

**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**

**JAHIBER EDUARDO ARCHILA DÁVILA**

Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología  
Bucaramanga  
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**

JAHIBER EDUARDO ARCHILA DÁVILA

**Trabajo de grado presentado para optar al título de biólogo**

**Director**

FERNANDO RONDÓN GONZÁLEZ  
**Doctor en Ciencias-Biología**

**Codirector**

JOSÉ GREGORIO MORENO PATIÑO  
**Magister en Ciencias-Biología**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA**

**2014**

*A la memoria Vitalia Ronderos.*

*1924-2012*

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis padres **Marco Antonio Archila** y **Resurrección Dávila** mis cimientos y ejemplo a seguir.

A **Fabiola** por su inmensa paciencia en estos últimos años.

A los profesores **Fernando Rondón**, **José Gregorio Moreno** por el apoyo, la guía y la confianza depositada en la ejecución del proyecto.

Al profesor **Jorge Hernández** y a su equipo de trabajo en el que labora en el **CINBIN**.

Al profesor **Francisco Martínez Pérez** por su orientación y apoyo en una parte crucial de este trabajo.

A los **Champo-colegas** con especial cariño a **Claudia Moreno** “we are the power inside...” y **Mafelu** “!!Ta' dormía mi china!!”

A mis colegas compañeros y ante todo amigos; **Laura Novoa**, **Julián “el Flaco”**, **Fercho**, **Freddy**.

A mis colegas del laboratorio de **Microbiología y Mutagénesis Ambiental** por permitir el uso de sus equipos.

A los propietarios de las fincas que nos recibieron en su casa con gran amabilidad señores: **Rosa Isabel Rincón Ruíz**, Finca Tierra Buena (Lebrija); **José Meneses**, Finca El Diviso (San Vicente de Chucurí); y a los habitantes de la vereda Los Helechales (Floridablanca).

A la **sección de comedores** en bienestar universitario.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>PAG.</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>18</b>
1.1 MODIFICACIÓN DEL HÁBITAT Y SUS EFECTOS .....	18
1.2 GENERALIDADES DE LA ESPECIE ESTUDIADA .....	19
1.3 GENOMA MITOCONDRIAL Y SU UTILIDAD EN ESTUDIOS GENÉTICOS POBLACIONALES.....	21
1.4 DISEÑO DE CEBADORES PARA PCR.....	24
1.5 ESTUDIOS GENÉTICOS POBLACIONALES EN <i>Ramphocelus icteronotus</i> . .....	25
<b>2. MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>28</b>
2.1 FASE IN SILICO .....	28
2.1.1 DISEÑO DE CEBADORES PARA AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL.....	28
2.1.2 BÚSQUEDA DE GENOMAS.....	29
2.1.3 ALINEAMIENTO.....	29
2.2 FASE DE CAMPO .....	30
2.2.1 ÁREA DE ESTUDIO .....	30
2.2.2 TOMA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.....	32
2.3 FASE DE LABORATORIO.....	32
2.3.1 EXTRACCIÓN DE DNA.....	33
2.3.2. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN CONTROL.....	33
2.4 ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	34
2.4.1 DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS .....	34

2.4.2 TIPIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS Y ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS DE DIVERSIDAD GENÉTICA.....	34
2.4.3 ESTRUCTURA Y FLUJO GÉNICO.....	35
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
3.1 DISEÑO DE CEBADORES.....	36
3.2 DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA OBTENIDA DE LA REGIÓN CONTROL DEL ADNMT DE <i>R. icteronotus</i> .....	38
3.3 DIVERSIDAD HAPLOTÍPICA Y NUCLEOTÍDICA .....	39
3.4 ESTRUCTURA Y FLUJO GÉNICO.....	43
<b>4. DISCUSION.....</b>	<b>46</b>
<b>5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Cebadores diseñados para amplificar y secuenciar la región control de ADNmt en <i>Ramphocelus icteronotus</i> . .....	37
<b>Tabla 2.</b> Sitios polimórficos de 12 haplotipos tipificados en del <i>D-loop</i> de <i>R. icteronotus</i> . .....	41
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia y distribución de los haplotipos <i>D-loop</i> tipificados en <i>R. icteronotus</i> en el presente estudio. ....	42
<b>Tabla 4.</b> AMOVA de las frecuencias haplotípicas del <i>D-loop</i> presentes en <i>Ramphocelus icteronotus</i> en tres localidades del departamento de Santander. ...	43
<b>Tabla 5.</b> Parejas de valores de $\Phi_{st}$ , $S_{nn}$ y $N_m$ a partir del análisis de haplotipos <i>D-loop</i> entre diferentes muestras poblacionales de <i>R. icteronotus</i> del departamento de Santander. ....	44

## LISTADO DE FIGURAS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de <i>Ramphocelus icteronotus</i> ..	20
<b>Figura 2.</b> Individuos de <i>Ramphocelus icteronotus</i> .....	21
<b>Figura 3.</b> Mapa del genoma mitocondrial de <i>Gallus gallus</i> .....	22
<b>Figura 4.</b> Estructura de la región control del ADNmt en Aves. ....	23
<b>Figura 5.</b> Ubicación de las áreas de estudio. ....	31
<b>Figura 6.</b> Posición de los cebadores en el ADNmt. ....	37
<b>Figura 7.</b> Productos de PCR obtenidos con los cebadores diseñados en el presente estudio. ....	38
<b>Figura 8.</b> Secuencia consenso parcial de la región control de ADNmt en <i>R. icteronotus</i> .....	40
<b>Figura 9.</b> Composición nucleotídica de los Dominios I y II de la región control del ADNmt de <i>Ramphocelus icteronotus</i> . ....	41
<b>Figura 10.</b> Red de haplotipos <i>D-loop</i> en <i>R. icteronotus</i> generada bajo el criterio Median Joining.....	44

## ANEXOS

	<b>Pag.</b>
<b>Anexo A.</b> Ensayos preliminares con indicadores reportados en la literatura .....	65
<b>Anexo B.</b> Especies usadas en el Alineamiento para el diseño del cebador.....	65
<b>Anexo C.</b> Individuos de <i>R. icteronotus</i> muestreados en cada localidad de estudio. .....	68
<b>Anexo D.</b> Electroferograma de una secuencia de la región control en la especie <i>R. dimidiatus</i> .....	68
<b>Anexo E.</b> Alineamiento de secuencias de especies de familias filogenéticamente cercanas de Thraupidae obtenidas mediante el uso de los cebadores diseñados en el presente estudio.....	69

## RESUMEN

### TITULO:

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

### AUTOR:

Jahiber Eduardo Archila Dávila\*\*

### PALABRAS CLAVES:

*Ramphocelus*, ADN mitocondrial, Cebadores Aves, Región control, Diversidad genética, Santander.

### DESCRIPCION

Los ecosistemas de los Andes Colombianos han sufrido una destrucción paulatina que ha conllevado a la ruptura de las dinámicas naturales de especies nativas. Dicho fenómeno ha afectado a la tángara *Ramphocelus icteronotus*, especie representativa del Chocó biogeográfico, quien en la actualidad está presente en áreas montañosas del departamento de Santander. El proceso de desplazamiento puede conducir a la diferenciación y al aislamiento genético entre distintas poblaciones de la especie. En Colombia, los estudios genético poblacionales que involucran a *R. icteronotus*, han sido realizados predominantemente con marcadores genéticos conservados, los cuales son más apropiados para análisis filogenéticos. Con el objetivo de analizar la diversidad genética de las poblaciones de *Ramphocelus icteronotus* presentes en el departamento de Santander, se implementaron cebadores diseñados a partir del modelo de pérdida de ADN; con estos se amplificó y se secuenció dos dominios de la región control (*D-loop*) de ADNmt. Se caracterizaron 22 sitios polimórficos definidos en 12 haplotipos. Al comparar entre los componentes subpoblacionales la diversidad haplotípica observada fue alta y la diversidad nucleotídica fue baja. El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) mostró ausencia de estructura genética entre las subpoblaciones estudiadas ( $\Phi_{ST}=-0,0496$ ), lo cual permite establecer que los componentes subpoblacionales analizados se comportan como una sola unidad reproductiva, soportada por infinitos migrantes efectivos por generación. Los hallazgos de este estudio indican que *Ramphocelus icteronotus* en el departamento de Santander, carece de estructura genética poblacional con base en el marcador molecular evaluado y permite hipotetizar que presenta características típicas de la diversidad genética de una especie en expansión.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias. Escuela de Biología. Director: Fernando Rondón González. Codirector: José Gregorio Moreno Patiño.

## ABSTRACT

### TITLE:

Study of genetic diversity of *Ramphocelus icteronotus* (Aves: tanager) present in the Santander department implementing primers designed for the analysis of mitochondrial DNA control region

### AUTOR:

Jahiber Eduardo Archila Dávila\*\*

### Key words:

*Ramphocelus*, mitochondrial DNA, Avian Primers, Control region, Genetic diversity, Santander.

### DESCRIPTION

The natural ecosystems in the Colombian Andes have suffered gradual destruction broking down the natural dynamic of native species. This phenomenon has affected the tanager *Ramphocelus icteronotus*, representative specie of Chocó biogeographic region, which currently inhabiting mountain areas of Santander department. The displacement process can lead to the differentiation and the genetic isolation between different populations of the species. In Colombia, genetic population studies involving *R. icteronotus* have been predominantly carried out using conserved gene markers, which are more suitable for phylogenetic analysis. The aim of this study was to analyze the genetic diversity of *R. icteronotus* populations present in the department of Santander. Were implemented primers designed from the DNA loss model, which allowed to amplify and sequence two domains of the control region (D-loop) from mtDNA. Were characterized 22 polymorphic sites defined in 12 haplotypes from HV1 region. A comparison between subpopulation components showed high haplotype diversity and low nucleotide diversity. The Analysis Molecular Variance (AMOVA) showed no genetic structure among the subpopulations studied ( $\Phi_{ST}=-0,0496$ ). This allowed establish that the subpopulation components analyzed behave as a single reproductive unit, supported by infinite effective migrants per generation. Based on the molecular marker evaluated, the findings of this study indicate that *Ramphocelus icteronotus* lack of population genetic structure. This result allows us to hypothesize that *Ramphocelus icteronotus* present typical characteristics of genetic diversity of a specie in expansion.

---

\* Work degree

\*\* Faculty of Sciences, School of Biology, Director: Fernando Rondón González, Codirector: José Gregorio Moreno Patiño.

## INTRODUCCIÓN

La modificación del hábitat, producto de la actividad humana, en las últimas décadas ha conllevado a la fragmentación de los ecosistemas naturales y al aislamiento de las poblaciones (Fjeldså et al. 2005), así como a la ruptura de barreras naturales las cuales han permitido la expansión del rango de distribución de algunas especies (Balmford et al. 2003); éste fenómeno ha causado el detrimento de las poblaciones naturales tanto de fauna y flora, implicando la modificación de las dinámicas poblacionales en diferentes especies (McCauley, 1991; Pannell, 2001; Fjeldså et al. 2005), situación evidenciada en varios ecosistemas andinos colombianos (Sibley, 1958; Helbig, 2001; Fjeldså et al. 2005; Bedoya y Murillo, 2012).

Particularmente, ha afectado poblaciones de aves que anteriormente permanecían aisladas, las cuales han realizado procesos de migración regionales (Helbig, 2001; Fjeldså et al. 2005; Ocampo, 2008), dando como resultado la ampliación del rango de distribución (Sibley, 1958; Rhymer y Simberloff, 1996; Allendorf et al. 2001), el establecimiento de poblaciones simpátricas (Allendorf et al. 2001), la generación de áreas estrechas de contacto secundario (Confer, 2006) y la posible formación de zonas híbridas (Wayne et al. 1992; Rhymer y Simberloff, 1996; Frankham et al. 2009), como ha ocurrido con las tángaras del género *Ramphocelus* en el valle del Río Cauca (Sibley, 1958; Bedoya y Murillo, 2012), cuyos mecanismos de desplazamiento intrínsecos a los nuevos rangos de distribución de estas tángaras son rápidos y no hicieron parte de su historia evolutiva (Sibley, 1958).

La evolución de las tángaras se inscribe en un período comprendido entre principios y mediados del Mioceno (Burns, 1997; Barker et al. 2002), después de la elevación inicial de la región de los Andes (Potts y Behrensmeyer, 1992).

Nuevos hábitats se formaron a través del levantamiento de las Cordilleras andinas (páramo y súper páramo) y se extendieron con el cambio climático en el Pleistoceno (Lessa et al. 2003), a razón de la joven geología de las montañas, lo que sugiere la formación de centros evolutivos que han permitido la continua diversificación y especiación de los diferentes grupos de aves, entre ellas las tángaras (García-Moreno et al. 2001, Sedano y Burns, 2009).

