por el contrario de lo observado entre las poblaciones separadas por la cordillera oriental, las poblaciones transandinas de la región Caribe y del valle del Magdalena presentaron baja estructura genética, lo que permite proponer al valle medio del río Magdalena como un posible corredor para el flujo de genes y al río mismo sin un rol como barrera. Como ya documentaron Sandoval-H et al. (2017) para cuatro especies de aves de tierras bajas (*Xiphorhynchus susurrans*, *Mionectes oleagineus*, *Leptopogon amaurocephalus* y *Eucometis penicillata*), el río Magdalena no representa barrera al flujo génico, lo que resalta que esto puede deberse a la dispersión de estos taxones en las estrechas cabeceras de los ríos. De manera similar, estudios en aves neotropicales demuestran que especies con alta capacidad de dispersión, como los colibríes ermitaños (Moore et al., 2008), presentan ausencia de estructura genética en paisajes continuos (Avendaño et al., 2013; Cadena et al., 2011).

Este patrón de ausencia de diferenciación genética en las poblaciones transandinas de *P. anthophilus* coincide con lo documentado en aves de tierras bajas con amplia distribución en el

norte andino. Por ejemplo, Cadena et al. (2011) encontraron en el icterido *Chrysomus icterocephalus* ausencia de estructura entre poblaciones del Caribe y del Magdalena, lo que respalda la idea de que el río y el valle en su extensión no actúan como barrera, sino más bien como un corredor para el flujo de genes; aunque este corredor no sería el valle por sí mismo, sino la red de bosques que lo atraviesa a lo largo y ancho de la cuenca. En este estudio, se interpreta que, aunque los resultados de estructura genética actual de *P. anthophilus* reflejan una conectividad histórica a través de bosques húmedos, secos y de galería del valle medio hasta la costa Caribe, actualmente esta conectividad podría verse afectada por la deforestación de la matriz boscosa, ya que depende en buena medida de la continuidad forestal. Sin embargo, para evidenciarlo sería necesario emplear otro tipo de marcadores moleculares. No obstante, se considera que la elevada capacidad de dispersión de la especie podría contrarrestar, al menos parcialmente, estos riesgos para esta especie casi endémica.

La misma dinámica se observa en estudios de mamíferos de la cuenca del Magdalena. Link et al. (2015) demostraron que el mono araña *Ateles hybridus* mantiene conectividad parcial a lo largo de corredores ribereños, incluso en presencia de barreras fluviales como el río Magdalena, lo que resalta la función de los grandes ríos como corredores de flujo más que como fronteras absolutas, a pesar de que en las zonas bajas el ancho del río puede medir más de 3 km (Sandoval-H et al., 2017). En este caso, se considera relevante que los ermitaños pueden cruzar sobre cuerpos de agua distancias de hasta 300 metros (Moore et al., 2008), lo que sugiere que, aunque en la zona media y baja el río es más ancho, en las cabeceras sí sería factible el cruce. Asimismo, se entiende que las dinámicas del río ayudan a interpretar la distribución de los haplotipos, como por ejemplo la formación de meandros (Castañeda & Osorio, 2018), que podrían funcionar como islas que conectan regularmente a ambas vertientes del río.

No obstante, no todas las especies responden de la misma manera. En contraste con los ejemplos anteriores, Hurtado-Gómez et al. (2024) mostraron en la serpiente acuática *Helicops danieli* que la filogeografía presenta una fuerte estructuración entre cuencas hidrográficas del Magdalena, Catatumbo y Orinoquía, con divergencias profundas que reflejan un aislamiento más estricto en relación con la historia hidrológica y la topografía. A diferencia de mamíferos y aves que aprovechan pasos bajos y valles para mantener diferentes grados de conectividad, en *H. danieli* el patrón de distribución apunta a limitaciones de dispersión mucho más severas, en gran medida por el hábitat específico de quebradas de esta especie y por la fragmentación hidrológica que restringe los intercambios entre sistemas fluviales.

Por otro lado, en mariposas del complejo *Heliconius cydno*, la región del Magdalena medio no aparece como una zona de ruptura genética, sino como un eje de distribución longitudinal, por ejemplo, en el valle del Magdalena donde las poblaciones se mantienen conectadas (Arias et al., 2014). Los análisis de estructura poblacional y filogeográfica de Arias et al. (2014) muestran que las subespecies presentes en el valle forman parte de la misma estructura genética de *H. cydno*, sin evidencia de aislamiento profundo, aunque con diferenciación morfológica en los patrones de coloración de las alas. Esto podría ser un caso similar a los individuos del Norte de Santander de *P. anthophilus* que presentan mayor similitud en morfología y coloración con los especímenes de la Orinoquía cisandina que con especímenes del valle del Magdalena, al sur de La Guajira (Stiles, 1993). Sin embargo, como lo menciona Stiles, estas poblaciones podrían pertenecer a la estructura de las transandinas y a su vez estar relacionadas con las de la costa norte en Venezuela.

La ausencia de muestras en los departamentos de Cundinamarca, Huila y Tolima, que comprenden la extensión del valle del Magdalena en su zona alta, impide determinar con precisión hasta dónde se extiende el flujo génico y si algunos de estos haplotipos podrían compartir similitud

con los de la Orinoquía, ya sea por intercambio a través de pasos bajos situados al sur de la cordillera oriental (Cadena et al., 2016). De igual manera, no se ha definido con claridad el límite occidental de las poblaciones en la Orinoquía, por lo que sería de interés estudiar este límite y su relación con el alto Magdalena. Asimismo, la falta de muestras en el Chocó y Antioquia en el análisis concatenado de los dos genes dificulta establecer la extensión del flujo génico hacia el noroeste de Colombia. Sin embargo, para el análisis del gen COI existe una secuencia del Chocó en la localidad de la Reserva Integral Sasardí, con un haplotipo que se agrupa a la población del Magdalena y que podría ser congruente con las subespecies propuestas por Stiles (1993): *P. a. anthophilus*, distribuida en el noroeste del país desde la frontera con Panamá hasta La Guajira y a lo largo del valle del Magdalena, y *P. a. fuscicapillus*, presente en Norte de Santander y Zulia (Venezuela), con extensión hacia los llanos al este de la cordillera oriental.

