

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Diglossa lafresnayii* Y
Diglossa humeralis humeralis (AVES: THRAUPIDAE)

SANDRA LORENA ALVAREZ ORDOÑEZ
SILVIA ALEXANDRA MONTENEGRO MUÑOZ

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2008

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Diglossa lafresnayii* Y
Diglossa humeralis humeralis (AVES: THRAUPIDAE)

SANDRA LORENA ALVAREZ ORDOÑEZ
SILVIA ALEXANDRA MONTENEGRO MUÑOZ

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de biólogo

Directores:
JAQUELINE MENA HUERTAS M.Sc.
JHON JAIRO CALDERÓN LEYTON M.Sc.

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
SAN JUAN DE PASTO
2008

“Las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado, son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del acuerdo N° 324 de Octubre 11 de 1996 emanado por el Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación

Director

Director

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto, Noviembre de 2008

DEDICATORIA

A Dios por darnos la oportunidad de soñar y de creer en los sueños.

A mi mamá, ejemplo de lucha, entrega, amor y amistad; quien me enseñó que sin importar las dificultades, si le pones el corazón a lo que haces siempre triunfarás.

A mi abuelita por su sabiduría, sus cuidados, amor y ternura; quien creyó en mí y siempre estuvo a mi lado brindándome su cariño y lo mejor de sí para que pudiera alcanzar mis sueños.

A Jairo y Valentina, los dos amores más grandes de mi vida, fuentes de esperanza, inspiración y amor, quienes me enseñaron que aunque la vida no es fácil vale la pena vivirla.

A Marcela, Viviana y Silvia quienes me enseñaron que la verdadera amistad supera los límites del espacio y del tiempo y a quienes llevaré siempre en mi corazón.

Sandra Lorena Álvarez Ordóñez

A Dios, por regalarme cada uno de los días de mi vida.

A mi mami, quien me ha enseñado a luchar por lo que quiero, por todo su amor, sus sacrificios, berraquera y entereza, un ejemplo a seguir y mi gratitud y amor eternos son de ella.

A mis hermanos Lucas el mayor el que ha llegado donde ha querido con mucho esfuerzo y sacrificio y Vicky la alegre, la luchadora y loquita, los dos me han hecho la vida más llevadera y son mis amigos de toda la vida.

A Elkin la fuerza y motivación de mi vida, quien me enseñó a amar la naturaleza y hacer de los sueños una realidad.

Silvia Alexandra Montenegro Muñoz

AGRADECIMIENTOS

A la vicerrectoría de investigaciones y postgrados de la Universidad de Nariño por la financiación de la investigación.

A la Asociación Grupo de Amigos para la Investigación y Conservación de las Aves GAICA, por la colaboración, apoyo, préstamo de equipos y acceso al archivo de fotos.

Al Instituto Alexander von Humboldt por la donación de los tejidos de las especies estudiadas y por permitirnos el ingreso a la colección ornitológica para la toma de datos.

Al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional y al Museo de Historia Natural de la Universidad de Nariño por permitirnos el ingreso a sus colecciones ornitológicas para la toma de datos.

A nuestros directores de trabajo de grado Jhon Jairo Calderón y Jacqueline Mena por su orientación, interés, paciencia y amistad.

A Milena Guerrero y Luz Stella Lagos, jurados de este trabajo por su apoyo y orientación.

A los profesores Oscar Burbano, Rodrigo Prieto, Dolly Revelo, Martha Sofía González y Germán Narváez por sus enseñanzas y su tiempo.

A nuestros padres y familiares por su apoyo incondicional, cariño y comprensión que llevaron a culminar con éxito esta etapa de nuestras vidas.

A María Fernanda Mideros, por su compañía, apoyo y orientación en el laboratorio.

A nuestras amigas Viviana Samboni y Lilian Cabrera por su compañía, amistad y trabajo en equipo que hicieron de las salidas de campo algo inolvidable.

A Carolina Obando por su amistad y por ser estar siempre presente durante la fase de laboratorio.

A Carlos por su compañía y alegría que hicieron de la estancia en galeras una oportunidad para ser amigos, reír y conocer historias.

A Luis Montenegro Muñoz, por su amistad, compañía y consejos en momentos precisos, que nos motivaron para seguir adelante.

A Elkin Noguera y Jairo Rodríguez por su cariño, apoyo, compañía, sugerencias en este trabajo y por todos los momentos compartidos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GENERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. MARCO TEÓRICO	22
4. ANTECEDENTES	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 DETECCIÓN MOLECULAR DE ND2 Y CITOCROMOB	29
5.1.1 Toma de muestras	29
5.1.2 Optimización de la extracción de ADN a partir de tejido, plumas y sangre	29
5.1.3 Extracción y verificación de ADN total	30
5.1.4 Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa PCR para ND2 y Cit b	30
5.1.5 Amplificación	31
5.1.6 Secuenciación	31
5.2 ESTUDIO MORFOMÉTRICO	31
5.2.1 Captura de aves	32
5.2.2 Medidas morfométricas	32
5.3 ANÁLISIS	33
5.3.1 Análisis molecular	33

5.3.2 Análisis morfológico	33
6. RESULTADOS	34
6.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN	34
6.1.1 Extracción de ADN a partir de sangre	34
6.1.2 Extracción de ADN a partir de plumas y tejido	34
6.1.3 Extracción de ADN a partir de muestras de sangre y tejido Kit CIDBIO	35
6.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA AMPLIFICAR LOS GENES CITOCROMO B Y ND2	36
6.3 ANÁLISIS MOLECULAR	38
6.3.1 Secuenciación	38
6.3.2 Outgroup	40
6.3.3 Composición de Nucleótidos	41
6.3.4 Variación molecular entre genes	42
6.3.5 Análisis de Similitud	44
6.3.5.1 Análisis de mínima evolución	44
6.3.5.2 Distancias genéticas	46
6.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	46
6.4.1 Análisis de funciones discriminantes	48
6.4.2 Registro fotográfico	49
7. DISCUSION	51
7.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE, PLUMAS Y TEJIDO	51
7.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA ND2 Y CITOCROMO B	51

7.3 ANÁLISIS MOLECULAR	52
7.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	56
8. CONCLUSIONES	60
9. RECOMENDACIONES	61
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXOS	68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variables tenidas en cuenta para la estandarización de la técnica para la extracción de ADN a partir de sangre tejido y plumas.	30
Tabla 2. Variables tenidas en cuenta para la optimización de la reacción en cadena de la polimerasa PCR.	31
Tabla 3. Iniciadores usados para la amplificación de los fragmentos de los genes mitocondriales citocromo b y ND2.	31
Tabla 4. Amplificados de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.	38
Tabla 5. Número de secuencias de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.	39
Tabla 6. Longitud de las secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo b.	41
Tabla 7. Longitud de las secuencias parciales del gen mitocondrial ND2.	42
Tabla 8. Transiciones y transversiones de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.	43
Tabla 9. Distancias genéticas (promedios) entre los taxones estudiados obtenidas del análisis del gen mitocondrial Citocromo b.	46
Tabla 10. Medidas en milímetros (promedio, desviación estándar y tamaño de muestra) de los individuos de las dos especies de <i>Diglossa</i> . El tamaño de la muestra se encuentra en paréntesis.	47
Tabla 11. Resultados de la prueba de t y U de Mann Whitney de las medidas morfométricas.	47
Tabla 12. a y b. Función derivada en el análisis discriminante para las especies <i>Diglossa lafresnayii</i> y <i>Diglossa humeralis humeralis</i> .	48
Tabla 13. Coeficientes estandarizados para la primera función derivada.	48
Tabla 14. Evaluación de la clasificación de los individuos de <i>Diglossa lafresnayii</i> y <i>Diglossa humeralis humeralis</i> según el análisis discriminante.	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Derecha: <i>Diglossa lafresnayii</i> . Fuente Montenegro <i>et al.</i> 2005. Izquierda: <i>Diglossa humeralis humeralis</i> . Fuente Rojas, 2005.	25
Figura 2. Distribución geográfica de <i>diglossa lafresnayii</i> (líneas rojas) y <i>diglossa humeralis humeralis</i> (línea fucsia)	25
Figura 3. Toma de datos en la colección Ornitológica del Museo de Historia Natural-Instituto de Ciencias Naturales (MHN-ICN) de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá - Cundinamarca).	32
Figura 4. Gel de agarosa en el que se visualiza el ADN extraído a partir de sangre mediante el método de Salting Out modificado Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. D.l <i>Diglossa lafresnayii</i> individuos 1, 2 y 3; D.h <i>Diglossa humeralis humeralis</i> individuos 2541 y 6809; D.ha <i>Diglossa humeralis aterrima</i> (control positivo); B blanco.	34
Figura 5. Gel de agarosa en el que se visualiza el ADN extraído a partir de plumas mediante el método de Saghai-Marooof <i>et al.</i> (1984), modificado por De Las Casas (2004) y el de Bello <i>et al</i> (2000). D.l <i>Diglossa lafresnayii</i> individuos 1, 2, 3, 4, 5 y 6; D.h <i>Diglossa humeralis humeralis</i> individuo 1151; D.a <i>Diglossa albilatera</i> (Control positivo); B blanco.	35
Figura 6. Gel de agarosa en el que se visualiza el ADN extraído a partir de tejido mediante el método de Saghai-Marooof <i>et al.</i> (1984), modificado por De Las Casas (2004) y el de Bello <i>et al</i> (2000). D.l <i>Diglossa lafresnayii</i> individuos 3, 4, 5 y 6; D.h <i>Diglossa humeralis humeralis</i> individuos 1151 y 6809; D.a <i>Diglossa albilatera</i> (Control positivo); B blanco.	35
Figura 7. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificadores obtenidos a partir ADN extraído de muestras de sangre, utilizando el KIT de extracción de ADN de CIDBIO. D.l <i>Diglossa lafresnayii</i> individuos 1, 3 y 6; D.h <i>Diglossa humeralis humeralis</i> individuos 2541, 1151 y 6809; D.a <i>Diglossa albilatera</i> (Control positivo); B blanco.	36
Figura 8. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificadores obtenidos a partir ADN extraído de muestras de tejido, utilizando el KIT de extracción de ADN de CIDBIO. . D.l <i>Diglossa lafresnayii</i> individuos 1, 2, 3 y 4; D.h <i>Diglossa humeralis humeralis</i> individuos 2541, 1151 y 6809; D.ha <i>Diglossa humeralis aterrima</i> (Control positivo); B blanco.	36
Figura 9. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificadores el ADN del gen mitocondrial Citocromo b. D.l <i>Diglossa lafresnayii</i> individuos 1, 2, 3, 4, 5 y 6; D.h <i>Diglossa humeralis humeralis</i> individuos 2541, 1151 y 6809; D.ha <i>Diglossa humeralis aterrima</i> (Control positivo); D.a <i>Diglossa albilatera</i> (Control positivo); B blanco.	37

- Figura 10. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificadores del ADN del gen mitocondrial ND2. D.l *Diglossa lafresnayii* individuos 1, 2, 3, 4, 5 y 6; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuos 2541, 1151 y 6809; D.ha *Diglossa humeralis aterrima* (Control positivo); D.a *Diglossa albilatera* (Control positivo); B blanco. 37
- Figura 11. Topología de las cinco tribus de oscines de nueve primarias propuesta por Klicka *et al*, 2000. a Tribu Icterini, b Tribu Emberizini, c Tribu Parulini, d Tribu Traupini, e Tribu Cardinalini, f Subfamilia fringillinae, g Outgroups. El círculo rojo representa la tribu en la cual se clasifica a *Diglossa* y el verde al grupo hermano seleccionado *Piranga*. 40
- Figura 12. Derecha: *Piranga olivacea* macho Izquierda: *Piranga olivacea* hembra. Fuente www.sdakotabirds.com/species/scarlet_tanager_info.htm. 41
- Figura 13. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los nucleótidos del gen mitocondrial ND2. G: localidad galeras, #: código del individuo. 6812, 2541, 6809, 1151 muestras del IAvH. 44
- Figura 14. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los aminoácidos del gen mitocondrial ND2. G localidad galeras, # código del individuo. 6812, 2541, 6809, 1151 muestras del IAvH. 45
- Figura 15. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los nucleótidos del gen mitocondrial Citocromo b. G localidad galeras, # código del individuo. 6809 muestra del IAvH; GB secuencias del GenBank. 45
- Figura 16. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los aminoácidos del gen mitocondrial Citocromo b. G localidad galeras, # código del individuo. 6812 muestra del IAvH; GB secuencias del GenBank. 46
- Figura 17. Especímenes de la colección ornitológica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional (ICN). Arriba *D. humeralis humeralis* con una coloración negra opaca y parche gris azul en el hombro, abajo *D. lafresnayii* con coloración negro café con hombro gris azulado. 49
- Figura 18. Especímenes de la colección ornitológica del Instituto Alexander von Humboldt. Arriba *D. lafresnayii*, abajo *D. humeralis humeralis*. 50
- Figura 19. Izquierda: *Diglossa lafresnayii*, alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras, coloración negra café y parche gris azul en el hombro. Fuente este estudio Derecha: *Diglossa humeralis humeralis*, Sabana de Bogotá veredas Torca y Yerbabuena, coloración negra opaca con parche gris azul en el hombro. Fuente Rojas 2007. 50
- Figura 20. *Diglossa humeralis* robando néctar de una flor de *Cavendishia bracteata*. Fuente Rojas 2007. b) *Macleania rupestres* perforada por *Diglossa*. Fuente Montenegro *et al*, 2005. 56
- Figura 21. Estrategias de forrajeo de las tres especies de *Diglossa*: a. Perchado horizontal, cuerpo diagonal hacia abajo, en dirección a la flor, b. Perchado y cuerpo horizontal en dirección a la flor, c. Perchado horizontal, cuerpo

ligeramente diagonal hacia arriba, d. Perchado vertical, cuerpo diagonal hacia arriba, e. Perchado y cuerpo vertical hacia abajo, f. Perchado y cuerpo vertical hacia arriba, g. Perchado diagonal y cuerpo diagonal en dirección a la flor.

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Método de Salting Out modificado Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.	68
Anexo B. Método de Saghai-Marroof <i>et al.</i> 1984, modificado por De Las Casas J. C. 2004.	69
Anexo C. Método de Bello N, Francino O. y Sánchez A. 2000.	70
Anexo D. Protocolo para la extracción de ADN a partir de tejidos. Kit CIDBIO.	71
Anexo E. Protocolo para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica. Kit CIDBIO.	72
Anexo F. Procedimiento de electroforesis para verificar presencia de ADN.	73
Anexo G. Protocolo PCR Bardeleben Carolyne y Gray Melissa 2005.	74
Anexo H. Protocolo PCR Hackett Shannon 1996.	74
Anexo I. Protocolo combinado: Saghai-Marroof <i>et al.</i> 1984, modificado por De Las Casas (2004) y Bello <i>et al.</i> , 2000	75
Anexo J. Secuencias editadas.	76
Anexo K. Composición de nucleótidos para los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.	80
Anexo M. Distancias genéticas de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.	81
Anexo N. Datos Morfológicos tomados a los especímenes de museo y a los individuos capturados.	82

RESUMEN

Los estudios realizados en oscines de nueve primarias, como es el caso de las aves del género *diglossa*, han concluido que tuvieron una rápida radiación evolutiva, debida a procesos de dispersión y vicarianza ocurridos durante los periodos glaciares e interglaciares y la orogénesis andina, limitando su divergencia morfológica y causando hoy problemas de clasificación e identificación. Este es el caso de *Diglossa lafresnayii* y *D. humeralis humeralis* cuyos patrones de coloración de plumaje similares han originado dudas sobre su distribución actual en Colombia y específicamente en Nariño donde se asume que se encuentran esta especie y subespecie lo que no concuerda con el mapa de distribución de *D. humeralis humeralis* según el cual solo llega hasta la sabana de Bogotá. Con el fin de esclarecer su distribución geográfica, y los eventos históricos, ecológicos y evolutivos que originaron esta distribución, en este trabajo se establecieron las diferencias y semejanzas a nivel morfológico y molecular entre esta especie y subespecie, mediante el análisis de medidas morfométricas y la secuenciación de los fragmentos de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2. El análisis morfológico de las especies mostró que cuatro variables pueden ser utilizadas para diferenciar *D. lafresnayii* de *D. humeralis humeralis*: culmen total, culmen expuesto, cuerda alar y tarso, siendo esta última la medida que presenta mayor peso en la separación de éstas. En cuanto al análisis molecular, después de optimizar las técnicas de extracción y amplificación de ADN para este género y realizar el análisis de las secuencias, se obtuvo una topología con los dos genes mitocondriales con dos clados importantes uno de ellos donde se agrupa a los individuos de *Diglossa lafresnayii* y otro, donde se agrupa a los individuos de *Diglossa humeralis humeralis*, resultados que revelan que los individuos capturados en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras corresponden a *Diglossa lafresnayii*, lo que coincide con los resultados morfológicos y confirma la distribución actual de esta especie y subespecie; estos resultados también mostraron que la distancia genética entre *D. humeralis humeralis* y *D. lafresnayii* es de 40000 años, época que coincide con la última glaciación en Colombia la cual favoreció la evolución de nuevas especies y subespecies. Es importante tener en cuenta que existe una combinación de factores que explica la ausencia de la subespecie *Diglossa humeralis humeralis* en Galeras: los parches de hábitat que impiden un continuo desplazamiento de las especies, las barreras geográficas que impiden la colonización de nuevos hábitat, los requerimientos ecológicos de las especies y sus interacciones con otras que determinan cuales de los posibles colonizadores pueden coexistir, los cambios climáticos, los procesos de adaptación a nuevos ambientes y su semejanza morfológica con *D. lafresnayii* que se traduce en alta presión competitiva.

Este es el primer estudio en sistemática molecular y biogeografía de aves en el departamento de Nariño y por lo tanto puede servir como base para abrir una nueva línea de investigación en estas áreas en la Universidad de Nariño y continuar así con los estudios a nivel molecular de las especies de aves silvestres en el departamento.

Palabras claves: *Diglossa*, morfología, genes mitocondriales, distribución.

ABSTRACT

In Nariño a serious confusion has been present at the moment of identifying into the field the species *Diglossa lafresnayii* because it has been taken into account the morphological characteristics given by Hilty in 2001. According to them, *D. lafresnayii* is brownish black with its bluish gray shoulder and *D. humeralis humeralis* is opaque black with a small bluish gray mark in its shoulder. But in this zone it was found both species *Diglossa lafresnayii* and *Diglossa humeralis humeralis*, therefore it does not belong with this subspecies distribution map. For these reasons, differences and similarities were established through morphological and molecular levels between the species and the subspecies. It was done through morphometrical measures and the fragments sequence of mitochondrial genes cytochrome b and ND2. The morphological analysis of the species showed that just four from eight studied variables can be used to differentiate *D. lafresnayii* from *D. humeralis humeralis*. These four variables are (total height, exposed height, string and tarsus). According to discriminatory analysis 94.4% from studied individuals are correctly classified and the tarsus measure indicates more weight when separating them. Regarding molecular analysis, after optimizing the extraction and amplification techniques of DNA for the genus and carrying out the analysis of the sequences. It was obtained a topology with two mitochondrial genes shows two important clades. The obtained topology with two mitochondrial genes shows two important clades. The first where *Diglossa lafresnayii* individuals are grouped and the second where *Diglossa humeralis humeralis* individuals are also grouped. These results show us that the individuals that were captured around the Sanctuary of flora and fauna Galeras belong to *Diglossa lafresnayii*. Therefore, it agrees with morphological results and confirms the current distribution of these species and subspecies. These results also showed that genetic distance between *Diglossa humeralis humeralis* y *Diglossa lafresnayii* is 40.000 (forty thousand) years. It belongs to the epoch in which Colombia suffered the last glaciations. So it was favorable to the new species and subspecies evolution. It is paramount to take into account that there is a combination of factors that explain us the lack of *Diglossa humeralis humeralis* in Galeras. First of all, the patches in habitat do not allow a continuous movement of the species: the geographic barriers that do not allow the colonization of new habitat and the narrowness of shrub-like zones that link them. Besides, climatic changes, the processes of adaptation to new atmospheres and its morphological similarity with *D. lafresnayii* and then it means high competitive pressure.

This is the first research that deals with birds in this zone taking into account their molecular system and biogeography. It states the basic background for a new research line in the University of Nariño and it contributes to genetic and ecological diversity knowledge in birds.

Keywords: *Diglossa*, morphology, mitochondrial genes, distribution.

1. INTRODUCCIÓN

Colombia es el país con mayor diversidad de aves, posee aproximadamente la sexta parte de las especies de la avifauna mundial, que involucra a los ecosistemas, las comunidades y la diversidad genética de las poblaciones que cada una de estas especies integra. Gran parte de esta diversidad se debe a la cantidad de hábitats que se formaron durante el reciente levantamiento de los Andes, lo que ha traído como consecuencia una radiación adaptativa muy rápida en términos evolutivos (Baena, 1999); sin embargo, esta diversidad se está perdiendo rápidamente por acciones directas o indirectas del hombre; la transformación de los hábitats y ecosistemas naturales, la deforestación por políticas inadecuadas de ocupación y utilización del territorio sin las debidas consideraciones ambientales han sido algunas de las principales causas que han conducido a esta situación. Por tal razón, para obtener la información necesaria con miras a un adecuado programa de conservación es necesario confrontar los conocimientos ecológicos, biogeográficos y evolutivos con los datos obtenidos mediante un análisis molecular adecuado, puesto que estos permiten hacer inferencias importantes sobre las relaciones existentes entre las especies de aves.

El levantamiento de los Andes al final del Cuaternario, formó una barrera efectiva para el intercambio de la fauna de tierras bajas a cada lado de esta cordillera. Adicionalmente, en la última mitad del Pleistoceno, las zonas altas de los Andes fueron sometidas a una serie de períodos glaciares e interglaciares, que causaron alternancia entre procesos de dispersión y aislamiento (Vuilleumier, 1984). Estos períodos de aislamiento y fragmentación de las distribuciones, probablemente dirigieron procesos de especiación y subespeciación de muchos taxones y la extinción local y ajuste de patrones de distribución en muchos grupos de organismos del neotrópico durante los últimos dos millones de años (Graves G. 1982). Este fue el panorama que enfrentaron los oscines de nueve primarias, aves dominantes en los bosques andinos, los cuales tuvieron una rápida radiación evolutiva, lo que limitó la divergencia morfológica causando hoy problemas de clasificación e identificación en campo, originando planteamientos erróneos en estudios sobre riqueza, diversidad y dinámica de las diferentes poblaciones y comunidades de aves (Baena, 1999).