En la actualidad, la influencia antropogénica sobre los rangos de distribución de las especies se ha convertido en uno de los eventos ecológicos dominantes de nuestra época (Cónfer, 2006; Leite et al. 2008); continuos procesos de segmentación de hábitat, la implementación de grandes áreas de cultivo y ganadería, sumando a ello grandes extensiones para uso de cultivos ilícitos sobre las aéreas Cordilleranas de los Andes (Fjeldså et al. 2005), han conllevado al desplazamiento de las poblaciones de muchas especies animales y vegetales alterando sus rangos de distribución, propiciando su extinción o la de otras especies (Fjeldså et al. 2005). Dentro de estos grupos de organismos, las aves y especialmente las tángaras no escapan a los impactos generados por causa de la influencia antropogénica (Bedoya, 2007) y muy probablemente, como consecuencia de dichos procesos, *Ramphocelus icteronotus* (Lafresnaye, 1846) se ha desplazado fuera de su rango de distribución histórico desde el Chocó biogeográfico (Hilty y Brown, 1986), estableciendo poblaciones en áreas montañosas del departamento de Santander (McMullan et al. 2010, observación personal).

Estudios basados en ADN mitocondrial (ADNmt), se han centrado en determinar el posible centro de diversificación (Burns, 1997), esclarecer relaciones filogenéticas (Hackett, 1996; Burns y Racicot, 2009; Sedano y Burns, 2010) y establecer tiempos de divergencia y analizar la estructura genética (González, 2009) de Aves

de la familia Thraupidae, siendo común en todos estos, el uso de genes mitocondriales como el gen *Cyt b*.

En Colombia se han realizado esfuerzos dirigidos a la descripción de poblaciones aisladas e híbridas de *Ramphocelus flammigerus* (Jardine y Selby, 1833) y *R. icteronotus*, las cuales coexisten en el valle geográfico del Río Cauca y en algunas zonas de la Cordillera Occidental (Sibley, 1958; Bedoya, 2007; Bedoya y Murillo, 2012) encontrando diferencias en la estructura y diversidad genética de estas taxa como resultado, posiblemente, del contacto secundario entre ellas en poblaciones del Pacífico colombiano (Ocampo, 2008; González, 2009). Ninguno de estos estudios ha incluido el análisis de marcadores altamente variables como la región control (*D-loop*) del ADNmt, la cual evoluciona con una tasa de mutación más rápida dentro de la molécula (Baker y Marshall, 1997) característica que permite tener una mayor resolución en estudios de variabilidad genética a nivel intrapoblacional (Kvist et al. 2001; Rhymer et al. 2001) y la convierte en una herramienta muy útil al momento de realizar estudios genéticos a nivel intrapoblacional (Moore y DeFilippis 1997; Baker y Marshall 1997; Rondón, 2007; Mtileni et al. 2011).

Teniendo en cuenta el hecho que no existen estudios encaminados al análisis de la dinámica poblacional, al establecimiento de la variación genética a partir de la información presente en secuencias *D-loop* del ADNmt, lo cual genera un vacío de conocimiento acerca del estado genético de las poblaciones de *Ramphocelus icteronotus* presentes en el departamento de Santander, se convirtió en el principal objetivo de la presente tesis, estudiar la variabilidad genética a partir de cebadores diseñados en nuestro laboratorio, los cuales permiten amplificar y secuenciar la región control del ADN mitocondrial en individuos de *R. icteronotus*. Adicionalmente, a partir del tipo y frecuencias de haplotipos caracterizados, se buscó establecer el grado de estructura genética considerando tres localidades de muestreo como una meta-población.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Modificación del hábitat y sus efectos

Los ecosistemas de los Andes Colombianos han sufrido una destrucción paulatina, causada por el aumento de las actividades antropogénicas en las últimas décadas (Fjeldså et al. 2005); lo que ha conllevado al detrimento de las poblaciones naturales tanto de fauna y flora, por modificación del hábitat, hecho que puede causar el rompimiento de las dinámicas naturales de las especies nativas de poblaciones de aves que anteriormente permanecían aisladas (MacDougall, 2011), las cuales han alterado sus dinámicas de distribución regionales dando como resultado la ocupación de nuevos ecosistemas(Confer, 2006).

Con el aumento de las presiones antrópicas y sumado los efectos del cambio climático global en poblaciones naturales (Møller et al. 2010), se esperaría un incremento en los casos de hibridación (Miller, 1949; Rhymer y Simberloff, 1996; Lamont et al. 2003), máxime cuando entre las especies parentales algunas tienen la capacidad de adaptarse a nuevos ambientes rápidamente, como es el caso de *R. icteronotus* (Isler e Isler, 1999; Rhymer ; 2006; Bedoya, 2007). Por lo tanto la modificación del hábitat causada por el hombre, además de conectar hábitats previamente separados, puede conducir a la diferenciación y al aislamiento a causa de la reducción del flujo génico entre distintas poblaciones de varias especies (González, 2009).

## 1.2 Generalidades de la especie estudiada

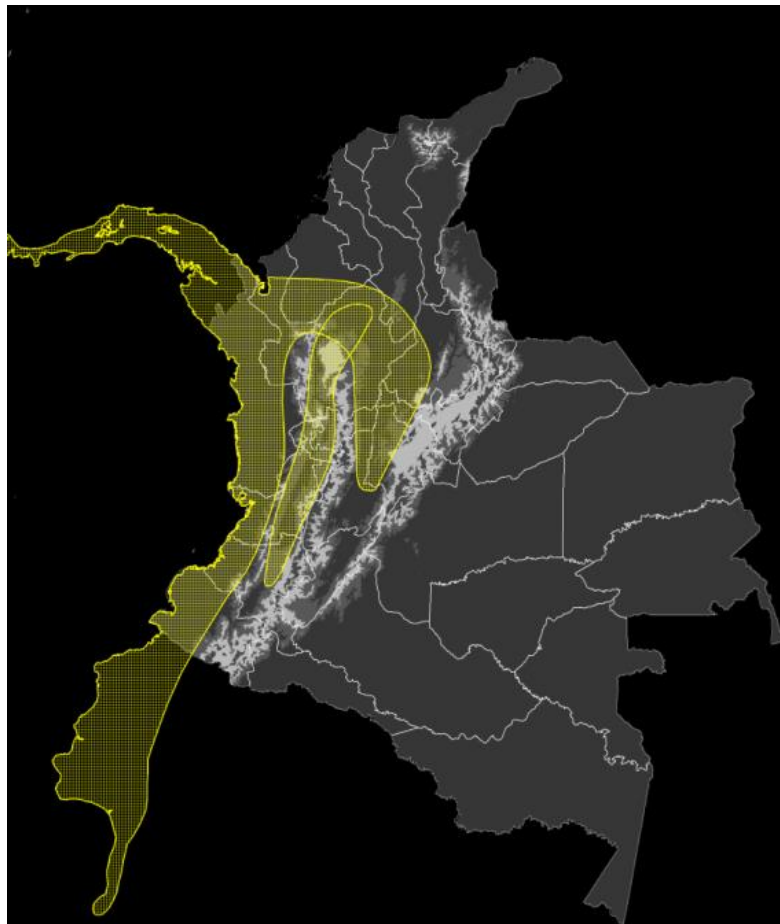
Con cerca de 347 especies, la familia Thraupidae representa uno de los grupos taxonómicos más diversos de aves presentes en el neotrópico (Fjeldså y Rahbek, 2006), cuyos integrantes explotan una amplia gama de recursos alimentarios, presentan plumajes con coloraciones brillantes y llamativas (Hackett 1996, Burns 1997, Isler e Isler 1999, Fjeldså y Rahbek, 2006) y en algunos casos se ha documentado la ampliación de sus rangos de distribución geográfica (McMullan et al. 2010; Donegan et al. 2010; Ridgely y Bird Life International, 2012).

*Ramphocelus* es un género de la familia Thraupidae que contiene nueve especies presentes en el neotrópico (Isler e Isler, 1999). En Colombia se han registrado poblaciones de cinco especies de este género (Hilty y Brown, 1986; McMullan et al. 2010), dentro de estas la especie *R. icteronotus* (Lafresnaye, 1846), históricamente se ha distribuido a lo largo del Chocó biogeográfico (Isler e Isler, 1999), siendo una de las aves más comunes en bordes de bosque, matorrales y plantaciones de la vertiente pacífica de la Cordillera Occidental (Hilty y Brown, 1986). Actualmente se han registrado poblaciones en la región media del valle geográfico del Río Magdalena (McMullan et al. 2010) (Figura 1).

El macho de *R. icteronotus* presenta una coloración predominantemente negra, rabadilla amarillo limón y pico perlado azul; la hembra presenta tonalidades ocres entre el amarillo y marrón (Figura 2). La principal fuente de alimento de estas aves son los frutos de banano, guayaba, algunas melastomatáceas, *Cecropia* y piperáceas, las cuales son forrajeadas en grupos familiares (Bedoya, 2007, observación personal).

Cultivos de algunos frutales referenciados anteriormente, han sido implementados en grandes áreas del país y hacen parte del pan coger de las poblaciones campesinas, esto trae como consecuencia un incremento de la frontera agrícola,

generando agroecosistemas asociados a relictos boscosos, lo cual ha conllevado posiblemente al desplazamiento de poblaciones de esta especie, lo cual permitiría explicar los registros de individuos de *R. icteronotus* avistados en zonas montañosas del departamento de Santander (Avendaño, 2006; observación personal).

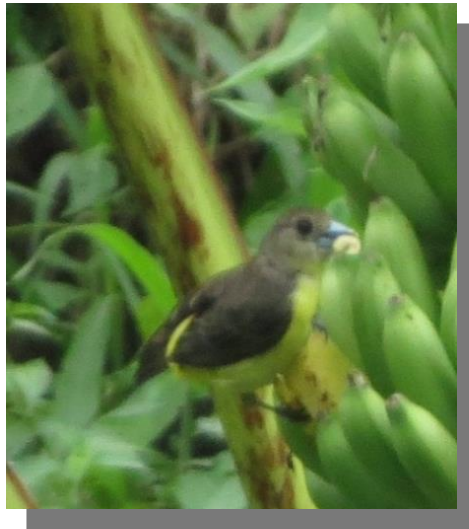


**Figura 1.** Distribución geográfica de *Ramphocelus icteronotus*. Fuente: IUCN (2013).

A.



B.

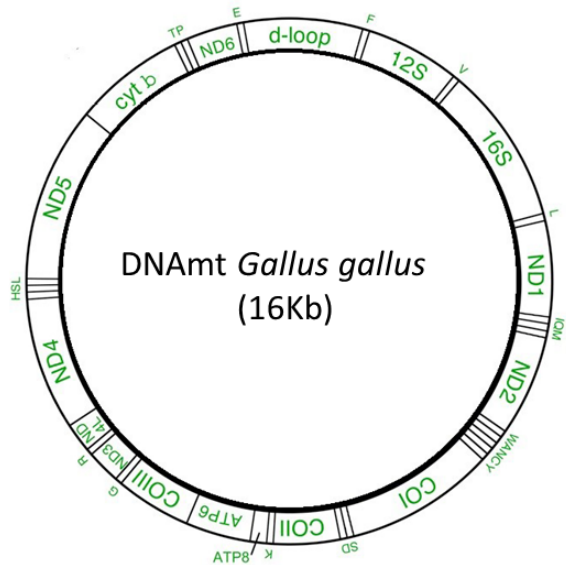


**Figura 2.** Individuos de *Ramphocelus icteronotus*. A) Macho; B) Hembra.

### **1.3 Genoma mitocondrial y su utilidad en estudios genéticos poblacionales**

La molécula de ADN mitocondrial se encuentra al interior de las mitocondrias de las células Eucariotas (Cooper y Hausman, 2008), dado su herencia materna y ausencia de recombinación (Rondón et al. 2007; Li et al.2010), en esta molécula se suelen preservar mutaciones al interior de la misma, las cuales se pueden reconocer como linajes de haplotipos (Rondón et al. 2007) y su variación se correlaciona altamente con el origen geográfico de las muestras (Liu et al. 2006; Mtileni et al. 2011); por tanto, cualquier haplotipo ancestral es factible de poder correlacionarse con fenotipos particulares en una especie (Confer, 2006).

El ADNmt presenta características que le han conferido una posición predominante en estudios genéticos poblacionales, biogeográficos y evolutivos, en una gran variedad de organismos (Kvist, 2000; Rest et al. 2003 Avise, 2004), destacándose entre otras una organización circular simple y compacta (Wolstenholme, 1992; Pereira, 2000)(Figura 3), el elevado número de copias por célula que

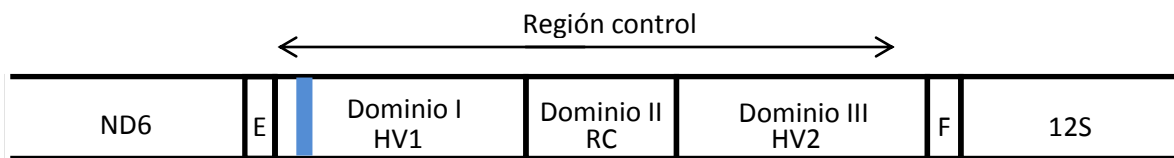


**Figura 3.** Mapa del genoma mitocondrial de *Gallus gallus* (Sorenson, 1999).

presenta, la ausencia de eventos de recombinación y la tasa de variación entre 5 a 10 veces mayor que la estimada para secuencias del genoma nuclear (Aquadro y Greenberg, 1983). Esto último se ha atribuido a que el genoma mitocondrial no codifica para las enzimas involucradas directamente en la polimerización y reparación de errores durante su replicación y la transcripción de los genes presentes en él (Cooper y Hausman, 2008).

