



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Filogeografía y patrones de diferenciación genética de las especies de colibríes pertenecientes al género *Agelaiocercus* (Zimmer, 1930)

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela

Por el Bachiller Jhoniel Perdigón Ferreira.

Como requisito parcial para optar al título

De Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Jorge Luis Pérez – Emán

Caracas, Venezuela

Octubre, 2013



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

El presente Trabajo Especial de Grado "Filogeografía y patrones de diferenciación genética de las especies de colibríes pertenecientes al género *Agelaiocercus* (Zimmer 1930)" fue defendido públicamente por el Br. Jhoniel Perdigón Ferreira el 24 de octubre de 2013 en la Universidad Central de Venezuela y aprobado por el siguiente jurado

Dr. Jorge Pérez – Emán
Tutor

Dr. Miguel Lentino
Jurado Principal

Dr. Adriana Rodríguez – Ferraro
Jurado Suplente

Agradecimientos

A la Universidad Central de Venezuela, por ser la casa de estudio que permitió desarrollar mi carrera profesional. Gracias por todo lo que me ha dado como institución.

A la Facultad de Ciencias, lugar donde gracias al esfuerzo y dedicación de cada uno de sus integrantes, en especial los profesores, logré obtener las herramientas necesarias para formarme como biólogo.

A mi tutor, Jorge Pérez, con quien estoy muy agradecido por muchas cosas. Primero, por ser una persona que con su dedicación y constancia me enseñó lo que significa comprometerse con lo que se quiere. Luego, porque con sus clases me inspiró a querer conocer y desarrollarme en el área de la biogeografía. También quiero agradecerle por abrirme las puertas en su laboratorio y aceptarme como estudiante. De igual manera, quiero agradecerle porque por encima de cualquier cosa me ha brindado su amistad y siempre ha estado abierto a escucharme y brindarme sus consejos. Gracias por ser tan excelente profesor, tutor, amigo, persona. Espero que podamos compartir muchas experiencias más.

A los miembros del jurado, Miguel Lentino, Juan Carlos Navarro y Adriana Rodríguez, por aceptar participar como evaluadores de este proyecto y por brindar distintas sugerencias que ayudaran a mejorar el trabajo.

A los miembros del Laboratorio de Biología y Conservación de Aves, Jhonathan Miranda y Marialejandra, gracias por el entrenamiento y la colaboración prestada durante la realización del proyecto. Sin ustedes hubiese sido difícil, sino imposible, realizar este trabajo.

A los integrantes del Laboratorio de Biología de Vectores, en especial al profesor Juan Carlos Navarro, por abrir las puertas de su laboratorio y permitir que se realizara el trabajo de laboratorio en su espacio.

A nuestros colaboradores en el exterior, Oscar Laverde, Andrés Cuervo, Christopher Witt y Elisa Bonaccorso. Para ustedes, mi eterno agradecimiento por los aportes tan significativos a este trabajo.

A mis padres, les agradezco el apoyo no sólo para realizar este trabajo sino por el soporte durante toda la carrera y en general, a lo largo de mi vida. Gracias por todo lo que me han dado. Para ustedes, mi amor.

A Victoria, por ser mi soporte emocional durante este último año y medio. Gracias por todo el amor, las palabras y los momentos. Eres increíble.

A mis familiares, quienes siempre me han apoyado y han estado pendientes de cómo iba desarrollándose el trabajo. Gracias por su cariño, los quiero.

A Luisana, difícilmente se puede conseguir una amistad tan sincera como la que me has brindado, te quiero, gracias por todo y espero que podamos compartir muchos años más.

A mis amigos, especialmente a aquellos con los que he compartido este y otros momentos importantes de mi vida. Leomar, Eduardo y Rosana, gracias por todos estos años de amistad. Espero podamos seguir compartiendo.

A todos aquellos con los que compartí estos años en la universidad, gracias por todo ya que con cada experiencia que compartimos fui forjándome como biólogo y como persona.

Resumen

La región Neotropical posee una gran diversidad de organismos, siendo una región de gran interés para la realización de estudios biogeográficos y evolutivos. Las aves son uno de los grupos más diversos dentro del sistema montañoso andino, destacando la familia Trochilidae (colibríes), en la cual se encuentra el género *Agelaiocercus*. Este género habita en la región andina y las cadenas montañosas del norte de Venezuela y está actualmente conformado por tres especies (*A. kingi*, *A. coelestis* y *A. berlepschi*). Los límites de especies en *Agelaiocercus*, cuya diversificación se presume haya ocurrido en el Pleistoceno, no están claros y diferentes autores consideran un número diferente de especies para este género. La realización de un estudio con caracteres moleculares para el establecimiento de relaciones filogenéticas puede generar información que ponga a prueba diferentes hipótesis sobre la taxonomía y el origen del género. Con este objetivo, utilizamos caracteres moleculares para generar una hipótesis de relación filogenética entre los diferentes taxa reconocidos para el género *Agelaiocercus* y evaluamos las hipótesis taxonómicas y biogeográficas realizadas previamente por otros autores. Secuenciamos el gen mitocondrial ND2 y el gen nuclear MUSK para 126 ejemplares que representan las distintas variantes geográficas del género. Generamos una hipótesis filogenética del género utilizando análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud. La hipótesis filogenética obtenida resultó en una politomía que no permite evaluar la monofilia del género o las relaciones entre los distintos linajes obtenidos para el género. La comparación de nuestra hipótesis filogenética con los caracteres morfológicos de los machos indicó la falta de señal filogenética de los últimos. Los altos valores de diversidad genética obtenidos junto con la longitud de las ramas de los árboles filogenéticos sugieren que la divergencia poblacional ocurrió en un periodo corto de tiempo y que posteriormente las poblaciones han permanecido aisladas. El valor de divergencia genética general promedio fue de 6,1%. El tiempo de origen y divergencia del género corresponde al periodo comprendido entre el Plioceno y el Pleistoceno. Los resultados permitieron ampliar la información que se tiene sobre los patrones filogeográficos de especies de aves montañas de la Región Neotropical, particularmente de la historia evolutiva de los colibríes, así como del papel de las áreas montañas en el origen y mantenimiento de la alta diversidad presente en ellas.

Tabla de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	8
2.1	El género <i>Aglaiocercus</i>	9
2.2	Límites entre especies.....	13
2.3	Escenario evolutivo del género.....	23
3	Objetivos.....	26
3.1	Objetivo general.....	26
3.2	Objetivos específicos.....	26
4	Materiales y Métodos.....	27
4.1	Toma de muestras.....	27
4.2	Extracción, amplificación y secuenciación del ADN.....	29
4.3	Análisis filogenético.....	30
4.4	Contraste de hipótesis filogenéticas.....	32
4.5	Índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, red de haplotipos y análisis demográfico.....	32
4.6	Tiempos de divergencia.....	34
5	Resultados.....	37
5.1	Análisis filogenético.....	37
5.2	Índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, red de haplotipos y análisis demográfico.....	43
5.3	Tiempos de divergencia.....	47
6	Discusión.....	48

6.1 Monofilia del género <i>Aglaiocercus</i>	48
6.2 Relaciones filogenéticas entre las distintas formas del género <i>Aglaiocercus</i>	50
6.3 Caracteres genéticos, morfológicos y geografía: su implicación taxonómica.....	53
6.4 Evolución y biogeografía.....	57
7 Conclusión.....	63
8 Bibliografía.....	64
9 Anexo.....	78

Índice de tablas

Tabla 4.1 Cebadores utilizados en este estudio para la amplificación de los genes ND2 y MUSK.....	30
Tabla 5.1 Índices de diversidad haplotípica, nucleotídica y pruebas de neutralidad para cada uno de los linajes obtenidos en los análisis filogenéticos realizados para el gen ND2. En rojo se muestran aquellos valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$).....	44
Tabla 5.2 Valores de divergencia genética (distancia-p), expresada en porcentaje, para los distintos linajes obtenidos para el género <i>Aglaiocercus</i> empleando el gen ND2. La diagonal en color rojo indica los valores de divergencia genética dentro de cada linaje.....	47

Índice de figuras

Figura 2.1 Árbol Bayesiano consenso que muestra las relaciones filogenéticas de algunas especies pertenecientes a varios linajes de la familia Trochilidae. Se observa que las especies <i>Taphrolesbia griseiventris</i> , <i>Heliangelus zusii</i> y <i>Adelomyia melanogenys</i> son las más cercanamente relacionadas al género <i>Agelaiocercus</i> . Los números en los nodos indican probabilidades posteriores Bayesianas/Valor de bootstrap de Máxima Verosimilitud (1000 pseudoréplicas)/Índice de Bremer para Máxima Parsimonia (modificado de Kirchman y col., 2010).....	12
Figura 2.2 Propuestas taxonómicas del género <i>Agelaiocercus</i> (<i>Cyanolesbia</i>) durante la última década del siglo XIX. El símbolo “-” indica que la propuesta no hace referencia a dicha forma.....	16
Figura 2.3 Propuestas taxonómicas del género <i>Agelaiocercus</i> (<i>Cyanolesbia</i> y <i>Lesbia</i>) realizadas por distintos autores.....	20
Figura 2.4 Patrones de coloración de las distintas especies y subespecies que conforman el género <i>Agelaiocercus</i> (Modificado de Schuchmann, 1999).....	22
Figura 2.5 Distribución espacial de las especies y subespecies pertenecientes al género <i>Agelaiocercus</i> (modificado de Schuchmann y Duffner, 1993).....	23
Figura 2.6 Posible radiación del género <i>Agelaiocercus</i> durante el Pleistoceno y Post-Pleistoceno. Las flechas indican la dirección de la colonización. (a) Colonización del Proto- <i>Agelaiocercus</i> desde el sur (1) hacia el norte (2) durante los periodos pluviales del Pleistoceno. (b) Aislamiento de la población occidental andina (1) y la población oriental de Venezuela (2) durante los periodos secos. (c) Aislamiento y especiación de las subespecies existentes. (Modificado de Schuchmann y Duffner, 1993).....	25
Figura 4.1 Distribución geográfica del género <i>Agelaiocercus</i> (fondo azul claro) con la localización de las muestras incluídas en este trabajo. La distribución potencial de cada especie fue obtenida de InfoNatura: Aves, Mamíferos y Anfibios de América Latina [Aplicación de página web]. 2007. Version 5.0. Arlington, Virginia (USA): NatureServe. Disponible en: http://www.natureserve.org/infonatura (Acceso: Noviembre 22, 2012).....	28