Dentro del grupo de los oscines de nueve primarias se encuentra la especie *Diglossa lafresnayii* y la subespecie *Diglossa humeralis humeralis*, pertenecientes a la familia Thraupidae (Remsen *et al*, 2008), las cuales presentan características morfológicas similares, lo que ha dificultado la identificación y por lo tanto ha generado confusiones en el momento de establecer la distribución geográfica en el Santuario de Flora y Fauna Galeras (Departamento de Nariño), donde se cree que se encuentran ambas especies, a pesar de que el rango de distribución de *Diglossa humeralis humeralis*, según lo reportado en literatura, llega hasta el departamento de Cundinamarca (Hilty & Brown, 2001).

Por otro lado, a pesar de la riqueza en biodiversidad y recursos genéticos reportados en Nariño, son pocos los estudios que se han realizado en el área de biología molecular y los que se han hecho se han enfocado hacia especies animales y vegetales de importancia

económica y comercial. Por estas razones con este trabajo se establecieron las diferencias y semejanzas a nivel morfológico y molecular entre esta especie y subespecie, mediante el análisis de medidas morfométricas y la secuenciación de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2, lo cual permitió esclarecer su presencia en Galeras. Para lograr estos objetivos en primer lugar se optimizaron las técnicas de extracción de ADN en muestras de sangre, tejido y plumas, y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR para este género. El análisis morfológico de las especies mostró que cuatro variables pueden ser utilizadas para diferenciar *D. lafresnayii* de *D. humeralis humeralis*: culmen total, culmen expuesto, cuerda alar y tarso, según el análisis discriminante el 94.4% de los individuos estudiados están correctamente clasificados y la medida del tarso es la que presenta mayor peso en la separación de éstas. En cuanto al análisis molecular, se encontró que de 596 nucleótidos en Citocromo b, 61 (10.235%) fueron variables o polimórficos y 535 (89.765%) filogenéticamente informativos, y en ND2 de 394 nucleótidos, 112 (28.426%) fueron variables y 282 (71.574%) conservados, en cuanto a la topología resultante, con los dos genes mitocondriales se obtuvo dos clados importantes uno donde agrupa a los individuos de *Diglossa lafresnayii* y otro, donde se agrupa a los individuos de *Diglossa humeralis humeralis*, resultados que revelan que los individuos capturados en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras corresponden a *Diglossa lafresnayii* y no a *Diglossa humeralis humeralis* como se planteaba de acuerdo a características morfológicas descritas por Hilty & Brown en 2001 y apuntes de campo, lo que coincide con los resultados morfológicos de este trabajo y confirma la distribución actual de esta especie y subespecie. El análisis molecular también reveló que la distancia genética entre *D. humeralis humeralis* y *D. lafresnayii* es de 40000 años, época que coincide con la última glaciación en Colombia favoreciendo la evolución de nuevas especies y subespecies. Es importante tener en cuenta que existe una combinación de factores que explica la ausencia de la subespecie *Diglossa humeralis humeralis* en Galeras: los parches de hábitat que impiden un continuo desplazamiento de las especies, las barreras geográficas que impiden la colonización de nuevos hábitat, la estreches de zonas arbustivas que los enlace, los cambios climáticos, los procesos de adaptación a nuevos ambientes y su semejanza morfológica con *D. lafresnayii* que se traduce en alta presión competitiva.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis* mediante análisis morfométrico y molecular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer el grado de diferenciación entre *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis* mediante el análisis morfométrico de ejemplares de campo y museo.

Determinar semejanzas y/o diferencias entre las especies estudiadas con base en la secuenciación de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.

Establecer el grado de relación existente entre los resultados morfométricos y de secuenciación con respecto a la historia ecológico-evolutiva de estas especies.

Confirmar la distribución geográfica de *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis* en el Santuario de Flora y Fauna Galeras, Departamento de Nariño.

3. MARCO TEÓRICO

La compleja evolución geomorfológica de Colombia dio origen a una amplia diversidad de geosistemas. Esto hizo confluír en el territorio ambientes y ecosistemas tan variados como la Región Andina, la Región Pacífica, la Región Caribe, la Orinoquía y la Amazonía. Los complejos y entrelazados fenómenos geológicos-históricos que configuraron a Colombia se manifestaron con la presencia de una amplia variedad de regiones biogeográficas, con elementos faunísticos y florísticos representativos tanto del continente Suramericano como del área Centroamericana. Este hecho hace de Colombia un área de amplia superposición de distribución geográfica para muchas especies, lo que le ha valido para ser considerado como uno de los seis países con mayor diversidad (Toussaint, 1993).

La alta biodiversidad presente en el territorio Colombiano pudo tener origen en tres factores principales: la orogénesis andina, los cambios climáticos producidos por las glaciaciones del pleistoceno y la posición geográfica del país que lo hizo paso obligado entre Norte y Sur América una vez formado el Istmo de Panamá. El levantamiento de los Andes produjo una topografía compleja con numerosos microclimas y hábitats variados que propiciaron la diversidad faunística y florística a partir de formas preexistentes en las zonas bajas y que evolucionaron hacia formas adaptadas a las nuevas condiciones; esto explica en parte la existencia en Colombia y en muchas zonas del trópico de numerosos endemismos. Una vez formado el Istmo de Panamá y las cordilleras alcanzaron cierta altura, permitieron el acceso de plantas y animales propios de latitudes más altas y climas más calidos tanto del norte como del sur, hacia latitudes ecuatoriales (Toussaint, 1993).

Durante los periodos glaciales se formaron corredores secos en dirección norte-sur a lo largo de los valles interandinos que permitieron el intercambio de plantas propias de las zonas secas y desérticas desde México hasta Argentina. En los periodos más secos, las selvas Amazónicas y de la Orinoquía fueron reemplazadas parcialmente por sabanas y desiertos; en estos periodos las selvas se restringieron a los flancos más húmedos de las cordilleras. En periodos húmedos como el actual, las selvas se expanden y solo quedan enclaves áridos en algunos valles interandinos, debido a la influencia directa de los vientos alisios que producen una inversión térmica. Estas contracciones y expansiones húmedas y secas, acompañadas de elevaciones y descensos en la vertical de los pisos térmicos han propiciado igualmente la amplia variedad biológica en el territorio colombiano (Toussaint, 1993).

El fenómeno de especiación se da en un espacio determinado y en un tiempo dado. Actualmente se reconocen cuatro modelos principales de especiación: alopátrica, parapátrica, simpátrica e hibridación. La especiación alopátrica ocurre cuando el área de distribución de una especie se fragmenta en dos subunidades separadas por una barrera geográfica, provocando el aislamiento de las dos poblaciones e interrumpiendo el flujo genético; las posibles diferencias entre la estructura genética de ambas poblaciones, una acumulación diferente de mutaciones y presiones de selección diferentes, terminan

diferenciándolas en dos grupos reproductivos independientes y mutuamente incompatibles (Zunino & Zullini, 2003).

La especiación parapátrica ocurre cuando una población fronteriza que no está separada de la población principal, está sometida a una presión de selección muy rigurosa y no homogénea con relación a la que actúa sobre la población principal; esto hace que los híbridos interpopulacionales sufran una selección negativa, particularmente drástica en el territorio ocupado por la población periférica, la cual, a causa de la eliminación del aporte genético de los híbridos, termina diferenciándose como especie separada. La especiación simpátrica se da cuando en el interior del territorio ocupado por una especie, por motivos independientes de los factores espaciales, un conjunto de individuos adquiere alguna peculiaridad biológica que provoca su separación de la población principal. La especiación por hibridación ocurre en condiciones de simpatria, dos poblaciones pertenecientes a dos especies estrictamente afines pueden acoplarse y producir una descendencia establemente fértil. La población híbrida adquiere características propias que las separan de las especies parentales (Zunino & Zullini, 2003).

El género *Diglossa* se caracteriza por ser fundamentalmente nectarívoro e insectívoro y por poseer picos especializados para perforar las bases de las flores, permitiéndoles extraer el néctar en forma "ilegítima", sin efectuar la polinización, de tal manera que han sido considerados como ladrones de néctar altamente especializados (Stiles *et al.*, 1992).

Todos los miembros de este género habitan los bosques montañosos y zonas arbustivas en las montañas del sur de México y América Central de los Andes de Venezuela y Colombia hasta el Norte de Argentina, en las montañas costeras de Venezuela y en las planicies del sur oriente de Venezuela en la frontera con Brasil. El norte de los Andes constituye el presente centro de distribución del género con cerca de siete especies simpátricas, en contraste con América central en la que se encuentra una especie al igual que en el sur de Venezuela y Argentina (Vuilleumier, 1969; Graves, 1982).

En Colombia se encuentran diez especies de este género: *Diglossa caerulesens*, *D. albilatera*, *D. sittoides* y *D. cyanea* que habitan las tres cordilleras, *D. glauca* se encuentra en la vertiente este de la Cordillera Oriental desde el occidente de Caquetá, oriente de Putumayo y este de Nariño, *Diglossa indigotica* habita en el oriente de Colombia, *Diglossa gloriosissima* endémica del extremo norte de la Cordillera Occidental en Antioquia y montañas de oriente de Cauca, *Diglossa brunneiventris* en el extremo norte de la Cordillera Central y Occidental, *Diglossa humeralis* en la cordillera Oriental y *Diglossa lafresnayii* en el sur de la Cordillera Oriental y en la Cordillera Central.

Este género politépico es muy atractivo para estudios genéticos porque es ejemplo de especiación en progreso (Vuilleumier, 1984) y se han presentado problemas sistemáticos al establecer el estado taxonómico de los taxa alopátricos, como es el caso de la superespecie *D. carbonaria* que está formada por una gran variedad de grupos alopátricos, hecho que dio origen a estudios como el de Graves (1982) en el que se establece una hipótesis sobre la especiación de esta superespecie en el complejo de los Andes.

Graves (1982) plantea que el ancestro de *D. carbonaria* probablemente se desarrolló en el noroeste de Suramérica, y que el linaje *Diglossine* proviene del sur de la región montañosa venezolana existente y que de aquí invadió los emergentes Andes. También propone que la distribución geográfica y el parcial solapamiento fenotípico de las superespecies *carbonaria* y *lafresnayii* indican que experimentaron un proceso similar a los “taxones cíclicos” que ocurre en las islas, pero que esta posibilidad sólo se puede verificar con un completo estudio de la superespecie *lafresnayii*.

El género *Diglossa* ha sido ubicado en diferentes familias según cada investigador: algunos lo ubican dentro de una familia separada: Coerebidae, otros debido a sus semejanzas con las reinitas lo clasifican dentro de la familia Parulidae, y otros basados en características morfológicas, comportamentales y genéticas lo consideran como uno de los linajes divergentes de tangara y por lo tanto lo ubican dentro de la familia Thraupidae, clasificación muy utilizada en diferentes investigaciones (Remsen *et al*, 2008). Se caracterizan por tener un pico ligeramente recurvado, con mandíbula superior más larga y de extremo en gancho y mandíbula inferior aguda; lengua en forma de U invertida como pincel (Hilty & Brown 2001).

Diglossa lafresnayii (Figura 1) fue descrita por Boissonneau en 1840, se caracteriza por tener el pico recurvado y muy ganchudo; es de color negro café con hombro gris azulado y ojos oscuros. Se confunde fácilmente con varias subespecies de *Diglossa humeralis* y al extremo norte de la cordillera oriental es difícilmente distinguible en el campo de la subespecie *Diglossa humeralis humeralis*. Se encuentra entre 2000 y 3700m, usualmente a más de 2700m, en el sur de la Cordillera Oriental hasta Bogotá, en la Cordillera Central desde el sureste de Antioquia, Caldas y Tolima y en el sur por las montañas de Nariño (Hilty & Brown 2001) (Figura 2).

Diglossa humeralis (Figura 1) fue descrita por Fraser en 1840, pico recurvado y muy ganchudo, se encuentran dentro de ella tres subespecies: *Diglossa humeralis humeralis aterrima*, completamente negra, *Diglossa nocticolor*, negra con rabadilla gris oscuro, y *Diglossa humeralis humeralis*, negra opaca con rabadilla gris oscura y pequeño parche gris azul en el hombro. Esta última se encuentra en la Cordillera Oriental desde Norte de Santander hasta Norte de Bogotá y no tiene ningún registro para el departamento de Nariño (Hilty & Brown 2001; Graves, 1982) (Figura 2).

Figura 1. Izquierda: *Diglossa humeralis humeralis*. Fuente Woodruff, 2007 www.flickr.com/photos/digitalbcon/2144177143. Derecha: *Diglossa lafresnayii*. Fuente Montenegro *et al.* 2005.



Figura 2. Distribución geográfica de *diglossa lafresnayii* (color naranja) y *diglossa humeralis humeralis* (color amarillo) Fuente www.zipcodezoo.com/Animals.asp.



Actualmente se utilizan datos moleculares para resolver problemas en la evolución de las especies, flujo de genes y comportamientos no detectables a través de observaciones directas y para estudiar relaciones filogenéticas a nivel de especie; para este último caso son de gran utilidad los genes mitocondriales debido a que 1) las diferencias encontradas entre individuos se deben única y exclusivamente a fenómenos de mutación y no son el resultado de recombinación; 2) en una población donde machos y hembras se encuentran en igual proporción el número efectivo de genes mitocondriales estará reducido por cuatro, incrementando el efecto de la deriva génica y la tasa de renovación genética dentro de las poblaciones; 3) este último factor, junto con una elevada tasa de mutación, incrementan el nivel de variabilidad entre poblaciones, eliminando más rápido los genes nucleares que los polimorfismos (alelos) ancestrales existentes a nivel inter e intraespecífico; 4) la comparación de marcadores genéticos uniparentales (mitocondriales) *versus* biparentales (nucleares) podrá utilizarse para identificar casos de hibridación entre organismos y detectar diferencias en el comportamiento entre los dos sexos; y 5) se trata de un ADN relativamente pequeño (unos 16.000 pares de bases) en comparación con los tres mil millones de pares de bases que constituyen el ADN nuclear (Awise, 1994).

Los genes mitocondriales ampliamente utilizados son el gen ND2 y el gen Citocromo b. Estos genes son secciones codificantes de ADN mitocondrial, que han sido utilizados en estudios intraespecíficos, debido a su relativa baja tasa de variabilidad. Esto significa que, comparando la secuencia de ADN de dos individuos de la misma especie, la coincidencia de bases va a ser muy elevada. Diferencias de más del 1% son significativas para designar a los individuos como pertenecientes a especies diferentes (Den Elzen *et al*, 2001; Hackett, 1996)

4. ANTECEDENTES

En la última década varios estudios moleculares se han dirigido a incrementar el conocimiento en las aves, entre los que se destacan están:

Vuillemier en 1969 realizó un estudio de sistemática del género *Diglossa* en el que propone que éste se divide en tres superespecies: Superespecie *lafresnayii*, superespecie carbonaria y superespecie *baritula*, cuyos patrones de coloración y aislamiento geográfico son muy similares, especialmente entre la superespecie *lafresnayii* y carbonaria. Dentro de la superespecie *lafresnayii* se encuentran las especies *D. lafresnayii*, *D. gloriosissima* y *D. mysticalis*; dentro de *baritula* las especies *D. baritula*, *D. plumbea* y *D. sittoides*; y dentro de carbonaria las especies *D. gloriosa*, *D. humeralis* y *D. carbonaria*.

Graves en 1982 afirma que la presente distribución de la superespecie carbonaria (*Diglossa carbonaria*) fue afectada por los ciclos glaciales del pleistoceno, existiendo una zona limitada de hibridación entre *brunneiventris* y *carbonaria* en el norte de la Paz, Bolivia; la presencia de individuos híbridos en poblaciones alopátricas del este de Bolivia (carbonaria), Colombia (*humeralis*) y Venezuela (*gloriosa*) puede deberse a un contacto genético del pasado y no a la presente introgresión de formas cercanas. Propone que la diferenciación entre las especies, ocurrió por aislamiento en los refugios de bosque alto andino durante el pleistoceno glacial e interglacial y que la dispersión y contacto genético ocurrió con cambios altitudinales.

Graves en 1990 describe una nueva subespecie de pinchaflor *Diglossa gloriosissima boyle*, para dos localidades en el norte de la Cordillera Occidental de los Andes de Colombia en el departamento de Antioquia. La nominada raza esta aparentemente restringida hacia las partes altas de la cordillera occidental al occidente de Popayán, departamento del Cauca.

Hackett en 1995 determinó la relación filogenética de ocho especies del género *Diglossa*, pertenecientes al complejo de la superespecie *Diglossa baritula*, utilizando aloenzimas, secuencias de ADN mitocondrial y comparaciones morfológicas. Después de analizar el modelo filogenético del complejo, Hackett encontró que *plumbea* (que se encuentra en la región montañosa del sur de América Central) está muy relacionada con *baritula* (que se encuentra en la región montañosa del norte de América Central) y que este modelo y las distancias genéticas sugieren que la divergencia de los taxa de la superespecie *baritula* ocurrió como resultado de dispersión y vicarianza durante el Pleistoceno.

Baena en 1999, determinó las relaciones filogenéticas entre los géneros *Basileuterus* (Parulidae) y *Hemispingus* (Thraupidae), mediante evidencias por Citocromo b del ADN mitocondrial. Posiblemente debido a su reciente divergencia y a una radiación adaptativa convergente, los géneros *Hemispingus* (Thraupidae) y *Basileuterus* (Parulidae) comprenden especies muy semejantes entre sí en su forma, patrón del plumaje y comportamiento. Esto ha causado que unos autores incluyan a una especie dentro de uno de estos géneros y

posteriormente ésta sea reubicada en el otro, y viceversa. Realizo una comparación genética de individuos de estos dos géneros para determinar si representaban dos géneros distintos en dos familias diferentes, y si la asignación de las especies colombianas a estos géneros era correcta. Secuencio 284 pares de bases de un fragmento del gen Citocromo b (corresponden a las posiciones 15003 a 15286 de *Gallus gallus*), para 11 especies del género *Basileuterus* de las 12 presentes en Colombia, y las cinco especies del género *Hemispingus* presentes en el país. La extracción de ADN se realizó a partir de plumas de ejemplares de museo en la colección ornitológica del Instituto de Ciencias Naturales. Se realizó clonación en *E. coli*, y se creó una librería de ADNmt. La topología consenso generada a partir del análisis de parsimonia, reveló la ancestralidad de Parulidae, lo que concuerda con trabajos previos; pero por otra parte, el análisis mostró con soportes 'bootstrap' del 100%, la relación entre *B. fulvicauda* con *H. frontalis* (dentro de Parulidae).

Pérez J. en el 2005, realizó un estudio sobre filogenia molecular y biogeografía del género *Myioborus* (Parulidae), utilizando secuencias de los genes mitocondriales Citocromo b, ND2, y ND3. La reconstrucción filogenética basada en la máxima parsimonia y probabilidad, y en los métodos bayesianos sugirieron que el origen del género *Myioborus* fue en el norte con una colonización subsiguiente de las regiones montañosas del neotrópico y que la especie de baja montaña *M. miniatus*, es un taxón hermano de los taxa de alta montaña. También encontró que la divergencia de los taxa de tierras altas produjo dos linajes monofiléticos, un clado en el norte de la Cordillera Central de los Andes formado por *M. albifrons*, *M. ornatus* y *M. melanocephalus*, y el otro clado en las montañas del sur de Venezuela, norte de Brasil y el oeste de la Guayana, formado por *M. castaneocapillus*, *M. albifacies*, y *M. cardonai*, y probablemente *M. pariae*. Llegó a la conclusión de que la rápida diversificación de las especies de alta montaña se debió probablemente a los eventos geológicos y climáticos del Plioceno tardío. Estos resultados sugieren que hubo una interacción de dispersión y vicarianza que dio origen a los modelos biogeográficos actuales de este género.

Mauck en 2008 realizó un estudio de filogenia, biogeografía y evolución paralela del tamaño del gancho del pico en *Diglossa*; encontrado que este género es el único grupo nectarívoro de tángaras distribuido en altas elevaciones en los Andes central y del norte de Sur América, Venezuela y las tierras altas de América Central. El principal centro de origen son los andes del norte, donde ocurrieron el 75% de las dispersiones hacia América Central, Venezuela y los Andes Centrales.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 DETECCIÓN MOLECULAR DE ND2 Y CITOCROMOB

5.1.1 Toma de muestras. Se trabajó con dos tipos de muestras: muestras donadas por el banco de tejidos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt sede Palmira, y muestras de ejemplares capturados en campo; de los primeros se extrajo ADN a partir tejido y de los segundos se obtuvo ADN a partir de tejido, sangre y plumas.

- Tratamiento para plumas. Se removieron cuatro plumas, timoneras y/o del ala, de cada ave e inmediatamente se cortaron los cañones con tijeras estériles y se depositaron en tubos eppendorf de 1,5 ml estériles (De las Casas 2004).
- Tratamiento de muestra de sangre. Las muestras de sangre (50-200 μ l aproximadamente) fueron tomadas a partir de punción cardiaca y de un corte en la uña del tercer dedo; esta fue colocada en tubos vacutainer que contenían 3.6 mg de EDTA (K₂). Para evitar la contaminación de las muestras el procedimiento se realizó en el menor tiempo posible (De las Casas 2004).
- Tratamiento de muestra de tejido. Se colectaron seis ejemplares de los que se obtuvo muestras de tejido de músculo, corazón e hígado, estas fueron colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles con etanol al 70 % (Torres, 2005).

5.1.2 Optimización de la extracción de ADN a partir de tejido, plumas y sangre. La fase de laboratorio se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología y biología molecular del Departamento de Biología de la Universidad de Nariño.

Para la extracción de ADN a partir de sangre se utilizó el método de Salting Out modificado en la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (Anexo A).

Para la extracción de ADN a partir de plumas y tejido (fragmentos entre 0.005 y 0.05 gramos) se probaron dos protocolos: el descrito por Saghai-Marroof *et al.* (1984), modificado por De Las Casas (2004) (Anexo B), y el descrito por Bello *et al* (2000) (Anexo C). También se utilizaron los protocolos de los kit de extracción de ADN a partir de tejidos y sangre del Centro de Investigación y Desarrollo en Biotecnología CIDBIO (Anexo D y E).

De acuerdo a esto se determinaron las condiciones iniciales de trabajo, las cuales fueron:

- Probar el protocolo original, sin ninguna modificación.
- Trabajar con la concentración de los reactivos establecida en cada protocolo base, excepto la concentración de la proteinasa k.

- No cambiar el tiempo ni las gravedades de la centrifugación.
- Trabajar con una temperatura de centrifugación de 4°C.

A partir de los protocolos utilizados se hicieron las modificaciones necesarias, teniendo en cuenta las variables nombradas en la tabla 1.

Tabla 1. Variables tenidas en cuenta para la optimización de la técnica para la extracción de ADN a partir de sangre, tejido y plumas.