La región codificante del ADNmt contiene 37 genes (Mindell et al. 1998; Saccone et al. 1999; Pereira, 2000; Resto et al. 2003), además de presentar una región no codificante, altamente variable denominada región control ó asa de desplazamiento *D-loop*, por sus siglas en inglés (Goodwin, 2007). Esta región contiene los promotores de transcripción mitocondrial y es un sitio de control que ejerce la regulación en la replicación y transcripción de la molécula (Quinn, 1997; Sorenson, 1999, Kvist, 2000).

Estructuralmente la región control contiene tres zonas reconocibles en forma de dominios (Figura 4), las cuales varían significativamente en cuanto a su composición de bases (Ruokonen y Kvist, 2002; Ketmaier y Bemardini, 2005). El dominio I HV1 es rico en AC y con bloques fuertes de Citosinas (*C-stretch*) y aparentemente se relaciona con funciones estructurales. El dominio II ó región central, es el más conservado de los tres, se caracteriza por su alto contenido de CT. El dominio III ó HV2 presenta alto contenido de AT y pobre en G (Baker e Marshall, 1997; Ruokonen y Kvist, 2002).



**Figura 4.** Estructura de la región control del ADNmt en Aves. ND6: gen NAD deshidrogenasa sub-unidad 6; E: tRNA de Glutamina; CS: *C-strech*; HV1: región hipervariable 1 (Dominio I); RC: región central (Dominio II); HV2: región hipervariable 2 (Dominio III); F: tRNA de Fenilalanina; 12S: gen ribosomal sub-unidad 12S.

El análisis de haplotipos obtenidos de secuencias mitocondriales ha mostrado que el *D-loop* ha sido considerado como una fuente potencial de marcadores genéticos apropiado para estudios a nivel intrapoblacional (Baker y Marshall, 1997; Brown et al. 1986; Miyazono et al. 2002; Ritchie y Lambert, 2000; Rondón et al. 2007) y entre especies cercanamente relacionadas (Lacerda et al. 2007; Mtileni et al. 2011).

El *D-loop*, como ya se mencionó, se caracteriza por tener una alta tasa de variación (Aquadro y Greenberg 1983; Cann et al. 1984; Heyer et al. 2001), una fuerte composición de CG y las estructuras en escorpión *C-strech* (Delport et al, 2001;Pereira et al. 2004; Mtileni, 2011). Precisamente estas características,

hacen que la región control del ADNmt sea un segmento difícil de amplificar con cebadores universales para vertebrados en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Delpont et al, 2002), lo cual se considera la principal razón por la que este marcador haya sido usado en menor frecuencia en estudios genéticos poblacionales. Lo anterior implica que se hace necesario la búsqueda y diseño de cebadores que permitan amplificar dicha región al momento de realizar estudios genéticos poblacionales que la involucren.

#### **1.4 Diseño de cebadores para PCR**

La biología molecular ha experimentado fuertes avances dirigidos al desarrollo de nuevos métodos de alto rendimiento para la secuenciación y análisis de genomas completos (Yurvey, 2008). Dentro de ellos, el diseño de cebadores es fundamental para la ejecución de proyectos que utilizan la PCR (Sorenson, 1999; Brodin, 2013). En el sentido expuesto, se han diseñado múltiples algoritmos dependiendo de la meta particular del proyecto, en los cuales se incluyen parámetros de selección simples, así como consideraciones propias sobre las características de longitud y composición del segmento de interés a analizar (Rychlik et al. 1990).

El diseño de cebadores para PCR de segmentos de ADN altamente variables, ha mostrado ser dificultoso y la eficiencia en la reacción requiere prestar atención a características propias de estos segmentos (Rychlik et al. 1990; Chavali et al. 2005; Brodin et al. 2013), como lo son variantes propias ocultas en la población, determinación de sitios degenerados para maximizar la cobertura en las poblaciones (Brodin et al 2013), cálculo de la temperatura de Anelamiento ( $T_m$ ) a

partir de la composición nucleotídica de la secuencia de interés (Rychlik et al. 1990, Henke et al. 1997), minimizar el riesgo de dímeros de cebadores o autohibridación (He et al. 1994), entre otras.

### **1.5 Estudios genéticos poblacionales en *Ramphocelus icteronotus*.**

Aunque se han diseñado cebadores que amplifican porciones del genoma mitocondrial y nuclear en aves del género *Ramphocelus*, estos han sido utilizados inicialmente en el establecimiento de las relaciones filogenéticas de las especies de este género (Hackett, 1996; Burns y Racicot, 2009; Barker et al. 2013) y la determinación de sistemas de marcadores moleculares tipo microsatélites (Krueger y Williams, 2006).

En Colombia solo se han realizado estudios genético poblacionales que involucran a *R. icteronotus*. En dichos estudios se han utilizado secuencias presentes en el gen citocromo b del ADNmt; estos han evidenciado moderada estructuración genética poblacional, lo que indica un proceso de diferenciación incipiente en las poblaciones analizadas (González, 2009).

Por su parte, Ocampo (2008) utilizó marcadores microsatélites nucleares y mostró que *R. icteronotus* presenta alta heterocigocidad y por tanto alta diversidad genética en las poblaciones analizadas en la costa Pacífica colombiana, pese a la continua intervención antrópica sobre los bosques en los que esta especie es común en dicha región de Colombia.

Los resultados de las dos investigaciones referenciadas anteriormente, tienen en común que *R. icteronotus* exhibe moderada estructura, sin embargo la principal

conclusión del trabajo de González (2009) radica en la pérdida de diversidad genética del taxón endémico en Colombia (*R. flammigerus*) a causa de introgresión genética de haplotipos de *R. icteronotus*.

Recientemente, estudios realizados a partir de la comparación morfológica entre *Ramphocelus flammigerus*, *R. icteronotus* y sus híbridos evidenciaron diferencias significativas entre los grupos analizados, donde los híbridos expresaron fenotipos intermedios entre los *R. flammigerus* y *R. icteronotus* (Bedoya y Murillo, 2012). De esta investigación se deriva la sugerencia de estudiar a profundidad la variación genética de las dos especies involucradas en el fenómeno de hibridación.

Carreño (2013), realizó una primera evaluación de la diversidad genética en poblaciones de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* en el departamento de Santander, para esto utilizó secuencias del gen Cyt b como marcador genético. Los resultados muestran ausencia de haplotipos compartidos pese a la simpatria de estas dos especies, además del elevado grado de diferenciación genética entre ellas. Adicionalmente, dentro *R. icteronotus* no evidenció diferenciación genética soportada por un elevado flujo génico en los diferentes componentes subpoblacionales considerados.

Con base en todo lo expuesto y teniendo en cuenta que ninguno de estos estudios ha incluido el análisis de secuencias nucleotídicas de alta variabilidad como lo es la región control (*D-loop*) del ADNmt, la cual aporta mayor resolución en estudios a nivel intrapoblacional y microevolutivos, se justificó la puesta en marcha de un macroproyecto, del cual hace parte el presente trabajo de grado, que permitiera estudiar la diversidad genética de especies del género

*Ramphocelus* en el departamento de Santander. Con el desarrollo de esta tesis se pretendió ampliar la base de estudios de diversidad genética en poblaciones de *Ramphocelus icteronotus*, a partir del diseño de cebadores que permitieran amplificar y secuenciar el *D-loop* del ADNmt en esta especie. Lo anterior a objeto de evaluar la hipótesis de presencia de algún grado de estructura genética, en poblaciones de *R. icteronotus* avistadas y registradas por nuestro grupo de investigación en el departamento de Santander, como consecuencia de la ampliación del rango de distribución de dicha especie.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente trabajo de grado es un producto del proyecto de investigación: “Estudio de la diversidad genética y relaciones morfométricas en dos especies del género *Ramphocelus* (Aves: Passeriformes: Thraupidae) en el departamento de Santander, Colombia”. Dicho proyecto fue financiado por la Vicerrectoría de Investigación y extensión de la Universidad Industrial de Santander (UIS) y quedó registrado bajo el código VIE-UIS 5188.

Previamente al diseño de los cebadores se realizaron ensayos con los iniciadores reportados por Tarr (1985), Sorenson (1999), Lacerda et al. (2007), utilizados en la amplificación de la región control en diferentes taxa de aves.

### **2.1 Fase *in silico***

#### **2.1.1 Diseño de cebadores para amplificación y secuenciación de la región control**

Todo el diseño dirigido a la determinación de los cebadores utilizados en el desarrollo de la presente tesis, fue orientado por el profesor Francisco Martínez Pérez director del Laboratorio de Genética de Celomados, utilizando la Unidad de Súper Cómputo y Cálculo Científico del Centro de Investigación, ambos en la Universidad Industrial de Santander.

### **2.1.2 Búsqueda de genomas**

Se realizó una búsqueda de los genomas mitocondriales completos de aves disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; Dotson y Beard, 2001) mediante *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Coulouris et al. 2012), los cuales fueron descargados en un archivo de texto plano y con formato Fasta.

### **2.1.3 Alineamiento**

Los genomas completos de ADNmt de aves descargados fueron alineados con el software Clustal W (Thompson et al.1997) bajo el modelo de pérdida de ADN propuesto por Martínez-Pérez et al. (2007). Con base en el alineamiento se determinaron: los genes, la posición y tamaño dentro del genoma y la delimitación y composición de la región control del ADNmt.

Posteriormente se realizó la búsqueda de regiones conservadas y secuencias consenso ubicadas en los genes que flanquean el *D-loop*, cuya composición nucleotídica fue analizada según los parámetros convencionales de contenido de CG (Allawi y Santa-Lucia, 1998), formación de estructuras en escorpión y auto hibridación (Santa-Lucia et al. 1996), mediante el programa Bioedit v7.2.3 (Hall, 1999), a objeto de diseñar cebadores de 23 a 25 nucleótidos que no presentaran estructuras secundarias o que funcionaran como cebadores tipo escorpión. Esta misma estrategia se utilizó al interior de la región control.

Los segmentos conservados como posibles secuencias cebadoras fueron analizados según los parámetros del programa Oligo Primer v4.1 (National

Biosciences, inc) y finalmente probados *in-silico* mediante BLAST y *primer* BLAST (Coulouris et al. 2012). Las secuencias finales fueron enviadas a sintetizar y purificar con cartuchos de fase reversa en Bioneer (Korea).

## 2.2 Fase de campo

### 2.2.1 Área de estudio

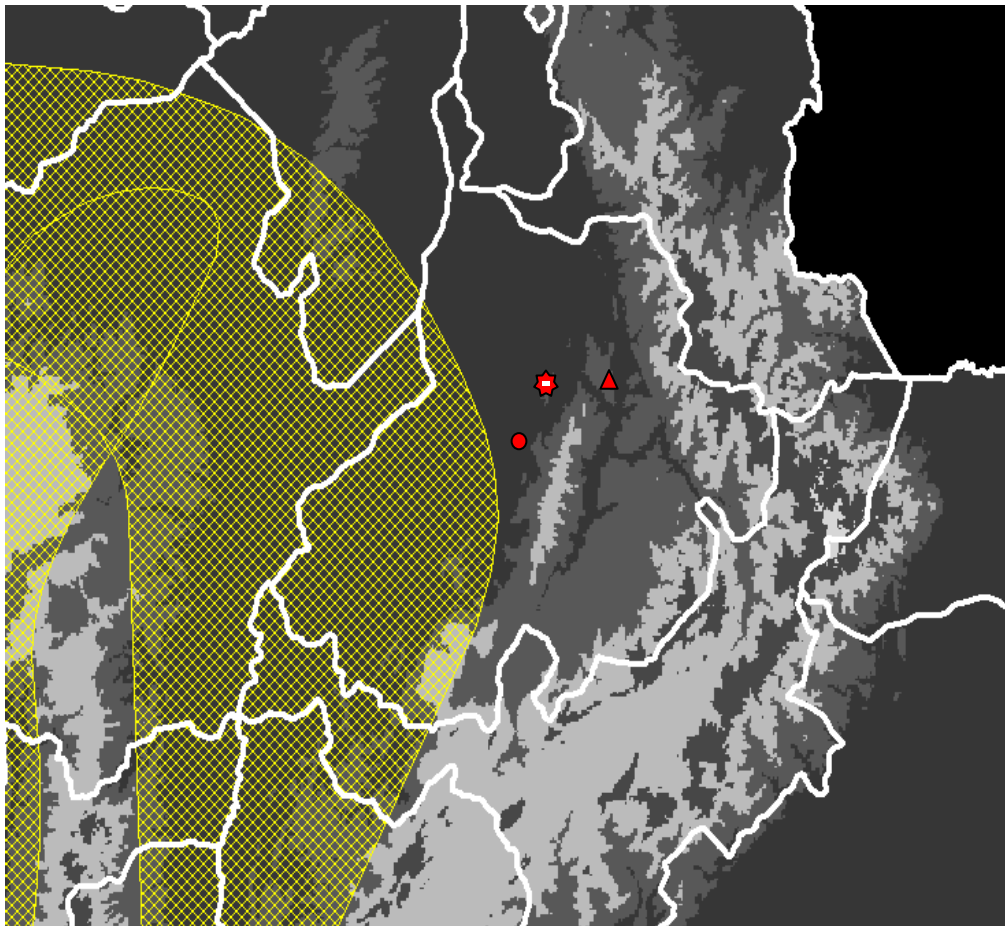
La fase de campo del estudio se llevó a cabo en el flanco occidental de la Cordillera Oriental de los Andes colombianos, en el departamento de Santander (Figura 5). Se realizaron muestreos en tres diferentes localidades las cuales fueron seleccionadas luego de realizar registros previos de *R. icteronotus* mediante camitas de observación.