Figura 5.1 Hipótesis de relaciones filogenéticas entre linajes del género *Agelaiocercus* para los genes ND2, MUSK y ambos genes concatenados empleando los métodos de MP y MV. En todos los casos se muestra el árbol obtenido por el método de MV. Los asteriscos rojos y azules sobre los nodos representan valores de bootstrap mayores a 75% (MP/MV). Los códigos corresponden a las muestras empleadas (Anexo 1). En rojo se resaltan la especie *Taphrolesbia griseiventris* (hipótesis obtenida para el gen ND2) y los haplotipos ID: A78 (hipótesis obtenida para el gen ND2), A83 y A84 (hipótesis obtenida para ambos genes concatenados; ver texto).....40

Figura 5.2 (a) Hipótesis de relaciones filogenéticas entre los principales linajes del género *Agelaiocercus* obtenidas por el método de MV para el gen ND2. Los asteriscos sobre los nodos indican un soporte mayor al 75%. Red de haplotipos de los principales linajes (A – I). Cada color indica la ubicación geográfica de las muestras. El haplotipo con borde negro indica a aquel definido como haplotipo ancestral. (b) Mapa de ubicación geográfica de las muestras. Los números indican las principales barreras geográficas que podrían estar impidiendo el flujo genético entre poblaciones. (1) Depresión de Unare; (2) Depresión Turbio – Yaracuy; (3) Valle del Río Marañón; (4) Valle Urubamba.....41

Figura 5.3 Hipótesis filogenética obtenida para el gen ND2 y patrones de coloración de la garganta y la cola de los machos en el género *Agelaiocercus*. Los asteriscos rojos sobre los nodos indican un soporte estadístico mayor al 75%.....42

Figura 5.4 Distribución desajustada de los haplotipos pertenecientes a los distintos linajes definidos para el gen ND2, asumiendo un modelo de crecimiento poblacional. Se representan tanto las distribuciones observadas (línea roja punteada) como las esperadas bajo un modelo de expansión poblacional (línea verde continua). Ver Tabla 5.1 para la significancia estadística de estos resultados.....44

Figura 5.5 Red de haplotipos del género *Agelaiocercus* para el gen nuclear MUSK de todas las muestras secuenciadas. La circunferencia bordeada en negro representa el haplotipo ancestral..46

Figura 6.1 Hipótesis filogenética sugerida para las distintas formas del género *Agelaiocercus* en función de los resultados obtenidos de nuestros análisis filogenéticos.....57

1 Introducción

Los patrones de variación geográfica de caracteres fenotípicos y genotípicos son comunes a la gran mayoría de los organismos vivos. La variación geográfica se refiere a las distintas formas en las que una característica puede presentarse a lo largo de la distribución espacial de un organismo. Su estudio es de gran importancia ya que, al tener conocimiento sobre los distintos patrones fenotípicos y genotípicos que puede presentar un organismo, se pueden realizar inferencias sobre los procesos que determinan dichos patrones.

El estudio de los patrones de diferenciación geográfica puede realizarse examinando prácticamente cualquier característica del organismo (p. ej. morfología, vocalizaciones, comportamiento, rasgos moleculares). Tradicionalmente, los estudios realizados con aves empleaban caracteres morfológicos al momento de describir la variación geográfica presente en poblaciones de una especie, y así, a nivel comparativo, definir límites entre especies (Brumfield y Remsen, 1996; Mayr, 1970). Sin embargo, actualmente se utilizan otro tipo de caracteres, principalmente vocalizaciones (Isler y col., 2001, 2005; Zimmer, 2002), comportamiento (Areta, 2007) y caracteres moleculares (Brumfield, 2005; Zink y col., 2005) teniéndose que la integración entre caracteres es cada vez más común (Cadena y Cuervo, 2010; Zimmer, 2002; Zink y col., 2005). En relación a los caracteres morfológicos, la integración de información ha permitido observar que, en ocasiones, un cambio en una característica morfológica no corresponde necesariamente a un cambio genético (Greenberg y col., 1998; Pérez-Emán y col., 2010; Zink y Remsen, 1986). Por lo tanto, la realización de estudios con caracteres moleculares, dentro del contexto de la variación geográfica presente en una especie, permite evaluar la congruencia existente entre los patrones de variación asociados a diferentes tipos de caracteres (Zink y Remsen, 1986) y, con ello, generar hipótesis sobre mecanismos o procesos evolutivos asociados a los patrones encontrados.

La filogeografía es una subdisciplina de la biogeografía que se encarga del estudio de los patrones de distribución geográfica de los linajes evolutivos de organismos definidos por rasgos moleculares (Avice y col., 1987). La filogeografía hace énfasis en los procesos históricos (eventos geológicos y/o climáticos) que determinaron la distribución espacial actual que presentan los distintos organismos. A través del análisis filogeográfico de las especies es posible conocer patrones geográficos del componente genético de la biodiversidad (Avice, 1998, 2000, 2009). Esto se realiza partiendo del principio de que existe una conexión entre la geografía y la estructura genética de las especies, lo que permite realizar inferencias sobre los procesos que modelaron la estructura filogeográfica actual si se analizan los procesos propios de las poblaciones (demográficos y genealógicos) a la par con aquellos que son propios de la Tierra (geológicos y climáticos; Domínguez-Domínguez, 2009).

Los estudios filogeográficos permiten realizar la reconstrucción de la historia biogeográfica de organismos utilizando la distribución geográfica actual de sus caracteres genéticos (Chaves y col., 2007; Milá y col., 2007; Spellman y col., 2007). Por otra parte, el uso de la filogeografía en la taxonomía ha generado un aporte al momento de establecer los límites entre especies ya que cuando se emplean caracteres moleculares y se encuentra una fuerte estructura genética (o ausencia de ella) asociada a la geografía se puede dar soporte o no a las propuestas taxonómicas aceptadas hoy en día y, en último caso, puede generar hipótesis taxonómicas alternativas (Gutiérrez-Pinto y col., 2012; Weir y col., 2008). Por lo general, los estudios filogeográficos combinan aspectos de la biogeografía y la taxonomía (Cabanne y col., 2008; García-Moreno y col., 2006) lo que convierte a la filogeografía en una disciplina integradora (Avice, 1998; Domínguez-Domínguez, 2009).

La gran diversidad de organismos presente en la Región Neotropical convierte a esta región en un área de interés para la realización de estudios filogeográficos. En particular, los patrones geográficos de la diversidad genética pueden ser utilizados para poner a prueba hipótesis de diversificación, incluyendo la dimensión temporal de las mismas. La diversificación de organismos que habitan en las tierras bajas de la Región Neotropical ha sido explicada por diversos factores históricos (Haffer, 1997; Wesselingh y col., 2010). Sin embargo, gran parte del debate se ha centrado en validar la hipótesis de diversificación asociada a los refugios climáticos (Haffer, 1969). Esta hipótesis sugiere que gran parte de la diversificación de las especies del Neotrópico ocurrió durante los episodios de fluctuaciones climáticas que se dieron durante el Pleistoceno, fluctuaciones que ocasionaron la fragmentación repetida de los hábitats, los cuales, al contraerse y expandirse repetidamente, promovieron la diversificación de los organismos allí presentes (Haffer, 1969, 1974; Haffer y Prance, 2001; Simpson y Haffer, 1978). Aunque la hipótesis de refugio fue inicialmente postulada para explicar la diversificación de los organismos en tierras bajas de la Región Neotropical, las fluctuaciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno también pudieron fragmentar los hábitats en las tierras altas de la región (particularmente en los Andes) y, por lo tanto, afectar a la diversidad de organismos allí presentes (Fjeldså, 1994; Simpson, 1975; Vuilleumier, 1971).

El levantamiento del sistema montañoso andino ocasionó cambios significativos en la geografía de la Región Neotropical. El surgimiento de esta cadena montañosa, muy dinámico durante el Cenozoico Tardío (Gregory-Wodzicki, 2000), está asociado, por ejemplo, con el origen de las características áridas del desierto de Atacama (Houston y Hartley, 2003) y el cambio del curso del río Orinoco en el norte de Suramérica (Díaz de Gamero, 1996). La historia dinámica del surgimiento de la Cordillera de Los Andes, en conjunto con las fluctuaciones climáticas, pudieron tener un efecto sobre la biodiversidad de aves allí presentes al generar oportunidades de

diversificación al crear condiciones de aislamiento y/o dispersión para los taxa allí presentes (Bates y Zink, 1994; Chaves y col., 2007; Cheviron y col., 2005; García - Moreno y col., 1999; Pérez-Emán, 2005).

Diversos procesos han sido asociados a la generación de la diversidad de aves que habitan las zonas montanas de la Región Neotropical. Algunos estudios sugieren que las aves que habitan los bosques andinos diversificaron durante todo el desarrollo de la cadena montañosa de los Andes del norte, con una cantidad menor de eventos de especiación durante los períodos glaciales del Pleistoceno (García - Moreno y Fjeldså, 2000; Ribas y col., 2007). Otros resultados sugieren que la diversificación de aves en tierras altas fue aumentando a lo largo del Plioceno y que durante el Pleistoceno Tardío alcanzó un máximo (Weir, 2006). Este último resultado es consistente con la hipótesis de que las fluctuaciones climáticas ocurridas durante dichos períodos fue el factor principal asociado a la diversificación de la fauna en la Región Neotropical. De igual forma, el intercambio de fauna entre tierras altas y tierras bajas, principalmente durante el Mioceno tardío y el Plioceno temprano, jugó un papel importante en la diversificación de especies que habitan la región montana (generación de nuevos hábitats con el levantamiento de los Andes; Weir, 2006).