5.3 Tiempo de divergencia y posibles procesos

Los resultados estimaron una divergencia de aproximadamente 312 mil años, lo cual, en el marco de la hipótesis de Haffer (1969), sugiere que las expansiones de bosques húmedos durante fases frías del Pleistoceno habrían abierto corredores boscosos de piedemonte y ribereños al norte de Colombia, facilitando el contacto entre poblaciones cis y transandinas y explicando la ausencia de un aislamiento profundo en *P. anthophilus*. No obstante, la falta de diferenciación estructural dentro de las poblaciones transandinas indica que este modelo, aunque útil, resulta insuficiente para explicar la dinámica actual. La propuesta de Nores (2004) es complementaria, ya que plantea que rutas alternativas fueron habilitadas por descensos y aumentos del nivel del mar (entre -150 m y +90 m) y la formación de planicies costeras en el norte de Suramérica hace aproximadamente 2.7 millones de años, facilitando expansiones y recolonizaciones locales. En *P. anthophilus*, estos procesos podrían explicar la ausencia de estructura genética dentro de las poblaciones

transandinas, dado que la dispersión recurrente a través de estas rutas habría evitado la acumulación de divergencias profundas.

Estudios más recientes han refinado estas hipótesis, destacando la importancia de pasos bajos en la cordillera oriental que, bajo condiciones climáticas favorables, pudieron permitir dispersión episódica de especies de tierras bajas (Cadena et al., 2016; Rodríguez-Muñoz et al., 2022). Para *P. anthophilus*, la presencia de un linaje cisandino en la Orinoquía es congruente con pasos bajos al norte de la cordillera oriental más que con pasos situados al sur. Además, se ha documentado que varias divergencias poblacionales en aves andinas corresponden a dinámicas del Pleistoceno (Valderrama et al., 2014; Caro et al., 2013), lo que sugiere que la falta de diferenciación profunda en *P. anthophilus* no es excepcional, sino parte de un patrón regional de divergencia reciente y, en algunos casos, incompleta. La variabilidad en la respuesta de las especies a los mismos eventos climáticos evidencia respuestas idiosincráticas (Arbeláez-Cortés, 2012). En *P. anthophilus*, esto podría explicar por qué, a pesar de compartir el contexto histórico con otras especies, la señal genética refleja dispersión y recolonización a lo largo del valle del Magdalena, más que aislamiento profundo.

El patrón de alta diversidad haplotípica, pero baja diversidad nucleotídica que se observa se interpreta como posible evidencia de expansiones demográficas recientes desde poblaciones reducidas (Grant y Bowen, 1998), coherente con un escenario de recolonización rápida que generó múltiples haplotipos sin acumular divergencias profundas a nivel nucleotídico. Este planteamiento podría respaldarse mediante pruebas de neutralidad como Tajima's D o Fu's Fs.

En primates como *Ateles*, Lynch et al. (2015) demostraron que los corredores boscosos abiertos durante fases frías del Pleistoceno explicaron la presencia de linajes cis y transandinos. Este patrón resulta análogo para *P. anthophilus*, dado que ambos taxones dependen de la

continuidad de hábitats de tierras bajas y responden a las mismas dinámicas de expansión y retracción de bosques. Los resultados también concuerdan biogeográficamente con las limitaciones morfofisiológicas descritas por Stiles (2004), quien señala que los colibríes ermitaños presentan poca flexibilidad morfológica, lo que restringió su diversificación en ambientes de tierras bajas y montanos tras el levantamiento andino.

A diferencia de colibríes no ermitaños, que desarrollaron adaptaciones al gradiente altitudinal y se diversificaron en tierras altas, los ermitaños como *P. anthophilus* permanecieron vinculados a sotobosques húmedos, vegetación secundaria densa con presencia de heliconias o incluso áreas abiertas de jardín por debajo de los 1500 m.s.n.m. y en casos raros los 1700 m.s.n.m. (Stiles, 2024; Ayerbe-Quiñones, 2024). Esta dependencia de su hábitat explica la estructura poblacional observada.

Tanto la hipótesis de la expansión septentrional de bosques, rodeando el norte de la cordillera oriental durante fases frías, como la existencia de pasos bajos locales resultan plausibles y, más que excluyentes, son complementarias para explicar el patrón filogeográfico observado en *P. anthophilus* (Haffer, 1969; Nores, 2004; Cadena et al., 2016). En conjunto, los resultados sugieren que los cambios climáticos del Pleistoceno, sumados a la topografía local de la cordillera oriental y a la ecología particular de los colibríes ermitaños, actuaron como filtros permeables que favorecieron procesos recurrentes de dispersión y conectividad en las poblaciones de *P. anthophilus*.

Dentro del género *Phaethornis*, estudios en *P. philippii* (do Nascimento et al., 2025) describieron una fuerte estructura poblacional con seis linajes monofiléticos en la Amazonía brasileña, donde grandes ríos como el Madeira y el Tapajós actuaron como barreras al flujo génico, a pesar de que morfológicamente se consideraba una especie monotípica. De manera similar, en *P.*

bourcieri, Hinkelmann & Schuchmann (1997) y McGuire et al. (2014) evidenciaron divergencias profundas entre poblaciones de la Amazonía occidental y la vertiente oriental andina, lo que condujo a reconocer a *P. major* y *P. koepckea* como especies independientes.