Variables		Parámetros de Evaluación
Maceración mecánica	Sin maceración Con maceración Maceración con nitrógeno líquido Maceración con vidrio	Obtención de ADN
Tiempo de incubación con lisis celular	De 30 minutos, 4 horas, 22 horas y 24 horas	Obtención de ADN
Temperatura de incubación con lisis celular	Temperatura ambiente, 37 °C, 56°C, 57°C y 65°C	Obtención de ADN
Tiempo de incubación con proteinasa k*	30 minutos, 4 horas, 22 horas y 24 horas	Obtención de ADN
Concentración de proteinasa k*	20mg/ml y 175µg/ml	Obtención de ADN

*Estas variables solo se evaluaron en los protocolos en los cuales la proteinasa k no estaba incluida en el buffer de lisis.

Con el fin de optimizar la técnica, cada variable se analizó de forma independiente y cada vez que se obtenían resultados se realizó la variación correspondiente y se prosiguió a evaluar las otras variables.

5.1.3 Extracción y verificación de ADN total. Para la extracción de ADN a partir de sangre, tejido y plumas se utilizaron los protocolos optimizados; la presencia de ADN genómico total se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio (Anexo F).

5.1.4 Optimización de la reacción en cadena de la polimerasa PCR para ND2 y Citocromo b. Para la optimización de la PCR se utilizaron los protocolos propuestos por Bardeleben y Gray (2005) (Anexo G), y por Hackett (1996) (Anexo H). Como condición inicial de trabajo se utilizó el volumen de reacción sugerido en cada protocolo.

A partir de los protocolos utilizados se hicieron las modificaciones necesarias, teniendo en cuenta las variables nombradas en la tabla 2.

Tabla 2. Variables tenidas en cuenta para la optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.

Variables		Parámetros de Evaluación
Numero de ciclos	28 y 40	Obtención de ADN amplificado
Temperatura de alineamiento	54, 56, 58, 60	Obtención de ADN amplificado

5.1.5 Amplificación. Mediante la técnica de PCR se amplificó un fragmento de 850 pb aproximadamente del gen Citocromo b, y un fragmento de 380 pb aproximadamente del gen ND2, utilizando los iniciadores citados en la tabla 3. Para esto se probaron dos protocolos: el de Bardeleben y Gray (2005) (Anexo G); y el de Hackett (1996) (Anexo H).

Tabla 3. Iniciadores usados para la amplificación del fragmento de los genes mitocondriales citocromo b y ND2

Gen	Primer	Secuencia	Referencia
Citocromo b	CBS-F	5' -CCAACATCTCHKCHTGTGAAAYTT- 3'	Sato <i>et al.</i> ,1999
Citocromo b	CBS-R	5' -GATGAAKGGGTVTTCTACTGGTTG-3'	Sato <i>et al.</i> ,1999
ND2	H5578	5' -CCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGA-3'	Hackett S., 1996
ND2	L5215	5' -TATCGGGCCCATACCCCGAAAAT-3'	Hackett S., 1996

Para verificar la presencia del fragmento amplificado, se corrió electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Finalmente se almacenaron los amplificados obtenidos a -20 °C.

5.1.6 Secuenciación. Una vez obtenidos los productos de PCR, se procedió a la secuenciación directa en ambas direcciones mediante el kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, EEUU y su análisis en un secuenciador ABI Prism 3100 (PE Applied Biosystems) de la compañía Macrogen (Corea del Sur). Se enviaron 30 µl de cada amplificado, en tubos de PCR sellados con papel parafinado, en una nevera de icopor con hielo seco.

5.2 ESTUDIO MORFOMÉTRICO

Este estudio se desarrolló entre los meses de julio de 2007 a febrero de 2008. Para la toma de medidas morfométricas se utilizaron ejemplares de la colección Ornitológica del Museo de Historia Natural-Instituto de Ciencias Naturales (MHN-ICN) de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá - Cundinamarca), de la colección Ornitológica del Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander von Humboldt (IAvH) sede Villa de Leiva

y del Museo de la Universidad de Nariño PSO-CZ (Figura 3), se capturaron individuos en campo, en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras, departamento de Nariño.

Figura 3. Toma de datos en la colección Ornitológica del Museo de Historia Natural-Instituto de Ciencias Naturales (MHN-ICN) de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá - Cundinamarca).



5.2.1 Captura de aves. Para la captura de las aves se utilizaron 10 redes de niebla (36 mm ojo de malla y 10 metros de longitud), las cuales se ubicaron en varios sitios estratégicos de la zona. Una vez capturada el ave se procedió a la identificación en campo mediante la comparación con las ilustraciones y datos morfoecológicos del ave encontrados en la Guía de Aves de Colombia (Hilty & Brown 2001), la Guía de los Altos Andes (Fjeldsa & Krabbe, 1990) y en la Guía de Aves de Santa Fe de Bogotá (Asociación Bogotana de Ornitología 2000). Se trabajó con todos los individuos de *Diglossa lafresnayii* o *Diglossa humeralis humeralis* que cayeron en las redes.

5.2.2 Medidas morfométricas. A los individuos capturados y a los ejemplares de museo se les tomaron las siguientes medidas morfológicas: longitud del culmen total (CT), longitud del culmen expuesto (CE), ancho de la comisura (ACO), altura del pico a nivel de la narina (ALN), ancho del pico a nivel de la narina (AN), longitud del tarso (T), longitud de la cuerda alar (CA), longitud de la cola (C). También se realizó un registro fotográfico de las aves capturadas y de las pieles de museo para establecer algunas características de la coloración del plumaje.

5.3 ANÁLISIS

5.3.1 Análisis molecular. Las secuencias parciales finales de los genes mitocondriales ND2 y Citocromo b se obtuvieron empleando los programas bioinformáticos EMBOSS (herramienta revseq) y CLUSTAL X 2.0.5. (Larkin *et al*, 2007). Las distancias genéticas, los porcentajes de bases nucleotídicas y topologías fueron obtenidas empleando el programa MEGA 4.0. (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Tamura *et al*, 2007).

- Definición del grupo Externo (Outgroup). Con el fin de identificar el grupo externo que enraíce los árboles de similitud, se realizaron varias reconstrucciones filogenéticas por el método de mínima evolución (De las Casas 2004), en el programa MEGA 4.0. Se utilizaron especies afines y cercanas al genero *Diglossa* según la clasificación de especies de aves de Sur América propuesta por Remsen *et al*, (2008).
- Análisis de similitud de las secuencias. Con el propósito de evaluar saturación de nucleótidos, se realizaron análisis de tasa de divergencia de transiciones y transversiones. Se analizó también la tasa de divergencia de cada posición del codón y se estimaron las divergencias genéticas entre las especies, usando el modelo de p-distance. Se realizaron reconstrucciones filogenéticas utilizando el método de mínima evolución. Para corroborar los resultados obtenidos con nucleótidos, se realizó la traducción a secuencias de aminoácidos y se calcularon las distancias genéticas, composición de aminoácidos y se hizo la respectiva reconstrucción filogenética. Todos los análisis filogenéticos fueron realizados con el programa MEGA 4.0.

5.3.2 Análisis morfológico. Se trabajó con los datos de los individuos adultos de cada una de las especies, a los cuales se les aplicó la prueba de Shapiro-Wills para evaluar la normalidad de cada variable. Para determinar si existen diferencias morfométricas significativas entre *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis*, a las variables que se ajustaron a una distribución normal se aplicó la prueba t de student, y las que no se ajustaron a esta distribución, fueron transformadas a \log_{10} y se les aplicó la misma prueba. Los datos que después de la transformación no se ajustaron a una distribución normal se les aplicó la prueba U de Mann Withney. Estos análisis se realizaron con los programas PAST - PAleontological STatistics - versión 1.38 (Hammer *et al*, 2005) y Excell.

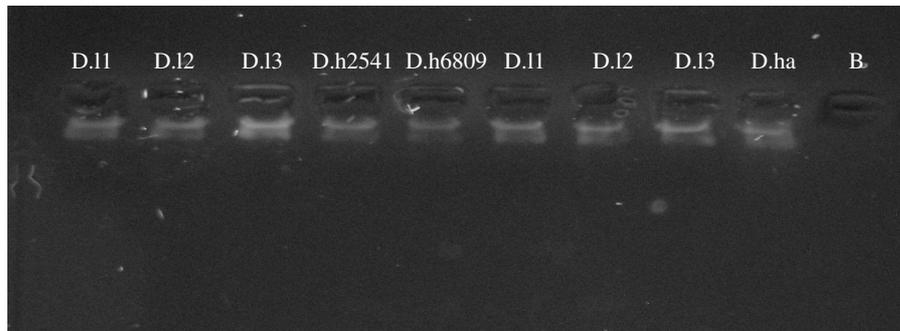
Los datos de las medidas morfométricas que presentaron diferencias significativas en la prueba de t y U se les aplicó un Análisis de Funciones Discriminantes para encontrar que medida(s) causa(n) la mayor separación entre las dos especies, el análisis fue realizado con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows versión 13.0 (Norusis, 2000).

6. RESULTADOS

6.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN DE ADN

6.1.1 Extracción de ADN a partir de sangre. Se usó el método de extracción de Salting Out utilizado en la universidad Nacional de Colombia sede Palmira y optimizado en este trabajo según el anexo A; para verificar su eficiencia se realizaron seis repeticiones y con electroforesis se observaron bandas bien definidas (Figura 4).

Figura 4. Gel de agarosa en el que se visualiza el ADN extraído a partir de sangre mediante el método de Salting Out modificado Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. D.l *Diglossa lafresnayii* individuos 1, 2 y 3; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuos 2541 y 6809; D.ha *Diglossa humeralis aterrima* (control positivo); B blanco.



6.1.2 Extracción de ADN a partir de plumas y tejido. Se probaron dos protocolos el de Saghai-Marroof *et al.* 1984, modificado por De Las Casas (2004) y el de Bello *et al.*, 2000 (Anexo B y C), obteniendo resultados negativos. Entonces se procedió a evaluar cada una de las variables sin ningún resultado favorable, por lo tanto se combinó los dos protocolos (Anexo I) y se incrementó un paso inicial de maceración mecánica de las muestras obteniendo resultados positivos; con este protocolo se realizaron siete repeticiones con muestras de plumas y cinco con muestras de tejido, obteniendo ADN de óptima calidad (Figuras 5 y 6).

Figura 5. Gel de agarosa en el que se visualiza el ADN extraído a partir de plumas mediante el método de Saghai-Marroof *et al.* (1984), modificado por De Las Casas (2004) y el de Bello *et al* (2000). D.1 *Diglossa lafresnayii* individuos 1, 2, 3, 4, 5 y 6; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuo 1151; D.a *Diglossa albilatera* (Control positivo); B blanco.

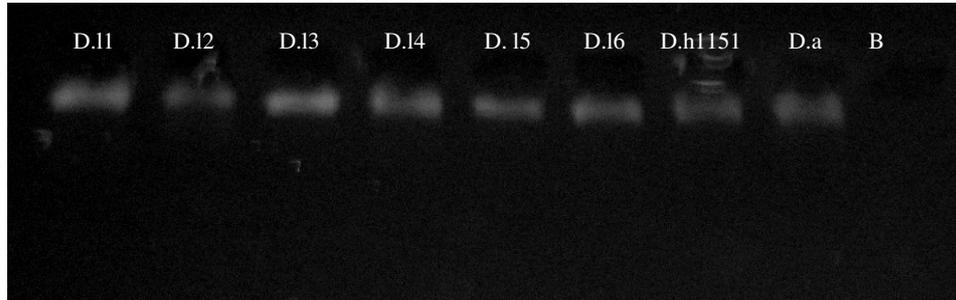
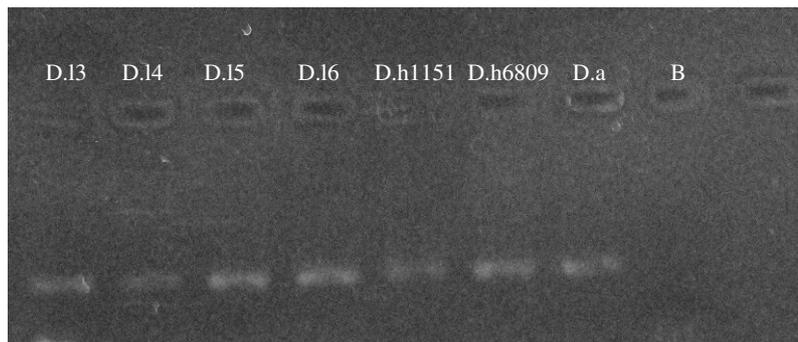


Figura 6. Gel de agarosa en el que se visualiza el ADN extraído a partir de tejido mediante el método de Saghai-Marroof *et al.* (1984), modificado por De Las Casas (2004) y el de Bello *et al* (2000). D.1 *Diglossa lafresnayii* individuos 3, 4, 5 y 6; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuos 1151 y 6809; D.a *Diglossa albilatera* (Control positivo); B blanco.



6.1.3 Extracción de ADN a partir de muestras de sangre y tejido Kit CIDBIO. Después de asistir a una capacitación en la Universidad Distrital se decidió utilizar dos Kits de extracción de ADN total, uno a partir de muestras de sangre y otro a partir de muestras de tejido, obteniendo resultados positivos con ambos. Debido a la baja cantidad de ADN en cada muestra no se pudieron visualizar las bandas en el gel de agarosa después de la extracción, por lo tanto todas las muestras fueron amplificadas vía PCR utilizando iniciadores de los genes de interés: Citocromo b y ND2, siguiendo los protocolos de Bardeleben y Gray, 2005 (Anexo G) y de Hackett, 1996 (Anexo H), ya optimizados (Figuras 7 y 8).

Figura 7. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificados obtenidos a partir ADN extraído de muestras de sangre, utilizando el KIT de extracción de ADN de CIDBIO. D.l *Diglossa lafresnayii* individuos 1, 3 y 6; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuos 2541, 1151 y 6809; D.a *Diglossa albilatera* (Control positivo); B blanco.

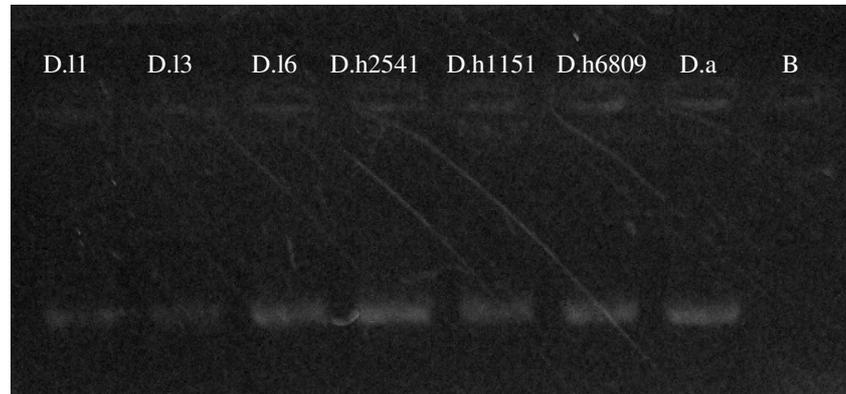
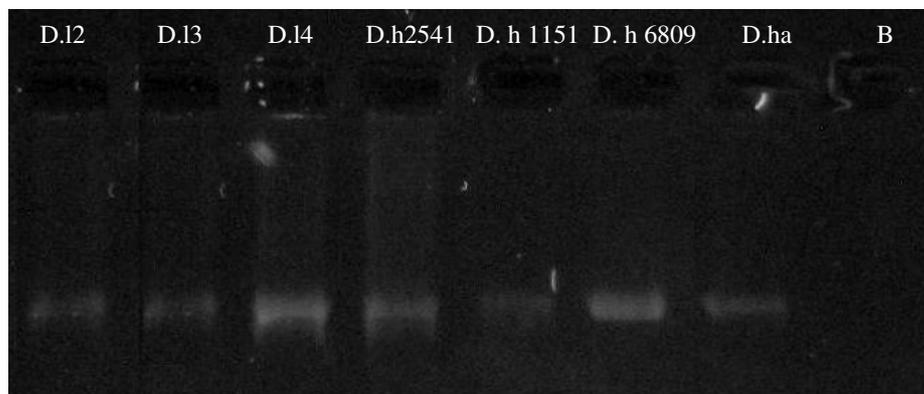


Figura 8. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificados obtenidos a partir ADN extraído de muestras de tejido, utilizando el KIT de extracción de ADN de CIDBIO. . D.l *Diglossa lafresnayii* individuos 2, 3 y 4; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuos 2541, 1151 y 6809; D.ha *Diglossa humeralis aterrima* (Control positivo); B blanco.



6.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA AMPLIFICAR LOS GENES CITOCROMO B Y ND2

Para el gen Citocromo b (fragmento de 800 pares de bases) el protocolo de Hackett (1996) dio resultados positivos (Figura 9), con una temperatura de alineamiento de 56°C y 40 ciclos, y el de Bardeleben y Gray (2005) resultados negativos. Para el gen ND2 (fragmento de 400 pares de bases) el protocolo de Bardeleben y Gray (2005) dio resultados positivos (Figura 10), con una temperatura de alineamiento de 60°C y 40 ciclos y el de Hackett (1996) resultados negativos. En todos los ensayos se utilizó un control positivo que se obtuvo de individuos *Diglossa albilatera* y *Diglossa humeralis aterrima* capturados en este estudio, a los cuales se les extrajo ADN y se les realizó amplificación por PCR; y un blanco

de la reacción para controlar posibles agentes contaminantes que pudieran dar falsos positivos. Además se utilizó una escalera de peso molecular de 100-1000 pares de bases marca Fermentas, con el fin de establecer el tamaño de los fragmentos amplificados. En todas las amplificaciones tanto el control positivo como el negativo y las bandas de la escalera de peso molecular fueron siempre bien definidas lo cual muestra la calidad de las amplificaciones.

Figura 9. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificados el ADN del gen mitocondrial Citocromo b. D.1 *Diglossa lafresnayii* individuos 1, 2, 3, 4, 5 y 6; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuos 2541, 1151 y 6809; D.ha *Diglossa humeralis aterrima* (Control positivo); D.a *Diglossa albilatera* (Control positivo); BR blanco de la reacción.

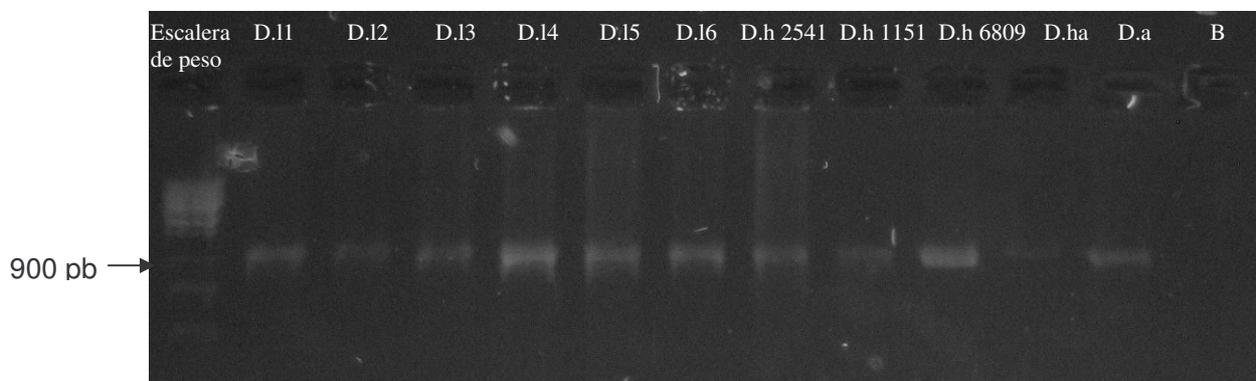
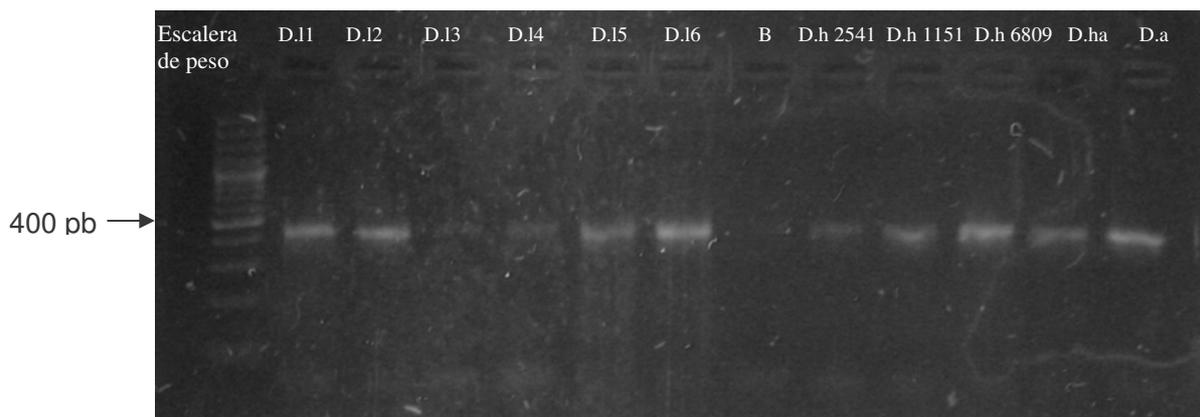


Figura 10. Gel de agarosa en el que se visualizan los amplificados el ADN del gen mitocondrial ND2. D.1 *Diglossa lafresnayii* individuos 1, 2, 3, 4, 5 y 6; D.h *Diglossa humeralis humeralis* individuos 2541, 1151 y 6809; D.ha *Diglossa humeralis aterrima* (Control positivo); D.a *Diglossa albilatera* (Control positivo); B blanco.



Se lograron amplificar 42 muestras del gen ND2 y 12 del gen Citocromo b correspondientes a individuos capturados en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras y a muestras de tejido donadas por el Instituto Alexander von Humboldt (Tabla 4).

Tabla 4. Amplificados de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.

Especie y Código	Gen mitocondrial	Fuente muestra	Numero de Amplificados
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 1	ND2	Galeras	4
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 2	ND2	Galeras	3
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 3	ND2	Galeras	5
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 4	ND2	Galeras	4
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 5	ND2	Galeras	4
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 6	ND2	Galeras	3
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 1	Citocromo b	Galeras	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 2	Citocromo b	Galeras	4
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 3	Citocromo b	Galeras	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 5	Citocromo b	Galeras	4
<i>D. humeralis humeralis</i> 1151	ND2	Instituto Humboldt	7
<i>D. humeralis humeralis</i> 2541	ND2	Instituto Humboldt	5
<i>D. humeralis humeralis</i> 6809	ND2	Instituto Humboldt	3
<i>D. humeralis humeralis</i> 6812	ND2	Instituto Humboldt	4
<i>D. humeralis humeralis</i> 6809	Citocromo b	Instituto Humboldt	1
<i>D. humeralis humeralis</i> 2541	Citocromo b	Instituto Humboldt	1

6.3 ANÁLISIS MOLECULAR

6.3.1 Secuenciación. Se enviaron a secuenciar 28 muestras de las cuales 20 correspondían al gen mitocondrial ND2 y ocho a citocromo b. De estas muestras se obtuvo 18 secuencias, 12 del gen ND2 y seis de citocromo b (Tabla 5, Anexo J).