La complejidad geográfica de las zonas montanas está asociada con un alto nivel de endemismo. La congruencia en la distribución restringida de las especies presentes en la región montana ha permitido definir centros de endemismo (Cracraft, 1985), cuyos límites coinciden en muchos casos con barreras geográficas (por ejemplo, valles ribereños interandinos) que podrían estar limitando el flujo genético y promoviendo la diversificación de especies (Vuilleumier, 1969). En efecto, muchas de las especies distribuidas en bosques húmedos del sistema montano Neotropical presentan poblaciones genéticamente diferenciadas asociadas a centros de endemismo, siendo la diferenciación genética mayor entre las regiones que se encuentran

separadas por tierras bajas y por valles ribereños áridos y profundos (Weir, 2009). Sin embargo, el papel que juegan tales barreras no es claro ya que, si bien existen grupos de organismos que parecen haber diferenciado o especiado a lados opuestos de las barreras (Ribas y col., 2007), existen otros que se distribuyen a lo largo de las mismas y ocupan distintas regiones de endemismo sin presentar una diferenciación aparente (Cadena y col., 2007). Es importante, entonces, que se realicen estudios filogeográficos que documenten los patrones de especiación en grupos poco estudiados para poder tener una mayor y mejor comprensión de los procesos que han generado la gran diversidad de organismos que habitan en las regiones montañosas del Neotrópico.

Las aves son uno de los grupos más diversos dentro del sistema montañoso andino. Dentro de este grupo se encuentran los colibríes (familia Trochilidae), su origen es considerado Neotropical (aunque estudios recientes han propuesto que existían colibríes en Europa durante el período Terciario Temprano; Mayr, 2004). Los colibríes son la familia de aves más numerosa de la Región Andina con aproximadamente unas trescientas veintiocho especies agrupadas en dos subfamilias, Phaethornithinae y Trochilinae (McGuire y col., 2007; Schuchmann, 1999). Su origen se asocia con las tierras bajas de Suramérica desde donde colonizarían Centroamérica y Norteamérica (McGuire y col., 2007); sin embargo, una parte de la diversidad de colibríes (Trochilinae) ha evolucionado potencialmente en las zonas altas de la Región Andina, donde habitan aproximadamente unas 79 especies de las aproximadamente 294 especies de colibríes descritas para esta subfamilia (McGuire y col., 2007, Schuchmann, 1999).

La diversidad de colibríes presente en los Andes podría estar respondiendo a los eventos geológicos y climáticos que han afectado a este sistema montañoso. Los pocos estudios filogeográficos realizados sugieren eventos de especiación ocurridos desde el Mioceno al

Pleistoceno, apoyando el papel de la evolución geológica y los cambios climáticos ocurridos en esta región (Chaves y col., 2007; Chaves y Smith, 2011; García-Moreno y col., 1999; Parra y col., 2009). Adicionalmente, la Cordillera Andina genera un gradiente ambiental (altitudinal) que podría actuar como barrera geográfica de dispersión, resultando en una estructura comunitaria y filogenética de colibríes propia de los Andes (Graham y col., 2009). Sin embargo, a pesar de diversos trabajos realizados sobre la ecología de estos organismos (p. ej. Feinsinger y col., 1982; Stiles, 1975), así como de su sistemática (Bleiweiss y col., 1997; McGuire y col., 2007; Schuchmann, 1999), se sabe muy poco sobre la historia evolutiva de los géneros que conforman la familia. Estudiar los procesos de especiación que han ocurrido en colibríes presentes en la Región Andina permitirá obtener una mejor comprensión de cuál ha sido el papel de la Cordillera de los Andes en la generación y mantenimiento de la diversidad de este grupo de aves y permitirá tener un mejor conocimiento sobre la historia evolutiva del grupo.

Dentro de la familia Trochilidae, y más específicamente en la subfamilia Trochilinae, se encuentra el género *Agelaiocercus* (Zimmer, 1930). Este género habita en las zonas montañas de Suramérica (900-3000 m) y está conformado por tres especies (Remsen y col., 2013; Schuchmann y Duffner, 1993). Dos de estas especies se distribuyen a lo largo de la Cordillera de Los Andes, *A. coelestis* y *A. kingi*, esta última igualmente presente en la Cordillera de la Costa de Venezuela. La otra especie es endémica de la Serranía del Turimiquire, al noreste de Venezuela, *A. berlepschi* (Hilty, 2003).

El género *Agelaiocercus* posee una historia taxonómica compleja (Zimmer, 1952). Desde su descripción, sus especies han sido incluidas en diversos géneros, definidos en función de caracteres morfológicos (Stejneger, 1885; Stone, 1907; Zimmer, 1930). Igualmente, las relaciones filogenéticas dentro del género no son claras debido a la falta de congruencia en presencia de los

diferentes caracteres fenotípicos utilizados en su descripción y la interpretación de su variación dentro y entre poblaciones (Chapman, 1917; Zimmer, 1952). Sin embargo, la utilización exclusiva de caracteres morfológicos para establecer límites entre especies puede generar conclusiones taxonómicas no congruentes con su historia evolutiva (Crochet y col., 2000; Marks y col., 2002; Omland y Lanyon, 2000). La caracterización de la variación geográfica del género a nivel molecular, así como la realización de estudios filogenéticos con estos caracteres, generará información que se pueda contrastar con las diferentes hipótesis propuestas sobre su taxonomía. Por otro lado, la única propuesta sobre el marco temporal de diversificación del género fue realizada por Schuchmann y Duffner (1993), quienes sugieren que la actual diversidad del género fue el resultado de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno con base en las escasas diferencias morfológicas que pueden observarse entre los diferentes taxa.

En este trabajo se utilizarán caracteres moleculares para reconstruir las relaciones filogenéticas entre las diferentes especies del género *Agelaiocercus*. Los resultados que se obtengan permitirán evaluar y comparar las hipótesis taxonómicas y biogeográficas realizadas previamente por otros autores con la propuesta en este estudio. Igualmente, este estudio permitirá ampliar la información disponible sobre los patrones filogeográficos de especies de aves montanas de la Región Neotropical, así como del papel de las áreas montanas en el origen y mantenimiento de la alta diversidad presente en ellas.

2 Antecedentes

La familia Trochilidae se encuentra conformada por unas 328 especies reconocidas que habitan principalmente en la Región Neotropical (con algunas especies presentes en zonas templadas) y se conocen con el nombre de colibríes. Esta diversidad de especies se agrupa en dos subfamilias, Phaethornithinae, con unas 34 especies, y Trochilinae, con 294 especies (Schuchmann, 1999). Esta familia es un grupo monofilético (McGuire y col., 2007; Schuchmann, 1999) cuyo origen se ha estimado entre finales del Cretáceo Tardío y principios del Terciario (entre 70 y 65 millones de años atrás, aproximadamente; Schuchmann, 1999). Se ha propuesto que este grupo se originó en las tierras bajas de Suramérica y posteriormente invadió tanto las regiones montañosas de Suramérica como también Centroamérica y Norteamérica (Bleiweiss, 1998). Sin embargo, estudios recientes describen restos fósiles de colibríes del Terciario Temprano de Europa, proponiendo una distribución geográfica del grupo más amplia en el pasado que la actual (Mayr, 2004).

Dentro de la Región Neotropical, los Andes posee la mayor diversidad de colibríes (Schuchmann, 1999). Esta diversidad es producto de procesos de dispersión y vicarianza, cuya importancia ha variado potencialmente a lo largo de la historia del grupo. Aunque se ha propuesto un origen en las tierras bajas de Suramérica, estudios recientes indican que una parte importante de la diversidad de colibríes existente en la actualidad se originó en las tierras altas de los Andes (alturas mayores a 2000 metros) donde 7 de los 9 linajes principales de colibríes se encuentran representados (McGuire y col., 2007). Entre los factores potencialmente asociados con esta diversificación podemos mencionar el aislamiento geográfico y la adaptación a nuevos hábitats. Estos estudios también indican al menos 10 eventos de invasión hacia los Andes y 5 eventos de dispersión desde los Andes (McGuire y col., 2007), sugiriendo que la colonización de nuevos

hábitats o regiones ha sido un proceso importante en determinar la composición de ensambles de colibríes en los Andes. Por otra parte, la variedad de linajes presentes en la región, varios de los cuales potencialmente invadieron desde tierras bajas, sugiere que factores generales, y no particulares para cada linaje, facilitaron las invasiones al sistema montañoso (Bleiweiss, 1998). Estos patrones sugieren una historia evolutiva muy dinámica de los colibríes presentes en la región andina y una asociación entre la diversificación de este grupo y la historia del sistema montañoso. Sin embargo, aún se sabe poco sobre cómo ha surgido tal biodiversidad y cómo se mantiene.

El género *Agelaiocercus* es característico de las regiones montañas del Neotrópico y se distribuye en los Andes y las cadenas montañosas del norte de Venezuela. Este género posee una historia taxonómica compleja en la que resalta: (1) la asignación de sus especies a diferentes géneros hasta la descripción del género en el cual se incluyen actualmente y (2) diferencias en la cantidad de especies y subespecies aceptadas por diversos autores, por lo que el problema taxonómico ha sido, luego de definir el género, establecer los límites entre especies. Estos límites se han definido en función de caracteres morfológicos, principalmente la coloración del plumaje, cola y tamaño del pico entre los machos y la coloración de las hembras, además de la interpretación de la variación de estos caracteres dentro y entre poblaciones.