Estos casos demuestran que la diversidad genética y la delimitación de linajes dentro del género han sido históricamente subestimadas y que las barreras geográficas, ya sean ríos amazónicos o cordilleras y ríos andinos, han sido decisivas en su diversificación. En este sentido, la diferenciación cis y transandina encontrada en *P. anthophilus* en Colombia se agrupa en un marco más amplio, en el que linajes crípticos de ermitaños se originaron por procesos históricos de dispersión y reconexión asociados al Pleistoceno y por la acción de barreras geográficas mayores, en este caso la cordillera oriental.

Finalmente, estudios de esta naturaleza impactan el conocimiento de la biodiversidad local, destacando especies semiendémicas de Colombia como *P. anthophilus*, presente en dos regiones con poca documentación en biodiversidad: la Orinoquía cisandina y el Caribe transandino (Arbeláez-Cortés, 2013). Además, estas áreas se encuentran en constante transformación debido a la intensificación de la actividad humana, especialmente en los valles interandinos como el Magdalena y en la costa Caribe (Armenteras et al., 2011). Estos factores antropogénicos que transforman el paisaje y, por ende, la conectividad entre bosques, resaltan la necesidad de incentivar la investigación en estas zonas afectadas con el objetivo de contar con información científica que contribuyan a estudios de conservación.

5.4 Limitaciones de los marcadores mitocondriales

Es fundamental reconocer que las inferencias de este estudio se basan exclusivamente en marcadores de ADN mitocondrial (ADNmt). Debido a su herencia estrictamente materna y a su

naturaleza como un único locus no recombinante, el ADNmt representa solo uno de los múltiples linajes genealógicos que conforman la historia evolutiva de una especie (Burton, 2022). Por consiguiente, los patrones filogeográficos aquí observados, aunque robustos para la genealogía materna, podrían estar influenciados por fenómenos como el sorteo incompleto de linajes (incomplete lineage sorting) o la introgresión mitocondrial histórica, los cuales pueden generar una topología génica que no refleje con exactitud la historia demográfica del genoma completo (Funk & Omland, 2003; Toews & Brelsford, 2012).

La interacción y coevolución entre los genomas mitocondrial y nuclear también juegan un papel crucial, donde una aparente conexión genética podría no solo reflejar historia, sino también procesos de selección sobre la compatibilidad mitonuclear (Príncipe & De Aguiar, 2020). Por ejemplo, la conexión sugerida por el gen COI entre las poblaciones del Caribe y la Orinoquía podría ser un artefacto de estos procesos en lugar de un reflejo de flujo génico nuclear reciente. Para obtener una visión más integral de la historia evolutiva de *Phaethornis anthophilus*, sería crucial validar estos hallazgos mediante el uso de marcadores nucleares que permiten evaluar la especiación como un proceso a lo largo de todo el genoma (Seehausen et al., 2014). Esta aproximación multilocus permitiría contrastar la historia materna con la biparental y confirmar si los patrones de diferenciación aquí descritos representan la historia evolutiva de la especie en su totalidad.

6. Conclusiones

La red de haplotipos, los valores de diferenciación genética y la filogenia datada me permiten el reconocimiento de dos linajes principales en *Phaethornis anthophilus*, separados por la Cordillera oriental. El primero posiblemente corresponde a *P. a. fuscicapillus* (Cory, 1913), restringido a las sabanas y bosques secos de la Orinoquía cisandina, mientras que el segundo, posiblemente sea *P. a. anthophilus* (Bourcier, 1843), que se distribuye en el ámbito transandino, ocupando tanto los bosques húmedos y secos del valle medio del Magdalena como los bosques secos tropicales de la región Caribe. Esta estructura filogeográfica es consistente con las diferencias de coloración, rasgos morfológicos y patrones de distribución previamente documentados por Stiles (1993), lo que refuerza la validez de estas subespecies y sugiere una diferenciación poblacional histórica por procesos de aislamiento geográfico.

En contraste con la marcada divergencia detectada entre los linajes cis y trans-andinos, no se evidenció estructura genética dentro del valle medio del Magdalena, lo que indica que esta región, en específico el río, no ha actuado como barrera al flujo génico. Por el contrario, el Magdalena medio parece desempeñar un papel de corredor biogeográfico, facilitando la conectividad entre las poblaciones de la región Caribe y aquellas distribuidas en el interior y a lo largo del valle del Magdalena.

Este estudio aporta una contribución significativa al contexto regional y nacional al generar la primera evidencia genética que respalda la validez de las subespecies de *P. anthophilus* en Colombia. Los hallazgos confirman la función de barrera de la Cordillera oriental y la importancia del valle del Magdalena como corredor, enriqueciendo así el conocimiento sobre los patrones filogeográficos en la avifauna de tierras bajas del país. A un nivel internacional, nuestros resultados se suman a la creciente evidencia de que los patrones de vicarianza y conectividad en los Andes y

en los valles interandinos son complejos y específicos de cada taxón. Esto provee información valiosa para la conservación de esta especie semiendémica y para el diseño de estrategias de manejo en los frágiles ecosistemas de bosque seco del norte de Colombia.