Las tres localidades se encuentran fuera de la distribución de la especie, se caracterizan principalmente por ser sistemas de producción agrícola y ganadero y se destaca en ella la presencia de pequeños remanentes de bosque. En cada localidad se trazaron transectos imaginarios sobre los cuales se instalaron ocho redes de niebla, abiertas entre las 05:00 y las 17:00 horas. Se dedicó un esfuerzo promedio de 50 días de muestreo, para un aproximado de 96 horas redes/día en los tres sitios.

**SV:** Es la localidad que se halla más cercana a la distribución de *R. icteronotus* (Figura 5), se ubica en la vereda La Colorada a 1180m, en el municipio de San Vicente de Chucurí. La zona se caracteriza por el cultivo de café, cítricos, banano, y fuertes extensiones de Cacao y Aguacate. Predominan en ella árboles de las

familias Myrtaceae, Fabaceae, Moraceae y Crecopiaceae, con algunos reductos de bosque secundario y en recuperación que circundan la localidad.

**FB:** Se ubica en la vereda los Helechales a 1450m del municipio de Floridablanca (Figura 5), se caracteriza por ser una zona de montañas escarpadas con fuertes remanentes de bosque secundario donde predominan los cultivos de café, cítricos y bananos. En la zona se destaca la influencia de la reserva civil Los Maklenkes, declarada como área de importancia para la conservación de las aves (AICA), importante para el refugio y tránsito de las aves de la región.



**Figura 5.** Ubicación de las áreas de estudio del presente trabajo de grado. Triangulo: FB; Estrella: LA; Circulo: SV. En amarillo vista de la distribución de *Ramphocelus icteronotus* según IUCN (2013).

**LA:** Situada en la vereda San Bernardo de la Cuchilla con un altura aproximada de 970m en el municipio de Lebrija (Figura 5), esta zona es principalmente ganadera con presencia parcial de cultivos de cítricos, cacao y café. Dentro de la zona existe reserva de ocho hectáreas denominada “La Tagua”, en honor a la presencia de gran cantidad de palmas del mismo nombre. De igual manera cabe destacar que esta localidad hace parte de la zona de impacto secundario del proyecto Represa Hidrosogamoso que en la actualidad se construye en la región.

### **2.2.2 Toma y almacenamiento de muestras**

A cada individuo capturado se le extrajo en promedio 50 µl de sangre de la vena braquial, utilizando jeringas de 1ml de aguja fija. La sangre se almacenó en mini colectores Vacutainer con EDTA 0,05M, almacenados en frío (4°C) hasta su procesamiento en el laboratorio; de igual forma se conservó una gota de sangre en un papel filtro estéril. Cada muestra fue rotulada con las dos letras iniciales del género y de la especie y el número de captura. Para evitar replicar datos de un mismo individuo, estos fueron codificados con anillos de color en el tarso izquierdo (Figura 2A).

### **2.3 Fase de laboratorio**

Las muestras de sangre fueron procesadas tanto en el laboratorio del Grupo de Investigación en Biotecnología Industrial y Biología Molecular (CINBIM), como en el laboratorio de Genética de Poblaciones y de la Conservación (LGPC), ambos adscritos a la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.

### **2.3.1 Extracción de DNA**

En total se capturaron 28 individuos a los cuales se les extrajo el ADN mediante el uso del kit DNeasy Blood and Tissue™ (Qiagen, Maryland), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN fue visualizado por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8%, corridos a 100 voltios durante 30 minutos y teñidos con colorante EzVision (AMRESCO).

### **2.3.2. Amplificación y secuenciación de la región control**

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador AB 2720 (Applied Biosystems) a partir de los cebadores diseñados y con las siguientes condiciones para la reacción: 1X buffer *DreamTaq*10X, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,3μM de cada cebador, 1U de enzima *Dream taq* (ThermoScientific) y 1μl de ADN (20ng/μl). El programa de la reacción fue el siguiente: 95°C por 5min, seguido por 35 ciclos que constan de 95°C por 30s, 56,6°C por 45s y 72°C por 1min y una extensión final a 72°C por 7 min. Todos los productos de PCR fueron visualizados por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa, corridos a 100 voltios durante 40 minutos y teñidos con colorante EzVision (AMRESCO). Los tamaños de los fragmentos fueron estimados comparándolos con un marcador de peso de 1Kb (ThermoScientific).

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por duplicado en MACROGEN Inc (Corea), a partir de los cebadores diseñados para la amplificación.

## **2.4 Análisis de los datos**

### **2.4.1 Descripción de las secuencias**

Se tuvieron en cuenta 22 secuencias de 28 muestras para los respectivos análisis moleculares y estadísticos; de las otras seis muestras no se logró obtener secuencias óptimas para ser incluidas en el estudio (Anexo B). Las secuencias obtenidas se alinearon con los programas Bioedit v7.2.3 (Hall, 1999) y Mega v5.2.2 (Tamura et al. 2011), a fin de generar una secuencia consenso para determinar los dominios I y II de la región control del ADNmt en *R. icteronotus*, como lo proponen Roukonen y Kvist (2001) y Pereira et al. (2004). A partir de la secuencia consenso se determinó la composición nucleotídica en porcentaje (%) de cada una de las bases (A, T, G, C) y se calculó tanto el porcentaje de homología con base en los sitios polimórficos (transiciones o transversiones) con el programa Mega v5.2.2 (Tamura et al. 2011).

### **2.4.2 Tipificación de haplotipos y estimación de parámetros de diversidad genética**

A partir de los índices de similitud se realizó un análisis de conglomerados (UPGMA) para establecer la secuencia de *R. icteronotus* más distante. Con base en dicha secuencia se caracterizaron los sitios polimórficos y se tipificaron los diferentes haplotipos *D-loop* (Remírez, 2004). También se estimó el número y frecuencia de los haplotipos detectados en cada localidad, así como la variación genética en términos de diversidad haplotípica ( $h$ ), el número de sitios segregantes o polimórficos y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), todo lo anterior con el uso del software DnaSP v4.5.3 (Rozas et al. 2009).

### **2.4.3 Estructura y flujo génico**

Se evaluó el flujo génico entre los componentes subpoblacionales, entendido como una estimación del número de migrantes ( $N_m$ ) efectivos por generación (Frankham, 2002) y el porcentaje de variación genética se calculó mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) usando el programa Arlequín v3.5.1. (Excoffier et al. 2009). Con el objeto de disminuir el error por el tamaño de la muestra, se realizó un análisis estadístico utilizando la estrategia del vecino más cercano ó Snn, de sus siglas en inglés, propuesto por Hudxon (2000); adicionalmente se construyó una red de haplotipos mediante el programa Network (FluxusTechnology Ltd).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Diseño de cebadores

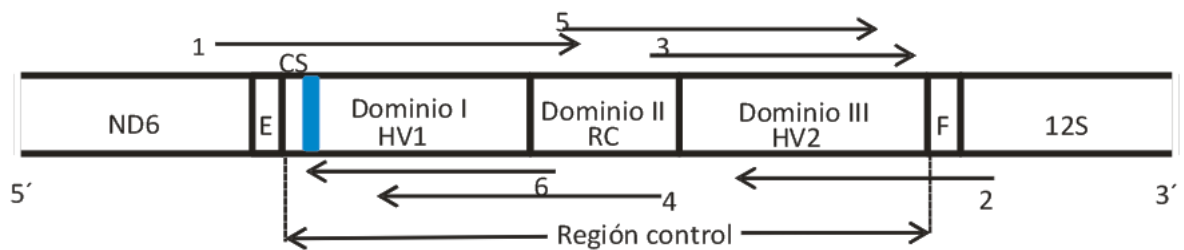
Después de realizar múltiples ensayos con los iniciadores reportados por Sorenson (1999), Tarr (1985), Lacerda et al. (2007), se obtuvieron productos de PCR inespecíficos, los cuales no se consideraron óptimos para someter a reacción de secuenciación. Estos ensayos fueron realizados en muestras de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* (Anexo A).

A partir del uso de 112 secuencias completas de ADNmt de 16Kb de longitud, en promedio, de aves Passeriformes disponibles en la base de datos del NCBI (Anexo A) y alineadas con los parámetros propuestos para el modelo de pérdida de ADN, 0,05 extensión de *gap* y 9 de apertura de *gap* (Martínez- Pérez, 2007), se logró establecer la posición y la delimitación de la región control del ADNmt y se seleccionaron regiones conservadas en los genes ND6 y ARNr 12S que flanquean al *D-loop* (Figura 4). Con base en dichas regiones se estableció una estrategia de amplificación y secuenciación de la región control de ADNmt de *R. icteronotus*, a partir del uso de seis cebadores que presentaron en promedio 24 nucleótidos de longitud (Tabla 1). Dos de ellos flanquean completamente la región control e incluyen los ARNt de Fenilalanina y Glutamina y los restantes cuatro se ubican al interior del dominio II (Figura 6).

**Tabla 1.** Cebadores diseñados para amplificar y secuenciar la región control de ADNmt en *Ramphocelus icteronotus*.

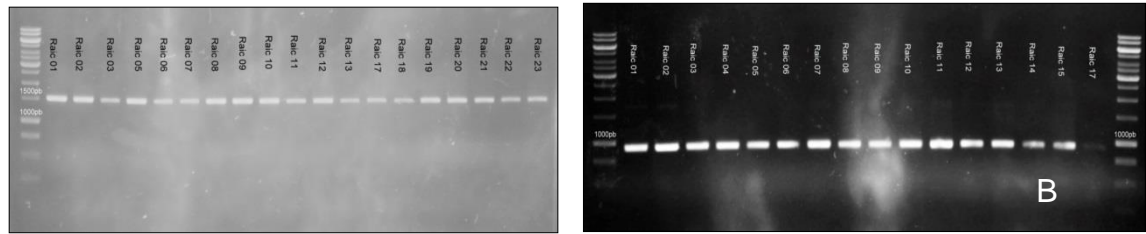
N°	Cebador	Secuencia del cebador (5´- 3´)
1	LND6	A C A C C G T A A T A C C G T G A T G G G T T T G <i>Forward</i>
2	H12S	G C G C C T A T G A A C G T A C A T A T A T G G <i>Reverse</i>
3	LRC2	C A G A T A G T G T A A T G G T T G C C G G A C <i>Forward</i>
4	HRC2	C A G G G C G T T G G T T A A T T C A T A G A T <i>Reverse</i>
5	LRC1	C T C T T G A C A T G T C C A T C A T A T G A C <i>Forward</i>
6	HRC1	C A G T A T A C T A C C T G T A C A G T T C T C <i>Reverse</i>

L: Cadena liviana ADNmt; H: Cadena pesada ADNmt.



**Figura 6.** Posición de los cebadores en el ADNmt. 1: LND6; 2: H12S; 3: LRC2; 4: HRC2; 5: LRC1; 6: HRC.

La combinación de los cebadores permite amplificar productos de PCR, cuyos fragmentos presentan entre 450pb hasta 1500pb (Figura 7). Estos fueron implementados para amplificar y secuenciar en forma efectiva otras especies de Thraupidae (*Ramphocelus dimidiatus*), Emberizidae (*Zonotrichia capensis*) y Cardinalidae (*Habia gutturalis*) (Anexo D), haciendo de este juego de cebadores una herramienta importante para futuros estudios evolutivos y de genética de poblaciones en otras familias de Oscines.



**Figura 7.** Productos de PCR obtenidos con los cebadores diseñados en el presente estudio. A) Amplificado de 1500pb conseguido con los cebadores LND6 y H12S; B) Amplificado de 950pb conseguido con los cebadores LND6 y HRC1.

### 3.2 Descripción de la secuencia obtenida de la región control del ADNmt de *R. icteronotus*

Las muestras amplificadas y secuenciadas en *R. icteronotus* se reportan en el Anexo B. Se obtuvieron secuencias de 900 nucleótidos de los 1200pb que aproximadamente contiene la región control de aves (Baker y Marshal, 1997), equivalentes al 75% de dicha región. Todas las secuencias se caracterizaron por incluir el gen ARNt-Glu, el cual comprende 71 nucleótidos antes del inicio de la región control del ADNmt (Figura 6). A partir del alineamiento de las secuencias de dicho gen ARNt-Glu se estableció la posición 1, inmersa en el *D-loop* del genoma mitocondrial de *R. icteronotus* (Figura 8).