Tabla 5. Número de secuencias de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2.

Especie y Código	Gen mitocondrial	Fuente muestra	Localidad	Nº de muestras enviadas secuenciación	Nº de secuencias
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 1	ND2	Galeras	Nariño	2	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 2	ND2	Galeras	Nariño	2	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 3	ND2	Galeras	Nariño	2	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 4	ND2	Galeras	Nariño	2	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 5	ND2	Galeras	Nariño	2	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 6	ND2	Galeras	Nariño	2	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 1	Citocromo b	Galeras	Nariño	1	1
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 2	Citocromo b	Galeras	Nariño	2	2
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 3	Citocromo b	Galeras	Nariño	1	0
<i>D. lafresnayii</i> Individuo 5	Citocromo b	Galeras	Nariño	2	2
<i>D. humeralis humeralis</i> 1151	ND2	Instituto Humboldt	Cundinamarca- Bojaca	2	2
<i>D. humeralis humeralis</i> 2541	ND2	Instituto Humboldt	Cundinamarca- Fómeque	2	1
<i>D. humeralis humeralis</i> 6809	ND2	Instituto Humboldt	Cundinamarca- Bojaca	2	2
<i>D. humeralis humeralis</i> 6812	ND2	Instituto Humboldt	Cundinamarca- Bojaca	2	1
<i>D. humeralis humeralis</i> 6809	Citocromo b	Instituto Humboldt	Cundinamarca- Bojaca	1	1
<i>D. humeralis humeralis</i> 2541	Citocromo b	Instituto Humboldt	Cundinamarca- Fómeque	1	0

Como se puede apreciar en la tabla anterior, el número de secuencias que se lograron amplificar y secuenciar exitosamente del gen mitocondrial citocromo b es menor que el de ND2 lo que se debió probablemente a los iniciadores los cuales no son específicos para *Diglossa* puesto que fueron tomados de un estudio que se realizó en pinzones (Sato, et al 1999), por otro lado las condiciones de envío para la secuenciación no superaron el tiempo de llegada y por lo tanto las muestras se pudieron haber alterado.

6.3.2 Outgroup. Después de realizar varias reconstrucciones filogenéticas y teniendo en cuenta la clasificación de especies de aves de Sur América propuesta por Remsen *et al*, 2008 y el trabajo realizado por Klicka en el 2000 en donde el genero *Piranga* aparece como grupo hermano del genero *Diglossa* (Figura 11), se escogieron las secuencias de los genes mitocondriales ND2 y citocromo b de *Piranga olivacea* (Figura 12) como grupo externo para desarrollar el análisis de agrupamiento correspondiente.

Figura 11. Topología de las cinco tribus de oscines de nueve primarias propuesta por Klicka *et al*, 2000. a Tribu Icterini, b Tribu Emberizini, c Tribu Parulini, d Tribu Traupini, e Tribu Cardinalini, f Subfamilia fringillinae, g Outgroups. El círculo rojo representa la tribu en la cual se clasifica a *Diglossa* y el verde al grupo hermano seleccionado *Piranga*.

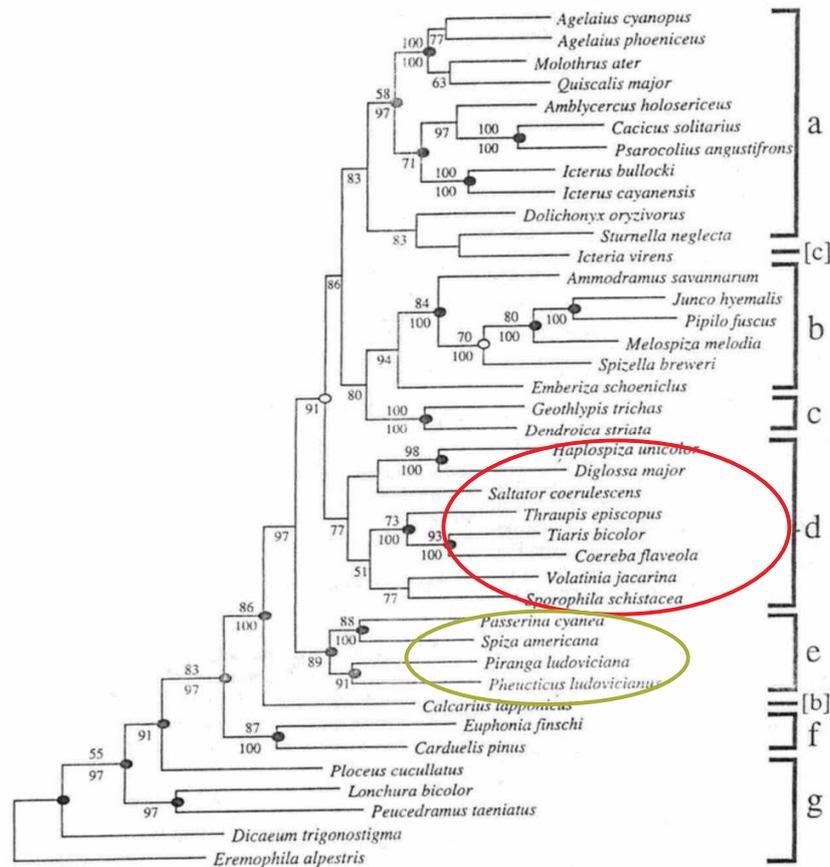


Figura 12. Derecha: *Piranga olivacea* macho Izquierda: *Piranga olivacea* hembra. Fuente www.sdakotabirds.com/species/scarlet_tanager_info.htm.



6.3.3 Análisis de composición de nucleótidos. La composición de bases para Citocromo b de las especies en estudio fue: timina 25.0%, citosina 34.1%, adenina 27.1%, guanina 13.8% y citocina-guanina 47.9%. Y para ND2: timina 27.7%, citosina 18.6%, adenina 25.8%, guanina 27.9% y citocina-guanina 46.5%. (Anexo K). La longitud de los fragmentos de los genes ND2 y citocromo b secuenciados se especifica en la tabla 6 y 7.

Tabla 6. Longitud de las secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo b.

Muestra	Nº de nucleótidos secuenciados	Fuente muestra
D.lafresnayiiG1	727	Galeras
D.lafresnayiiG5	730	Galeras
D.lafresnayiiG2	729	Galeras
D.humeralis6809	737	Instituto Humboldt
D.humeralisGB	527	GenBank
D.lafresnayiiGB	553	GenBank
<i>Piranga olivacea</i>	957	GenBank

Tabla 7. Longitud de las secuencias parciales del gen mitocondrial ND2.

Muestra	Nº de nucleótido secuenciados	Fuente muestra
D.lafresnayiiG1	412	Galeras
D.lafresnayiiG2	415	Galeras
D.lafresnayiiG3	412	Galeras
D.lafresnayiiG5	380	Galeras
D.lafresnayiiG6	374	Galeras
D.lafresnayiiG4	412	Galeras
D.humeralis2541	382	Instituto Humboldt
D.humeralis6809	418	Instituto Humboldt
D.humeralis1151	508	Instituto Humboldt
D.humeralis6812	415	Instituto Humboldt
Piranga olivácea	605	GenBank

6.3.4 Variación molecular entre genes. De 596 bases nucleotídicas en Citocromo b, 61 (10.235%) fueron variables o polimórficas y 535 (89.765%) conservadas y por lo tanto filogenéticamente informativas, y en ND2 de 394 bases nucleotídicas 112 (28.426%) fueron variables y 282 (71.574%) conservadas y por lo tanto filogenéticamente informativas (Tabla 14).

De las 112 bases nucleotídicas encontradas para el gen ND2, 60 corresponden a transiciones y 52 transversiones. Para el gen Citocromo b de las 61 bases nucleotídicas variables 37 son transiciones y 24 transversiones (Tabla 8).

Tabla 8. Transiciones y transversiones de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2

Citocromo b

Domain	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG	Total	Domain Info
1. Avg	535	37	24	1.5	128	15	1	2	15	182	6	2	4	5	151	4	1	3	3	74	595.7	Data
. 1st	168	21	10	2.2	24	9	1	1	8	70	3	1	1	2	59	3	0	1	2	14	198.1	1st Pos Data
. 2nd	183	8	8	1.0	37	3	0	1	4	60	2	1	1	2	49	0	1	0	1	37	198.5	2nd Pos Data
. 3rd	184	8	7	1.2	66	3	0	0	3	52	1	1	1	1	43	1	0	1	1	23	199.0	3rd Pos Data

ND2

Domain	ii	si	sv	R	TT	TC	TA	TG	CT	CC	CA	CG	AT	AC	AA	AG	GT	GC	GA	GG	Total	Domain Info
1. Avg	282	60	52	1.1	84	9	5	10	17	43	10	10	6	4	71	20	3	3	13	84	394.5	Data
. 1st	97	17	16	1.0	30	3	2	4	6	16	2	2	2	2	23	5	1	1	3	28	131.0	1st Pos Data
. 2nd	92	21	18	1.2	28	4	1	3	5	14	4	4	2	1	23	7	2	1	5	27	131.7	2nd Pos Data
. 3rd	93	21	17	1.2	26	3	2	4	6	13	4	4	2	1	25	8	0	1	5	29	131.8	3rd Pos Data

ii = Pares identicos

i = Transiciones

sv = Transversiones

R = si/sv Transiciones/ Transversiones

6.3.5 Análisis de Similitud

6.3.5.1 Análisis de mínima evolución. Para establecer la relación taxonómica entre los individuos capturados en Galeras y clasificados como *D. lafresnayii*, y los ejemplares de *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis* se utilizó el método de mínima evolución con 500 replicas para boopstrap, y p-distance para calcular las distancias genéticas entre las especies.

La topología resultante con los dos genes mitocondriales ND2 y Citocromo b (Figura 13 y 15) muestran dos clados importantes con un alto boopstrap (100%); uno de ellos donde se agrupa a los individuos de *Diglossa lafresnayii* y otro clado donde se agrupa a los individuos de *Diglossa humeralis humeralis*. Para confirmar esta topología se realizaron árboles filogenéticos transformando los nucleótidos a aminoácidos obteniendo resultados similares (Figuras 14 y 16).

Figura 13. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los nucleótidos del gen mitocondrial ND2. G: localidad galeras, #: código del individuo. 6812, 2541, 6809, 1151 muestras del IAvH.

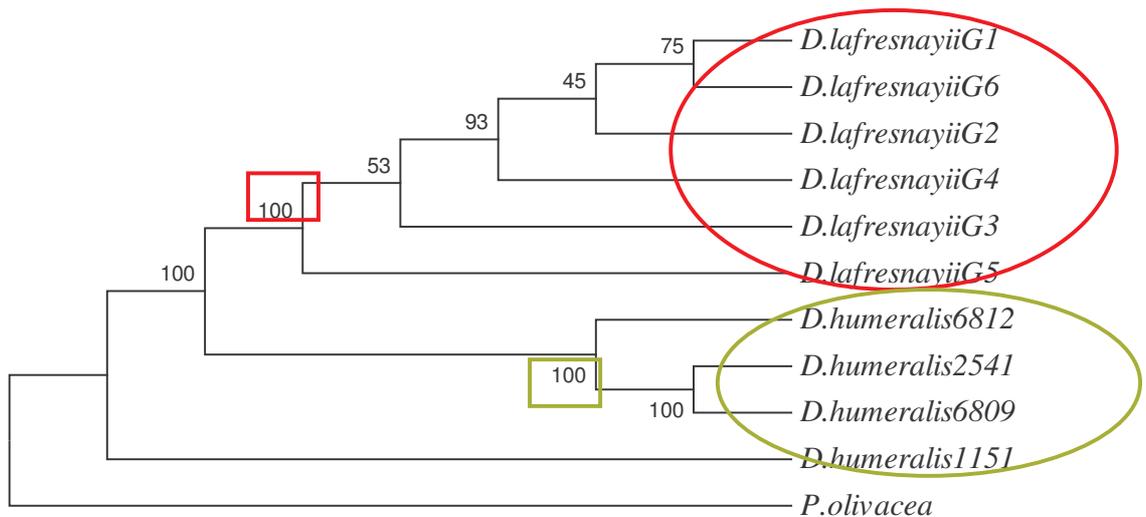


Figura 14. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los aminoácidos del gen mitocondrial ND2. G localidad galeras, # código del individuo. 6812, 2541, 6809, 1151 muestras del IAvH.

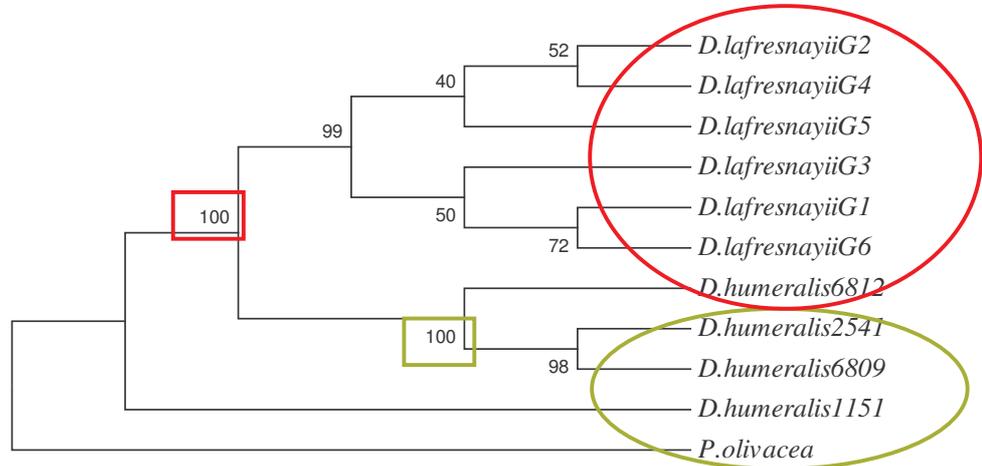


Figura 15. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los nucleótidos del gen mitocondrial Citocromo b. G localidad galeras, # código del individuo. 6809 muestra del IAvH; GB secuencias del GenBank.

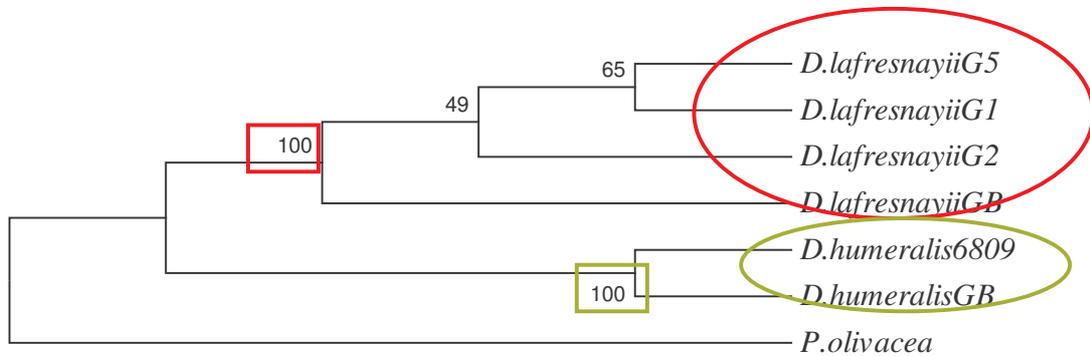
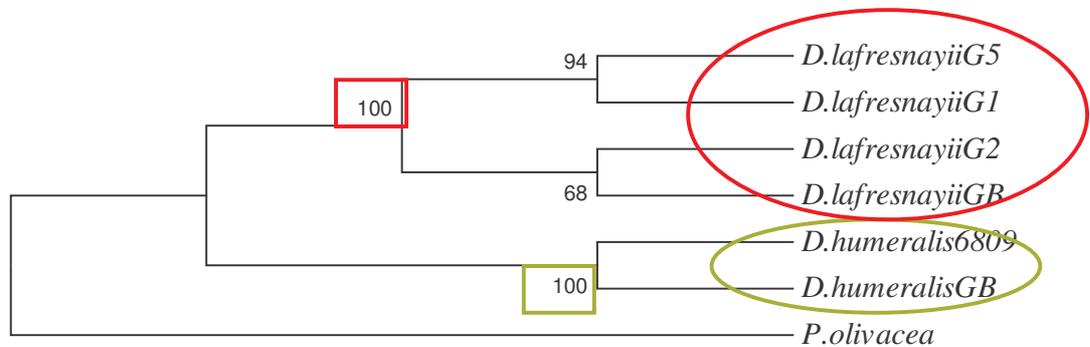


Figura 16. Topología de mínima evolución con valores de bootstrap a partir del análisis de los aminoácidos del gen mitocondrial Citocromo b. G localidad galeras, # código del individuo. 6812 muestra del IAvH; GB secuencias del GenBank.



6.3.5.2 Distancias genéticas. Debido a que el reloj molecular de genes mitocondriales ha sido calibrado teniendo en cuenta únicamente el gen mitocondrial Citocromo b (Weir & Schluter, 2008; Barker *et al*, 2004; Arbogast *et al*, 2002; Arbogast & Slowinski, 1998; Avise, 1994), se calcularon los promedios de las distancias genéticas de este gen para estimar la divergencia entre los dos taxones estudiados (Tabla 9, Anexo M). Asumiendo una tasa de divergencia de 2.1 % por millón de años para aves (Weir & Schluter, 2008), se puede estimar que *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis* comenzaron a divergir de un ancestro común hace 0.40 millones de años (40000 años).

Tabla 9. Distancias genéticas (promedios) entre los taxones estudiados obtenidas del análisis del gen mitocondrial Citocromo b.

Taxon	D. humeralis	D. lafresnayii	D. humeralis + D. lafresnayii
D. humeralis		0.006	
D. lafresnayii	0.011		
D. humeralis + D. lafresnayii			0.0085

6.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Los individuos capturados en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras fueron incluidos en la colección de aves del Museo de Historia Natural PSO-CZ de la Universidad de Nariño. Las medidas tomadas se presentan en el Anexo N, y el promedio, la desviación estándar y el tamaño de la muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Medidas en milímetros (promedio, desviación estándar y tamaño de muestra) de los individuos de las dos especies de *Diglossa*. El tamaño de la muestra se encuentra en paréntesis.

Medidas	<i>Diglossa lafresnayii</i>	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>
Culmen Total (CT)	13,54 ± 1,9 (18)	14,73 ± 0,63 (18)
Longitud del culmen expuesto (CE)	10,70 ± 1,36 (18)	11,35 ± 0,74 (18)
Ancho de la Comisura (ACO)	5,25 ± 1,29 (18)	5,54 ± 0,44 (18)
Alto del pico a nivel de la narina (ALN)	5,05 ± 0,42 (16)	4,8 ± 0,37 (18)
Ancho del pico a nivel de la narina (AN)	2,89 ± 0,26 (18)	2,86 ± 0,33 (18)
Longitud del tarso (T)	24,73 ± 2,13 (18)	20,06 ± 1,02 (18)
Longitud de la cuerda alar (CA)	70,74 ± 3,91 (18)	65,20 ± 3,93 (18)
Longitud de la cola (C)	61,16 ± 5,64 (18)	58,1 ± 4,09 (18)

Al aplicar la prueba de t a los datos que se ajustaron a una distribución normal y la prueba U de Mann Whitney a los que no, se encontró que existen diferencias significativas entre el culmen total, culmen expuesto, cuerda alar y tarso de las dos especies (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de la prueba de t y U de Mann Whitney de las medidas morfométricas.

Medidas morfométricas	p-Value
CT	0,00511*
CE	0,01484*
ACO	0,09052*
ALN	0,072738
AN	0,72333
T	3,61E-10
CA	0,00014387
C	0,061242

* Variables a las que se les aplico la prueba U de Mann Whitney.

Negrilla variables con diferencias significativas entre las dos especies utilizadas para el análisis discriminante.

6.4.1 Análisis de funciones discriminantes. Para encontrar que variables causan la mayor separación entre las dos especies de *Diglossa* se llevó a cabo un análisis multivariante discriminante (AD). Para este análisis se excluyeron las variables ACO, ALN, AN y C, las cuales no presentaron diferencias significativas en la prueba de t y U de Mann Whitney.

Este análisis mostró que la función derivada 1 tiene un valor P-value = 0.000, lo que significa que tiene un alto valor significativo para separar las dos especies de *Diglossa*, con un chi cuadrado de 38,485 (Tablas 12 a y b).

Tabla 12. a y b. Función derivada en el análisis discriminante para las especies *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis*.

a.

Función discriminante	Eigenvalue	Porcentaje relativo	Correlacion canónica
1	2,329	100,0	0,836

b.

Función derivada	Wilks' Lambda	Chi-Square	DF	P-value
1	0,300	38,485	4	0,000

La medida del tarso presentó el mayor peso en la separación de *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis* con respecto a las otras variables restantes según los coeficientes estandarizados (Tabla 13).

Tabla 13. Coeficientes estandarizados para la primera función derivada.

Variable	Función 1
CT	0,040
CE	-0,103
CA	0,202
T	0,913

Según el análisis discriminante, dos de los individuos clasificados dentro de la especie *Diglossa lafresnayii* deberían estar clasificados dentro del grupo de *Diglossa humeralis humeralis*, por lo tanto el 94.4% de los individuos estudiados están correctamente clasificados (Tabla 14).

Tabla 14. Evaluación de la clasificación de los individuos de *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis* según el análisis discriminante.

Especie	<i>Diglossa lafresnayii</i>	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	Total
<i>Diglossa lafresnayii</i>	16	2	18
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	0	18	18
<i>Diglossa lafresnayii</i>	88.9	11.1	100.0
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	.0	100.0	100.0

6.4.2 Registro fotográfico. Al analizar la coloración del plumaje de *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis* de los especímenes de la colección ornitológica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional ICN (Figura 17) y del Instituto Alexander Von Humboldt (Figura 18), se encontró que *D. lafresnayii* presenta una coloración negro café con hombros gris azulado, en comparación con *D. humeralis humeralis* que presenta una coloración negra opaca y pequeño parche gris azul en el hombro. Al comparar la coloración de estos ejemplares con la de los individuos capturados en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras (Figura 19) se encontró, que la coloración del plumaje de estos últimos corresponde a *D. humeralis humeralis*.

Figura 17. Especímenes de la colección ornitológica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional (ICN). Arriba *D. humeralis humeralis* con una coloración negra opaca y parche gris azul en el hombro, abajo *D. lafresnayii* con coloración negro café con hombro gris azulado.



Figura 18. Especímenes de la colección ornitológica del Instituto Alexander Von Humboldt. Arriba *D. lafresnayii*, abajo *D. humeralis humeralis*.