7. Recomendaciones

Los resultados obtenidos en este estudio filogeográfico representan una visión de la historia evolutiva y estructura genética de *Phaethornis anthophilus* en Colombia. Sin embargo, para lograr una delimitación taxonómica robusta y una mejor resolución filogeográfica, se recomienda: 1. revisar los especímenes de colección (UIS-AV e IAvH-A) asociados a los tejidos para verificar su adscripción a las subespecies referidas; 2. Incentivar el incremento de colecta de material en áreas de distribución de interés para la estructura poblacional como el Alto Magdalena, Norte de Santander y la costa norte de Venezuela, al igual que los llanos orientales de esta y de otras especies para comprender mejor la evolución de la biota en esta zona de Colombia.

Referencias Bibliográficas

- Arengo, F., Porzecanski, A. L., Blair, M. E., Amato, G., Filardi, C., & Sterling, E. J. (2017). The essential role of museums in biodiversity conservation. En E. Dorfman (Ed.), *The future of natural history museums* (pp. 82–100). Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781315531892>
- Arbeláez-Cortés, E. (2012). Filogeografía comparada: Conceptos, métodos y patrones generales en aves neotropicales. *Acta Biológica Colombiana*, 17(1), 19–38. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2012000100002
- Arbeláez-Cortés, E. (2013). Conocimiento de la biodiversidad colombiana: publicado e indexado. *Biodiversidad y conservación*, 22(12), 2875–2906. <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0560-y>
- Arbeláez-Cortés, E. (2020). Defining the phylogeographic relationship between cis- and trans-Andean populations of *Dendrocincla fuliginosa* and *Xenops minutus* in Colombia. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 91, e2984. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2020.91.2984>
- Arbeláez-Cortés, E. (2024). *Colección Ornitológica de la Universidad Industrial de Santander* (Version 6.4) [Conjunto de datos]. Universidad Industrial de Santander. <https://doi.org/10.15472/w2sefh>
- Arbeláez-Cortés, E., Acosta-Galvis, A. R., & Do Nascimento, C. (2017). Knowledge linked to museum specimen vouchers: Measuring scientific production from a major biological collection in Colombia. *Scientometrics*, 112(3), 1323–1341. <https://doi.org/10.1007/s11192-017-2461-4>

- Arbeláez-Cortés Arias, C. F., Salazar, C., Rosales, C., Kronforst, M. R., Linares, M., Bermingham, E., & McMillan, W. O. (2014). Phylogeography of *Heliconius cydno* and its closest relatives: Disentangling their origin and diversification. *Molecular Ecology*, *23*(14), 4137–4152. <https://doi.org/10.1111/mec.12844>
- Armenteras, D., Rodríguez, N., Retana, J., & Espelta, J. M. (2011). Understanding deforestation in montane and lowland forests of the Colombian Andes. *Regional Environmental Change*, *11*(3), 693–705. <https://doi.org/10.1007/s10113-010-0200-y>
- Arteaga, A., Pyron, R. A., Batista, A., Vieira, J., Meneses Pelayo, E., Smith, E. N., Barrio Amorós, C. L., Koch, C., Agne, S., Valencia, J. H., Bustamante, L., & Harris, K. J. (2024). Systematic revision of the Eyelash Palm-Pitviper *Bothriechis schlegelii* (Serpentes, Viperidae), with the description of five new species and revalidation of three. *Evolutionary Systematics*, *8*(1), 15–64. <https://doi.org/10.3897/evolsyst.8.114527>
- Avendaño, J. E., Arbeláez-Cortés, E., & Cadena, C. D. (2017). On the importance of geographic and taxonomic sampling in phylogeography: A reevaluation of diversification and species limits in a Neotropical thrush (Aves, Turdidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *111*, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.03.020>
- Avendaño, J. E., Cortés-Herrera, J. O., Briceño-Lara, E. R., & Rincón-Guarín, D. A. (2013). Crossing or bypassing the Andes: A commentary on recent range extensions of cis-Andean birds to the west of the Andes of Colombia. *Orinoquia*, *17*(2), 207–214. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-37092013000200008
- Ayerbe-Quiñones, F. (2024). *Colibríes de Colombia* (2nd ed.). Avifauna Colombiana; Editorial Puntoaparte.

- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, *16*(1), 37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Borja-Acosta, K. G., & Leyton-Ramos, L. M. (2024). *Colección de Tejidos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH-CT)* (Versión 20.9) [Conjunto de datos]. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. <https://doi.org/10.15472/9uddlh>
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., & Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, *15*(4), e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
- Burton, R. S. (2022). The role of mitonuclear incompatibilities in allopatric speciation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *79*, 103. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04059-3>
- Cadena, C. D., Gutiérrez-Pinto, N., Dávila, N., & Chesser, R. T. (2011). No population genetic structure in a widespread aquatic songbird from the Neotropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *58*(3), 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.12.014>
- Cadena, C. D., Pedraza, C. A., & Brumfield, R. T. (2016). Climate, habitat associations and the potential distributions of Neotropical birds: Implications for diversification across the Andes. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, *40*(155), 275–287. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.280>

- Caro, L. M., Caycedo-Rosales, P. C., Bowie, R. C. K., Slabbekoorn, H., & Cadena, C. D. (2013). Ecological speciation along an elevational gradient in a tropical passerine bird? *Journal of Evolutionary Biology*, *26*(2), 357–374. <https://doi.org/10.1111/jeb.12055>
- Castañeda, J. A., & Osorio, J. H. (2018). Evolution and conduct of the meander “curva el conejo” of Magdalena River in the Dorada-Caldas zone. *Scientia Et Technica*, *23*(2), 280–287. <https://doi.org/10.22517/23447214.19061>
- Castaño, N., Peña, M. A., González-Caro, S., Aldana, A. M., Casas, L. F., Correa-Gómez, D. F., González-Abella, J. S., Pelaez, N., Stevenson, P., Sua, S., Zuleta, D., & Duque, Á. (2024). Contrasting drivers of aboveground woody biomass and aboveground woody productivity in lowland forests of Colombia. *Ecography*, *2024*(2), e06693. <https://doi.org/10.1111/ecog.06693>
- Clemann, N., Rowe, K. M. C., Rowe, K. C., Raadik, T. A., Gomon, M. F., Menkhorst, P., Sumner, J., Bray, D., Norman, M., & Melville, J. (2014). Value and impacts of collecting vertebrate voucher specimens, with guidelines for ethical collection. *Memoirs of Museum Victoria*, *72*, 141–153. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.508091139486039>
- Cuervo, A. M., Cadena, C. D., & Parra, J. L. (2023). Seguir colectando aves en Colombia es imprescindible: un llamado a fortalecer las colecciones ornitológicas. *Ornitología Colombiana*, *23*, e113. <https://doi.org/10.59517/oc.e113>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics, and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