2.1 El género *Agelaiocercus*

Antes de conocerse con el nombre que actualmente lo define (*Agelaiocercus*), este grupo de colibríes fue incluido en varios géneros. El nombre *Cynanthus*, con el cual se describieron algunas de las especies del género, fue descrito originalmente por Swainson en 1827 (*Zoological Journal*). En esta descripción, Swainson incluyó a cuatro especies, todas como tipo, las cuales hoy en día pertenecen a cuatro géneros distintos (ninguno corresponde a *Agelaiocercus*). Sin embargo, a pesar de ser ésta la publicación donde se describe por primera vez al género, otra publicación

del autor incluyendo este género sale con anterioridad (The Philosophical Magazine, Swainson 1827), mencionando a *C. latirostris*, especie válida actualmente que correspondería al tipo de este género (por reglas de prioridad). En 1837, Swainson vuelve a definir el género pero sin incluir a ninguna de las especies anteriores sino a *C. forficatus*, la cual fue descrita inicialmente como *Trochilus forficatus* (Linneo, 1758). Sin embargo, debido a que esta especie no estuvo incluida en la descripción inicial del género y, por lo tanto, éste no estaba disponible, Stejneger (1885) crea el nombre *Cyanolesbia*, designando a *C. forficata* (Linn.) como tipo. Sin embargo, la descripción de la especie *T. forficatus* (Linneo, 1758) se realizó en función de un ejemplar que había sido descrito como "*Polytmus major nigricans*" por Browne (1756) y basado en una lámina de color denominada "*Long – tailed Green Hummingbird*" por Edwards (1743). Sin embargo, la lámina de Edwards citada por Linneo no se corresponde con la descripción de Browne, siendo esta última la que corresponde al *Trochilus polytmus* de Linneo. Como consecuencia, *Trochilus forficatus* es sinónimo de *T. polytmus* y, resultado lógico, *Cyanolesbia* es igualmente sinónimo de *Trochilus* (Zimmer 1930). Basado en esto, Zimmer (1930) propone la necesidad de crear un nuevo nombre, *Agelaiocercus*, para definir al género ya que los que se habían empleado anteriormente no eran válidos, incluyendo al género *Lesbia* (utilizado por Simon (1921) para estas especies), que al igual que en los casos anteriores, se definió en función de *T. forficatus* e incluyó la especie que hoy en día representa el tipo del género, *L. nuna*.

La designación del ejemplar tipo de *Agelaiocercus* no ha sido menos complicada. El problema surge porque el ejemplar de la lámina de Edwards (1743) se asemeja a un *Agelaiocercus*, pero indica que la localidad es Jamaica (sitio donde actualmente se encuentra la especie *Trochilus polytmus* que corresponde al ejemplar de Browne y la descripción de Linneo). Zimmer (1930) designó como tipo a *Ornismya kingii* de Lesson (1832), especie basada en un ejemplar de la colección de Loddiges en Inglaterra (probablemente colectado en Colombia), similar al "*Long-*

tailed Green Hummingbird“ de Edwards y cuya procedencia de Jamaica fue puesta en duda por Boissonneau (1840) en una revisión de aves de Santa Fe de Bogotá. Igualmente, Salvin (1892) sugiere que el uso del ejemplar representado en la lámina de Edwards no es confiable descartando el uso de *Trochilus forficatus*. Vale la pena resaltar que Zimmer denomina el epíteto específico con dos letras “i”. Actualmente (Remsen y col., 2013), el nombre de la especie es escrito empleando una sola letra “i” (*kingi*). Esto es aparentemente un error ya que el nombre original de la especie tipo es *Ornismya kingii* (Lesson, 1832) pero Salvin (1892) incluye *Trochilus kingi* como sinónimo de *Cyanolesbia gorgo*, taxón que hoy día corresponde a *Agelaiocercus kingi* (Hartert 1897) (Zoonomen Nomenclatural data, 2013).

Las relaciones filogenéticas del género *Agelaiocercus* han sido revisadas en el contexto de estudios sistemáticos de la familia Trochilidae. Estudios recientes indican que el género es monofilético, aunque sólo se consideraron dos de las especies, *kingi* y *coelestis* (McGuire y col., 2007). Las relaciones filogenéticas con otras especies no están claras por la baja resolución obtenida a este nivel en estudios moleculares. Las especies hoy día consideradas como las más relacionadas con el género *Agelaiocercus* son *Taphrolesbia griseiventris*, *Heliangelus zusii* (conocido de una piel de “Bogotá” y descrito recientemente por Graves (1993)) y *Adelomyia melanogenys* (Fig. 2.1; Kirchman y col., 2009; McGuire y col., 2007). *Taphrolesbia griseiventris* fue originalmente incluida dentro de los géneros *Cynanthus* y *Cyanolesbia* (Taczanoswski 1883, Salvin 1892) pero Hartert, en 1898, consideró su exclusión de *Cyanolesbia* debido a las diferencias en el pico (largo, recto, puntiagudo y fuerte), la anchura de las rectrices y los patrones de coloración de ambos sexos. Esta especie fue posteriormente incluida dentro de un género nuevo, *Taphrolesbia* (Simon, 1918), monotípico, y con el cual se sigue denominando en la actualidad.

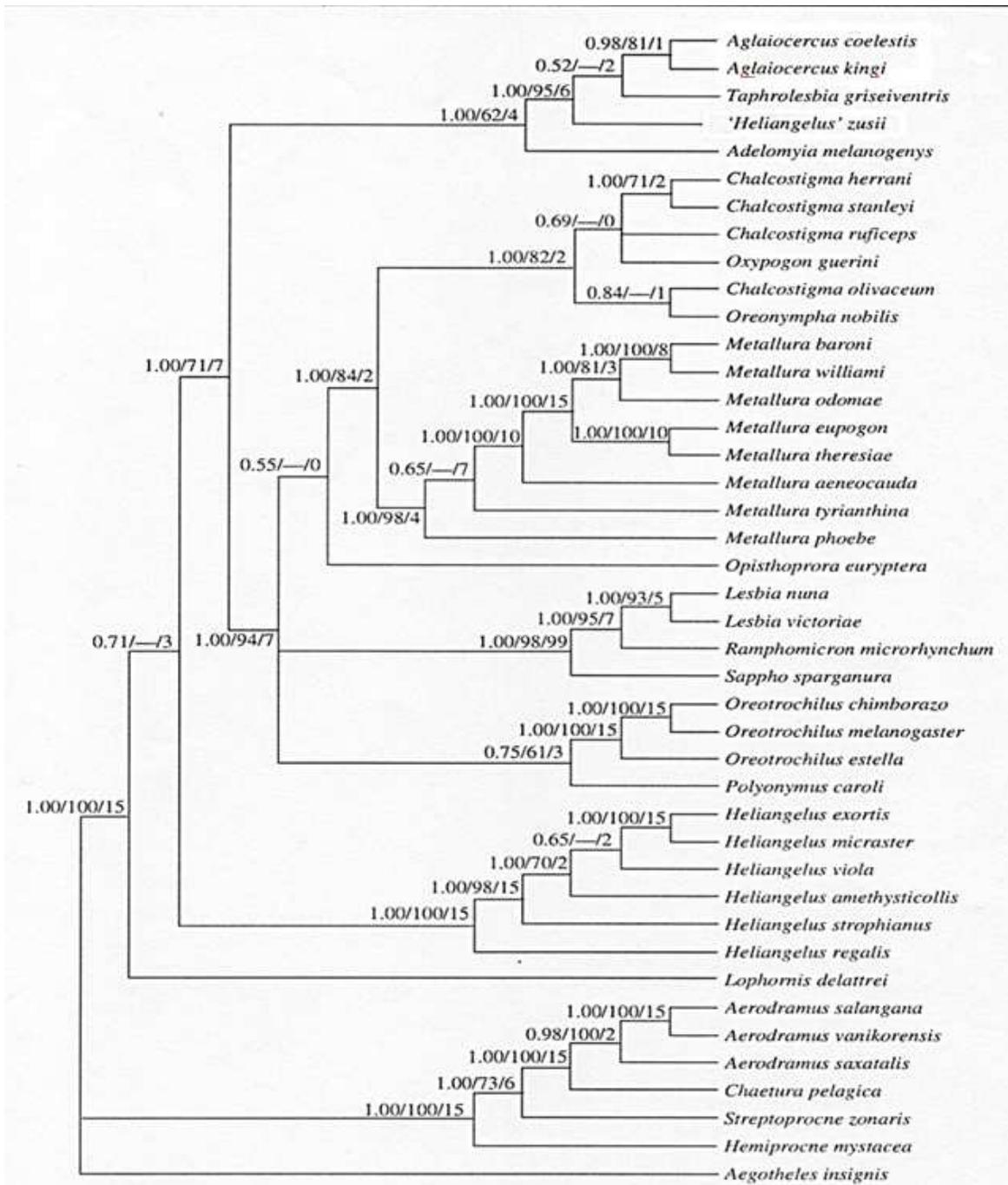


Figura 2.1 Árbol Bayesiano consenso que muestra las relaciones filogenéticas de algunas especies pertenecientes a varios linajes de la familia Trochilidae. Se observa que las especies *Taphrolesia griseiventris*, *Heliangelus zusii* y *Adelomyia melanogenys* son las más cercanamente relacionadas al género *Aglaiocercus*. Los números en los nodos indican probabilidades posteriores Bayesianas/Valor de bootstrap de Máxima Verosimilitud (1000 pseudoréplicas)/Índice de Bremer para Máxima Parsimonia (modificado de Kirchner y col., 2009).

2.2 Límites entre especies

Los límites entre las especies de *Aglaiocercus* han variado a lo largo de la historia taxonómica del género por dos razones principales. (1) A medida que se realizaban nuevas colectas y expediciones se tenía un mayor y mejor conocimiento de la distribución geográfica de cada uno de los taxa previamente descritos y, (2) los límites entre especies han variado de acuerdo a la interpretación que cada uno de los autores le ha dado a las variaciones morfológicas encontradas entre y dentro las distintas poblaciones conocidas del género.