Figura 19. Izquierda: *Diglossa lafresnayii*, alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras, coloración negra café y parche gris azul en el hombro. Fuente este estudio Derecha: *Diglossa humeralis humeralis*, Sabana de Bogotá veredas Torca y Yerbabuena, coloración negra opaca con parche gris azul en el hombro. Fuente Rojas 2007.



7. DISCUSION

7.1 EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE, PLUMAS Y TEJIDO

El método Salting Out modificado Universidad Nacional de Colombia sede Palmira fue utilizado exitosamente para la extracción de ADN a partir de sangre, debido a que éste protocolo fue optimizado para el trabajo específico con aves. Sin embargo para las muestras de plumas y tejido con los dos métodos probados no se obtuvo ADN debido probablemente a la dureza de los tejidos, que impidió la lisis celular, puesto que en ninguno de los protocolos se macera para romper las membranas celulares, paso importante para la obtención de ADN teniendo en cuenta el alto contenido de queratina de las células de las plumas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Otro factor que pudo influir en el resultado es la baja cantidad de ADN contenida en la muestra ya que cada cañón contiene pocos nanogramos de pulpa celular (Taberlet & Bouvet, 1991; Tarberlet & Luikart, 1999). Es por estas razones se decidió combinar los dos protocolos y aumentar un primer paso en el que se realizó una maceración mecánica de la muestra con mortero.

En el protocolo combinado se utilizó el primer paso del protocolo de Bello puesto que a diferencia de el De Las Casas, que solo utiliza CTAB (Bromuro de cetil-trimetil-amonio), detergente catiónico fácilmente removible por dilución que permite la solubilización de compuestos de tipo polisacárido y que cuyo pH impide el pH óptimo de enzimas degradativas, utiliza un buffer de lisis que contiene Tris-HCL, que mantiene estable el pH de la solución; EDTA, que protege el ADN de la acción de enzimas nucleasas; SDS, que solubiliza proteínas, tejidos y membranas, evitando que una cantidad significativa de ADN quede atrapada en los desechos o restos celulares; y proteinasa K, que degrada proteínas. Lo cual puede mejorar la eficiencia de la reacción (Torres, 2005). Y se continuó con el protocolo de De Las Casas debido a que este, a pesar de presentar los mismos principios básicos de extracción de ADN que el protocolo de Bello, especifica las concentraciones y cantidades de los reactivos en cada paso.

7.2 OPTIMIZACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA ND2 Y CITOCROMO B

La desnaturalización para ambos genes se hizo a 94°C durante un minuto 30 segundos para garantizar la apertura adecuada de la cadena molde. Es importante tener en cuenta que la temperatura de fusión o alineamiento (T_m) depende de varios factores como la longitud y secuencia de los iniciadores y es específica para cada primer, por lo tanto cada cebador exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de hibridación específica ya que si ésta es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa (Velasco, 2004). Esta etapa se realizó a 56°C para el caso de Citocromo b y a 60°C para ND2. La amplificación de la secuencia específica se realizó a 72°C que es la temperatura óptima de trabajo de la taq polimerasa.

Además de las tres etapas de cada ciclo comúnmente se añade una etapa previa y una final al conjunto de todos los ciclos. La previa, programada a 94°C, sirve básicamente para inactivar proteasas y nucleasas de la muestra, así como para asegurar la desnaturalización completa del ADN de partida, especialmente si este es de gran tamaño, como el caso del Citocromo b, o posee regiones muy compactadas. La etapa final, por su parte, consiste en una prolongación de la última elongación, para permitir que se completen todos los fragmentos, que en el caso de los dos genes fue de 72°C.

Se programaron 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y replicación para conseguir una enorme amplificación del número de moléculas que contenía cada una de las secuencias de los genes estudiados, se consideró este amplio número de ciclos de manera especial para Citocromo b puesto que es un segmento de gran tamaño. Generalmente el número de ciclos varía entre 20 y 40 de 1.5 a 5 minutos de duración cada uno (Luque & Herráez, 2001).

En cuanto a la mezcla patrón o stock, no se realizó ninguna modificación debido a que los componentes y su concentración final se encuentran dentro de los parámetros adecuados para obtener una amplificación positiva: el buffer (concentración final 1X) mantiene la mezcla patrón en el pH apropiado para que la reacción de la PCR tenga lugar, los desoxinucleótidos dNTPs (concentración final 200mM) proporcionan tanto la energía como los nucleosidos para la síntesis del ADN, los iniciadores (concentración final 0.2 - 1 mM) fragmentos cortos de ADN (20 – 30 bases) que se ligan al molde de ADN permitiéndole a la enzima Taq ADN polimerasa iniciar la incorporación de desoxinucleótidos, la Taq polimerasa (concentración final 2.5 U / 100ml) es una enzima estable al calor que agrega desoxinucleótidos al ADN molde y ADN molde (concentración final 0.05 – 1mg) que será amplificado por la PCR (Velasco, 2004).

7.3 ANÁLISIS MOLECULAR

Para este estudio se eligió trabajar con ADN mitocondrial porque éste, además de ser uno de los más usados en estudios de sistemática molecular en aves, posee una serie de características que le dan ventajas sobre el ADN nuclear; dentro de las que se destacan:

- a. La evolución conservativa en cuanto al orden de los genes principalmente los que codifican para proteínas; se conserva en gran manera la estructura de aminoácidos de sus genes y no se presentan inserciones o deleciones en estos.
- b. Una tasa de sustitución silenciosa suficiente para incrementar la posibilidad de que la molécula pueda contener sinapomorfias que revelen ancestros comunes.
- c. Tiene una tasa rápida de sustitución que lo hace muy útil para estudios de sistemática a nivel de género y especie (Avice, 1994).

Citocromo b y ND2 son dos de las regiones más conservadas del ADN mitocondrial esto se evidencia con los datos de la tabla 8 donde se puede apreciar que el 89.765% de las bases del citocromo b son conservadas y por lo tanto filogenéticamente informativas; esto se explica teniendo en cuenta que el citocromo b participa en la cadena de transferencia de electrones, es uno de las 9-10 proteínas que se combinan para formar el complejo III del

sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial, este complejo transfiere electrones desde la dihydroubiquinona hasta el citocromo c, el cual esta acoplado con la translocación de proteínas a través del interior de la membrana mitocondrial (Murray *et. al*, 1994). Para el caso de ND2, el 71.574% de las bases fueron conservadas esto esta asociado al hecho de que ND2 es una de las coenzimas más importantes en la célula puesto que participa en reacciones de oxido-reducción como la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico en la respiración celular; numerosos sustratos oxidables de distinta naturaleza (piruvato, malato, isocitrato, glutamato, etc.) son deshidrogenados en la matriz mitocondrial en reacciones catalizadas por enzimas específicas (deshidrogenasas) cuya coenzima es un nucleótido de nicotinamida que en su estado reducido se encuentra unido a un hidrógeno y a un electrón, el NAD reducido en la matriz mitocondrial cede hidrógenos a la cadena respiratoria con la finalidad de producir energía (Blanco, 2006; Murray *et al*, 2004).

En este trabajo se encontró que el gen Citocromo b presenta una tasa de transiciones/transversiones de 1.5 y el gen ND2 de 1.1, lo que coincide con el hecho de que las transiciones ocurren más frecuentemente que las transversiones, a pesar que en la teoría si las sustituciones nucleotídicas ocurrieran al azar para los cuatro nucleótidos se esperaría que el número de transversiones fuera mayor que el número de transiciones, como hay cuatro nucleótidos en cada secuencia A, T, C y G se pueden formar 16 tipos diferentes de pares de nucleótidos, cuatro de los cuales son nucleótidos idénticos (AA, TT, CC y GG), cuatro transiciones (AG, GA, TC y CT) y ocho transversiones. (Nei & Kumar, 2000).

Al analizar la tasa de transiciones/transversiones en cada posición del codón (Tabla 13) se puede observar que para Citocromo b es más alta en la primera posición con un valor de 2.2 y para ND2 en la tercera con 1.2, lo que indica que el gen ND2 es más conservado que el gen citocromo b. Investigaciones sugieren que cambios en la tercera posición del codón (particularmente transiciones) ocurren más frecuentemente que cambios en la primera y segunda posición, debido a que estos son mutaciones silenciosas caracterizadas porque a pesar de haber un cambio en la secuencia del ADN, no se altera la secuencia de su producto proteico; en otras palabras el nuevo triplete es sinónimo del original y, por lo tanto, codifica el mismo aminoácido (Luque & Herraes, 2001); mientras que los cambios en la primera y segunda posición producen cambios en la composición de aminoácidos y por lo tanto de la proteína. (Hackett, 1996).

Para realizar las topologías de similitud se utilizó el método de mínima evolución, el cual es más apropiado que el método del vecino más cercano cuando se trabaja un número de secuencias pequeño y cuando se están comparando especies muy cercanas filogenéticamente como es el caso de las especies analizadas en este estudio (Nei & Kumar, 2000). Esta selección se valida gracias a que se obtuvo una topología similar con los dos genes mitocondriales ND2 y Citocromo b (Figuras 13 y 15), en la cual se observan dos clados importantes uno de ellos donde agrupa a los individuos de *Diglossa lafresnayii* y otro, donde se agrupa a los individuos de *Diglossa humeralis humeralis*. A pesar de la estrecha relación entre las especies en estudio se observa variabilidad genética dentro de cada clado, en las figuras 13, 14, 15 y 16.

Los resultados corroboran que los individuos capturados en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras corresponden a *Diglossa lafresnayii* y no a *Diglossa humeralis humeralis* como se creía, lo cual coincide con los resultados morfológicos obtenidos en este trabajo y confirma la distribución actual de *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis*, según la cual *D. humeralis humeralis* no se encuentra en la zona de Galeras; *D. lafresnayii*, como se menciona en el marco teórico, se encuentra entre 2000 y 3700m, usualmente a más de 2700m, en el sur de la Cordillera Oriental hasta Bogotá, en la Cordillera Central desde el sureste de Antioquia, Caldas y Tolima y en el sur por las montañas de Nariño y *D. humeralis humeralis* se encuentra en la Cordillera Oriental desde Norte de Santander hasta Bogotá (Hilty & Brown, 2001).

Al analizar la distribución actual de este género en Colombia y, teniendo en cuenta que la diversidad de la avifauna colombiana es el resultado de diferentes factores que incluyen la posición geográfica del país, su compleja topografía, la diversidad de hábitats y la confluencia de elementos con diferentes afinidades biogeográficas (Instituto Humboldt, 1997) se podría decir que ésta distribución se debe probablemente a procesos de especiación, dispersión y vicarianza que ocurrieron durante la orogénesis de los Andes (Castellanos, 2006). La hipótesis que plantea Graves en 1982 es que se produjo un aislamiento reproductivo por una barrera física geográfica, en este caso los Andes, lo que originó procesos de especiación y las aves del género *Diglossa* se relacionaron con su ambiente de modos nuevos lo que permitió que se expandieran rápidamente y se irradiaran en nuevas direcciones, incluso produciéndose modificaciones evolutivas adicionales en el proceso de adaptarse al nuevo ambiente desafiante, así la mayor diversidad ocurrió en los Andes desde Colombia hasta el sur de Bolivia, donde en la actualidad se encuentran hasta siete especies de este género en un gradiente altitudinal relativamente amplio.

Sin embargo al analizar la distancia genética calculada en este trabajo, según la cual *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis* divergieron hace 40000 años, tiempo en el que los Andes ya estaban formados completamente, y teniendo en cuenta que esta especie y subespecie son aves de alta montaña, se podría afirmar que los factores que tuvieron más influencia en esta separación fueron los cambios climáticos asociados a las características biológicas y factores ecológicos propios de las especies. Hace 40000 años Colombia pasaba por la última glaciación, la cual comenzó 116000 años atrás y alcanzó la máxima extensión del hielo poco antes de los 350000 años (Van der Hammen, 1985; Flores, 1992), favoreciendo la evolución de nuevas especies y subespecies (Toussaint, 1993).

Los periodos de glaciación e interglaciación en Colombia, se relacionan básicamente con los cambios climáticos, principalmente de temperatura y humedad, que tuvieron efectos directos en los diversos elementos de los geosistemas: extensión y composición de la vegetación y la fauna, nivel del mar, de lagos y lagunas, concentración de CO₂ etc., por ejemplo, desde el comienzo del último glacial, en el altiplano cundi-boyacense, lugar donde *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis* son simpátricas, y en alturas similares de los Andes, la vegetación herbácea y rala de los páramos fue reemplazando paulatinamente al bosque andino y alto-andino que a su vez migró hacia altitudes inferiores, y por lo que se conoce sobre la extensión de los glaciares, se infiere que las áreas arriba de los 2800 m

estaban desprovistas de vegetación durante la glaciación (Florez, 1992; Florez, 2003), cambios que tuvieron que afrontar esta especie y subespecie y que se encuentran estrechamente relacionados con su distribución actual. Lo que concuerda con lo planteado por Vuilleumier en 1969 quien afirma que en el género *Diglossa* ha ocurrido especiación alopátrica y simpátrica, durante el periodo de máxima glaciación el clima en los Andes fue generalmente húmedo, el gradiente de temperatura en montaña decreció y el cinturón de vegetación, especialmente el superior, fue bajando y, subió durante las interglaciaciones, lo que originó fluctuaciones verticales que podrían haber permitido que los bosques montañosos altos y las islas de arbustos (hábitat de *Diglossa*) formaran bandas continuas a lo largo de las montañas de Centro América y de los Andes durante los episodios glaciales. En otras palabras las barreras que impedían el flujo de genes, podrían haberse estrechado durante la glaciación hasta que la dispersión a través de ellas habría sido fácil.

Vuilleumier (1979, 1986) también afirma que la historia geográfica y evolutiva de las especies de aves de alta montaña, como es el caso de *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis*, puede ser explicada por efectos a corto plazo (competencia), como se mencionó anteriormente, ocurre en la sabana de Bogota donde la abundancia de *D. lafresnayii* disminuye notablemente cuando *D. humeralis* es más abundante (Rojas, 2007); mediano plazo (insularidad), periodos glaciares e interglaciares que afectaron la distribución de esta especie y subespecie; y largo plazo (especiación).

Otra de las razones por las cuales *D. humeralis humeralis* probablemente no se encuentra en Nariño es por la fluctuación que sufrieron los hábitats en tamaño durante los ciclos glaciales, lo que concuerda con encontrado por Graves en 1982, quien afirma que estas fluctuaciones llevaron aparentemente a la extinción de formas negras y rufas de carbonaria en el departamento del Cauca y Antioquia. Un ejemplo claro de esta situación se presenta en el sur de Bogota donde varias brechas previenen hoy el contacto entre *D. humeralis humeralis* y *D. humeralis aterrima* a lo largo de la cordillera oriental, como por ejemplo el valle del Rio Magdalena que tiene altura por debajo de la zona de temperatura en la que viven estas aves (Zimmer 1929).

La actual distribución de esta especie y subespecie puede estar asociada al hecho que *D. lafresnayii* presenta mayor plasticidad ecológica (entendida como la capacidad de colonizar nuevos hábitats) que *D. humeralis humeralis* y logró una “mejor adaptación” a las condiciones ambientales locales de Galeras. En otras palabras, hay una combinación de factores que explican la ausencia de la subespecie *Diglossa humeralis humeralis* en Galeras: los parches de hábitat que impiden un continuo desplazamiento de las especies, las barreras geográficas que impiden la colonización de nuevos hábitat y la estreches de zonas arbustivas que los enlace, los cambios climáticos, los procesos de adaptación a nuevos ambientes entre otros (Vuilleumier, 1986)

7.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Las diferencias interespecíficas en tamaño y proporción dentro de *Diglossa* no se encuentran bien definidas, ambos varían geográficamente en el amplio rango de distribución del género y deben ser usados en conexión con otros caracteres taxonómicos (Vuilleumier, 1969). El análisis morfológico de las especies muestra que solo cuatro de las ocho variables estudiadas pueden ser utilizadas para diferenciar *D. lafresnayii* de *D. humeralis humeralis*, mientras que las variables restantes no son suficientes para considerar a los individuos estudiados como especies diferentes. La variable de mayor peso, según el análisis de funciones discriminantes, para la separación de la especie y subespecie, es el tarso seguido de las medidas del culmen total, culmen expuesto y la cuerda alar. Estas estructuras morfológicas se encuentran estrechamente relacionadas con los hábitos alimenticios y las estrategias de forrajeo del ave, y permiten a las especies utilizar diferentes segmentos del espectro de recursos disponibles, lo cual interviene en la segregación del subnicho trófico (Acosta *et. al.*, 2003). Las adaptaciones para la alimentación son una característica importante en la evolución de las aves, el pico es la adaptación clave para alimentarse, por lo que el tamaño, la forma y la fortaleza de él afecta su dieta; más aún, ligeras variaciones en las dimensiones del pico pueden influenciar la tasa de ingestión de alimento. Sin embargo, los picos de las aves, al igual que otras estructuras importantes para el forrajeo, como el tipo y la longitud de las patas, pueden ser empleados en diferentes tipos de hábitat y explotar diferentes recursos (Colorado 2004; Barbosa 1994).

En cuanto a las características del pico, las diglossas poseen una morfología especial que les permite perforar flores de corolas tubulares para extraer el néctar, por lo cual son consideradas robadoras de néctar altamente especializadas. La maxila termina en un gancho con el que el ave sujeta la flor mientras hace un agujero en la corola con la puntiaguda mandíbula a través de la cual mete la lengua para extraer el néctar (Figura 20). La evolución de este grupo de aves parece ir acompañada por una tendencia morfológica hacia el alargamiento del gancho maxilar, que ha favorecido la eficiencia en la extracción del néctar a través de perforaciones, pero que a su vez ha disminuido su capacidad de manipular y consumir frutos, constituyendo un fenómeno de compensación evolutivo (Stiles, *et. al.* 1992).

Figura 20. a) *Diglossa humeralis* robando néctar de una flor de *Cavendishia bracteata*. Fuente Rojas 2007. b) *Macleania rupestres* perforada por *Diglossa*. Fuente Montenegro *et al.* 2005

a.

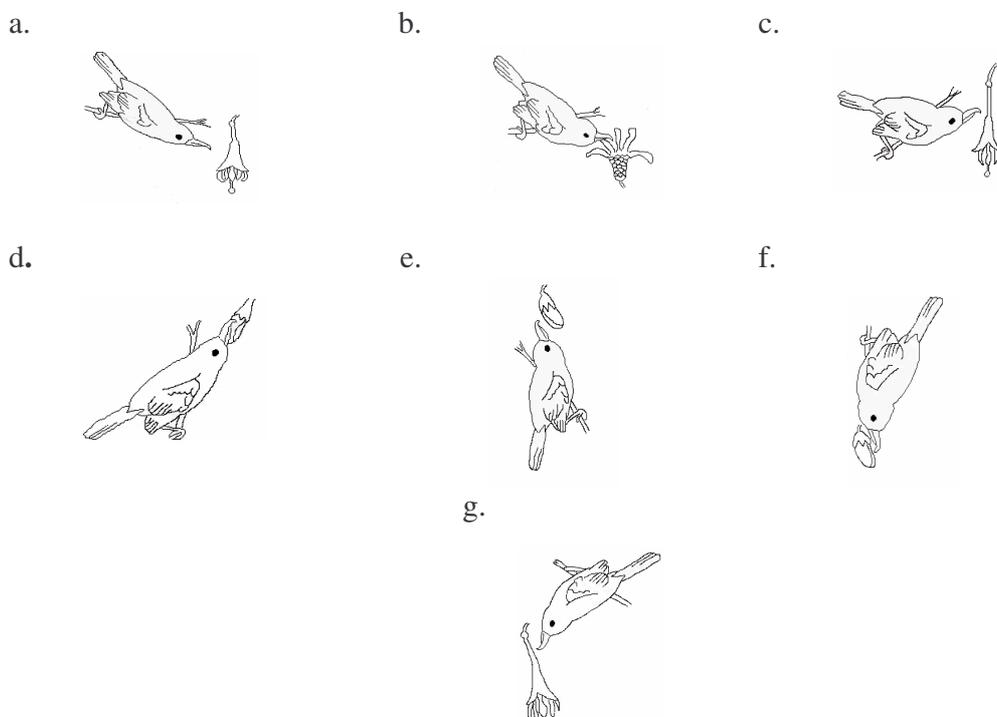


b.



En un estudio realizado por Montenegro *et al.* en el 2005 acerca de los hábitos alimenticios de *Diglossa humeralis*, *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa cyanea*, se encontró que el tarso cumple un papel fundamental en las estrategias de forrajeo de éstas especies puesto que es el sostén para acceder a las diferentes especies florales (Figura 21).

Figura 21. Estrategias de forrajeo de las tres especies de *Diglossa*: a. Perchado horizontal, cuerpo diagonal hacia abajo, en dirección a la flor, b. Perchado y cuerpo horizontal en dirección a la flor, c. Perchado horizontal, cuerpo ligeramente diagonal hacia arriba, d. Perchado vertical, cuerpo diagonal hacia arriba, e. Perchado y cuerpo vertical hacia abajo, f. Perchado y cuerpo vertical hacia arriba, g. Perchado diagonal y cuerpo diagonal en dirección a la flor.



Los taxa alopátricos de las tres superespecies de diglossa: la superespecie *baritula* (*baritula*, *plumbea* y *sittoides*), superespecie *lafresnayii* (*lafresnayii*, *gloriosissima* y *misticalis*) y superespecie *carbonaria* (*gloriosa*, *humeralis* y *carbonaria*) difieren conspicuamente en los patrones de coloración. Con menos diferencias las tres superespecies tienen poblaciones negras y gris oscuro. Estos patrones de coloración muestran claramente que dentro de cada una de las tres superespecies las poblaciones diferenciadas están cercanamente relacionadas. Si todas estas poblaciones fueran completamente alopátricas sería imposible saber si el grado de diferenciación morfológica refleja el aislamiento reproductivo (Vuilleumier, 1969). Al analizar la coloración del plumaje de las especies se

estableció la dificultad para diferenciarlas, especialmente en campo, basándose únicamente en los patrones de coloración, por lo tanto es necesaria la utilización de otros caracteres morfológicos y si es posible de caracteres moleculares que permitan una correcta identificación de estas especies.

Un problema con el uso de los caracteres del plumaje para diferenciar algunas especies de aves es que los complejos mecanismos y múltiples fuentes responsables del color del plumaje dificultan la identificación y codificación de caracteres homólogos, además se sabe muy poco acerca de cómo se produce el color de las plumas y los patrones de coloración. El color puede ser una base estructural o puede venir de una variedad de pigmentos, especialmente melaninas y carotenoides que las aves obtienen de su dieta. En estudios del patrón de coloración del plumaje de algunas aves se ha encontrado que colores que parecen idénticos pueden provenir de fuentes completamente diferentes por lo tanto el color del plumaje, especialmente si se desconocen sus bases químicas es menos usado que otros caracteres para el análisis filogenético (Burns, 1998).