- Do Nascimento, N. F., Quaresma, T. F., Batista, R., et al. (2025). Revealing hidden diversity: Molecular insights into a monotypic Amazonian hummingbird species. *Journal of Ornithology*. <https://doi.org/10.1007/s10336-025-02295-z>
- Duque, A., Sánchez, M., Cavelier, J., & Duivenvoorden, J. F. (2002). Different floristic patterns of woody understorey and canopy plants in Colombian Amazonia. *Journal of Tropical Ecology*, 18(4), 499–525. <https://doi.org/10.1017/S0266467402002341>
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8(3), 186–194. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>
- Fluxus Technology Ltd. (2019). *NETWORK* (Version 10.2.0.0) [Computer software]. <https://www.fluxus-engineering.com>
- Funk, D. J., & Omland, K. E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 397–423. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132421>
- Galeano, G., Suárez, S., & Balslev, H. (1998). Vascular plant species count in a wet forest in the Chocó area on the Pacific coast of Colombia. *Biodiversity and Conservation*, 7(12), 1563–1575. <https://doi.org/10.1023/A:1008802624275>

- González-M, R., García, H., Isaacs, P., Cuadros, H., López-Camacho, R., Rodríguez, N., Pérez, K., Mijares, F., Castaño-Naranjo, A., & Jurado, R. (2018). Disentangling the environmental heterogeneity, floristic distinctiveness and current threats of tropical dry forests in Colombia. *Environmental Research Letters*, *13*(4), 045007. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aaad74>
- Grant, W. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, *89*(5), 415-426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>
- Gregory-Wodzicki, K. M. (2000). Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin*, *112*(7), 1091–1105. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(2000\)112<1091:UHOTCA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(2000)112<1091:UHOTCA>2.0.CO;2)
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, *165*(3889), 131–137. <https://doi.org/10.1126/science.165.3889.131>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95-98.
- Hinkelmann, C., & Schuchmann, K. (1997). Phylogeny of the hermit hummingbirds (Trochilidae: Phaethornithinae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, *32*(3), 142–163. <https://doi.org/10.1080/01650521.1997.9709616>
- Hoorn, C., Wesselingh, F. P., ter Stege, H., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C. L., Figueiredo, J. P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F. R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T., & Antonelli, A. (2010).

- Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330(6006), 927–931. <https://doi.org/10.1126/science.1194585>
- Hurtado-Gómez, J. P., Daza, J. M., Vargas-Ramírez, M., Deepak, V., & Fritz, U. (2024). Phylogeography of the Colombian water snake *Helicops danieli* Amaral, 1938 (Reptilia, Squamata, Dipsadidae) with comments on the systematics and evolution of the genus *Helicops* Wagler, 1828. *ZooKeys*, 1215, 335–358. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1215.128795>
- Kattan, G. H., Franco, P., Rojas, V., & Morales, G. (2004). Biological diversification in a complex region: A spatial analysis of faunistic diversity and biogeography of the Andes of Colombia. *Journal of Biogeography*, 31(11), 1829–1839. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2004.01109.x>
- Kerr, K. C. R., Stoeckle, M. Y., Dove, C. J., Weigt, L. A., Francis, C. M., & Hebert, P. D. N. (2007). Comprehensive DNA barcode coverage of North American birds. *Molecular Ecology Notes*, 7(4), 535–543. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01670.x>
- Lerner, H., Meyer, M., James, H. F., Hofreiter, M., & Fleischer, R. C. (2011). Multilocus resolution of phylogeny and timescale in the extant adaptive radiation of Hawaiian Honeycreepers. *Current Biology*, 21(21), 1838–1844. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.039>
- Link, A., Valencia, L. M., & Céspedes, L. N. (2015). Phylogeography of the critically endangered Brown Spider Monkey (*Ateles hybridus*): Testing the riverine barrier hypothesis. *International Journal of Primatology*, 36(3), 530–547. <https://doi.org/10.1007/s10764-015-9840-6>

- Lynch Alfaro, J. W., Cortés-Ortiz, L., Di Fiore, A., & Boubli, J. P. (2015). Special issue: Comparative biogeography of Neotropical primates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82(B), 518–529. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.027>
- Main, D. C., Taft, J. M., Geneva, A. J., Jansen van Vuuren, B., & Tolley, K. A. (2024). The efficacy of single mitochondrial genes at reconciling the complete mitogenome phylogeny—a case study on dwarf chameleons. *PeerJ*, 12, e17076. <https://doi.org/10.7717/peerj.17076>
- Miller, M. J., Bermingham, E., Klicka, J., Escalante, P., Raposo do Amaral, F. S., Weir, J. T., & Winker, K. (2008). Out of Amazonia again and again: Episodic crossing of the Andes promotes diversification in a lowland forest flycatcher. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1639), 1133–1142. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0015>
- Moore, R. P., Robinson, W. D., Lovette, I. J., & Robinson, T. R. (2008). Experimental evidence for extreme dispersal limitation in tropical forest birds. *Ecology Letters*, 11(9), 960–968. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01196.x>
- Nores, M. (2004). The implications of Tertiary and Quaternary sea level rise events for avian distribution patterns in the lowlands of northern South America. *Global Ecology and Biogeography*, 13(2), 129–138. <https://doi.org/10.1111/j.1466-882X.2004.00076.x>
- Prieto-Torres, D. A., Cuervo, A. M., & Bonaccorso, E. (2018). On geographic barriers and Pleistocene glaciations: Tracing the diversification of the Russet-crowned Warbler (*Myiothlypis coronata*) along the Andes. *PLoS ONE*, 13(3), e0191598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191598>