Durante la última década del siglo XIX se realizaron al menos cinco revisiones de las especies que conformaban el género hasta entonces conocido como *Cyanolesbia* (Berlepsch, 1892; Boucard, 1895; Hartert, 1897a, 1897b, 1898; Hartert y Hartert, 1894; Salvin, 1892; Fig. 2.2). En cada uno de estos trabajos, los autores realizaron descripciones de nuevas formas así como de las distintas formas que para el momento eran consideradas válidas para el género. Sin considerar a la especie hoy en día incluida dentro del género *Taphrolesbia*, Salvin (1892) consideró 4 especies: (1) *C. gorgo*, para la cual reconoce hasta cinco (5) formas o variedades: *gorgo*, una forma ya previamente reconocida por Heine (1863) como *margarethae*, y otras tres que las denomina “a”, “c” y “e”. Salvin consideraba que por la poca información sobre la procedencia de los especímenes evaluados probablemente se estaban agrupando a distintas formas en una sola especie pero que por dicha razón no podía separarlas. Morfológicamente, el macho de la forma *gorgo* difiere del resto de las formas en que éste posee la parte superior de un color verde grama brillante y oscuro (la del macho de la forma *margarethae* es verde claro por arriba); la mancha en la garganta es azul zafiro (el macho de la forma “c” no posee la mancha en la garganta, es verde); la cola azul-violeta, negra en la base, la parte expuesta de las ocho plumas más internas frecuentemente de color verde brillante en las puntas (en *margarethae* todas las rectrices, excepto el par lateral son verde

brillante, como las de *mocoa*. Adicionalmente, el macho de la forma “a” tiene la cola prácticamente azul-violeta en la parte superior expuesta y algunos machos de la forma “e” poseen la cola totalmente violeta y difieren de otros que poseen las rectrices centrales más o menos verdes). La hembra posee la parte superior de color verde plateado brillante, la corona verde brillante, por debajo es castaña y la garganta es blanca con un disco verde en cada pluma. (2) *C. coelestis*, una especie similar a *gorgo* pero con el cuerpo y el pico más largo y la parte inferior más marrón. En la hembra, la corona cambia de verde brillante a azul brillante y el pecho es siempre blanco. (3) *C. mocoa* cuyas diferencias principales con *gorgo* eran la parte superior expuesta de la cola de color verde brillante y la mancha en la garganta azul zafiro. Por último, (4) *C. smaragdina* con el macho parecido a *mocoa* pero con la cola más corta y con la mancha de la garganta de color azul verdoso pálido brillante.

La disponibilidad de un mayor número de ejemplares de procedencia conocida permitió un mejor conocimiento de la variabilidad incluida en *C. gorgo*. Berlepsch, en 1892, describe dos nuevas especies (*C. caudata* y *C. emmae*) las cuales, por su distribución geográfica y morfología, correspondían a las formas que Salvin denominó “c” (Mérida, Venezuela) y “e” (pieles de Bogotá, con un ejemplar de Antioquia analizado por Berlepsch). Ambas formas se caracterizan por la ausencia de la mancha azul de la garganta. Es curioso que tres años después (1895), aunque probablemente haya sido en noviembre de 1893 (Hartert 1897), Boucard sugiere que estas formas, de ser diferentes, sean reconocidas como *C. meridana* y *columbiana*, respectivamente (formas no válidas por reglas de prioridad). Hartert y Hartert, en 1894, sugirieron que la especie *emmae* debía ser considerada como una subespecie dentro de *gorgo* debido a la presencia de especímenes con características intermedias entre ambas formas. Por otro lado, Berlepsch (1892) reconoce la constancia morfológica en la forma llamada *margarethae* pero la considera una subespecie de *C. gorgo*. En 1897, Hartert propone un cambio en el nombre con el cual se define el

epíteto específico de *C. gorgo*, el cual constituía el tipo con el cual se define el género. Este autor observó que la especie *Ornismya kingii* (Lesson, 1832) se había descrito en función de lo que en ese entonces se reconocía como *Cyanolesbia gorgo* (específicamente un ejemplar de Bogotá). Es por esta razón que propone un cambio en el epíteto específico, pasando de *gorgo* a *kingi*. Un año más tarde, en 1898, este mismo autor describe a *C. berlepschi*, especie solamente conocida de la región nororiental de Venezuela y que correspondería a la forma “a” de *C. gorgo* de Salvin (1892). Esta especie difiere de *margarethae* principalmente por la cola larga de color azul violácea y en la coloración de la hembra, la cual es totalmente blanca en la parte inferior y no castaña como en las otras formas. Aunque no incluidas dentro de *gorgo*, las formas *mocoa* y *smaragdina* fueron reconocidas como especies diferentes (Salvin 1892, Boucard 1895 – este último autor reconoció *boliviana* en lugar de *smaragdina*, siendo el primer nombre sinónimo del segundo) o como variaciones subespecíficas de *mocoa* (Berlepsch 1892).

Con la diversidad morfológica de *Agelaiocercus* prácticamente descrita para finales del siglo XIX, se comienzan a realizar propuestas más completas asociadas al número de especies reconocidas para el género. Hartert (1898) reconoce tres especies (*coelestis*, *kingi* y *berlepschi*), considerando el resto de las formas como variaciones subespecíficas de *kingi* (*kingi*, *emmae*, *mocoa*, *margarethae*, *caudata* y *smaragdina*). Las especies *berlepschi* y *coelestis* se mantienen a nivel de especies, básicamente, por las diferencias entre las hembras de ambas especies y aquellas que conforman la especie *kingi*. En *berlepschi* las hembras poseen el pecho totalmente blanco y en *coelestis* el pecho es blanco y el abdomen castaño, mientras que en *kingi* las hembras poseen el pecho y el abdomen totalmente castaño. La agrupación del resto de las formas dentro de *kingi* lo hace por considerar que las variaciones morfológicas encontradas en la coloración de la garganta y la cola no son lo suficientemente marcadas, encontrando ejemplares intermedios entre formas en

algunos casos, como para dar el rango de especie a cada forma. De igual manera, se apoya en el hecho de encontrar poca o ninguna diferencia entre las hembras de las distintas formas.

Salvin 1892		Berlepsch 1892		Hartert y Hartert 1894		Boucard 1895
<i>C. griseiventris</i>	→	-	→	<i>C. griseiventris</i>	→	<i>C. griseiventris</i>
<i>C. g. gorgo</i>	→	<i>C. g. gorgo</i>	→	<i>C. g. gorgo</i>	→	<i>C. gorgo</i>
<i>C. g. margarethae</i>	→	<i>C. g. margarethae</i>	→	<i>C. g. margarethae</i>	→	<i>C. gorgo</i>
<i>C. g. "a"</i>	→	-	→	-	→	-
<i>C. g. "c"</i>	→	<i>C. caudata</i>	→	<i>C. caudata</i>	→	<i>C. meridana</i>
<i>C. g. "e"</i>	→	<i>C. emmae</i>	→	<i>C. emmae</i>	→	<i>C. columbiana</i>
<i>C. coelestis</i>	→	-	→	<i>C. coelestis</i>	→	<i>C. coelestis</i>
<i>C. mocoa</i>	→	<i>C. mocoa</i>	→	<i>C. mocoa</i>	→	<i>C. mocoa</i>
<i>C. smaragdina</i>	→	<i>C. smaragdina</i>	→	<i>C. smaragdina</i>	→	<i>C. boliviana</i>

Figura 2.2 Propuestas taxonómicas del género *Aglaiocercus* (*Cyanolesbia*) durante la última década del siglo XIX. El símbolo "-" indica que la propuesta no hace referencia a dicha forma.

Posteriormente, como consecuencia de una campaña extraordinaria de inventario de los Andes Colombianos que permitió ampliar la información sobre la distribución de cada uno de los taxa colectados y a su vez permitió comprender mejor la distribución de los mismos (sobre todo en Colombia donde muchas de las primeras descripciones venían de pieles de Bogotá con poca información de la procedencia exacta de las mismas), se realizó una nueva revisión del género (Chapman, 1917; Fig. 2.3). Este autor realizó una descripción del intervalo de distribución geográfica de las distintas especies del género y también generó una nueva hipótesis de los límites entre especies. Consideró cinco especies (*emmae*, *caudata*, *kingi*, *mocoa* y *coelestis*), con *kingi* y *mocoa* presentando variación subespecífica (*kingi kingi*, *k. margarethae*; *mocoa mocoa* y *m. smaragdina*). Este autor consideró que la presencia, simpátrica en algunas localidades de los Andes Occidentales de Colombia, de las formas *emmae* y *coelestis*, justificaba su asignación como especies distintas ya que, de los ejemplares analizados, no encontró ninguno que presentase características de coloración intermedia (consideró que las observaciones de ejemplares con caracteres intermedios realizadas por Hartert (1898) no era confiable por falta de información apropiada asociada a los ejemplares examinados). *C. emmae* se distribuye en los Andes

Occidentales y la parte norte de los Andes Centrales de Colombia, mientras que *C. coelestis* está presente igualmente en los Andes Occidentales de Colombia y el oeste de Ecuador. De igual forma, no observó intergradación entre *emmae* y el resto de las formas y, aunque en Mérida se encuentra *caudata* (la cual, según Chapman, es la representación de *emmae* en dicha región), consideró que son especies distintas. Con respecto a *kingi* (Andes Orientales en la región de Bogotá hasta Bucaramanga) y *margarethae* (Cordillera de la Costa, Venezuela) consideró que esta última difiere poco de *kingi* por lo que solo puede ser reconocida como una subespecie de esta especie en Venezuela. Con respecto a *mocoo* (Andes Centrales y Orientales de Colombia, desde lo alto del Valle Magdalena hacia el sur por los Andes Orientales de Ecuador probablemente hasta el norte de Perú), el autor comenta que la zona de colecta de ejemplares es prácticamente idéntica (a nivel faunístico) a la región de Bogotá (donde habita *kingi*) y, sin embargo, no encontró evidencia de intergradación entre ambas formas. Chapman no evaluó ningún ejemplar de *C. berlepschi* pero, basado en la descripción de Hartert (1898), comenta que se asemeja más a *coelestis* por la coloración blanca en el pecho de la hembra. Con respecto a *coelestis*, Chapman encontró que los ejemplares de dos localidades al norte de su distribución en Colombia (Trocha Nóvita y Tatamá) se asemejaban a *kingi* en el color más verduzco del plumaje del abdomen, al menos en los machos disponibles (observaciones realizadas previamente para Tatamá por Hellmayr (1911)). En 1925, Chapman describe *C. coelestis aethereus* del suroeste de Ecuador, la cual se diferencia principalmente de la forma *C. c. coelestis* en que no posee la coloración púrpura en la garganta sino que es verde con las plumas de la cola más largas, más azules por encima y más oscuras por debajo. Esta forma se asemeja a *C. caudata* pero las diferencias en las hembras es lo que sugiere que son especies distintas. Chapman considera a *aethereus* como subespecie de la forma *coelestis*, ya que, en las localidades más cercanas entre ambas formas (por ejemplo, Zaruma, Ecuador), encontró ejemplares de *aethereus* que presentaban algunas plumas moradas

en la garganta y la coloración de la cola intermedia entre *coelestis* y *aethereus*. Esto podría indicar una posible intergradación entre ambas formas.