Moynihan en 1968 afirma que los comportamientos de eludir y de lucha pueden ser entendidos como parte de las interacciones comportamentales, las cuales están correlacionadas con varios grados de semejanza morfológica y el los incluye dentro del termino de mimetismo social. Si esto fuera verdad la evolución de los patrones similares del plumaje en las superespecies *lafresnayii* - carbonaria en la parte de los andes donde son simpátricas podría deberse a la presión de selección asociada con el forrajeo (Vuilleumier, 1969).

Es importante tener en cuenta que además de los agentes históricos responsables de la fauna regional, las características biológicas y factores ecológicos propios de las especies juegan un papel determinante en su presencia actual en una localidad. Por lo tanto, el número de especies que coexisten en un hábitat está determinado por factores históricos y ecológicos: los eventos históricos de especiación y cruce de barreras geográficas determinan la colonización potencial de las especies a un determinado lugar; y los requerimientos ecológicos de esas especies y sus interacciones con otras, determina cuales de los posibles colonizadores pueden coexistir. Según el modelo de Lotka y Volterra las especies que experimentan mayores presiones competitivas podrían exhibir bajas abundancias. Este postulado aportó las bases teóricas que condujeron a explicar el fenómeno de compensación de la densidad, que consiste en que las especies que son morfológicamente más diferentes de las otras experimentan bajas presiones competitivas y por lo tanto presentan mayores abundancias poblacionales en la comunidad. Por lo tanto existe una relación positiva entre la abundancia y la distancia morfológica de una especie con respecto a sus competidores potenciales (Rojas 2007).

Teniendo en cuenta este modelo y analizando la distribución actual de *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis* se podría decir que una de las razones por las cuales *D. humeralis humeralis* no se encuentra en Nariño es por su semejanza morfológica con *D. lafresnayii* que se traduce en alta presión competitiva. Sin embargo, al observar el mapa de distribución de esta especie y subespecie (Figura 2) se puede ver como se encuentran en

simpatria en la sabana de Bogotá, entonces ¿Qué está ocurriendo? ¿Por qué no pasa lo mismo en Galeras? En el estudio realizado por Rojas en el 2007, en las veredas de Torca y Hierbabuena (Sabana de Bogotá), se encontró que *D. lafresnayii* y *D. humeralis* presentaron importantes diferencias en el número de individuos registrados a lo largo de un año, pero además que sus periodos de máxima abundancia sucedieron en épocas muy diferentes, de manera que cuando *D. humeralis* fue más abundante *D. lafresnayii* no fue registrada en el área de estudio, abundancia relacionada estrechamente con la época de floración de las plantas que son suministro de alimento de estas especies. Entonces se podría decir que en esta zona se encuentran las dos especies porque la abundancia de recursos alimenticios (72 plantas ornitófilas) les permite disminuir la presión competitiva; lo que no ocurre en Galeras, en donde en el estudio de Montenegro *et al.* en el 2005 se registraron solamente diez especies de plantas potencialmente ornitófilas (*Barnadesia spinosa*, *Fuchsia dependens*, *Fuchsia corollata*, *Macleania rupestris*, *Brachyotum ledifolium*, *Brachyotum lindenii*, *Siphocampylus giganteus*, *Pasiflora mollissima*, *Bomarea multiflora*, *Berberis grandiflora*) suministro de alimento de *D. lafresnayii*, lo que probablemente ha originado que *D. lafresnayii* esté ejerciendo una mayor presión competitiva sobre *D. humeralis humeralis* en esta zona; además si se asume que la habilidad para detectar, atrapar y procesar los alimentos depende ampliamente de la morfología de los organismos, los recursos que consumen individuos morfológicamente similares tienden a ser similares, entonces si esta subespecie y especie fueran simpátricas en el área de Galeras la competencia por el recurso sería grande y una de las dos desplazaría a la otra.

La diversidad de especies y la distribución de una biota reflejan la historia de unas posibles respuestas evolutivas a cambios de hábitat producidos por la actividad geológica. Las secuencias de ADN de un taxón pueden ser usadas para inferir la especiación y la biogeografía histórica y ecológica del mismo o para determinar si los patrones de distribución son debidos a procesos de vicarianza o dispersión (Duarte, 1998). Por esta razón, las técnicas de biología molecular, particularmente la comparación de secuencias genómicas, han facilitado en los últimos años la discriminación de especies dentro de un mismo género o incluso de razas dentro de una misma especie, ya que las diferencias moleculares no se corresponden, en la mayoría de los casos, con diferencias morfológicas, lo que hace necesario el desarrollo de pruebas de identificación genómicas (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Sin embargo, al comparar los resultados morfológicos y moleculares obtenidos en este trabajo, se puede apreciar como con los dos se obtienen resultados similares en cuanto a la diferenciación de los individuos de *D. lafresnayii* y *D. humeralis humeralis*, lo que concuerda con lo propuesto por Tuinen en el 2002 y por Scotland *et al.* en el 2003 quienes afirman que se debería esperar que los caracteres moleculares y morfológicos reflejen la misma historia evolutiva, lo cual generalmente está basado en el concepto de que la genética está detrás de la diversidad morfológica vista en la naturaleza. Por esta razón los ornitólogos usan ambos tipos de datos, algunas veces combinados, para la reconstrucción de la historia evolutiva de las aves modernas.

8. CONCLUSIONES

- Según los resultados moleculares y morfológicos, los individuos capturados en los alrededores del Santuario de Flora y Fauna Galeras corresponden a *Diglossa lafresnayii* y no a *Diglossa humeralis humeralis*, confirmándose así la distribución actual de esta especie y subespecie.
- Las medidas morfométricas del culmen total, culmen expuesto, tarso y cuerda alar son las más apropiadas para diferenciar en campo a *Diglossa lafresnayii* de *Diglossa humeralis humeralis*, siendo el tarso la medida con mayor peso.
- Los datos moleculares respaldan la hipótesis planteada en este trabajo en donde la distribución actual de *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis* se debe a los cambios climáticos asociados a las características biológicas y factores ecológicos propios de las especies.
- Teniendo en cuenta la distancia genética entre *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa humeralis humeralis*, calculada con base en el gen mitocondrial citocromo b, la morfología similar entre esta especie y subespecie probablemente se debe a su reciente radiación adaptativa (0.40 millones de años), la cual no permitió una marcada diferenciación morfológica.
- Los datos morfológicos y moleculares se complementan dando una visión holística de la historia ecológica- evolutiva de las especies.

9. RECOMENDACIONES

- Este es el primer estudio en sistemática molecular y biogeografía de aves en el departamento de Nariño y por lo tanto puede servir como base para abrir una nueva línea de investigación en estas áreas en la Universidad de Nariño y continuar así con los estudios a nivel molecular de las especies de aves silvestres en el Departamento.
- Caracterizar molecularmente las especies del género *Diglossa* presentes en el departamento de Nariño utilizando las técnicas para extracción y amplificación de ADN optimizadas en este trabajo.
- Ampliar el estudio de distribución geográfica del género *Diglossa* en el Departamento de Nariño utilizando caracteres morfológicos y moleculares.
- Secuenciar los genes completos citocromo b y ND2 de las especies del género *Diglossa* presentes en Colombia con el fin de plantear una hipótesis sobre su historia evolutiva y explicar su distribución geográfica en Colombia.

BIBLIOGRAFIA

- ACOSTA Martin, LOPEZ DE LA C. Anyeli y MUGICA Lourdes. 2003. Relación entre la Morfología del Pico y la Segregación trófica de las especies en la comunidad de aves Acuáticas de Agroecosistema Arrocerero. Universidad de la Habana. Revista Biología. Vol. 17, No. 1.
- ARBOGAST Brian, SCOTT Edwards, WAKELEY John, BEERLI Peter, SLOWINSKI Joseph. 2002. Estimating Divergence Times From Molecular Data on Phylogenetic and Population Genetic Timescales. *Annu. Rev. Ecol. Syst* 33. p. 707–40.
- ARBOGAST Brian & SLOWINSKI Joseph. 1998. Pleistocene Speciation and the Mitochondrial ADN Clock. *Science* Vol. 282. p. 1955a.
- ASOCIACIÓN BOGOTANA DE ORNITOLOGÍA. 2000. Aves de la Sabana de Bogotá, Guía de Campo. Bogotá.
- ATTWOOD Teresa y PARRY-SMITH David. 2002. Introducción a la bioinformática. Pearson Educación, S. A., Madrid.
- AVISE, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Editorial Sinauer Associates, Inc. Segunda edición. *Journal. Zool.* 41. p. 621–638.
- BAENA, Andres. 1999. Determinación de las relaciones filogenéticas entre los géneros *Basileuterus* (Parulidae) y *Hemispingus* (Thraupidae): evidencia de ADN mitocondrial Citocromo b. Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Bogotá D.C.
- BARBOSA Andres. 1994 Estudio ecomorfológico de las aves limícolas (Aves: Charadrii): modificaciones adaptativas relacionadas con la búsqueda del alimento. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. p. 1-166.
- BARDELEBEN Carolyne y GRAY Melissa. 2005. Isolation of Polymorphic Tetranucleotide Microsatellite Markers for the Masked Flowerpiercer *Diglossa cyanea*. *Molecular Ecology Notes*. Universidad de California. Los Angeles.
- BARKER Keith, CIBOIS Alice, SCHIKLER Peter, FEINSTEIN Julie, CRACRAFT Joel. 2004. Phylogeny and diversification of the largest avian radiation. *PNAS* Vol. 101, No. 30. p. 11040–11045.
- BLANCO Antonio. 2006. Bioquímica Biológica. Editorial El Ateneo. Octava edición. Buenos Aires, Argentina. p. 145–167.

- BELLO Natalia, FRANCINO Olga y SANCHEZ Armand. 2000. Isolation of Genomic AND from feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. España. p. 32–35.
- BURNS Kevin. 1998. Molecular Phylogenetics of the Genus *Piranga*: Implications for Biogeography and the Evolution of Morphology and Behavior. *The Auk* 115(3) p. 621–634.
- BURNS Kevin & NAOKI, Kazuya. 2004. Molecular Phylogenetics and Biogeography of Neotropical Tanagers in the Genus *Tangara*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
- CASTELLANO Morales César Augusto y CHAMARRAVI Guerra Nydia. 2006. Colombia: Estación Biogeográfica en el Origen de su Diversidad Biótica. Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander.
- COLORADO Gabriel. 2004. Relación de la morfometría de aves con gremios alimenticios. *Boletín Sociedad Antioqueña de Ornitología*. Vol. XIV No 26 & 27. p. 25- 32
- DE LAS CASAS Juan. 2004. Evaluación del Estado Taxonómico del Semillero de Tumaco *Sporophila insulata* (Fringilidae: Embericidae) Utilizando Métodos Morfológicos y Genéticos. Tesis de Pregrado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. p. 1–47.
- DEN ELZEN R. Van, GUILLEN J., DEL VALLE V. Ruiz, ALLENDE L. M., LOWY E., ZAMORA J. y VILLENA A. Arnaiz. 2001. Both Morphological and Molecular Characters Support Speciation of South American Siskins by Sexual Selection. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58. p. 2117-2128.
- DUARTE Jesús. 2005. La Biología Molecular como herramienta de investigación en Biogeografía y Biología de la Conservación. Universidad de Malaga España. *Invenia* No. 46, 1998. www.invenia.es/oai:dialnet.unirioja.es.ART000009767
- FERREIRA Márcio y GRATTAPAGLIA Darío. 1998. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Ministerio de Agricultura y Abastecimiento; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria; Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnología. Brasilia, D.F.
- FJELDSA Jon y KRABBE Niels. 1990. *Birds of the High Andes*. Zoological Museum. University of Copenhagen.
- FLOREZ Antonio. 2003. Colombia: Evolución de sus Relieves y Modelados. Universidad Nacional de Colombia. Primera edición. Bogotá.
- FLOREZ Antonio. 1992. Los Nevados de Colombia, Glaciales y Glaciaciones. Análisis Geográficos. No.22. p. 1–120. IGAC, Bogotá.

- GRAVES Gary. 1982. Speciation in the Carbonated flower-piercer (*Diglossa carbonaria*) complex of the Andes. *Condor*, Vol 84 No 1. p. 1-14.
- GRAVES Gary. 1990. A New Subspecies of *Diglossa gloriosissima* (aves Thraupinae) from the Western Andes of Colombia. *PROC. BIOL.SOC. WASH.* 103(4). p. 962–965.
- HACKETT Shannon. 1996. Molecular Phylogenetics and Biogeography of Tanagers in the Genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol 5. No 2 p. 368–382. Louisiana.
- HACKETT Shannon. 1995. Molecular Systematic and Zoogeography of Flowerpierces in the *Diglossa baritula* Complex. *The Auk*, 112(1) p. 156–170.
- HAMMER Øyvind, HARPER D. A. T. y RYAN P. D. 2005. PAST – PAleontological STatistics, ver. 1.38. p. 1–69.
- HILTY S y BROWN W. 2001. Guía de aves de Colombia. Princeton, Estados Unidos.
- Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Informe nacional sobre el estado de la biodiversidad 1997-Colombia. Aves endémicas de Colombia. Editado por Maria Elfi Chaves y Natalia Arango. Santa Fe de Bogotá. Instituto Humboldt, PNUMA, Ministerio del Medio Ambiente. Vol 3. p. 378–385.
- JONSON Kevin & SORENSON Michael. 1999. Phylogeny and Biogeography of Dabbling Ducks (Genus: *Anas*): a Comparasion of Molecualr and Morphological Evidence. *The Auk* 116 (3). p. 792–805.
- KLICKA Jhon, KEVIN P. Jhonson y SCOTT M. Lanyon. 2000. New World Nine-Primaried Relationships: Constructing a Mitochondrial ADN Framework. *The Auk* 117 (2) p. 321–336.
- KLICKA Jhon, VOELKER Gary y SPELLMAN Garth. 2005. A Molecular Phylogenetic Analysis of the “true thrushes” (Aves Turdinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 34 p. 486–500.
- KLICKA Jhon, BURNS Kevin, SPELLMAN Garth. 2007. Defining a Monophyletic Cardinalini: a Molecular Perspective. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45 p. 1014–1032.
- LARKIN M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. and HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23. p. 2947–2948.

- LUQUE José, HERRÁEZ Ángel. 2001. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Ediciones Harcourt. Madrid, España
- MAUCK William. 2008. *Phylogeny, Biography and Parallel Evolution of Hook Size in Flowerpiercers (Diglossa and Diglossopsis)*. Thesis Máster of Science in Biology. Faculty of San Diego State University. p. 1–38.
- MURRAY Brent, McGillivray Bruce, BARLOW Jon, BEECH Robin, STROBECK Curtis. 1994. The Use of Cytochrome b Sequence Variation in Estimation of Phylogeny in the Vireonidae. *The Condor* 96 p. 1037–1054.
- MURRAY Robert, GRAMER Daryl, MAYES Peter, RODWELL Victor. 2004. Harper Bioquímica. Editorial El Manual Moderno. 16ª edición. p. 105–124. México.
- MONTENEGRO Silvia, CALDERÓN Jhon Jairo, ALVAREZ Sandra. 2005. Comparación de los Hábitos Alimenticios de *Diglossa humeralis*, *Diglossa lafresnayii* y *Diglossa cyanea*, en el Bosque Húmedo Montano del Santuario de Flora y Fauna Galeras, Nariño (Colombia). Universidad de Nariño. Sin publicar.
- NEI Masatoshi y KUMAR Sudhir. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York. p. 33–35.
- NORUSIS M. J. 2000. *SPSS 10.0 Guide to Data Analysis*. Upper Saddle River, N.J., p. 567.
- PEREZ Jorge. 2005. *Molecular Phylogenetics and Biogeography of the Neotropical Redstarts (Myioborus; Aves, Parulinae)*. *Molecular and Phylogenetics and Evolution*.
- REMSEN. JARAMILLO. NORES M. PACHECO J. M, ROBBINS. SCHULENBERG T. STILES G. DA SILVA J. STOTZ D and ZIMMER K. 2008. Version [date]. A classification of the bird species of South America. American Ornithologist's Union. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>
- ROJAS Sandra. 2007. Estrategias de Extracción de Néctar por Pinchaflores (Aves: *Diglossa* y *Diglossopsis*) y sus Efectos sobre la Polinización de Plantas de los Altos Andes. *Ornitología Colombiana* No 5: 21-39.
- SATO Akie, OHUigin Colm, FIGUEROA Felipe, GRANT Peter, GRANT Rosemary, TICHY Herbert y KLEIN Jan. 1999. Phylogeny of Darwin's finches as revealed by mtADN sequences. *Evolution*. Vol. 96. p. 5101–5106.
- SCOTLAND Robert, OLMSTEAD Richard and BENNETT Jonathan. 2003. Phylogeny Reconstruction: the Role of Morphology. *Systematic Biology* 52 (4) p. 539–548.

STILES Gary, AYALA Ana. GIRÓN, Mercedes. 1992. Polinización de las Flores de *Brachyotum* (Melastomataceae) por dos especies de *Diglossa* (Emberizidae). *Caldasia*, 17 (1) p. 47–54.

TABERLET Pierre & BOUVET Jean. 1991. A Single Plucked Feather as a Source of ADN for Bird Genetic Studies. Short Communication. *Auk*. Vol. 108. p. 959–960.

TABERLET Pierre y LUIKART Gordon. 1999. Non-invasive Genetic Sampling and Individual Identification. *Biological Journal of the Linnean Society*. 68:41-55.

TAMURA Koichiro, DUDLEY J, NEI M & KUMAR Sudhir. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24 p. 1596–1599. (Publication PDF at <http://www.kumarlab.net/publications>)

TORRES Ana Lucia. 2005. Especialización en Bioquímica Clínica. Memorias para el Curso de Biología Molecular. Pontificia Universidad Javeriana. San Juan de Pasto.

TOUSSAINT Francois. 1993. Evolución Geológica de Colombia. Colciencias.

TUINEN Marcel van. 2002. Relationships of birds- Molecules versus Morphology. Stanford University. Encyclopedia of life Sciences. California. USA.

VAN der Hammen T. 1985. Estratigrafía del Terciario y Maestrichtiano Continentales y Tectogenésis de los Andes Colombianos-Colombia. *Boletín Geológico*. Volumen 6 p. 67-128.

VELASCO Reinaldo. 2004. Principio de las Técnicas Moleculares Basadas en PCR. Trabajo de Grado Especialista en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

VUILLEUMIER Francois. 1984. Zoogeography of Andean Birds: Two Major Barriers and Speciation and Taxonomy of the *Diglossa carbonaria* Superspecies. National Geographic Society Research Reports, New York. Vol. 16. p. 713–731.

VUILLEUMIER Francois. 1969. Systematics and Evolution in *Diglossa* (Aves, Coerebidae). *American Museum Novitates*. New York. Numero 2381. p. 1–44.

WEIR J. T. y SCHLUTER D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17 p. 2321–2328.

WOODRUFF. 2007. www.flickr.com/photos/digitalbcon/2144177143.

ZIMMER Jhon T. 1929. Variation and distribution in two species of *diglossa*. *Field Museum of Natural History*. Vol XLVI. p. 21-37

ZUNINO Mario & ZULLINI Aldo. 2003. Biogeografía la Dimensión Espacial de la Evolución. Fondo de Cultura económica México.

www.sdakotabirds.com/species/scarlet_tanager_info.htm.

www.zipcodezoo.com/Animals.asp.

ANEXOS

Anexo A. Método de Salting Out modificado Universidad Nacional de Colombia sede Palmira:

1. Tomar entre 0.2 y 0.5ml de sangre total y agregarlos en 0.5ml de solución de Lisis I en un tubo Eppendorf.
2. Mezclar por inversión e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
3. Centrifugar a 19173.7 gravedades por 1 minuto.
4. Voltar el tubo suavemente para descartar el sobrenadante y evitar que se salga el precipitado. Escurrir en una servilleta limpia.
5. Adicionar 1ml de Lisis I y mezclar por inversión. Hacer vortex hasta desbaratar lo más posible el pellet o utilizar una punta aerosol resistente para desbaratar el mismo, evitando formar espuma.
6. Centrifugar a 19173.7 gravedades por 1 minuto y descartar el sobrenadante.
7. Repetir los pasos 5 y 6 hasta lograr un pellet de color totalmente blanco o transparente (2 o 3 veces más).
8. Agregar al precipitado 400µl de solución de Lisis II y 20 µl de proteinasa K (10µg/µl). Resuspender con punta aerosol resistente.
9. Incubar 30 minutos a 56°C y hacer vortex periódicamente. Se puede dejar más tiempo incluso hasta el otro día.
10. Agregar 300 µl de solución NaCl 5M. Hacer vortex de 30 a 60 segundos. Centrifugar a 19173.7 gravedades por 12 minutos.
11. Pasar 350 µl de sobrenadante a un tubo nuevo con 900 µl de etano absoluto frío. Mezclar suavemente por inversión y observar la malla de ADN. En este paso se puede dejar hasta el otro día a -20°C.
12. Centrifugar a 19173.7 gravedades por 12 minutos.
13. Descartar el sobrenadante suavemente para evitar perder el pellet.
14. Agregar 1ml de etanol al 70%, mezclar por inversión durante 2 minutos y centrifugar a 19173.7 gravedades durante 5 minutos.

15. Descartar suavemente el sobrenadante y dejar secar el pellet 5 minutos en la cabina extractora de gases.
16. Adicionar 100 μ l de TE 1X. Si el pellet es aun muy viscoso agregar más TE 1X.
17. Dejar para la determinación de la concentración por lo menos 5 minutos a 37°C toda la noche a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN DE LISIS I
0.32 M Sacarosa
10 mM Tris HCl, pH=7.5
5 mM MgCl ₂
1% Triton X100

SOLUCIÓN DE LISIS II
10 mM Tris HCl, pH=7.5
10 mM EDTA, pH=8.0
50 mM NaCl
0.2% SDS

TE 1X
1 mM Tris HCl, pH=7.5
0.1 mM EDTA, pH=8.0

STOCKS
EDTA 0.5 M pH=7.5
MgCl 1 M
NaCl 5 M

Anexo B. Método de Saghai-Marroof *et al.* 1984, modificado por De Las Casas J. C. 2004:

1. Anotación código, especie y sexo en cuaderno de trabajo.
2. Centrifugar muestras de sangre a 16532.425 gravedades durante 30 min.
3. Retirar con cuidado la mayor parte del buffer dejando el precipitado en el tubo. Para las muestras de tejido, macerar el tejido en dos gotas de CTAB utilizando una cuchilla fina hasta dejar muy bien homogenizada la muestra.
4. Adicionar 600 μ l de buffer CTAB.