- Príncipe, D., & De Aguiar, M. A. M. (2020). Modelado de la compatibilidad mitonuclear y su papel en la identificación de especies. *Systematic Biology*, *70*(1), 133–144. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syaa044>
- R Core Team. (2023). *R: A language and environment for statistical computing* [Computer software]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Rambaut, A. (2018). *FigTree* (Version 1.4.4) [Computer software]. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, *67*(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Rodriguez-Muñoz, E., Montes, C., Rojas-Runjaic, F. J. M., & Crawford, A. J. (2022). Synthesis of geological data and comparative phylogeography of lowland tetrapods suggests recent dispersal through lowland portals crossing the Eastern Andean Cordillera. *PeerJ*, *10*, e13186. <https://doi.org/10.7717/peerj.13186>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sandoval-H, J., Gómez, J. P., & Cadena, C. D. (2017). Is the largest river valley west of the Andes a driver of diversification in Neotropical lowland birds? *The Auk*, *134*(1), 168–180. <https://doi.org/10.1642/AUK-16-91.1>

- Seehausen, O., Butlin, R. K., Keller, I., Wagner, C. E., Boughman, J. W., Hohenlohe, P. A., Peichel, C. L., Saetre, G.-P., Bank, C., Brännström, Å., Brelsford, A., Clarkson, C. S., Eroukhmanoff, F., Feder, J. L., Fischer, M. C., Foote, A. D., Franchini, P., Jiggins, C. D., Jones, F. C., Lindholm, A. K., ... Widmer, A. (2014). Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics*, *15*(3), 176–192. <https://doi.org/10.1038/nrg3644>
- Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T., & Mindell, D. P. (1999). Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *12*(2), 105–114. <https://doi.org/10.1006/mpev.1998.0602>
- Stiles, F. G. (1993). Distribución y variación en el ermitaño carinegro (*Phaethornis anthophilus*) en Colombia. *Caldasia*, *18*(86(1)), 119–129. <https://www.jstor.org/stable/23641326>
- Stiles, F. G. (2004). Phylogenetic constraints upon morphological and ecological adaptation in hummingbirds (Trochilidae): Why are there no hermits in the paramo? *Ornitología Neotropical*, *15*(Suppl.), 191–198. Stiles.fm
- Stucky, B. J. (2021). SeqTrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques*, *23*(3), 90–93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444287/>
- Suarez, A. V., & Tsutsui, N. D. (2004). The value of museum collections for research and society. *BioScience*, *54*(1), 66–74. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2004\)054\[0066:TVOMCF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2004)054[0066:TVOMCF]2.0.CO;2)

- Toews, D. P. L., & Brelsford, A. (2012). The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*, *21*(16), 3907–3930.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05664>
- Valderrama, E., Pérez-Emán, J. L., Brumfield, R. T., Cuervo, A. M., & Cadena, C. D. (2014). The influence of the complex topography and dynamic history of the montane Neotropics on the evolutionary differentiation of a cloud forest bird (*Premnoplex brunnescens*, Furnariidae). *Journal of Biogeography*, *41*(8), 1533–1546.
<https://doi.org/10.1111/jbi.12317>
- Weitemier, K., Penaluna, B. E., Hauck, L. L., Longway, L. J., Garcia, T., & Cronn, R. (2021). Estimating the genetic diversity of Pacific salmon and trout using multigene eDNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, *30*(20), 4970–4990.
<https://doi.org/10.1111/mec.15811>
- Wright, S. (1978). *Evolution and the genetics of populations, Volume 4: Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press.

Apéndices
Apéndice A. Datos de localidad y colecta de especímenes de *Phaethornis anthophilus*.