Otras propuestas taxonómicas reflejan la variedad de criterios y opiniones relacionados con el número de especies presentes en el género *Agelaiocercus* (clasificaciones previas a 1930 se refieren a *Cyanolesbia* o *Lesbia*). Simon (1921; Fig. 2.3) considera a la mayoría de las formas descritas como especies válidas: *berlepschi*, *coelestis*, *caudata*, *emmae*, *mocoa*, *smaragdina*, *margarethae* y *kingi*. Sin embargo, para *kingi* reconoce tres variedades adicionales a la nominal: *k. pseudocoelestis*, *k. pseudomargarethae* y *k. holocyanea*. La primera corresponde a los ejemplares presentes en Tatamá (Chocó colombiano) y ya discutidos previamente por Hellmayr (1911) y Chapman (1917), aunque Simon incluye dos ejemplares de Mérida pero, según él, con características que no son totalmente comparables con los ejemplares de Tatamá. Esta forma es evaluada posteriormente por Chapman (1925) y, debido a mayores similitudes con *coelestis* que con *emmae*, decide incluirla dentro de la primera especie (*A. coelestis pseudocoelestis*). Las otras dos variedades corresponden a variaciones presentes en las pieles de Bogotá. La variedad *k. pseudomargarethae* es propuesta como sinónimo de la forma “e” de Salvin (1892), por lo que correspondería a *emmae* que, sin embargo y de manera confusa, es reconocida por Simon. Por otra parte, la variedad *holocyanea* correspondería a la lámina 718 de Reichenbach (1855) asociada a *Trochilus forficatus* aunque de supuesta procedencia de Chile – Sur de Perú (un error según Simon). Esta lámina muestra un ejemplar con rectrices largas de color violáceo. En todo caso, la información presente en Simon (1921) de estas variedades es bastante escasa y no permite tener una clara idea sobre los aspectos morfológicos asociados a estas variedades.

De manera totalmente opuesta, Hartert (1922) considera que todas las formas del género deben ser reconocidas como subespecies de *C. kingi* debido a que ninguna de ellas se encuentran

coexistiendo en una misma localidad. Peters (1945; Fig. 2.3) propone una agrupación novel en relación a lo publicado anteriormente. Reconoce tres especies (*kingi*, *emmae* y *coelestis*) cada una con determinadas subespecies. En el caso de *kingi* propone que *kingi*, *margarethae*, *mocoa*, *smaragdinus* y *berlepschi* son representaciones subespecíficas de dicha forma. De igual manera, *caudata* es considerada una subespecie de *emmae*, basado en la ausencia de parche gular azul. Finalmente, mantiene a la especie *coelestis* como se había propuesto anteriormente con sus subespecies *aethereus* y *coelestis*. Finalmente, Zimmer (1952; Fig. 2.3) concuerda con la propuesta de Hartert (1922) y considera todas las formas como subespecies de *A. kingi*. El principal argumento para esta propuesta es el hecho de encontrar gran variabilidad individual y patrones de plumaje que parecieran indicar intergradación entre las distintas formas. Sin embargo, parte de estos ejemplos provienen de pieles de Bogotá, lo cual dificulta evaluar la posibilidad de intergradación entre diferentes formas del género así como la validez de las variedades de Simon (1921) y Berlioz (1940 en Zimmer 1952; *k. brevirostris*, aparentemente similar a la variedad *holocyanea*). El autor considera que la mayoría de las formas del género son diagnosticables, presentan una distribución geográfica definida y que muchos de los ejemplares intermedios no presentan información confiable en las etiquetas (pieles de Bogotá). Sin embargo, basado en los patrones de variación considera el reconocimiento de variaciones subespecíficas como la mejor propuesta para el género.

La propuesta taxonómica aceptada actualmente (Schuchmann y Duffner, 1993; Remsen y col., 2013; Fig. 2.3) reconoce tres especies y sus variaciones subespecíficas (Figs. 2.4 y 2.5). Schuchmann y Duffer (1993) indican que los patrones de coloración de la garganta y la cola se distribuyen de manera confusa. Sin embargo, proponen que la coloración de la garganta sigue un patrón aparentemente clinal (en dirección sur – norte), pasando del color turquesa en las poblaciones de *smaragdinus* (Perú y Bolivia) al morado en *kingi* (Colombia). También observan

algunos ejemplares con la garganta morada en las poblaciones de *emmae* y *aethereus* (ambas con garganta verde), un patrón similar al mencionado por Hartert (1922) para algunos individuos de *caudata* en Venezuela. Schuchmann y Duffer (1993) sugieren un carácter plesiomórfico a dicha característica, la cual se expresa en pocos individuos de estas dos subespecies. Con respecto a la cola, también observan una variación en dirección sur – norte, con poblaciones de Bolivia hasta el sur de Colombia y en la Cordillera Central de Colombia que presentan una cola verde que luego pasa a violeta en la Cordillera Oriental de Colombia. Las poblaciones de *coelestis* al oeste andino y *berlepschi* al noreste de Venezuela se parecen y *k. margarethae* en la Cordillera de la Costa de Venezuela posee características intermedias con los cuatro pares de plumas internos de la cola de color esmeralda y el par externo violeta.

Hartert 1898	Chapman 1917	Simon 1921	Peters 1945	Zimmer 1952	Schuchmann y Duffner 1993
<i>C. k. kingi</i>	<i>C. k. kingi</i>	<i>L. k. pseudomargarethae</i>	<i>A. k. kingi</i>	<i>A. k. kingii</i>	<i>A. k. kingi</i>
<i>C. k. margarethae</i>	<i>C. k. margarethae</i>	<i>L. k. holocyanea</i>	<i>A. k. margarethae</i>	<i>A. k. margarethae</i>	<i>A. k. margarethae</i>
<i>C. berlepschi</i>	<i>C. berlepschi</i>	<i>L. k. pseudocoelestis</i>	<i>A. k. berlepschi</i>	<i>A. k. berlepschi</i>	<i>A. k. berlepschi</i>
<i>C. k. caudata</i>	<i>C. caudata</i>	<i>L. margarethae</i>	<i>A. e. caudata</i>	<i>A. k. caudatus</i>	<i>A. k. caudata</i>
<i>C. k. emmae</i>	<i>C. emmae</i>	<i>L. berlepschi</i>	<i>A. e. emmae</i>	<i>A. k. emmae</i>	<i>A. k. emmae</i>
<i>C. coelestis</i>	<i>C. coelestis</i>	<i>L. caudata</i>	<i>A. c. coelestis</i>	<i>A. k. coelestis</i>	<i>A. c. coelestis</i>
<i>C. k. mocoa</i>	<i>C. m. mocoa</i>	<i>L. emmae</i>	<i>A. k. mocoa</i>	<i>A. k. mocoa</i>	<i>A. k. mocoa</i>
<i>C. k. smaragdina</i>	<i>C. m. smaragdina</i>	<i>L. coelestis</i>	<i>A. k. smaragdinus</i>	<i>A. k. smaragdinus</i>	<i>A. k. smaragdinus</i>
		<i>L. mocoa</i>	<i>A. c. aethereus</i>	<i>A. k. aethereus</i>	<i>A. c. aethereus</i>
		<i>L. smaragdina</i>		<i>A. k. pseudocoelestis</i>	

Figura 2.3. Propuestas taxonómicas del género *Agelaiocercus* (*Cyanolesbia* y *Lesbia*) realizadas por distintos autores.

Schuchmann y Duffer (1993) proponen distintas zonas de contacto basados en el hecho de haber encontrado ejemplares con caracteres intermedios entre diferentes poblaciones. En específico, proponen una zona de contacto entre *kingi* y *caudata* en Bucaramanga (Santander, Colombia) y que existe intergradación entre las dos formas de *coelestis* por encontrar machos de *aethereus* (garganta verde) con la coloración de la garganta similar a *coelestis* (garganta morada), característica ya mencionada por Chapman (1925). Por otra parte, dudan que exista contacto entre *margarethae* y *berlepschi*, ya que la Depresión de Unare (Venezuela) representaría una

barrera geográfica fuerte que impediría el paso de individuos de un lado a otro de la misma. Con respecto a las poblaciones de *emmae* y *coelestis*, éstas se encuentran en parapatría en la Cordillera Occidental (Colombia) siendo posible la exclusión altitudinal, con las poblaciones de *emmae* ubicadas a mayor altura. Sin embargo, hacia el sur de Colombia (Nariño) se propone una zona de intergradación con la presencia de híbridos (supuestamente presentes en la colección científica del INDERENA, Bogotá). También proponen una posible zona de contacto entre *coelestis* y *mocoa* en Ecuador ya que encontraron una hembra en Pichincha que presenta características morfométricas y de coloración intermedias entre ambas formas.

Con respecto a la taxonomía del género, Schuchmann y Duffner (1993) argumentan que la coloración verde en la garganta en *k. emmae* y *k. caudata* es un carácter secundario a considerar y, por esta razón, son consideradas como subespecies dentro de *A. kingi*. El nivel de subespecie para *k. smaragdinus* y *k. mocoa* lo argumentaron en función de criterios geográficos ya que no se pudo hacer una clara diferenciación morfológica. *A. coelestis* fue dividido en dos subespecies de acuerdo a las variaciones morfológicas entre los machos. Finalmente, la población conocida como *pseudocoelestis* no presentó variaciones morfológicas significativas y, según los autores, no debe ser considerada como una subespecie válida dentro de *coelestis*.