5. Incubar la muestra a 65°C durante 30 min.
6. Adicionar 5 µl de proteinasa K 20mg/ml. Agitar suavemente. Dejar 30 min. adicionales. Agitar periódicamente.
7. Incubar la muestra a 65°C durante 30 min.
8. Agregar 600 µl de fenol-cloroformo. Mezclar suavemente. Dejar actuando durante 5 min. Centrifugar a 16532.425 gravedades durante 15 min. Repetir este procedimiento con la fase acuosa si esta aparece lechosa.
9. Tomar la primera fase. Agregar 600 µl de isopropanol mezclar por inversión. Almacenar a -4°C durante 48 horas.
10. Centrifugar 30 min. a 16532.425 gravedades. Descartar el sobrenadante evitando tomar el precipitado (ADN).
11. Agregar 1 ml de etanol: TE (70:30), dejar 10 min. en reposo y luego centrifugar 15 min. a 16532.425 gravedades.
12. Extraer el etanol : TE y dejar el precipitado. Secar la muestra usando bomba de vacío (Speedvac) durante 30 min.
13. Agregar 200 µl de TE buffer y golpear el tubo para aflojar el pellet.
14. Almacenar a 4°C.

Anexo C. Método de Bello N, Francino O. y Sánchez A. 2000

1. Cortar la parte terminal de la pluma y colocarla en un tubo eppendorf de 1.5ml estéril con 500µl de buffer de lisis (50mM Tris-HCL pH 8; 20mM EDTA pH 8; 2% SDS) y proteinasa K a una concentración final de 175µg/ml.
2. La temperatura de lisis y el tiempo de incubación dependen del tamaño de la pluma, cuando el cañón de la pluma contiene tejido blando o sangre se deja a 37°C durante toda la noche con una suave agitación; cuando se usa plumas pequeñas sin tejido blando ni sangre se debe incubar a 56°C por cuatro horas y no es necesario agitar.
3. Homogenizar con vortex y centrifugar a 14086.8 gravedades durante 10 minutos solo si no se ha digerido el tejido blando presente.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo de 1.5ml estéril y agregar

fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).

5. Agregar 50µl de NaCl 2M y dos volúmenes de etanol. Para maximizar la recuperación de ADN este paso puede llevarse a cabo a -20°C durante toda la noche.
6. Lavar el pellet con etanol al 70% y resuspender en 50 a 500µl de TE (10mM Tris HCL, 1Mm de EDTA pH 8) ó agua estéril.

Anexo D. Protocolo para la extracción de ADN a partir de tejidos

Preparación de la muestra:

1. Tomar un fragmento de tejido de aproximadamente 0.7mg y lavar con 2 ml de etanol al 70% (No incluido) por 3 minutos.
2. Luego realizar dos lavados de 20 minutos cada uno con agua destilada.
3. Cambiar el fragmento de tejido desinfectado a un tubo eppendorf de 1.5 µl nuevo estéril.
4. Agregar 600 µl de solución de digestión y dejar toda la noche a 37°C para la digestión del tejido.

Extracción ADN

1. Tomar el tubo donde realizó la digestión del tejido, mezclar varias veces y transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo.
2. Para un volumen de 600 l de muestra, se adiciona 900 µl de lisis celular. Incubar durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y mezclar por inversión durante el tiempo de incubación. Centrifugar a 9782.5 gravedades por 3 minutos.
3. Descartar el sobrenadante sin perder el pellet, etirando la mayor cantidad posible (usar pipeta). Dar vortex vigorosamente durante 10 a 15 segundos hasta resuspender completamente las células.
4. Incubar la lisis nucleica por 20 minutos a 37°C antes de usar. Adicionar 300 µl de lisis nucleica, dar vortex vigorosamente durante 10 a 15 segundos.

Nota: Si se desea un ADN completamente libre de proteínas, colocar 10 µl de proteinasa K (10 µl/ml) e incubar por 20 minutos (no incluida).

5. Adicionar 200 µl de precipitación proteica, dar ortex vigorosamente durante 20 segundos. Centrifugar a 9782.5 gravedades por 3 minutos.

6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y adicionar 300 μ l de precipitación de ADN. Mezclar suavemente la solución por inversión hasta que el ADN se observe en forma de mota de algodón. Centrifugue a 9782.5 gravedades por 3 minutos.
7. Desechar el sobrenadante y adicionar 300 μ l de buffer de lavado, invertir varias veces el tubo para limpiar el ADN. Centrifugar a 9782.5 gravedades por 3 minutos.
8. Descartar el sobrenadante. sin perder el pellet y dejarlo secar al aire libre durante 5 a 10 minutos.
9. Adicionar 100 μ l de rehidratación. La cantidad a agregar a la muestra depende del tamaño de la mota de ADN observada previamente. Si el ADN es para utilizar inmediatamente incubar la solución a 65°C durante 30 minutos, de lo contrario almacenar la muestra a 4°C.

Anexo E. Protocolo para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica.

Las muestras para aislamiento deben ser tomadas en tubo con anticoagulante EDTA.

1. Tomar 300 μ l de sangre total con anticoagulante EDTA y transferirlos a un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Para un volumen de 300 μ l de muestra, se adiciona 900 μ l de lisis celular. Incubar durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y mezclar por inversión durante el tiempo de incubación. Centrifugar a 9782.5 gravedades por 3 minutos.
3. Descartar el sobrenadante sin perder el pellet, retirando la mayor cantidad de hemoglobina posible (usar pipeta). Dar vortex vigorosamente durante 10 a 15 segundos hasta resuspender completamente las células.
4. Incubar la lisis nucleica por 15 minutos a 37°C antes de usar. Adicionar 300 μ l de lisis nucleica, dar vortex vigorosamente durante 10 a 15 segundos.

Nota: Si se desea un ADN completamente libre de proteínas, colocar 10 μ l de proteinasa K (10 μ l/ml) e incubar por 20 minutos (no incluida).

5. Adicionar 200 μ l de precipitación proteica, dar vortex vigorosamente durante 20 segundos. Centrifugar a 9782.5 gravedades por 3 minutos.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml y adicionar 300 μ l de precipitación de ADN. Mezclar suavemente la solución por inversión hasta que el ADN se observe en forma de mota de algodón. Centrifugue a 9782.5 gravedades por 3 minutos.

7. Desechar el sobrenadante y adicionar 300 μl de buffer de lavado, invertir varias veces el tubo para limpiar el ADN. Centrifugar a 9782.5 gravedades por 3 minutos.
8. Descartar el sobrenadante sin perder el pellet y dejarlo secar al aire libre durante 5 a 10 minutos.
9. Adicionar de 50 a 100 μl de rehidratación. La cantidad a agregar a la muestra depende del tamaño de la mota de ADN observada previamente. Si el ADN es para utilizar inmediatamente incubar la solución a 65°C durante 30 minutos, de lo contrario almacenar la muestra a 4°C.

Anexo F. Procedimiento de electroforesis para verificar presencia de ADN

1. Lavar con jabón y agua destilada el portageles y peinetas, secar con toallas de papel y desengrasar con etanol. Realizar el montaje de las bases de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Preparación del gel: Para verificar la presencia de ADN se debe preparar un gel poco concentrado (0.8%), que genera una matriz de poros grandes. Para una cuba de 50 ml es necesario pesar 400 mg de agar, mezclarlos con 500 ml de TBE 0.5X (Tris-borato 0.045M + EDTA 0.001M), y calentar hasta ebullición con agitación frecuente, luego dejar reposar por 1 minuto y agregar 5 μl de bromuro de etidio (1:100) y agitar.
3. El portageles debe estar limpio, seco y nivelado: Ubicar un peine de 10 o 12 pozos. Verter el gel caliente cuidando de que su espesor no supere los 0.5 ml y dejar endurecer a temperatura ambiente (30 min. aprox.). Una vez endurecido retirar el gel con cuidado, empezando por la peineta de pozos y luego por los seguros laterales. La manipulación debe ser cuidadosa evitando provocar cualquier fractura en el gel y siempre usando guantes porque el Bromuro de Etidio que contiene el gel es altamente mutagénico.
4. Tomar cinco tubos eppendorf y marcarlos con marcador indeleble del 1 al 5; en cada uno agregar, con una punta diferente, 2 μl de TE 1X, 0,5 μl de azul de Bromofenol (éste puede ser remplazado por 3 μl de buffer de carga) y 4 μl de la muestra de ADN.
5. Cargado del gel: Ubicar el gel endurecido en la cámara de electroforesis y agregar con cuidado el Buffer de corrida (TE 1X) en la cuba, hasta que sobrepase el gel. Con ayuda de una micropipeta servir con cuidado 0.45 μl de la solución preparada en el punto anterior. Se debe tener cuidado de no depositar la muestra fuera del pozo porque puede generar un rastro erróneo.
6. Una vez servidas todas las muestras terminar de armar la cámara de electroforesis cuidando de ubicar los pozos hacia el cátodo (electrodo negativo) de tal manera que la corrida avance hacia el ánodo (electrodo positivo), y conectarla a 80 voltios durante 1 hora aproximadamente (sin embargo el azul de bromofenol puede servir de guía para

verificar el “avance” de las moléculas de ADN, la electroforesis se debe detener cuando éstas estén cerca del borde inferior.

7. Después de desconectar la cámara se debe retirar con cuidado el buffer de corrida hasta que se pueda retirar el gel, el cual se lleva al transiluminador para su correspondiente análisis.

Anexo G. Protocolo PCR Bardeleben C. y Gray M. 2005

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Agua			13.4ul
Buffer PCR	10X	1X	2.5ul
DNTP's	10mM	200uM	0.5ul
Mg Cl ₂	25mM	1.5mM	1.5ul
Primer H	10uM	0.4uM	1ul
Primer L	10uM	0.4uM	1ul
Taq	5U	0.5U	0.1ul
ADN			5
Total			25

Programación del termociclador

Ubicar las muestras en el termociclador programando los siguientes tiempos y temperaturas: 94°C por 3 minutos, 28 ciclos de 94 °C por 45 segundos, temperatura de alineamiento por 45 segundos, 72 °C por 30 segundos y temperatura de extensión final 72°C por 5 minutos.

Anexo H. Protocolo PCR Hackett S. 1996

Reactivos	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción
Agua			20.674ul
Buffer PCR	10X	1X	3.5ul
DNTP's	10mM	0.04mM	0.14ul
Mg Cl ₂	25mM	1.5mM	2.1ul
Primer F	10uM	0.5uM	1.75ul
Primer R	10uM	0.5uM	1.75ul
Taq	5U	0.5U	0.086ul
ADN			5
Total			35

Anexo I. Protocolo combinado: Saghai-Marroof *et al.* 1984, modificado por De Las Casas (2004) y Bello *et al.*, 2000

1. En el caso de muestras de plumas se corto la parte terminal y se macero con la ayuda de mortero. En el caso de los tejidos se macero en un tubo eppendorf de 1.5ml estéril con ayuda de una punta azul.

2. La muestra se colocó en un tubo eppendorf de 1.5ml estéril con 500µl de buffer de lisis (5mM Tris-HCL pH 8; 20mM EDTA pH 8; 2% SDS) y 437,5 µl de proteinasa K a una concentración final de 175µg/ml. Se incubó en baño maria a 37°C durante 22 horas.

Nota: Después de este paso a las muestras de tejido se les hizo vortex y se centrifugaron a 14086.8 gravedades durante 10 minutos, transfiriendo el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.

3. Se agregaron 600 µl de fenol:cloroformo. Se mezcló suavemente. Se dejó actuar durante 5 min. Se centrifugó a 16532.425 gravedades durante 15 min.

4. Se tomó la primera fase. Se agregaron 600 µl de isopropanol y se mezcló por inversión. Se almacenó a -4°C durante 48 horas.

5. Se centrifugó 30 min. a 16532.425 gravedades. Se descartó el sobrenadante evitando tomar el precipitado (ADN). Se secó con papel absorbente.

6. Se agregó 1 ml de etanol : TE (70:30), se dejó 10 min. en reposo y luego se centrifugó 15 min. a 16532.425 gravedades.

7. Se extrajo el etanol : TE y se dejó el precipitado. Se secó la muestra con papel absorbente.

8. Se agregó 200 µl de TE 1X.

9. Se almacenó a 4°C.

Anexo J. Secuencias editadas

Citocromo b

D.lafresnayii1G1

GGCCGAGGACTCTACTACGGCTCATACTGAACAAAGAGACCTGAAACATCGGAGTCATCCTCCTCCTAACCCCTC
ATAGCAACCGCCTTCGTAGGGTACGTACTACCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACTGTAATCACAAAC
CTATTCTCCGCTATTCCCTACATCGGACAAACACTAGTAGAATGAGCTTGAGGTGGATTTTCCGTCGACAACCCCA
CACTCACTCGATTTTTCGCACTCCACTTCCTTCTCCATTCTTCATTGTAGGCCTCACACTCGTCCATCTCACTTTCC
TCCACGAGACAGGATCAAACAACCCACTAGGAATCCCTCAGACTGCGATAAAATCCCCTTTCACCCATACTACA
CTATCAAGGATATCCTAGGATTCGTATTAATACTCTCCCTTCTAGTCTCATTAGCACTATTCGCCCCCAACCTCCTA
GGAGACCCAGAAAACCTTCACACCAGCCAACCCACTAGTTACCCCTCCCCACATCAAACCTGAATGATATTTCCCTAT
TCGCATACGCTATTCTTCGATCCATCCCAAACAACACTAGGAGGCGTGCTAGCCCTAGCCGCCTCAATCCTAGTTCT
ATTCCTCACCCCACTACTTCACACATCAAAACTACGATCAATGACTTTCCGTCCCCTATCACAAATCTATTCTGAAC
CCAGTNGNNAACCCAACTTACCTAAATCGGNNGNAAAATCGG

D.lafresnayiiG5

TTTTTTTNCGACCTGAACCTTTCTAGATNCAAGTATGGAGGAGGTGTGCTAGCCCTGGACGCCTCAGTCCATGTTCT
ATTCCTGCATCCTCATTACTTCCCCATCTATGCTACGACTCAATGACTTGCCGGACCCCTCTCGCAAATCTTATGTC
TGAAGCCGACTCGTCAATGTCCATCCGCCTAAACTGAGTAGGCAGCCGAGGACTCTAATACCCCTTCTTCACTGAA
CAAAGAGACCTGAAACATCGGAGTCATCCTCCTCCTAACCCCTCATAGCAACCGCCTTCGTAGGCTACGTACTACCC
CAATGAGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACTGTAATCACAAACCTATTCTCCGCTATTCCCTACATCGGACAAA
CACTAGTAGAATGAGCTTGAGGTGGATTCTCCGTCGACAACCCCACTCACTCGATTTTTTCGCACTCCACTTCCTT
CTCCCATTCCTCATTGTAGGCCTCACACTCGTCCATCTCACTTTCTCCACGAGACAGGATCAAACAACCCACTAG
GAATTCCTCAGACTGCGATAAAATCCCCTTTCACCCATACTACACTATCAAGGATATCCTAGGATTCGTATTAAT
ACTCTCCCTTCTAGTCTCATTAGCACTATTCGCCCCCAACCTCCTAGGAGCGACCCAGAAAACCTTCACACCAGCCA
ACCCACTAGTTACCCCTCCCCACATCAAACCTGAATGATATTT

D.lafresnayiiG2

TCTCTTTNCGTCCTCAGATTGTTNAATACTCAATCATCTAGGAGGTGTGCTCGCCTTGCACGATACAGTACACGCT
CTATTACTGATTCTCATTCCGTTACCCACTCTATGCTAAGACGTATGATTTGGCTGACTCATCCACAACCTTCCATGT
CTGAAGGCGACTCCTTCTTCTTCATCTGCCTCTACTGTACTCATCGGCCAGAGGACTCTACTACCCATTCATACT
GAACAAAGAGACCTGAAACATCGGAGTCATCCTCCTCCTAACCCCTCATAGCAACCGCCTTCGTAGGCTACGTA
ACCATGAGGCCAAATATCATTCTGAGGTGCCACTGTAATCACAAACCTATTCTCCGCTATTCCCTACATCGGACAA
ACACTAGTAGAATGAGCTTGAGGTGGATTCTCCGTCGACAACCCACACTCACTCGATTTTTTCGCACTCCACTTCC
TTCTCCCATTCTTCATCGTAGGCCTCACACTCGTCCATCTCACCTTCCTCCACGAGACAGGATCAAACAACCCACTA
GGAATTCCTCAGACTGCGATAAAAATCCCCTTTCACCCATACTACACTATCAAGGATATCCTAGGATTTCGTATTA
TACTCTCCCTTCTAGTCTCACTAGCACTATTTCGCCCCAACCTCCTAGGAGACCCAGAAAACCTTCACACCAGCCAA
CCCCTAGTTACCCCTCCCCACATCAAACCTGAATGATATTT

D.humeralis6809

TTTGAGGGGGTAATGTAGCCCTTATCAGATGAGATGTTGGGAGGNCCTCTACTTGCCATACACTATAACAGCAGACA
CTAAACTAGCCTTCTCCTCCGTTGCTCACATATGCCGAGACGTACAATTCGGCTGACTCATCTTCGCAACCTCCAA
CCGCAAACGGAGCTTCCTTCTTCTTCATCTTAGCATCTAACTTACACATCGGGCCGAGGACTCTTACTACGGTTTCA
TACCTGAACAAAGAAACCTGAAACATCGGAGTCATTCTCCTCCTAACCCCTCATAGCAACTGCCTTCGTAGGCTAAC
GTACTACCATGAGGCCAAATAATCATTCTGAGGCGCTACCGTAATCACAAACCTATTTTTTCAGCCATCCCCTACAT
CGGACAAACACTAGTAGAATGAGCCTGAGGCGGATTCTCTGTGACAATCCACACTCACTCGATTCTTCGCACTT
CACTTCCTTCTCCATTCTCATCGTAGGCCTCACACTCGTCCATCTCACCTTCCTCCACGAAACAGGATCAAACAA
CCCCTAGGAATCCCCTCAGACTGCGACAAAATCCCCTTCCACCCATACTACCCATCAAAGATATCCTAGGATTC
GTGCTAATACTCTCCCTCCTAGTCTCATTAGCCCTATTCTCCCCAACCTTCTAGGCGACCCAGAAAACCTTCACACC
AGCTAACCCACTAGTCACCCACCCACCAATCAAACCCGAATGATACTT

ND2

D.lafresnayiiG1

CCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAGTGGAATGGTACTAGTCCTAGTTTTATTGCAATTGCGGAGGTAAGGATTA
AGCAAGATACTGGGTGGGTGAGCTGAGTAATATCTCACTGTCCGGTCTGCCATGCGTTGGTTATGCTGGAGAATAG
AACTAGGGCGGAGGCAGCTGATTGGGTTAGGAAATATTTAGTAGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGATGAGATTT
TGAAATTAATGGGAGGATAGCGAGCGTGTTGATCTCAAGGCCGGCTCAGGCTATGATTCAGTGGTTGCTCGATAT

GGTGATAGTTGTCCCTAGAAGTAGGCTAATGACAAAAATTAAGTTTGCTGGGGGGTTCATTAGCAGGAGGAGAAG
TCGGAAAATCATTTCGGGGTA
TGGGCCCGATAAA

D.lafresnayiiG2

TNTCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAGTGGAATGGTACTAGTCCTAGTTTTATTGCAATTGCGGAGGTAAGGA
TTAAGCAAGATACTGGGTGGGTGAGCTGAGTAATATCTCACTGTCCGGTCTGCCATGCGTTGGTTATGCTGGAGAA
TAGAACTAGGGCGGAGGCAGCTGATTGGGTTAGGAAATATTTAGTAGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGATGAGA
TTTTGAAATTAATGGGAGGATAGCGAGCGTGTGATCTCAAGGCCGGCTCAGGCTATGATTCAGTGGTTGCTCGAT
ATGGTGATAGTTGTCCCTAGAAGTAGGCTAATGACAAAAATTAAGTTTCCTTGGGGGCTCATCAGCAGGATGAGG
CGGGAAAACATCATTTCGGGGTATGGGCCCGATAAA

D.lafresnayiiG3

TCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAAGGGGNGGATAGTCTGTCCAGTTTTATTGCACTTGCGGAGGTAAGGATT
AAGCAAGATACTGGGTGGGTGAGCTGAGTAATATCTCACTGTCCGGTCTGCCATGCGTTGGTTATGCTGGAGAATA
GAACTAGGGCGGAGGCAGCTGATTGGGTTAGGAAATATTTAGTAGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGATGAGATT
TTGAAATTAATGGGAGGATAGCGAGCGTGTGATCTCAAGGCCGGCTCAGGCTATGATTCAGTGGTTGCTCGATAT
GGTGATAGTTGTCCCTAGAAGTAGGCTAATAACAAAAATTAAGTTTGCTTGGGGGTTCATTAGCAGGGGAAGGAG
TTGAACCATCATTTCGGGGTATGGGCCCGATAAA

D.lafresnayiiG5

TCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAGTGGAATGGTACTAGTCCTAGTTTTATTGCAATTGCGGAGGTAAGGATT
AAGCAAGATACTGGGTGGGTGAGCTGAGTAATATCTCACTGTCCGGTCTGCCATGCGTTGGTTATGCTGGAGAATA
GAACTAGGGCGGAGGCAGCTGATTGGGTTAGGAAATATTTAGTAGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGATGAGATT
TTGAAATTAATGGGAGGATAGCGAGCGTGTGATCTCAAGGCCGGCTCAGGCTATGATTCAGTGGTTGCTCGATAT
GGTGATAGTTGTCCCTAGAAGTAGGCTAATAACAAAAATTAAGTTTGCCTGAAGCCTCGCGATCAGGNCGCGGAA
TT

D.lafresnayiiG6

TCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAGTGGAATGGTACTAGTCCTAGTTTTATTGCAATTGCGGAGGTAAGGATT
AAGCAAGATACTGGGTGGGTGAGCTGAGTAATATCTCACTGTCCGGTCTGCCATGCGTTGGTTATGCTGGAGAATA
GAACTAGGGCGGAGGCAGCTGATTGGGTTAGGAAATATTTAGTAGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGATGAGATT

TTGAAATTAATGGGAGGATAGCGAGCGTGTTGATCTCAAGGCCGGCTCAGGCTATGATTCAGTGGTTGCTCGATAT
GGTGATAGTTGTCCCTAGAAGTAGGCTAATGACAAAAATTAAGTTTGCTGGGGGGTTCATAGCGGGAAGAG

D.lafresnayiiG4

TCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAGTGAATGGTACTAGTCCTAGTTTTATTGCAATTGCGGAGGTAAGGATT
AAGCAAGATACTGGGTGGGTGAGCTGAGTAATATCTCACTGTCCGGTCTGCCATGCGTTGGTTATGCTGGAGAATA
GAACTAGGGCGGAGGCAGCTGATTGGGTTAGGAAATATTTAGTAGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGATGAGATT
TTGAAATTAATGGGAGGATAGCGAGCGTGTTGATCTCAAGGCCGGCTCAGGCTATGATTCAGTGGTTGCTCGATAT
GGTGATAGTTGTCCCTAGAAGTAGGCTAATGACAAAAATTAAGTTTCCTTGGGGGCTCATTAGCGTGAGGTGGCG
GAAAACCATCATTTTCGGGGTATGGGCCCGATAA