Con base en la secuencia consenso (Figura 8) se describieron las características típicas de los dominios I y II de la región control de ADNmt reportadas previamente para aves por Baker y Marshall (1997), Ruokonen y Kvist (2002) y Pereira et al. (2004).

En el sentido expuesto, la composición de nucleótidos del Dominio I (comprendido desde la posición 1 hasta la 440, Figura 8) mostró C 36,56%, T 21,30%, A 29,36% y G 12,78% (Figura 9). El dominio II o región central presentó 393pb, que inician

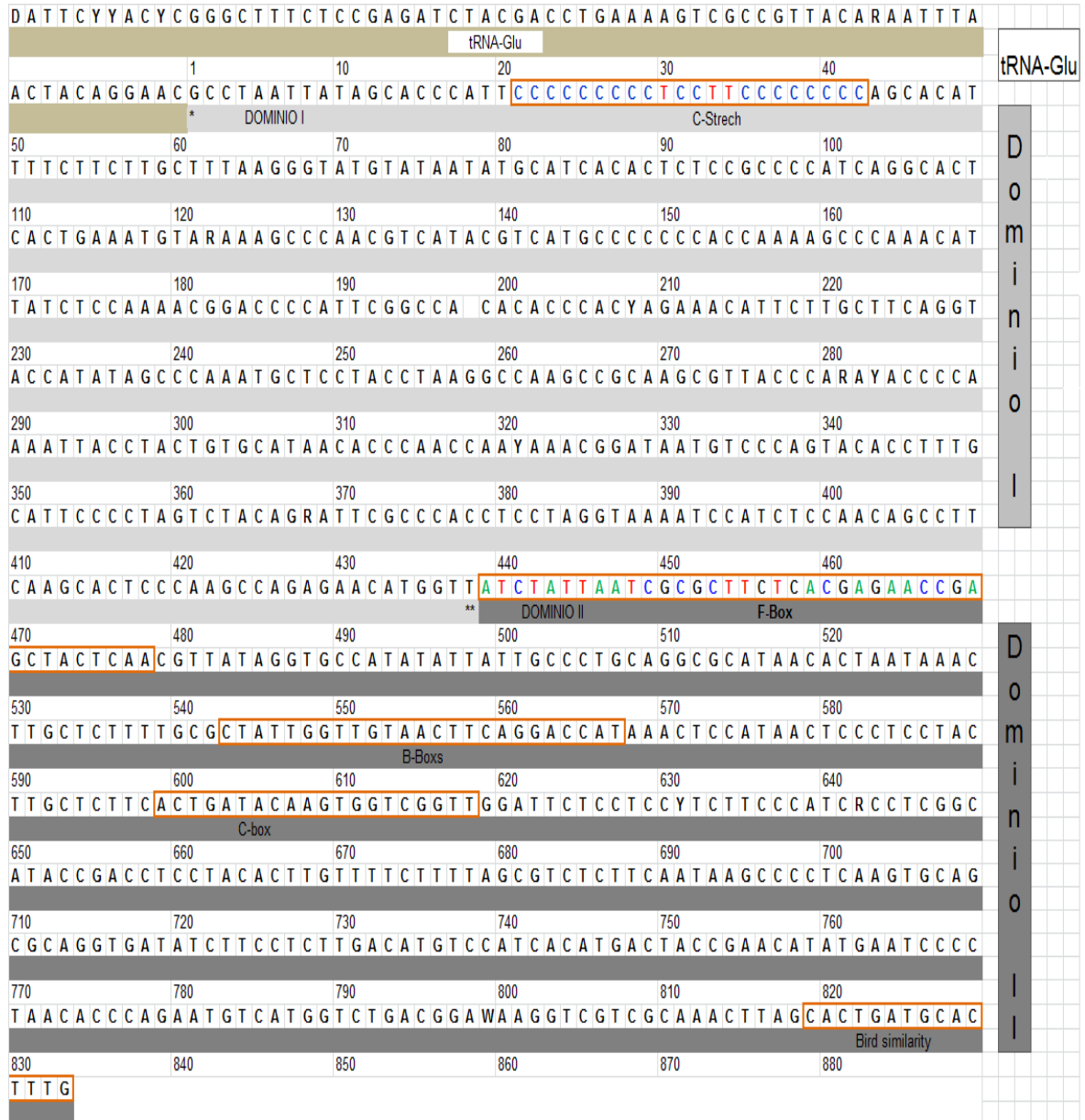
en el nucleótido 441 y finaliza en el 833 (Figura 8); la composición nucleotídica en este dominio fue T 32,6%, C 22,2%, A 26,7% y G 18,5% (Figura 9).

En el dominio II de *R. icteronotus* observaron las cuatro regiones conservadas reportadas por Pereira et al. (2004), a saber: *F-Box* (posición 441 a 479), *D-box* (posición 560 a 584), *C-box* (posición 599 a 618) y la región común en aves o *Bird similarity* (posición 819 a 834), la cual marca el final de este dominio (Baker y Marshall, 1997; Roukonen y Kvist, 2002;) (Figura 8).

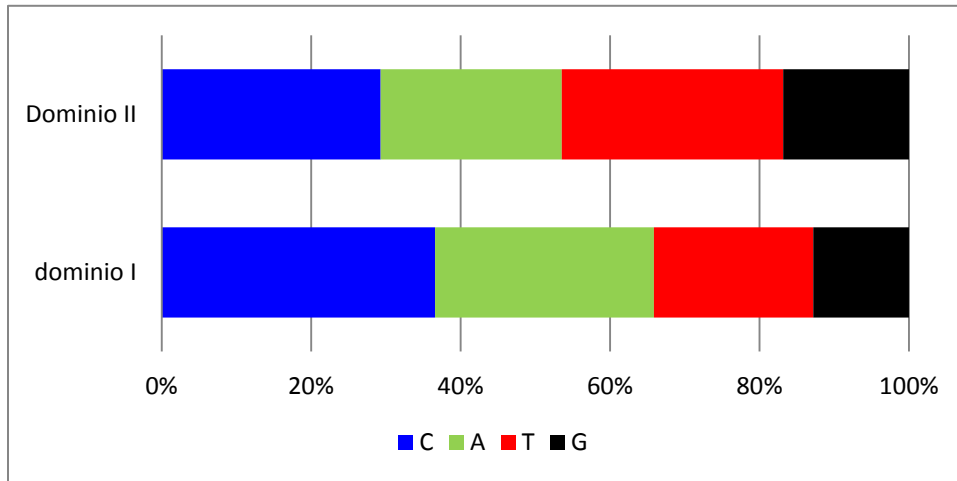
### 3.3 Diversidad haplotípica y nucleotídica

El análisis de los nucleótidos correspondientes al dominio I y parcialmente al dominio II de la región control de ADNmt caracterizada en *R. icteronotus*, permitió detectar 22 sitios polimórficos definidos en 12 haplotipos en la totalidad de localidades muestreadas (Tabla 2), siendo el más frecuente el denominado Hap 8 ( $f=0,28$ ), el cual estuvo presente en las tres localidades estudiadas. En general la diversidad haplotípica fue  $h=0,917\pm 0,0018$  y la nucleotídica fue  $\pi=0,0065\pm 0,01$  (Tabla 3).

En la subpoblación de *R. icteronotus* en SV se tipificaron 18 eventos mutacionales correspondientes a 13 transiciones y cinco transversiones, de estos, tres eventos son únicos y fueron detectados en el haplotipo 1 (T434G, G461A y T645G) (Tabla 2). El haplotipo más frecuente fue el Hap 8 ( $f=0,202\pm 0,087$ ). En SV la diversidad haplotípica estimada fue  $h=0,92424\pm 0,0057$  y la diversidad nucleotídica fue la mayor entre las tres localidades (Tabla 3).



**Figura 8.** Secuencia consenso parcial de la región control de ADNmt en *R. icteronotus*. Se observa el ARNt-Glu. \*Posición 1 e inicio del D-loop; *C-strech* (posición 21 a 42); \*\*Inicio del Dominio II en el cual se observan las subsecuencias *F-box*, *B-box*, *C-box* y *Bird Similarity*.



**Figura 9.** Composición nucleotídica de los Dominios I y II de la región control del ADNmt de *Ramphocelus icteronotus*.

**Tabla 2.** Sitios polimórficos de 12 haplotipos tipificados en del *D-loop* de *R. icteronotus*.

	122	208	210	281	283	301	303	321	368	427	429	434	446	461	463	561	618	623	631	636	642	645
Hap 1	G	T	G	A	T	T	T	C	A	A	A	G	A	A	A	G	G	T	C	C	G	G
Hap 2	A	.	A	.	C	G	G	.	G	.	.	T	.	G	.	.	T	.	.	T	A	T
Hap 3	.	.	.	G	C	.	.	.	.	G	G	T	.	G	G	.	T	.	.	.	A	T
Hap 4	.	.	.	G	C	.	.	.	G	G	G	T	.	G	G	.	T	.	T	.	A	T
Hap 5	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	G	T	.	G	G	.	T	.	.	.	.	T
Hap 6	.	C	.	G	.	.	.	T	G	G	G	T	.	G	G	.	T	.	.	.	A	T
Hap 7	.	C	.	.	.	.	.	T	.	G	G	T	.	G	G	.	T	.	.	.	A	T
Hap 8	.	.	.	G	C	.	.	.	G	G	G	T	.	G	G	.	T	.	.	.	A	T
Hap 9	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	G	T	.	G	G	.	T	.	.	.	A	T
Hap 10	.	C	.	G	.	.	.	.	.	G	G	T	.	G	G	.	T	.	.	.	A	T
Hap 11	.	.	.	G	C	.	.	.	G	G	G	T	G	G	G	.	T	.	T	.	A	T
Hap 12	.	C	.	G	.	.	.	.	.	G	G	T	.	G	G	C	C	A	T	.	T	T

En la subpoblación LA se detectaron 12 sustituciones de las cuales una fue transversión. *R. icteronotus* en esta localidad presentó el menor número de haplotipos tipificados en el estudio, de los cuales Hap 4 fue exclusivo (Tabla 2). Los valores estimados de diversidad haplotípica y de diversidad nucleotídica fueron los más bajos de las tres localidades estudiadas (Tabla 3).

*Ramphocelus icteronotus* en FB presentó 17 eventos mutacionales correspondientes a 13 transiciones y cuatro transversiones, de estos, tres no están compartidos con ningún otro haplotipo (G446A, C561G y A623T). Se destaca también la detección de la sustitución T642G que ayuda a definir al haplotipo 12 (Tabla 2).

**Tabla 3.** Frecuencia y distribución de los haplotipos D-loop tipificados en *R. icteronotus* en el presente estudio.

Haplotipo	Santander (n=22)		SV (n=12)		LA (n= 5)		FB (n=5)	
	<i>f</i>	s.d	<i>f</i>	s.d	<i>f</i>	s.d	<i>f</i>	s.d
Hap 1	0,043	0,0435	0,083	0,083				
Hap 2	0,043	0,0435	0,083	0,083				
Hap 3	0,087	0,0601	0,167	0,112				
Hap 4	0,043	0,0435			0,2	0,2		
Hap 5	0,174	0,0808	0,167	0,112	0,4	0,245		
Hap 6	0,087	0,0601	0,083	0,083			0,2	0,2
Hap 7	0,043	0,0435	0,083	0,083				
Hap 8	0,217	0,0879	0,25	0,131	0,2	0,2	0,2	0,2
Hap 9	0,043	0,0435					0,2	0,2
Hap 10	0,13	0,0718	0,083	0,083	0,2	0,2		
Hap 11	0,043	0,0435					0,2	0,2
Hap 12	0,043	0,0435					0,2	0,2
<i>h</i>	0,917	0,0018	0,929	0,05	0,9	0,161	1	0,127
$\pi$	0,007	0,01	0,008	0,0045	0,004	0,00299	0,007	0,005

*f*: frecuencia de haplotipos; *h*: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica; s.d: desviación estándar.

La diversidad haplotípica en FB fue la mayor entre las tres localidades estudiadas y la diversidad nucleotídica no presenta diferencias significativas con respecto a SV (Tabla 3).

### 3.4 Estructura y flujo génico

El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) mostró que dentro de las poblaciones el valor de variación fue superior al 100%, lo cual evidencia un alto flujo génico y la ausencia de estructura genética entre las subpoblaciones muestreadas, corroborado por el valor de  $\Phi_{ST} = -0,0496$  (Tabla 4) y una tasa efectiva infinita de migrantes por generación (Tabla 5).

Por otro lado, el análisis estadístico del vecino más cercano (Snn) sugiere que valores por encima de 0,46 son evidencias de diferencias genéticas entre las parejas de subpoblaciones que se estén comparando (Hudson, 2000). En el presente estudio esto no se observó entre LA y FB (Tabla 5).