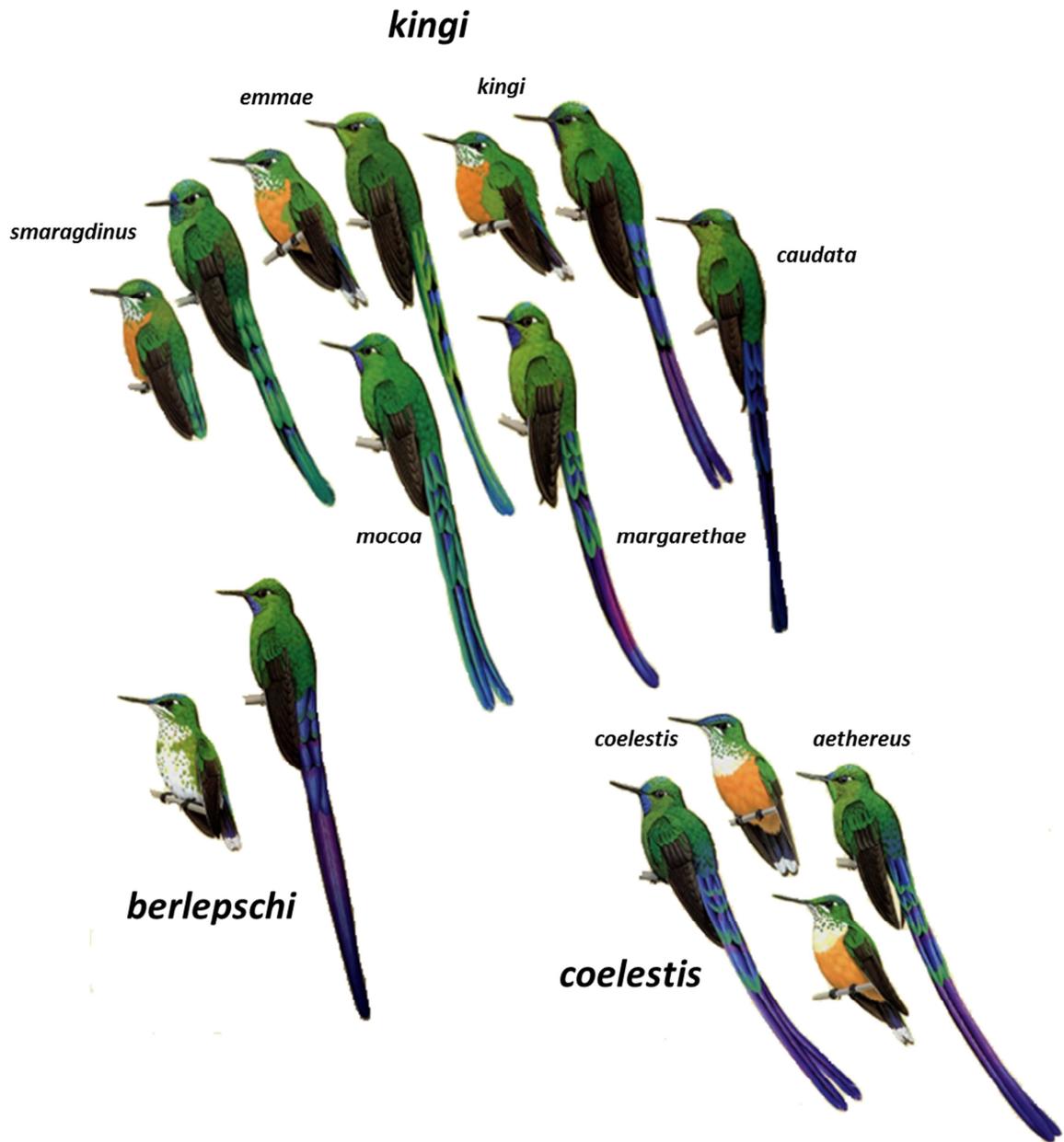


Figura 2.4. Patrones de coloración de las distintas especies y subespecies que conforman el género *Aglaiocercus* (Modificado de Schuchmann, 1999).

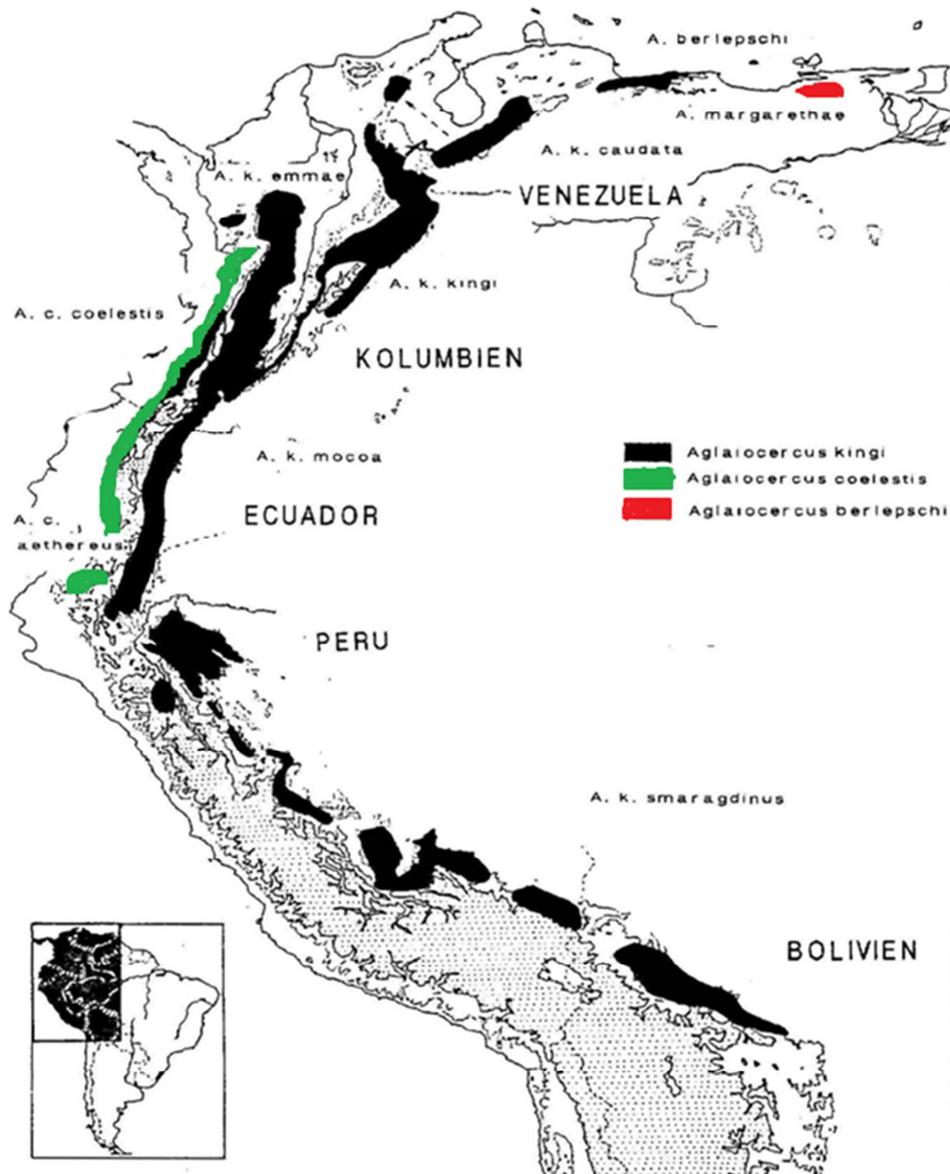


Figura 2.5. Distribución espacial de las especies y subespecies pertenecientes al género *Aglaiocercus* (modificado de Schuchmann y Duffner, 1993).

2.3 Escenario evolutivo del género

La propuesta sobre el proceso de evolución del género aportada por Schuchmann y Duffner (1993) se basó en características morfológicas, principalmente el patrón de coloración y longitud de las plumas de la cola en los machos. Estos autores proponen que el hecho de encontrar un patrón clinal sur a norte en la longitud de las plumas externas de la cola, al igual que el cambio

en la coloración de la misma, de verde esmeralda en el sur, a violeta en el norte, indican una dirección de propagación considerando la longitud más corta de la cola y la coloración esmeralda las características plesiomórficas. Schuchmann y Duffner (1993) proponen que, en función de la poca variación que encontraron en las hembras y la poca diferenciación morfológica entre los distintos taxa, el género es un grupo filogenético joven y, basados en la distribución actual del género, la cual coincide en gran parte con los refugios de fauna del Pleistoceno (Haffer, 1974), realizaron una propuesta del escenario histórico de radiación del género (Fig. 2.6). Estos autores sugieren que la colonización de los bosques andinos se dió, inicialmente, por lo que denominaron un “proto-Aglaiocercus”, el cual se ubicaba en las zonas bajas de Los Andes (al sur). Dentro del marco temporal de radiación del género durante el Pleistoceno, en una época en la que los bosques montanos se encontraban en zonas más bajas como consecuencia de los cambios climáticos ocurridos durante este período, el “proto-Aglaiocercus” pudo expandirse rápidamente (Fig. 2.6a). Las poblaciones de *coelestis* y *berlepschi* debieron quedar aisladas tempranamente en la radiación del género (Fig. 2.6b). Las diferencias morfológicas encontradas entre *k. emmae* y *coelestis* sugieren que la población de *emmae* posiblemente se desplazó hacia el oeste en un período posterior a la colonización de *coelestis* luego de que hubiese ocurrido la diferenciación entre las especies *kingi* y *coelestis* y dicha colonización se pudo generar como consecuencia de una nueva expansión de los bosques montanos (Fig. 2.6c).