N°	Número de colección	numero de colecta	Latitud y longitud	Municipio/Dpto	Localidad
1	UIS-CT-224	CSem-11	7.40238 -73.766933	Puerto Wilches/Santander	Ciénaga de Paredes, Sector Campoduro, Finca el Arrayan, a 15 km en línea recta al ENE del casco urbano de Puerto Wilches.
2	UIS-CT-227	CSem-14	7.40238 -73.766933	Puerto Wilches/Santander	Ciénaga de Paredes, Sector Campoduro, Finca el Arrayan, a 15 km en línea recta al ENE del casco urbano de Puerto Wilches.
3	UIS-CT-235	CSem-22	7.40238 -73.766933	Puerto Wilches/Santander	Ciénaga de Paredes, Sector Campoduro, Finca el Arrayan, a 15 km en línea recta al ENE del casco urbano de Puerto Wilches.
4	UIS-CT-322	SBIO-127	6.404167 -74.09	Cimitarra/Santander	Bosque frente a finca Aguas Claras, a 20 minutos en carro desde finca El Dorado, Vereda El Tigre, 18 km lineales NOPO del casco urbano de Cimitarra
5	UIS-CT1150	Cap 19	6.574611 -73.565194	El Carmen de Chucurí/Santander	vda. La Belleza, finca señor Jesús Vera
6	UIS-CT1210	JSP037	6.07247 -74.21339	Cimitarra/Santander	Vda. Guineales, finca los Nogales
7	UIS-CT1221	SPP038	6.07247 -74.21339	Cimitarra/Santander	Vda. Guineales, finca los Nogales
8	UIS-CT1272	SPP053	6.06838 -74.21342	Bolívar/Santander	Vda. Locación, pasando caño feo en el sector cabecera
9	UIS-CT1398	LGPC-UIS-A-0067	6.32345 -73.949	Cimitarra/Santander	Granja Experimental CICA
10	UIS-CT1662	ColC-103	7.0626 -74.20064	Cantagallo/Bolívar	Bosque camino al acueducto, Casa de la finca la Bufalera, vereda Santo Domingo a 32 km OpN de Yondó
11	UIS-CT1768	ColC-223	7.06335 -74.20577	Cantagallo/Bolívar	En la finca de doña Irene Ramírez, un km lineal al norte de la casa de la finca La Bufalera a 32 km OpN de Yondó.
12	UIS-CT1785	ColC-240	7.06356 -74.20383	Cantagallo/Bolívar	Vereda Santo Domingo, caño X, 1,1 km al norte de la casa de la finca La Bufalera a 32 km OpN de Yondó.
13	UIS-CT1786	ColC-241	7.06335 -74.20577	Cantagallo/Bolívar	Vereda Santo Domingo, camino hacia la finca de doña Irene Ramírez, un km lineal al norte de la casa de la finca La Bufalera a 32 km OpN de Yondó.
14	UIS-CT2996	BUIS0922	7.14026 -73.11995	Bga/Santander	Campus central UIS, Bucaramanga, Santander, Colombia

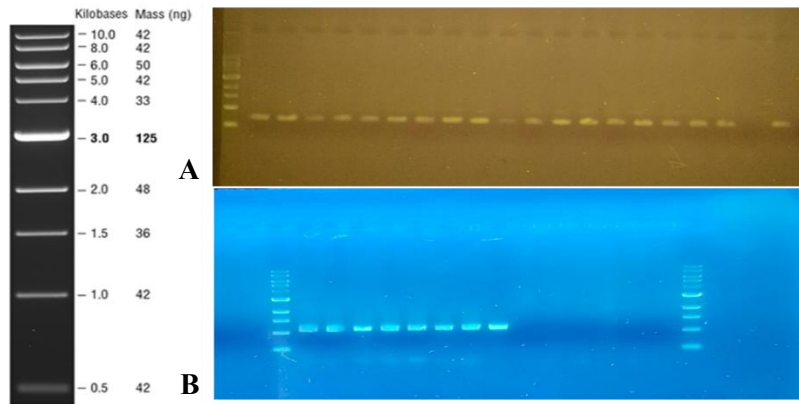
15	UIS-CT3052	FMA0032021	7.14704 -73.34	Lebrija/Santander	Finca Manantial de la aurora, vereda cerro la aurora, Lebrija, Santander, Colombia
16	UIS-CT3061	Hemo 01	7.10288 -73.57798	San Vicente de Chucurí/Santander	A 16 minutos caminando en el interior del bosque al Sur de la casa de la Reserva el Porvenir cerca al corregimiento la Fortuna, Barrancabermeja/San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia.
17	UIS-CT3062	Hemo 02	7.10341 -73.57643	San Vicente de Chucurí/Santander	A 10 minutos caminando en el interior del bosque al Sur de la casa de la Reserva el Porvenir cerca al corregimiento la Fortuna, Barrancabermeja/San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia.
18	UIS-CT3063	Hemo 03	7.10341 -73.57643	San Vicente de Chucurí/Santander	A 10 minutos caminando en el interior del bosque al Sur de la casa de la Reserva el Porvenir cerca al corregimiento la Fortuna, Barrancabermeja/San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia.
19	UIS-CT3106	Hemo 46	7.04589 -73.41145	Betulia/Santander	A 60 minutos caminando arriba de la casa de "El Paraíso Agroturístico", Vereda Sogamoso, 21 km lineales al NO del casco urbano de Betulia, Serranía de la Paz, Betulia, Santander, Colombia
20	UIS-CT3181	LGPC-UIS-A-170	7.10342 -73.57541	San Vicente de Chucurí/Santander	A 15 minutos caminado al SE de la casa, Reserva El Porvenir, cerca al Corregimiento La Fortuna, Barrancabermeja/San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia.
21		CII		Girón/Santander	
22	IAvH-CT-2064	PCPR 001	8.060944 -76.65025	Turbo/Antioquia	Vereda El Tres
23	IAvH-CT-2066	PCPR 005	8.383333 -77.134722	/Chocó	Triganá, reserva Integral Sasardí
24	IAvH-CT-4687	SS-335	5.65 -74.766667	/Caldas	Vereda La Miel
25	IAvH-CT-4702	SS-351	5.65 -74.766667	/Caldas	Vereda La Miel
26	IAvH-CT-4727	SS-377	5.65 -74.766667	/Caldas	Vereda La Miel
27	IAvH-CT-4897	20	9.994278 -75.070333	San Onofre/Sucre	SFF El Corchal El Mono Hernandez, corregimiento La Barce
28	IAvH-CT-4898	4	9.994278 -75.070333	San Onofre/Sucre	SFF El Corchal El Mono Hernandez, corregimiento La Barce
29	IAvH-CT-6729	SS-790	5.5 -74.616667	Puerto Salgar/Cundinamarca	Laguna del Coco
30	IAvH-CT-6831	SS-907	5.710444 -72.050833	Pore/Casanare	Corregimiento Altamira, Vereda Altamira La Esperanza La Esperanza
31	IAvH-CT-8659	SS-175	9.994167 -75.070278	San Onofre/Sucre	SFF El Corchal El Mono Hernandez, corregimiento La Barce, primera estación corchal