**Tabla 4.** AMOVA de las frecuencias haplotípicas del *D-loop* presentes en *Ramphocelus icteronotus* en tres localidades del departamento de Santander.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	gl	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	$\Phi_{ST}$
Entre Poblaciones	3,071	2	-0,10546 Va	-4.96	-0,0496*
Dentro de poblaciones	42,383	20	2,23070 Vb	104,96	
Total	45,455		212,524		

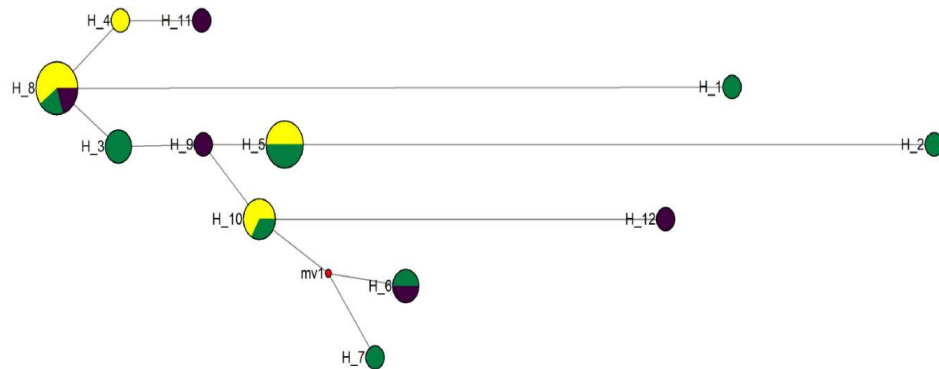
\*p=0,821; gl: grados de libertad.

**Tabla 5.** Parejas de valores de  $\Phi_{st}$ , Snn y Nm a partir del análisis de haplotipos *D-loop* entre diferentes muestras poblacionales de *R. icteronotus* del departamento de Santander.

	LA	SV	FB
LA	-	$\infty$	$\infty$
SV	-0,053 (0,49)	-	$\infty$
FB	-0,068 (0,39)	-0,014 (0,5)	-

Debajo de la diagonal: valores  $\Phi_{ST}$  y en paréntesis valores Snn; encima de la diagonal valores Nm.

La red construida a partir de los 12 haplotipos descritos en el presente trabajo, permite corroborar la no existencia de diferenciación genética entre los componentes subpoblacionales de *R. icteronotus* analizados en el departamento de Santander, ya que no se presentan agrupamientos de haplotipos específicos definidos en cada localidad (Figura 10).



**Figura 10.** Red de haplotipos *D-loop* en *R. icteronotus* generada bajo el criterio Median Joining. Los círculos son proporcionales a las frecuencias de los haplotipos; en amarillo LA, en verde SV y en violeta FB.



## 4. DISCUSIÓN

Con el análisis de genomas mitocondriales completos de aves (Anexo A) alineados bajo el modelo de pérdida de ADN (Martínez-Pérez et al. 2007), se logró el diseño de seis cebadores que permiten la amplificación y secuenciación de la región control de *R. icteronotus*. Estos iniciadores constituyen el primer hallazgo en el sentido expuesto, dado que no hay cebadores reportados para el género ni para familias afines filogenéticamente a Thraupidae (Barker et al. 2002). Adicionalmente, este estudio se constituye en el primero en analizar la variabilidad genética en una especie de la familia Thraupidae, a partir de secuencias de la región control del ADNmt.

Los genes ND6 y ARNr 12S presentan una ubicación estratégica, por su cercanía a la región control en aves (Delport, 2001; Sorenson, 2003) la cual fue adecuada para la búsqueda de sub-secuencias conservadas que fungieron como secuencias cebadoras, ya que dos de los iniciadores obtenidos (LND6 y H12S) flanquean la región control de la especie considerada en el estudio. Las secuencias del Dominio II del *D-loop* permitieron complementar la estrategia de amplificación y secuenciación, debido a que este dominio ha sido reportado como una subregión altamente conservada dentro de aves (Baker y Marshall, 1997; Ruokonen y Kvist 2002; Pereira et al. 2004), lo cual la convierte en una región propicia para el diseño de cebadores al interior del *D-loop*.

Los cebadores reportados en este estudio, además de ser implementados para amplificación y secuenciación de *R. icteronotus*, han sido implementados de forma efectiva en la amplificación y secuenciación de las especies de Oscines

*Ramphocelus dimidiatus* y *Dacnis hartlaubi* (Thraupidae), *Zonotrichia capensis* (Emberizidae) y *Habia gutturalis* (Cardinalidae) (Anexo D).

Al comparar las características de los dominios de la región control de *R. icteronotus*, caracterizados en el presente estudio, con secuencias de genomas completos.

En todas las secuencias obtenidas, al inicio del dominio I se observó una subsecuencia rica en C, la cual ha sido reportada en varios genomas mitocondriales de aves (Baker y Marshall, 1997; Omland et al. 2000; Kvist et al. 2001; Rhymer et al. 2001; Ruokonen y Kvist, 2002). En *R. icteronotus* esta subsecuencia se observó entre las posiciones 21 a 42 y en ella se presentan tres Timinas en las posiciones 30, 33 y 34, respectivamente (Figura 8). Estudios en humanos, por ejemplo, han mostrado que dicha subsecuencia, al no presentar nucleótidos diferentes a Citosinas, impiden la adición de nucleótidos durante la reacción de secuenciación, lo cual también permite sustentar la definición de haplotipos, como es el caso del B en Amerindios (Rondón, 2009). En el intento de obtener secuencias diferentes a las de *R. icteronotus*, se utilizaron muestras de *R. dimidiatus* las cuales siempre exhibieron el cambio C30T, hecho que no permitió conseguir secuencia alguna del *D-loop* en esta especie (Anexo C), corroborando lo evidenciado en humanos. Lo anterior se puede deber a la tendencia que tiene esta región a conformar estructuras en escorpión o *hairpins* (Randi y Lucchini, 1998) y sumado a ello, un fuerte contenido de CG en el resto del *D-loop*.

En el caso de la secuencia consenso de *R. icteronotus* descrita en el presente estudio (Figura 8), no se logró ubicar la subsecuencia *D-box* del dominio II caracterizada en los trabajos realizados por Eberhard et al. (2001) y Roukonen y Kvist (2001). Lo anterior se puede deber al hecho que estos grupos de investigadores describieron el *D-box* en Aves no Passeriformes y en cinco familias

de Passeriformes que no incluyeron a Thraupidae; lo cual puede ser indicio que en esta familia dicha secuencia no se encuentre o que puede estar presente en otras especies de la familia, diferente a *R. icteronotus*.

Adicionalmente, es preciso aclarar que en Aves no se encuentran todas las subregiones conservadas de la región control de vertebrados (Desjardins y Morais, 1990; Baker y Marshall 1997; Randi y Lucchini 1998; Pereira et al. 2004), otro ejemplo de lo anterior lo constituye la presencia de *C-box* (Pereira et al. 2004) en *R. icteronotus* (Figura 8), subsecuencia que no fue caracterizada en los estudios de estructura y evolución de la región control de Aves realizados por Roukonen y Kvist (2001).

Una de las metas del proyecto donde se enmarca el presente estudio, consistió en describir la secuencia de nucleótidos de la región control del ADNmt de *R. icteronotus* y *R. dimidiatus* y adicionalmente utilizar dicha región como marcador para realizar estudios genéticos poblacionales. Como ya se mencionó anteriormente en esta sección, ninguna reacción de secuenciación en muestras de *R. dimidiatus* logró superar el fuerte bloque de C presentes al inicio del D-loop (Anexo C), razón por la cual se excluyó esta especie de los correspondientes análisis genéticos poblacionales y se hizo énfasis en el estudio de la diversidad genética en subpoblaciones de *Ramphocelus icteronotus* presentes en el departamento de Santander.

En *R. icteronotus* se evidenció un patrón de diversidad haplotípica alta y nucleotídica baja, comparada con lo reportado por Mila et al. (2012) para especies de avifauna transamazónicas, sin embargo es de tener en cuenta que en ese estudio los componentes de diversidad fueron estimados a partir de secuencias de un marcador conservado (gen Citocromo oxidasa I COI). En el sentido expuesto es de tener presente que cada marcador tiene dinámicas evolutivas

independientes, por tanto, no es de esperar que dos marcadores genéticos diferentes, necesariamente mantengan las mismas tendencias evolutivas, especialmente siendo *D-loop* un marcador altamente variable. De hecho el mismo trabajo de Mila et al. (2012) reporta un valor de  $\pi=0,023$  en diferentes especies de Aves de Norte América. Lo cual podría permitir inferencias relacionadas con un compartimiento clinal en aumento de la diversidad nucleotídica desde Norte hacia Sur América, a partir de la evaluación de este parámetro en secuencias mitocondriales y ubica el valor de  $\pi=0,007$  hallado en el presente estudio, hacía la mitad de los valores de  $\pi$  estimados para genes mitocondriales por Mila et al. (2012).

El patrón sugerido de diversidad haplotípica alta nucleotídica baja a partir de secuencias D-loop en *R. icteronotus*, se podría explicar: 1. Por eventos de extinción y recolonización locales (McClaudi, 1991); 2. La presencia de varios haplotipos únicos (De la Rosa, 2012) producto de una baja representación de la muestra en las distintas localidades y 3. A causa de un fenómeno de expansión que esté realizando la especie. Precisamente, el patrón de diversidad haplotípica alta y nucleotídica baja ha sido detectado en poblaciones de *R. icteronotus* en el Pacífico colombiano, a partir del análisis de secuencias del gen citocromo b (González, 2009); también este estudio mostró que dicha especie ha presentado un patrón de expansión demográfica reciente, lo cual pudo suceder en las poblaciones consideradas en el departamento de Santander, hipótesis que debe ser evaluada en posteriores estudios.

Otra posible explicación del patrón planteado anteriormente, se puede deber al hecho que en hábitats fuertemente fragmentados, como es el caso de varios ecosistemas de las Cordilleras colombianas (Sibley, 1958; Helbig, 2001; Balmford et al. 2003; Fjeldså et al. 2005; Ocampo, 2008), las poblaciones en expansión de *R. icteronotus* pueden sufrir cierta probabilidad de extinción local debido a las

características demográficas y la estocasticidad ambiental asociada con los tamaños pequeños de las mismas (McClaudi, 1991; Pannell, 2001), afectando su tamaño efectivo (Maruyama y Kimuya, 1980) y llevando al reemplazo de las poblaciones extintas. Lo anterior se podría sustentar con base en la red de haplotipos, ya que el haplotipo 8, el cual mostró ser el de mayor frecuencia en la meta-población, siendo el único que se distribuye en las tres subpoblaciones, puede surgir las veces de un posible haplotipo ancestral del que posiblemente hayan derivado la mayoría de haplotipos detectados y a su vez sirva como un reservorio de nuevas mutaciones.

Con base en las frecuencias haplotípicas estimadas, el análisis de varianza molecular (Excoffier et al.1992) permitió establecer el nivel de diferenciación genética entre las tres subpoblaciones de *R. icteronotus* analizadas en el departamento de Santander; dicho análisis permitió definir que en estas no existe ninguna diferencia en la composición genética, con base en el marcador molecular estudiado y que las diferencias se deben a la variación generada por los individuos (Tabla 4).

Lo anterior se corrobora con el índice de subestructura poblacional estimado, el cual permite inferir que los componentes subpoblacionales no se encuentran diferenciados genéticamente y que *Ramphocelus icteronotus* en las tres localidades de estudio, se comporta como una unidad reproductiva. Este resultado no coincide con el obtenido por González (2009), en donde se definió que las poblaciones de esta especie en el Pacífico colombiano, muestran niveles moderados de diferenciación con base en secuencias del gen Citocromo b. La ausencia de estructura genética en *R. icteronotus* en las poblaciones de Santander, también se sustenta a partir del valor estimado de migrantes por generación, el cual fue infinito entre las parejas de subpoblaciones evidenciando

un elevado flujo génico entre ellas y no evidenció agrupación de los haplotipos con relación a las localidades estudiadas (Tabla 5). Dicho resultado corrobora lo obtenido por Carreño (2013), cuyo estudio determinó que dicha población no se presenta estructurada genéticamente y la comparación de haplotipos Cyt b de *R. icteronotus* no presentó estructura filogeográfica en las localidades estudiadas del departamento de Santander.

Teniendo en cuenta los bajos tamaños de las muestras en las subpoblaciones, se realizó un análisis estadístico del vecino más cercano (Snn) el cual permite comparar poblaciones con tamaños de muestra diferentes y cuyos valores establecen diferencias mínimas entre las parejas de subpoblaciones (Hudson, 2000). En el sentido expuesto las parejas de poblaciones FB-SV y LA-SV mostraron valores Snn altos (Tabla 5), respecto al valor de referencia de Snn=0,46 propuesto por Hudson (2000), sin embargo la prueba estadística de estos valores no evidenció diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en estos casos, lo que permite confirmar que las subpoblaciones no están diferenciadas, como se observó con los valores de parejas  $\Phi_{ST}$ , pese a lo anterior el *D-loop* como marcador genético intrapoblacional puede verse limitado en situaciones donde el tamaño de muestra no represente la metapoblación. Algo que refleja en común el análisis de parejas Snn, de forma adicional, es el hecho que la subpoblación de *R. icteronotus* del Diviso hace parte de las parejas de poblaciones que presentaron los mayores valores Snn (Tabla 5), lo cual puede ser indicativo que esta población, al presentar mayor número de haplotipos y entre ellos algunos exclusivos, esté en un proceso incipiente de diferenciación, pese a participar del flujo que hay entre las localidades, como se evidencia en la red de haplotipos (Figura 10).