D.humeralis2541

TTCCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAATGGAATGGTACCAATCCTAGTTTTATTGCAATTGCAGAGGTGAGGA
TTAGGCAGGGTACTGGGTGAGTGAGTTGGGTGATATCTCACTGCCAGTCTGTCATGCGTTGGTTATGCTGGAAAA
TAGGACTAGGGCAGAGGCAGCTGCTTGGGTTAGGAAGTACTTAGTGGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGGTGGGA
TTTTGAGATTAATGGAAGGATGGCGAGTGTGTTAATTTCAAGGCCGGCTCAGGCCGTGATTCAATGGTTGCTCGAG
ATGGTGATGGTTGTTTCTAGGAGCAGACTGGTGGCAAAAAATTAATTTGCCTGAAGCCTCGGAATCAGGTCGCGG
GAAA

D.humeralis6809

CTCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAATGGAATGGTACCAAGGTCCTAGTTTTAGGTTGCAATTGCAGAGGTGA
GGATTAGGCAGGGTACTGGGTGAGTGAGTTGGGTGATATCTCACTGCCAGTCTGTCATGCGTTGGTTATGCTGGA
AAATAGGACTAGGGCAGAGGCAGCTGCTTGGGTTAGGAAGTACTTAGTGGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGGTG
GGATTTTGAGATTAATGGAAGGATGGCGAGTGTGTTAATTTCAAGGCCGGCTCAGGCCGTGATTCAATGGTTGCTC
GAGATGTAGAGGGTTGTTTCTAGGAGCAGACTGGTGGCAAAAAATTAATTTCTGCAGCCTCTGATCAGGTCGGCG
AAAAATTGAACCATCATTTTCGGGGTATGGGCCCGATAAC

D.humeralis1151

TCTTCGTGCCAACGCTTTTTGCCGCTTGCCGAATGTAGTCACCTCTGGAAATCAGAATAAAATCGACTGTAGTCCG
CGCTTAGATGATATTGCNTATGTCTCTACTCTCCCGAGAATATTGACTTACCGTCTTGACATATGTGTGACACTCT
ATGTCTGAATGGTATATGACCGTAGCGTGAACGCGACGTGCTATCTCTATCTGTACTAATGTCAAAGTGTTGCAA
TTTGCCCTGAGCTTAAAATAGCATCTTACTAACCTGCTCAGCGGCGTGACAGCGTATACTGACGTGTCGGACGAAG

ACTCCGCGTACCAGTTTGACATGCATAGTATAGCGTGATAAATTGTTTGCTCTCACTCATAATGCCTACTCCTCTGG
 CATGTAGAGTCGCCCTAACACTCCCAGTACTTTTCGTGCCTTTTACAAGCCCCTAGTGGACACTACATAGCTAAATT
 ACAAACNTTAGCATGACATTCTATTTTTACAGTGGCTTCTTCGAAGCGAA

D.humeralis6812

TCCTTGAAGCACTTCTGGGAATCAGAAATTAAGGTTGACATCCTGGTTTAGGCGCACTTACAGAGGTGAGGATT
 AGGCAGGGTACTGGGTGAGTGAGTTGGGTGATATCTCACTGCCAGTCTGTCATGCGTTGGTTATGCTGGAAAATA
 GGACTAGGGCAGAGGCAGCTGCTTGGGTAGGAAGTACTTAGTGGCAGCTTCAATGGCTCGTGGGTGGTGGGATT
 TTGAGATTAATGGAAGGATGGCGAGTGTGTTAATTTCAAGGCCGGCTCAGGCCGTGATTCAATGGTTGCTCGAGAT
 GGTGATGGTTGTTCTAGGAGCAGACTGGTGGCAAAAATTAATTTGCTTGGGGTTTCGAATTAGCAGGGGAAGG
 AGTTGAACCATCATTTTCGGGGTATGGNCCCGATAAA

Anexo K. Composición de nucleótidos para los genes mitocondriales Citocromo b y ND2

Citocromo b

	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
D.lafresnayiiG5	26.1	33.2	25.8	14.8	728	19.3	38.1	29.9	12.7	244	24.9	31.1	25.7	18.3	241	34.2	30.5	21.8	13.6	243
D.lafresnayiiG2	26.9	33.2	26.0	13.9	726	19.8	38.4	29.3	12.4	242	25.1	31.3	25.5	18.1	243	35.7	29.9	23.2	11.2	241
D.lafresnayiiGB	24.8	34.5	27.3	13.4	553	16.3	41.3	33.7	8.7	184	21.7	32.6	25.5	20.1	184	36.2	29.7	22.7	11.4	185
D.humeralis6809	24.5	33.8	27.2	14.5	736	18.7	39.8	31.7	9.8	246	20.9	33.6	26.6	18.9	244	33.7	28.0	23.2	15.0	246
D.humeralisGB	23.3	35.5	27.7	13.5	527	12.6	46.0	33.9	7.5	174	20.3	33.3	26.0	20.3	177	36.9	27.3	23.3	12.5	176
P.olivacea	24.6	34.7	27.8	13.0	957	27.0	35.7	26.0	11.3	319	16.4	38.1	32.7	12.9	318	30.3	30.3	24.7	14.7	320
D.lafresnayiiG1	24.8	33.7	27.9	13.6	721	22.6	38.1	29.3	10.0	239	19.5	32.0	31.1	17.4	241	32.4	31.1	23.2	13.3	241
Avg.	25.0	34.1	27.1	13.8	706.9	20.2	39.1	30.1	10.6	235.4	21.1	33.4	28.0	17.6	235.4	33.8	29.7	23.2	13.3	236

ND2

	T(U)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T-3	C-3	A-3	G-3	Pos #3
D.lafresnayiiG2	27.8	15.2	25.8	31.2	414	29.7	16.7	24.6	29.0	138	28.3	14.5	26.8	30.4	138	25.4	14.5	26.1	34.1	138
D.lafresnayiiG4	28.2	15.3	25.2	31.3	412	29.9	16.8	24.1	29.2	137	28.3	15.2	26.1	30.4	138	26.3	13.9	25.5	34.3	137
D.lafresnayiiG1	27.7	14.3	26.2	31.8	412	29.2	15.3	25.5	29.9	137	27.5	14.5	26.1	31.9	138	26.3	13.1	27.0	33.6	137
D.lafresnayiiG6	28.1	14.2	25.7	32.1	374	30.6	15.3	23.4	30.6	124	27.8	15.1	26.2	31.0	126	25.8	12.1	27.4	34.7	124

D.lafresnayiiG3	28.0	14.8	25.3	31.9	411	29.9	15.3	23.4	31.4	137	27.0	15.3	26.3	31.4	137	27.0	13.9	26.3	32.8	137
D.lafresnayiiG5	28.0	15.6	25.9	30.6	379	31.2	16.8	23.2	28.8	125	27.6	16.5	26.8	29.1	127	25.2	13.4	27.6	33.9	127
D.humeralis2541	27.5	15.7	23.8	33.0	382	30.7	17.3	22.0	29.9	127	28.1	15.6	20.3	35.9	128	23.6	14.2	29.1	33.1	127
D.humeralis6809	27.3	16.3	23.9	32.5	418	29.0	15.9	23.9	31.2	138	27.1	16.4	21.4	35.0	140	25.7	16.4	26.4	31.4	140
D.humeralis6812	27.5	15.0	23.9	33.6	414	29.2	15.3	22.6	32.8	137	26.8	15.2	21.7	36.2	138	26.6	14.4	27.3	31.7	139
D.humeralis1151	30.4	24.7	25.1	19.8	506	30.2	27.2	19.5	23.1	169	34.5	19.0	29.8	16.7	168	26.6	27.8	26.0	19.5	169
P.olivacea	24.8	34.2	30.4	10.6	605	24.8	33.2	32.7	9.4	202	23.4	36.3	28.4	11.9	201	26.2	33.2	30.2	10.4	202
Avg.	27.7	18.6	25.8	27.9	429.7	29.3	19.5	24.4	26.9	142.8	27.8	18.4	25.6	28.1	143.5	25.9	17.9	27.3	28.9	143.4

Anexo M. Distancias genéticas de los genes mitocondriales Citocromo b y ND2

Distancias genéticas Citocromo b

	D.lafresnayiiG5	D.lafresnayiiG2	D.lafresnayiiGB	D.humeralis6809	D.humeralisGB	P.olivacea	D.lafresnayii1G1
D.lafresnayiiG5							
D.lafresnayiiG2	0.011						
D.lafresnayiiGB	0.013	0.006					
D.humeralis6809	0.082	0.076	0.072				
D.humeralisGB	0.088	0.082	0.078	0.006			
P.olivacea	0.122	0.114	0.109	0.099	0.105		
D.lafresnayii1G1	0.011	0.015	0.010	0.078	0.084	0.118	

Distancias genéticas ND2

	D.lafresnayiiG2	D.lafresnayiiG4	D.lafresnayiiG1	D.lafresnayiiG6	D.lafresnayiiG3	D.lafresnayiiG5	D.humeralis2541	D.humeralis6809	D.humeralis6812	D.humeralis1151	P.olivacea
D.lafresnayiiG2											
D.lafresnayiiG4	0.011										
D.lafresnayiiG1	0.008	0.014									
D.lafresnayiiG6	0.011	0.014	0.006								
D.lafresnayiiG3	0.042	0.047	0.039	0.045							
D.lafresnayiiG5	0.028	0.033	0.033	0.036	0.061						
D.humeralis2541	0.148	0.145	0.150	0.153	0.175	0.142					
D.humeralis6809	0.153	0.156	0.159	0.159	0.184	0.153	0.019				
D.humeralis6812	0.153	0.159	0.150	0.156	0.159	0.173	0.061	0.072			
D.humeralis1151	0.543	0.540	0.546	0.549	0.554	0.546	0.552	0.560	0.549		
P.olivacea	0.685	0.688	0.682	0.680	0.682	0.685	0.669	0.666	0.688	0.657	

ANEXO J. Datos Morfológicos tomados a los especímenes de museo y a los individuos capturados.

MUSEO	ESPECIE	OSCIFICACION	DEPARTAMENTO	CT	CE	ACO	ALN	AN	CP	CA	T	C
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	15	13,4	6,4	5,7	3	2,2	79,5	22,9	71,2
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	15,9	13,5	6,2	4,9	3	2,5	66,5	22,4	60,5
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	NORTE DE SANTANDER	16,8	13,4	7,1	5,2	3,1	1,9	67,2	22,4	61,9
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	JUVENIL	CUNDINAMARCA	13,9	10,3	6	5,1	3,1	2,1	69,1	19,3	58,9
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	NORTE DE SANTANDER	17,3	11,8	7,9	5,7	2,9	2,1	71,7	22,8	67,8
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	TOLIMA	16,1	12,8	6,3	4,8	2,8	1,9	64,2	24,1	64,7
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	16,7	13,5	6,1	5,9	3,6	2	71,9	21,8	64,2
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	14,3	10,7	4,3	4,3	2,7	1,5	65,7	18,5	58,8
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	BOYACA	16,2	12,5	7,5	5,8	3,3	2,2	72,4	22,6	71,2
IAvH	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	META	16,2	13,2	6,3	5,1	3,3	1,7	67,2	24,7	60
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	12,7	11,1	4,95	5,24	2,4	2,5	68,6	21,1	56,9
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	11,9	10,6	4,08	4,79	2,6	2,2	68,7	25,4	57,4
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	JUVENIL	BOYACA	13	11,1	4,64	4,46	2,3	2,6	72	24,4	59,4
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	13,3	10,8	4,9	5,37	2,6	2,9	67,9	25,3	57,9
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	11,7	9,06	5,07	4,18	2,9	2,6	63,6	23,5	52,3
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	12,7	10,4	4,5	4,85	2,5	2,8	75,1	28,3	61,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	12,9	10,1	4,09	5,52	2,7	2,5	70,9	23,7	57,9
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NARIÑO	11,7	9,97	4,72	5,06	3,1	2,2	65,2	23,5	55,4
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	CAUCA	12,2	10,3	4,3	4,51	2,7	2,8	71,5	25,9	60,1

ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	12,9	10,4	4,86	4,81	3,1	3,3	67,2	23,3	61,2
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	12,6	10,8	4,65	4,89	2,8	2,3	68,2	28,2	60,1
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	15,1	10,7	4,69	4,7	2,9	2,5	62,5	23,6	57,3
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	13,2	11,1	4,84	5,08	2,8	2,4	69	26,2	61,7
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	VALLE DEL CAUCA	12,6	10,6	5,11	4,93	2,6	2,5	71,7	24,4	63,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	13,1	10,4	4,52	4,64	3	2,6	75,6	26,1	57,5
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	12,6	9,59	5,34	5,06	2,8	2,2	71,8	24,2	61,2
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	14,2	11,4	5,52	5,11	3,1	3,3	73,4	24,9	63,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	13,7	10,1	4,24	5,18	2,9	2,5	74,1	25	63,5
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NARIÑO	13,5	10,6	5,24	4,97	2,9	2,5	68,9	25,5	63,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	13	10,6	5,43	5,06	2,9	2,5	72,3	21,6	66,8
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	13,4	11,1	4,92	5,25	2,9	2,5	65,6	24,2	58,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	14	11,6	5,29	5,64	3,2	2,4	75,9	25,3	68
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	13,2	10,5	4,52	5,44	2,5	2,6	71,6	26	65,1
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	13,2	9,77	5,01	5,33	2,7	2,5	78,6	25	64,9
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	12,8	10,5	4,84	7,1	2,9	2,6	73,9	25,8	61,8
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	13,3	10,7	4,52	6,3	3	2,3	73,7	27,6	67,5
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NORTE DE SANTANDER	13,7	10,4	5	4,9	2,9	2,9	75,4	25	64,9
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NARIÑO	12,2	10	4,6	5,28	2,9	2,8	71,4	25,4	62,3

ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	12,2	9,04	4,02	5,11	2,8	2,6	76,5	24,2	67
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	VALLE DEL CAUCA	12,8	9,77	3,75	4,73	2,6	2,7	72,5	23,5	49,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	12,9	10,7	4,96	5,08	2,5	2,9	70	26,3	65,2
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	VALLE DEL CAUCA	11,6	9,44	4,13	5,02	2,7	2,5	63,6	22,9	48,8
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CAUCA	12,8	10,2	4,04	5,1	2,6	1,9	79,5	26,3	73,5
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	TOLIMA	13,9	9,28	4,95	5,19	3,1	2,2	78,8	25,5	66
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CAUCA	14	10,7	4,63	5,44	2,9	2,7	65,6	25,9	67,8
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	14,9	11,4	4,34	4,99	3,3	2,5	75,2	25,1	68
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	13	9,55	4,4	5,42	3,3	3,3	77	24,6	70,3
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	14,4	10,2	5,31	5,85	3,1	2,7	74,9	25,7	67,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	CUNDINAMARCA	14,1	10,5	4,35	5,68	2,9	2,6	75,7	27	65,6
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	JUVENIL	NARIÑO	13,1	11,5	5,5	5,1	2,5	2,2	66,5	26,7	64,1
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	JUVENIL	NARIÑO	12,5	10	5,2	5,2	3,4	2,2	72,3	28,1	57,7
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	*	NARIÑO	12,3	10	4,6	5,9	2,5	1,2	67,2	28	64,2
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	JUVENIL	NARIÑO	13,7	11,5	5	4,7	2,7	1,5	65,2	28,9	59,7
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	NARIÑO	12,2	10	5	4,7	2,9	1,6	68,4	28,2	61,4
ICN	<i>Diglossa lafresnayii lafresnayii</i>	ADULTO	NARIÑO	13,1	11	4,2	5,2	3,4	1,6	71,5	28	62,8
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14	11,6	5,3	4,7	3,1	1,8	68,2	21,1	57,7
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	13,4	12,1	5,7	4,6	3,1	1,9	70	20,7	58,7
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,8	12,3	6,7	5,3	4,1	2	77,5	23,5	69,8
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,3	11,8	7,6	5,8	3,5	1,4	74,5	23,2	65,8

IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	16,7	12,2	6,6	5,2	3,3	2,3	69,3	21,2	58,4
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,8	11,8	5,1	4,3	3,1	2	66,1	20,4	59,2
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	14,4	11,2	4,6	5,1	3	1,8	64,3	20,7	58,7
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	BOYACA	15	12,9	5	4,7	3,8	2,4	60	19,4	53
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	15,2	10,5	6,1	4,1	2,6	2,2	60,3	19,2	52,1
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	16	12,1	5,1	4,6	3,5	1,6	68,8	20,4	63,2
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	QUINDIO	14,9	11,3	5,6	5,1	3,5	1,7	62	20,6	57,9
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	15,5	11,8	5,2	5,4	3,3	1,6	63,1	19,8	57,1
IAvH	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,6	11,7	5,7	5,7	3,2	2	67,1	20,9	55,4
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	JUVENIL	SANTANDER	13,8	9	6,5	4,2	3,4	1,5	62,5	19	48,3
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	15,5	11,5	6,1	4,6	2,9	2,1	67,9	21,8	64,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	JUVENIL	CUNDINAMARCA	15,2	11	4,6	4,2	2,9	1,6	65	18,9	55,4
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	15,6	11,1	5	4,7	2,6	1,9	63,2	18,9	62,4
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	JUVENIL	CUNDINAMARCA	13,9	10,8	5,7	4,6	2,9	2	63,2	21,2	55,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,4	11,7	6,1	5,1	2,7	1,5	61,9	17,8	54
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,6	10,4	5,5	4,8	2,9	1,6	68,9	22	62,6
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,1	11,5	5,5	5,2	3,3	2,1	64,4	20,7	52,2
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	BOYACA	15	11,3	5	4,4	2,5	1,3	65,5	19,5	57,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	14	11	5	4,6	3	1,9	63,2	19,5	56,5
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	JUVENIL	CUNDINAMARCA	15,4	12,3	5,1	5	3	1,8	60,6	19,1	57,7

ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	13,4	11,1	5,8	4,7	3,2	2,5	74,8	20,3	66,2
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,9	10,7	6,2	4,8	3,1	1,8	60	21	53,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	13,8	11,3	6,7	5,1	2,8	1,3	66,7	22,7	58
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	JUVENIL	CUNDINAMARCA	15,4	11,4	5,5	4,4	2,6	1,7	68,7	20,3	61,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14	10,9	6,1	4,8	3,2	1,8	62	20,1	52,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	BOYACA	13,8	10,6	5,1	4,7	2,3	1,9	62,5	18,5	55,7
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,9	12,1	5,4	5,2	2,8	1,9	61,5	20,3	61,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,5	11,6	5,3	4,9	2,6	1,7	63,4	18,7	56,2
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	BOYACA	15,5	11,1	5,5	4,6	3,1	2	69,2	20,8	57,5
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13	11	6	5,1	3,2	2	60,8	20,5	54,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,8	11,3	5,6	4,9	3,1	2	63,5	17,5	54,5
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,8	11,4	6,2	5	2,8	2	68	18,5	58,5
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	14,5	10,8	5,8	4,8	2,3	1,9	65,1	18,9	56,4
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	*	13,9	10,6	5,7	4,4	2,9	1,9	71,3	22,5	60,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	BOYACA	13	11,5	5,5	4,8	2,7	1,7	61,9	18,6	56,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	12,9	10,7	5,7	4,6	2,7	1,5	60,7	20,3	52,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,3	11,4	6,3	4,7	3,4	2	59	20,6	62
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	13,6	10,9	5,4	4,4	3,2	1,4	60,1	20	50,2
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,7	11	6,6	4,7	2,6	1,6	66,7	22,5	57,4
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	15	10,5	5,7	5,5	2,7	1,6	59,9	20,9	57,2

ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,9	10,8	6,2	5,2	2,9	1,9	65,6	22	56,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,6	12,1	6,7	4,2	2,9	1,8	66	18,5	60,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	14,6	11,3	6	4,8	2,8	1,7	64,9	21	62,6
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,2	11,5	6,5	5	2,6	1,8	62	21,4	59,2
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,1	11,1	6,5	4,1	3,6	2,1	66,9	19,3	59,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14	11,6	5,5	4,9	2,8	2	68,3	20,1	61,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,8	11	6	4,4	3,1	1,4	66,4	22,1	61,5
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	*	14,4	11,5	6	5,1	3	1,8	64,7	19,4	60,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	15,2	12,9	5,8	5	3	2,1	64,2	19,5	54,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,3	12,2	6	5	2,7	2	69,1	20,6	61,3
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	14,7	11,3	5,8	4,9	2,7	1,8	70,4	18,6	61,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	12,4	10,8	5,4	5,2	2,9	1,5	67,6	20,9	58,2
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	15,3	12,4	5,9	5,3	3,1	1,2	70,8	21,1	61,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	14,6	11,7	6	4,8	2,6	1,8	66,1	21,1	59,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,9	10,6	6,1	5	3,3	2	70,5	19,1	61,3
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,3	9,9	6,3	4,5	2,8	1,6	69,2	20,9	58,5
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,3	11	5,8	4,9	2,6	2,1	64,4	21,6	53,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,6	11,9	6,5	4,6	2,8	2,1	68,1	22,5	56,1
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	13,8	11,3	4,9	5,5	2,8	1,2	71,9	21	62
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,4	11,3	5,9	5,1	3,1	1,9	68,7	20,7	60

ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	16,9	11,7	5,7	5,2	2,6	2,1	64,9	20,3	57,6
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	15,5	12	5,2	4,4	3,3	1,7	70	21,3	58,7
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,8	11,1	6,4	4,9	3,4	1,7	67,1	21,2	60,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,7	11,2	5,2	5,1	2,8	2	66,3	17,6	59,3
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	13,9	11,8	6,2	4,9	3	2	68,6	21,1	60,8
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	ADULTO	CUNDINAMARCA	14,4	10,5	5,5	4,7	2,8	1,6	68,9	21	55,9
ICN	<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	*	CUNDINAMARCA	14,2	11,6	6,7	5,1	3,2	1,6	67,7	20,9	56,9

CT: Longitud del culmen total; CE: Longitud del culmen expuesto; ACO: Ancho de la comisura; ALN: Altura del pico a nivel de la narina;

AN: Ancho del pico a nivel de la narina; T: Longitud del tarso; CA: Longitud de la cuerda alar; C: Longitud de la cola; CP: Longitud de la curvatura del pico

ICN: Colección Ornitológica del Museo de Historia Natural-Instituto de Ciencias Naturales (MHN-ICN) de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá - Cundinamarca)

IAvH: Colección Ornitológica del Instituto de investigación de recursos biológicos ALEXANDER von HUMBOLDT sede Villa de Leyva

* : Datos desconocidos