32	IAvH-CT-10646	SS-967	6.93065 -71.261133	Araucuita/Arauca	Vereda Las Acacias, Plataforma El Jiba
33	IAvH-CT-10689	SS-1010	6.933367 -71.167733	Araucuita/Arauca	Vereda La Osa, Caño Verde
34	IAvH-CT-10693	SS-1014	6.933367 -71.167733	Araucuita/Arauca	Vereda La Osa, Caño Verde
35	IAvH-CT-10723	SS-1044	6.919333 -71.168333	Araucuita/Arauca	Puente El Jorobado, Caño Limón
36	IAvH-CT-10725	SS-1046	6.919333 -71.168333	Araucuita/Arauca	Puente El Jorobado, Caño Limón
37	IAvH-CT-10729	SS-1050	6.919333 -71.168333	Araucuita/Arauca	Puente El Jorobado, Caño Limón
38	IAvH-CT-10732	SS-1053	6.982222 -71.023333	Araucuita/Arauca	Extracción de Arenas Remolinos, Río Arauca
39	IAvH-CT-10764	SS-1086	6.971388 -71.059444	Araucuita/Arauca	Estero La Conquista
40	IAvH-CT-12914	AMU-847	9.534167 -75.352222	Colosá/Sucre	Estación Primatológica, Montes de María Bosque higrotropofático calcáncola en ladera, Primera estación
41	IAvH-CT-12928	AMU-861	9.534167 -75.352222	Colosá/Sucre	Estación Primatológica, Montes de María Bosque higrotropofático calcáncola en ladera, Primera estación
42	IAvH-CT-12934	AMU-867	9.534167 -75.352222	Colosá/Sucre	Estación Primatológica, Montes de María Bosque higrotropofático calcáncola en ladera, Primera estación
43	IAvH-CT-12940	AMU-873	9.534167 -75.352222	Colosá/Sucre	Estación Primatológica, Montes de María Bosque higrotropofático calcáncola en ladera, Primera estación
44	IAvH-CT-12963	AMU-896	9.534167 -75.352222	Colosá/Sucre	Estación Primatológica, Montes de María Bosque higrotropofático calcáncola en ladera, Primera estación
45	IAvH-CT-13103	AMU-1036	9.5775 -75.461111	Tolú Viejo/Sucre	Corregimiento El Cañito, Monte de Los Navas, Primera estación
46	IAvH-CT-17403	CHC15F-13	5.93195 -71.48553	Hato Corozal/Casanare	Corregimiento La Chapa, Bosque del Caño Oso cerca a Finca La Conquista
47	IAvH-CT-17417	CHC15F-27	6.02215 -71.53296	Hato Corozal/Casanare	Vereda Santa María, Bosque entre río Chire Viejo y río Chire Nuevo cerca a la finca El Conuco
48	IAvH-CT-17418	CHC15F-28	6.02215 -71.53296	Hato Corozal/Casanare	Vereda Santa María, Bosque entre río Chire Viejo y río Chire Nuevo cerca a la finca El Conuco
49	IAvH-CT-18416	MCH027	5.563889 -71.901389	Pore/Casanare	Vereda La Plata, finca La Enramada
50	IAvH-CT-18445	OHM150	6.330361 -71.770722	Tame/Arauca	Vereda Puna Puna, finca La Envidia, cerca al caño Freitero
51	IAvH-CT-18756	109	9.266667 -73.863611	Chimichagua/Cesar	Las Varas, vía el trebol

Apéndice B. Protocolo de PCR modificado para los genes ND2 y COI.

	Desnat. inicial	Desnat. Hibrid. ceb.	Ext.	Desnat. Hibrid. ceb. Ext.	Ext. final	
Protocolo 1	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	
	1 min	15 s	30 s	30 s	7 min	
	1 ciclo		10 ciclo		35 ciclo	1 ciclo
Protocolo 2	94°C	94°C	55°C	72°C	72°C	
	1 min	15 s	30 s	30 s	7 min	
	1 ciclo		15 ciclo		40 ciclo	1 ciclo

Apéndice C. Electroforesis de los amplicones de los genes COI y ND2.



Apéndice D. Muestras de *Phaethornis anthophilus* utilizadas en los análisis genéticos.

Gen	Número de colección
COI	UIS-CT-224, UIS-CT-227, UIS-CT-235, UIS-CT-322, UIS-CT1150, UIS-CT1210, UIS-CT1221, UIS-CT1272, UIS-CT1398, UIS-CT1662, UIS-CT1768, UIS-CT1785, UIS-CT1786, UIS-CT2996, UIS-CT3052, UIS-CT3061, UIS-CT3062, UIS-CT3063, UIS-CT3106, CII, IAvH-CT-2064, IAvH-CT-2066, IAvH-CT-4702, IAvH-CT-4727, IAvH-CT-4898, IAvH-CT-6729, IAvH-CT-6831, IAvH-CT-8659, IAvH-CT-10646, IAvH-CT-10689, IAvH-CT-10693, IAvH-CT-10723, IAvH-CT-10725, IAvH-CT-10729
	UIS-CT-224, UIS-CT-227, UIS-CT1785, UIS-CT1786, CII, IAvH-CT-4687, IAvH-CT-4727, IAvH-CT-4897, IAvH-CT-4898, IAvH-CT-6729, IAvH-CT-6831, IAvH-CT-8659, IAvH-CT-10646, IAvH-CT-10689, IAvH-CT-10693, IAvH-CT-10723, IAvH-CT-10725,