La zona analizada representa una muestra del total de la población de *R. icteronotus* que puede estar distribuida en el departamento de Santander, por lo

cual se hace necesario ampliar tanto el número de individuos por cada localidad muestreada, así como el número de localidades. Por otro lado, se recomienda en futuros estudios que pretendan evaluar la diversidad genética a partir de secuencias D-loop, incluir la información contenida en el dominio III (HV2), a fin de ampliar el entendimiento de la dinámica de las poblaciones de esta especie presentes en Santander y así mismo generar información base que permita extender el análisis hacia otras regiones de Colombia donde está distribuida *Ramphocelus icteronotus*.

## 5. CONCLUSIONES

\* Los cebadores diseñados a partir del modelo de pérdida de ADN (Martínez-Pérez, 2007) y reportados en el presente estudio, además de ser implementados para la amplificación y secuenciación del *D-loop* en *Ramphocelus icteronotus*, permitieron la amplificación de forma efectiva en las especies *Ramphocelus dimidiatus* y *Dacnis hartlaubi* (Thraupidae), *Zonotrichia capensis* (Emberizidae) y *Habia gutturalis* (Cardinalidae). Lo anterior convierte a este juego de cebadores en una herramienta importante para futuros estudios de genética poblacional, micro-evolutivos, evolutivos y filogenéticos, tanto en *R. icteronotus* como en otras especies de familias que comprenden el complejo Oscines.

\* *Ramphocelus icteronotus* presenta mayor diversidad nucleotídica con respecto a lo establecido a partir del uso de marcadores genéticos conservados como el gen *Cyt b*, hecho que se puede corroborar al comparar con el estudio de González (2009) en poblaciones del Pacífico colombiano y lo detectado por Carreño (2013) en la población del departamento de Santander. Lo anterior soporta los planteamientos de otros investigadores que consideran que *D-loop* es un marcador genético altamente variable y proporciona una mayor resolución en análisis a nivel intrapoblacional.

\* Las subpoblaciones de *R. icteronotus* estudiadas en el departamento de Santander a partir del análisis de haplotipos presentes en el *D-loop* del ADNmt, muestran alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, patrón relacionado a bajos efectivos poblacionales y a poblaciones de organismos que se encuentran ampliando sus rangos de expansión.

\* *Ramphocelus icteronotus*, a partir del marcador molecular analizado, presentó ausencia de estructura genética en las localidades estudiadas en el departamento de Santander. Lo anterior debe analizarse detenidamente dada la detección de ligeras diferencias estadísticas (valores Snn) entre las parejas poblacionales que involucran la muestra del Diviso (SV).

## BIBLIOGRAFÍA

Aquadro, C. F & Greenberg, B.D. 1980. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals *Gen.* 103: 287-312

Allawi H.T., Santa-LuciaJ.Jr. 1998. Nearest neighbor thermodynamic parameters for internal G.A mismatches in DNA.*Bioc.* 37:2170–2179.

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.

Arnold, M.L & Martin, N.H. 2009. Adaptation by introgression. *J. Biol.* 8: 82.1-82.3

Avendaño, C.J.E. 2006. Estado de la Diversidad de la Avifauna de la Subcuenca Lebrija Alto, Santander, Colombia. Informe Final. Corporación Autónoma Regional para la Defensa de la Meseta de Bucaramanga.

Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution.* 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Balmford, A., Green, R.E., Jenkins, M. 2003. Measuring the changing state of nature. *TRENDS Ecol Evol.* 18: 326-330.

Barker, K.F., George, F. Barrowclough., Groth J.G. 2002. A phylogenetic hypothesis for passerine birds: taxonomic and biogeographic implications of an analysis of nuclear DNA sequence data. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 269: 295–308

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. Cali-Colombia, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. 53p.

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.

Boecklen, W.J & Howard, D.J. 1997. Genetic analysis of hybrid zones: Numbers of markers and power of resolution. *Ecology.* 78: 2611-2617

Brown, G.G., Gadaleta, G., Pepe, G., Saccone, C., Sbisá, E.1986. Structural conservation and variation in the D-loop containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192: 503–511.

Burns, K.J. 1997. Molecular systematics of tanagers (Thraupinae): evolution and biogeography of a diverse radiation of neotropical birds. *Mol. Phyl. Evol.* 8: 334-348.

Burns, K.J & Racicot, R.A. 2009. Molecular Phylogenetics of a Clade of Lowland Tanagers: Implications for Avian Participation in the Great American Interchange. *The Auk.* 126: 635–648.

Carreño, M. 2013. Evaluación de la diversidad genética en poblaciones de *Ramphocelus dimidiatus* y *R. icteronotus* (Thraupidae) presentes en el departamento de Santander empleando secuencias del gen Citocromo b. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander.

Chavali, S., Mahajan, A., Tabassum, R., Maiti, S., Bharadwaj, D. 2005. Oligonucleotide properties determination and primer designing: a critical examination of predictions. *Bioi.* 21:3918–25.

Confer, L. 2006. Secondary contact and introgression of golden-winged warblers (*Vermivora chrysoptera*): documenting the mechanism. *The Auk*. 123: 958–961.

Cooper, G.M, Hausman, R.E. 2008. *A Molecular Approach* 5<sup>a</sup> Ed. Boston University: ASM Press.

De la Rosa, C.L.M. 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.

Donegan, T.M., Avendaño, J.E., Briceño, E., Luna, J.C., Roa, C., Parra, R., Turner, Clare., Sharp, M., & Huertas, B. 2010. Aves de la Serranía de los Yarigués y tierras bajas circundantes, Santander, Colombia. *Coti*. 32: 72–89.

Dotson, E& Beard C. 2001. Sequence and organization of the mitochondrial genome of the Chagas disease vector, *Triatoma dimidiata*. *Insect. Mol. Biol.* 10:205-215.

Fjeldså, 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*. 34: 205-211.

Fjeldså, J & Rahbek, C. 2006. Diversification of tanagers, a species rich bird group, from lowlands to montane regions of South America. *Int. Comp. Biol.* 46: 72-81.

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biol. Con.* 126: 131-140.

Frankham, R., Briscoe, D., Ballou, J. 2009. *Introduction to conservation genetics*. New York: Cam. Univ.Press.

García-Moreno, J., Ohlson, J., Fjeldså, J. 2001. MtDNA Sequences Support Monophyly of *Hemispingus* Tanagers. *Molecular. Phyl. Evol.* 21:424-435

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.

Goodwin, W. 2007. An introduction to Forensic Genetics. UK. John Wiley and Sons.. p. 138

Hackett, S.J. 1996. Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Mol. Phyl. Evol.* 5: 368-382.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

He, Q., Marjamaki, M., Soini, H., Mertsola, J., Viljanen, M.K. 1994. Primers are decisive for sensitivity of PCR. *BioT.* 17: 82–87.

Helbig, A.J., Salomon, M., Bensch, S., Seibold, I. 2001. Male-biased gene flow across an avian hybrid zone: evidence from mitochondrial and microsatellite DNA. *J. Evol. Biol.* 14: 277-287.

Henke, W.; Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., and Loening, S. A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucl. Acid. Res.* 19. 3957–3958

Heyer E, Zietkiewicz E, Rochowski A, Yotova V, Puymirat J, Labuda D. 2001. Phylogenetic and Familial Estimates of Mitochondrial Substitution Rates: Study of

Control Region Mutations in Deep-Rooting Pedigrees En: Am. J. Hum. Genet. 69: 1113–1126

Hilty, S.L & Brown, W.L. 1986. A guide to the birds of Colombian. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Isler, M.L & Isler, P.R. 1999. The Tanagers: Natural history, Distribution, and Identification. Smit. Inst. Press: 406.

Ketmaier, V & Bemardini, C. 2005. Structure of the mitochondrial control region of the Eurasian Otter (*Lutra lutra*; Carnivora, Mustelidae): Patterns of genetic heterogeneity and implications for conservation of the species in Italy. J. Her. 96: 318-328.

Koichiro, Tamura., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. Mol. Biol. and Evol. 28: 2731-2739.

Krueger, T.R & Williams, D.A. 2006. Microsatellite loci for Cherrie's tanager (*Ramphocelus costaricensis*). Mol. Ecol. Not. 6: 853–855.

Kvist, L., Martens, J., Ahola, A., Orell, M. 2001. Phylogeography of a Palearctic sedentary passerine, the willow tit (*Parus montanus*). J. Evol. Biol., v. 14, p. 930-941,

Lacerda, D.R., Marini, M.A., Santos, F.R. 2007. Mitochondrial DNA corroborates the species distinctiveness of the Planalto (*Thamnophilus pelzelni* (Hellmayr, 1924) and the Sooretama (*T. ambiguous* (Swainson, 1825) Slaty-antshrikes (Passeriformes: Thamnophilidae). Braz. J. Biol. 67: 873-882.

Lafresnaye, D.E. 1846. Sur le *Ramphocelus icteronotus* du prince Bonaparte. Rev. Soc. Cuv. 365-368.

Lamont, B.B., Enright, N.J. Krauss, S.L. Miller, B.P. 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. J. Evol. Biol. 16: 551-557.

Leite, K.C.E., Seixas, G.H.F., Berkunsky, I., Collevatti, R.G., Caparroz, R. 2008. Population genetics structure of the blue-fronted Amazon (*Amazona aestiva*), Psittacidae: Aves) based on nuclear microsatellite loci: implications for conservation. Genet. Mol. Res. 7: 819-829.

Lessa, E.P., Cook, J.A., Patton, J.L. 2003. Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not in Amazonia, during the late Quaternary. PNAS. 100: 10331–10334.

Liu, Y.P., Wu, G.S., Yao, Y.G., Miao, Y.W., Luikart, G., Baig, M., Pereira, A.B., Ding, Z.L., Palanichamy, M.G., Zhang, Y.P. 2006. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles. Mol. Phyl. Evol. 38: 12-19

McCauley, D.E. 1991. Genetic consequences of Population Extinction and Recolonization TREE.6:1.

McMullan, M., Donegan, T., Quevedo, A. 2010. Field Guide to the birds of Colombia. Proaves.

Miller, A.H. 1949. Some Concepts of Hybridization and Integration in Wild Populations of birds. Mus. Vert. Zoo. Berkeley, California.

Moore, W.S & De Filippis, V.R. 1997. The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial Cytochrome b. *Avian. Mol. Evol. and Syst.* 83-119.

MacDougall-Shackleton, E. a., Clinchy, M., Zanette, L., & Neff, B. D. 2011. Songbird genetic diversity is lower in anthropogenically versus naturally fragmented landscapes. *Conservation Genetics*, 12(5). 1195–1203.

Miyazono, F., Schneider, P.M., Metzger, R., Wamecke-Eberz, U., Baldus, S.E., Dienes, H.P., Aikou, T., Hoelscher, A.H. 2002. Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Onco.* 21: 3780-3783.

Mtileni, B.J., Muchadeyi, F.C., Maiwashe, A., Chimonyo, M., Groeneveld, E., Weigend, S., Dzama, K. 2011. Diversity and origin of South African chickens. *Poul. Sci.* 90: 2189-94.

Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. New York: Columbia University Press.

Network 4.5.1.0. Copyright 2004-2014 Fluxus Technology Ltd. All rights reserved. Steiner (MP) algorithm developed By Tobias Polzin and Siavash Vahdati Daneshman.

Ocampo, I.C. 2008. Caracterización de dos subespecies de *Ramphocelus flammigerus* a partir de marcadores moleculares microsatélites. Tesis de pregrado. Uni. del Valle, Cali.

Omland, K.E., Tarr, C.L., Boarman, W.I., Marzluff, J.M., Fleischer, R.C. 2000. Cryptic genetic variation and paraphyly in Ravens. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 267: 2475- 242.

Pannell, J.R. 2003. Coalescence in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization. *Evol.* 57: 949–961.

Pereira, L., Van, A.B., Amorim, A. 2004. Standardisation of nomenclature for dog mtDNA D-loop: a prerequisite for launching a *Canis familiaris* database. *For. Sci. Int.* 141: 99-108.

Pereira, S.L. 2000. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genet. Mol. Biol.* 23: 745–752.

Pereira, S. L., Grau, E. T., Wajntal, A. 2004 . Molecular architecture and rates of DNA substitutions of the mitochondrial control region of cracid birds. *Geno.* 47: 535–545

Potts, R & Behrensmeyer, A.K. 1992. Late Cenozoic terrestrial ecosystems. 419-541. Uni. of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Quinn, T. W. Molecular evolution of the mitochondrial genome. In: MINDELL, D. P. (Ed.) *Avian molecular evolution and systematics*. San Diego: Acad. Press, 1997. p. 3-28.

Randi, E & Lucchini, V. 1998. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *J. Mol. Evol.* 47: 449–462.

Remírez. B.B. 2004. Caracterización morfométrica y genética de las poblaciones españolas de cangrejo de río *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet, 1858) mediante el uso de marcadores moleculares. Memoria presentada para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid

Rest, J.S., Ast, J.C., Austin, C.C., Waddell, P.J., Tibbetts, E.A., Hay, J.M., and Mindell, D.P. 2003. Molecular systematics of primary reptilian lineages and the tuatara mitochondrial genome. *Mol. Phyl. Evol.* 29: 289–297.

Ridgely & 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 icteronotus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species.Version 2013.1.

Rondón, F., Braga, Y., Cárdenas, H., Barreto, G. 2007. Análisis de la diversidad y estructura genética presente en poblaciones humanas colombianas a partir del uso de marcadores RFLP's de mtDNA. *Rev. Asoc. Col. Cienc. Biol.* 19: 94-103.

Rozas, J., Sanchez-Delbarrio, J.C. Rozas, R. 2009. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics.* 19: 2496 2497.

Rychlik, W., Spence, W.J., Rhoads, R.E.1990.Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic. Acids. Rese.* 18: 6409-6412

Rhymer, J.M. 2006. Extinction by hybridization and introgression in anatine ducks. *Act. Zoo.Sin.* 52: 583–585.

Rhymer, J. M., Fain, M.G., Austin, J.E., Johnson, D.H.,Krajewski, C. 2001. Mitochondrial phylogeography, subspecific taxonomy, and conservation genetics of sandhill cranes (*Grusca canadensis*; Aves: Gruidae). *Cons.Gen.* 2: 203-218.

Rhymer, J.M & Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annu. Rev. Ecol. Sys.* 27: 83-109.

Saccone, C., De Giorgio, C., Gissi, C., Pesole, G., and Reyes, A. 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Genetics*. 238: 195–209.

Santa-Lucia J. Jr., Allawi, H.T., Seneviratne, P.A. 1996. Improved nearest-neighbor parameters for predicting DNA duplex stability. *Biocience*. 35:3555–3562.

Sedano, R.E & Burns, K.J. 2010. Area the Northern Andes a species pump for neotropical birds? Phylogenetics and biogeografia of clade of netropical tanagers (Aves: Thraupini). *J. Biog.* 37:325-343

Sibley, C.G. 1958. Hybridization in Some Colombian Tanagers, Avian Genus "*Ramphocelus*". *Proc. Amer. Phil. Soc.* 102: 448-453.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Mougín, J.F., Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc. Acid. Res.* 25:4876-4882.

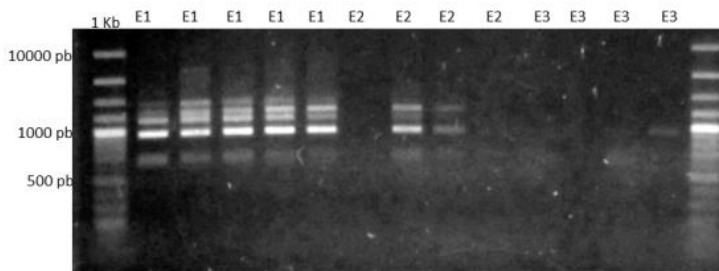
Wayne, R.K., Lehman, N., Allard, M.W. & Honeycutt, R.L. 1992 Mitochondrial DNA variability of the Gray Wolf: genetic consequences of population decline and habitat fragmentation. *Cons. Biol.* 6: 559-569.

Wolstenholme, D.R. 1992. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141: 173-216.

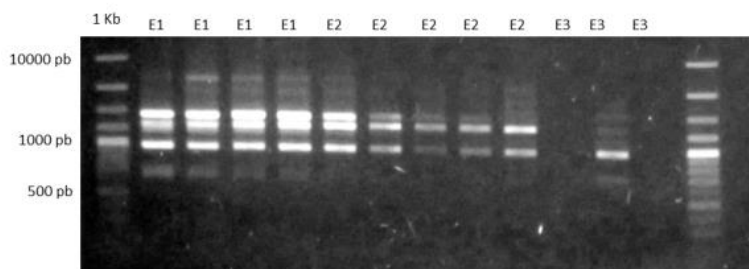
Yuri, T & Mindell, D.P. 2002. Molecular phylogenetic analysis of Fringillidae, "New World nine-primaried oscines" (Aves: Passeriformes). *Mol. Phyl. Evol.* 23:229–243.

## ANEXOS

**Anexo A.** Resultado de ensayos preliminares con iniciadores reportados en la literatura.



Iniciadores reportados por Tarr (1985) y Lacerda (2007).



Iniciadores reportados por Sorenson (1999).

**Anexo B.** Especies usadas en el Alineamiento para el diseño del cebador.

N° NCBI	especie	N° NCBI	especie
FJ752433.1	<i>Chrysolophus pictus</i>	HQ896033.1	<i>Cyanoptila cyanomelana</i>
FJ752427.1	<i>Tragopan temminckii</i>	JF810423.1	<i>Acridotheres cristatellus</i>
EU417812.1	<i>Polyplectron bicalcaratum</i>	HM535648.1	<i>Pseudopodoces humilis</i>
JF921875.1	<i>Ithaginis cruentus</i>	JN018411.1	<i>Ficedula zanthopygia</i>
FJ752430.1	<i>Phasianus colchicus</i>	HQ915864.1	<i>Sturnus tristis</i>

EU417810.1	<i>Lophura nycthemera</i>	HQ690246.1	<i>Luscinia calliope</i>
AB164622.1	<i>Syrnaticus soemmerringi</i>	JX901073.1	<i>Eopsaltria australis</i>
AB164626.1	<i>Phasianus versicolor</i>	JX901075.1	<i>Petroica goodenovii</i>
AB164627.1	<i>Lophura ignita</i>	Y18522.2	<i>Corvus frugilegus</i>
JF739859.1	<i>Phasianus colchicus</i>	JQ071621.1	<i>Tachycineta leucorrhoea</i>
HQ891119.1	<i>Crossoptilon crossoptilon</i>	JQ071622.1	<i>Tachycineta meyeri</i>
FJ752426.1	<i>Alectoris chukar</i>	JQ071614.1	<i>Tachycineta bicolor</i>
AB164623.1	<i>Syrnaticus reevesii</i>	JQ071620.1	<i>Tachycineta albiventer</i>
JF937589.1	<i>Crossoptilon auritum</i>	JQ071619.1	<i>Tachycineta albilinea</i>
AP003195.2	<i>Coturnix japonica</i>	JX901074.1	<i>Petroica boodang</i>
AB164625.1	<i>Syrnaticus humiae</i>	JN108020.1	<i>Cyanopica cyanus</i>
AB073301.1	<i>Coturnix chinensis</i>	AM889141.1	<i>Sylvia crassirostris</i>
JX516064.1	<i>Quiscalus quiscula</i>	JN018413.1	<i>Garrulus glandarius</i>
JX516072.1	<i>Euphagus cyanocephalus</i>	JQ071617.1	<i>Tachycineta cyaneoviridis</i>
JX516061.1	<i>Dives dives mitochondrion</i>	GU475148.1	<i>Pycnonotus sinensis</i>
JX516067.1	<i>Molothrus aeneus mitochondrion</i>	HM746790.1	<i>Gallicolumba luzonica</i>
JX516065.1	<i>Xanthopsar flavus mitochondrion</i>	JX901076.1	<i>Petroica phoenicea</i>
JX516071.1	<i>Pseudoleistes guirahuro</i>	JX901072.1	<i>Epthianura albifrons</i>
JX516074.1	<i>Molothrus badius mitochondrion</i>	FJ378536.2	<i>Pycnonotus taivanus</i>
JX516054.1	<i>Nesopsar nigerrimus mitochondrion</i>	JQ071623.1	<i>Progne chalybea</i>
JX516070.1	<i>Curaeus curaeus mitochondrion</i>	HQ915867.1	<i>Pica pica</i>
JX516056.1	<i>Chrysomus ruficapillus</i>	JQ071615.1	<i>Tachycineta thalassina</i>
JX516076.1	<i>Chrysomus cyanopus</i>	HQ690245.1	<i>Leiothrix argenteauris</i>
JX516075.1	<i>Gymnomystax mexicanus</i>	JQ071618.1	<i>Tachycineta stolzmanni</i>

JX516062.1	<i>Agelaius phoeniceus</i>	GU592504.1	<i>Podoces hendersoni</i>
JX516069.1	<i>Chrysomus thilius</i>	AM889140.1	<i>Sylvia atricapilla</i>
JX516060.1	<i>Chrysomus icterocephalus</i>	AY542313.1	<i>Menura novaehollandiae</i>
JX516066.1	<i>Pseudoleistes virescens</i>	EF532932.1	<i>Phoenicopterus ruber</i>
JX516059.1	<i>Chrysomus xanthophthalmus</i>	JX516058.1	<i>Oreopsar bolivianus</i>
AP009190.1	<i>Gavia pacifica</i>	JX516055.1	<i>Gnorimopsar chopi</i>
AP009189.1	<i>Eudypetes chrysocome</i>	AF380305.2	<i>Buteo buteo</i>
GU071055.1	<i>Anhinga rufa</i>	DQ780878.1	<i>Ardea novaehollandiae</i>
JX516063.1	<i>Amblyramphus holosericeus</i>	EU072995.1	<i>Egretta eulophotes</i>
JX516073.1	<i>Macroagelaius imthurni</i>	AY074885.2	<i>Arenaria interpres</i>
HQ896035.1	<i>Emberiza tristrami</i>	DQ780883.1	<i>Pelecanus conspicillatus</i>
HQ896034.1	<i>Emberiza chrysophrys</i>	AY293619.1	<i>Larus dominicanus</i>
JX516068.1	<i>Icterus mesomelas</i>	GQ199608.1	<i>Platalea leucorodia</i>
HQ915866.1	<i>Carduelis spinus</i>	AB104902.1	<i>Nipponia nippon</i>
HQ915865.1	<i>Carduelis sinica</i>	AY158678.1	<i>Pterodroma brevirostris</i>
DQ453515.1	<i>Taeniopygia guttata</i>	AY158677.2	<i>Thalassarche melanophris</i>
DQ453512.1	<i>Taeniopygia guttata</i>	EF455490.1	<i>Platalea minor</i>
DQ453512.1	<i>Taeniopygia guttata</i>	GU071054.1	<i>Phalacrocorax chalconotus</i>
DQ422742.1	<i>Taeniopygia guttata</i>	AF362763.1	<i>Eudypetula minor</i>
JF937590.1	<i>Gracula religiosa</i>	HM746791.1	<i>Geopelia striata</i>
AF090341.1	<i>Vidua chalybeata</i>	HQ690247.1	<i>Ixobrychus cinnamomeus</i>
HM859900.1	<i>Sturnus sericeus</i>	GQ240309.1	<i>Columba livia</i>
HQ896037.1	<i>Sturnus cineraceus</i>	GQ358927.1	<i>Threskiornis aethiopicus</i>
JX516057.1	<i>Lamprosar tanagrinus</i>	JQ071443.1	<i>Saundersilarus saundersi</i>

AM237310.1 *Apus apus complete*

FJ751803.1 *Otis tarda mitochondrion*

JN018412.1 *Nycticorax nycticorax*

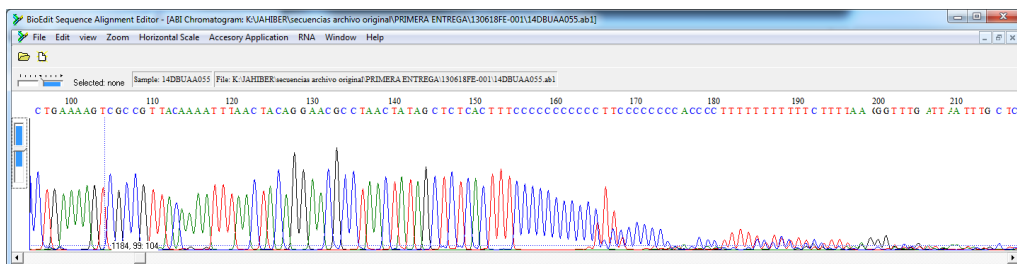
EF532936.1 *Tachybaptus novaehollandiae*

**Anexo C.** Individuos de *R. icteronotus* muestreados en cada localidad de estudio.

SV	LA	FB
* Raic 01	Raic 04	* Raic 17
* Raic 02	* Raic 05	* Raic 18
* Raic 03	* Raic 11	* Raic 19
* Raic 06	* Raic 12	* Raic 20
* Raic 07	* Raic 13	* Raic 21
* Raic 08	* Raic 23	Raic 27
* Raic 09	Raic 24	Raic 28
Raic 10	*Raic 25	
* Raic 14		
* Raic 15		
* Raic 16		
* Raic 22		
* Raic 26		

\*Muestras con secuencias óptimas incluidas en los análisis.

**Anexo D.** Electroferograma de una secuencia de la región control en la especie *R. dimidiatus*.



**Anexo E.** Alineamiento de secuencias de especies de familias filogenéticamente cercanas de Thraupidae obtenidas mediante el uso de los cebadores diseñados en el presente estudio.