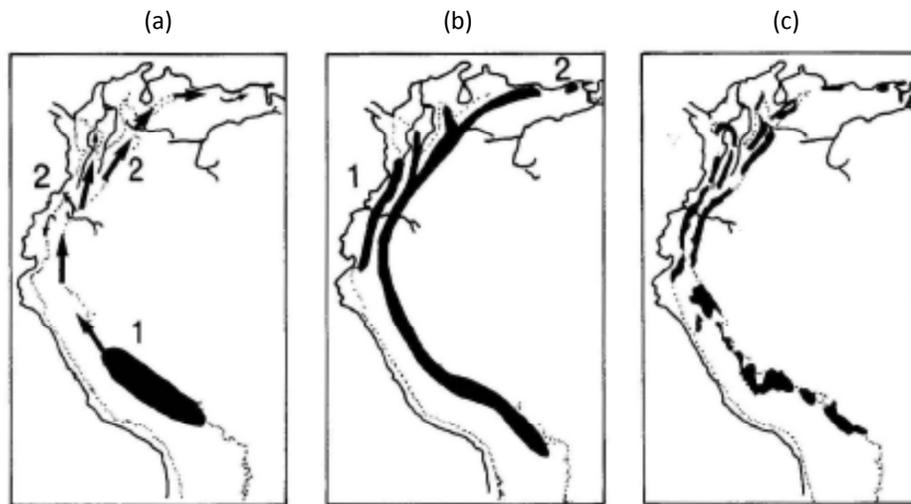


Figura 2.6. Posible radiación del género *Aglaiocercus* durante el Pleistoceno y Post-Pleistoceno. Las flechas indican la dirección de la colonización. (a) Colonización del Proto-*Aglaiocercus* desde el sur (1) hacia el norte (2) durante los periodos pluviales del Pleistoceno. (b) Aislamiento de la población occidental andina (1) y la población oriental de Venezuela (2) durante los periodos secos. (c) Aislamiento y especiación de las subespecies existentes. (Modificado de Schuchmann y Duffner, 1993).

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

- Proponer una hipótesis filogenética y biogeográfica del género *Agelaiocercus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar una hipótesis filogenética de las especies del género *Agelaiocercus* basada en caracteres moleculares.
- Contrastar hipótesis taxonómicas formuladas previamente por otros autores con la hipótesis filogenética derivada de este proyecto.
- Inferir los procesos biogeográficos que originaron la distribución actual del género.

4 Materiales y métodos

4.1 Toma de muestras

En este estudio utilizamos 126 muestras que incluyen las tres especies descritas del género *Agelaiocercus* (*kingi*, *coelestis* y *berlepschi*; Remsen y col., 2013). Este muestreo es representativo de la variación geográfica descrita (incluye todas las subespecies; Schuchmann, 1999) y representa una buena cobertura de la distribución geográfica del género (Fig. 4.1). Las muestras fueron colectadas por integrantes del Laboratorio de Biología de Aves y Conservación (IZET-UCV) o solicitadas a diferentes museos y colecciones biológicas (Anexo 1). Del número total de muestras, trabajamos directamente en el proceso de extracción y amplificación de un total de 38 muestras, provenientes de la Colección Ornitológica Phelps (COP) y el Laboratorio de Biología de Aves y Conservación (IZET-UCV). Las muestras consistieron de tejido (músculo o hígado) preservado en etanol al 100% a bajas temperaturas (-80°C), y algunas plumas o muestras de sangre obtenidas en estudios en los cuales no se colectaron individuos (Anexo 1). Las muestras de Colombia fueron procesadas en la Universidad de Los Andes, Bogotá, por Oscar Laverde, y/o en Louisiana State University por Andrés Cuervo. De estas muestras, una parte fue enviada al laboratorio del Dr. Christopher Witt en el Museum of Southwestern Biology de la Universidad de Nuevo México para que se realizara la amplificación y secuenciación de las mismas. Las muestras del Museo de Zoología de la Universidad Católica de Ecuador fueron extraídas y amplificadas en Ecuador por la Dra. Elisa Bonaccorso y secuenciadas en el servicio de secuenciación de Korea (Macrogen).

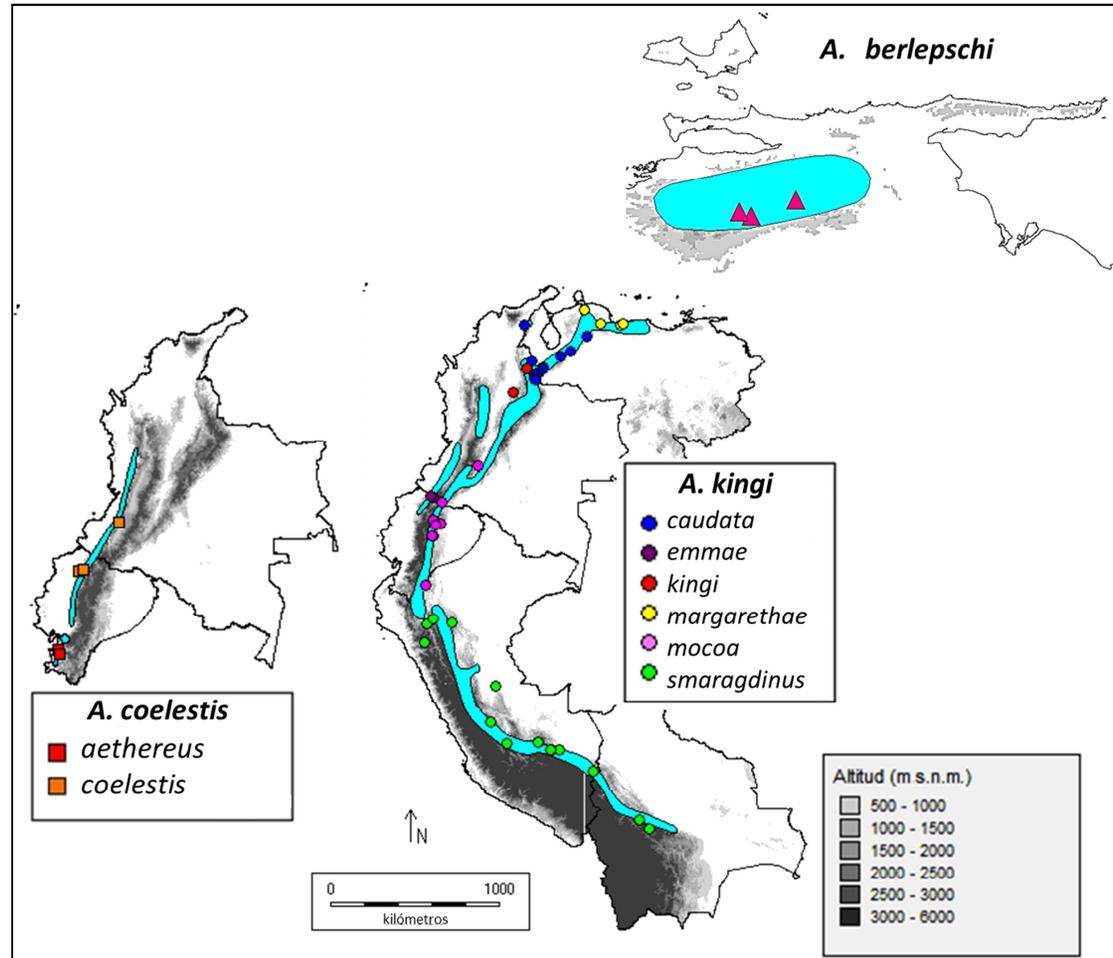


Figura 4.1. Distribución geográfica del género *Aglaiocercus* (fondo azul claro) con la localización de las muestras incluidas en este trabajo. La distribución potencial de cada especie fue obtenida de InfoNatura: Aves, Mamíferos y Anfibios de América Latina [Aplicación de página web]. 2007. Version 5.0. Arlington, Virginia (USA); NatureServe. Disponible en: <http://www.natureserve.org/infonatura> (Acceso: Noviembre 22, 2012).

4.2 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

La extracción del ADN la realizamos utilizando el kit de extracción DNeasy de Qiagen siguiendo el protocolo estándar descrito en el manual de Qiagen. Extrajimos el gen ND2 (subunidad 2 del gen mitocondrial nicotinamida deshidrogenasa; 1041 pares de bases) y el intrón 3 del gen nuclear MUSK (receptor músculo esquelético de la tirosina quinasa; 598 pares de bases) que se encuentra asociado al cromosoma sexual Z en aves. Estos genes han sido probados previamente en la familia y han mostrado tener una buena resolución (Benham, 2012). Amplificamos estos genes en el Laboratorio de Biología de Vectores del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET-UCV) mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) utilizando los cebadores de ADN utilizados previamente para amplificar ambos genes en otras especies (Tabla 1). Las amplificaciones las realizamos utilizando una termocicladora 2720 (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial a 95°C por 8 minutos, seguido de 35 ciclos divididos en 3 fases, la primera a 95°C por 30 segundos para que ocurra la desnaturalización del ADN, luego una fase de hibridación a 50°C por 30 segundos, y finalmente una fase de extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, realizamos una fase final de extensión por 10 minutos a 72°C. Las reacciones de PCR contenían 1-2 µL de ADN, 0,125 µL de *Taq* polimerasa (PROMEGA), 14,375 µL de H₂O, 1,5 µL de MgCl₂, 5 µL de solución buffer, 1,25 µL de cada cebador y 0,5 µL de dNTPs, en un volumen total de 25 µL. Verificamos la presencia del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% de concentración. Los productos amplificados los enviamos, para su posterior purificación y secuenciación, al laboratorio del Dr. Christopher Witt, en el Museum of Southwestern Biology de la Universidad de Nuevo México (Nuevo México, Estados Unidos).

Tabla 4.1. Cebadores utilizados en este estudio para la amplificación de los genes ND2 y MUSK.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Fuente
ND2	L5219	CCCATACCCCGAAAATGATG	Sorenson y col., 1999
ND2	H6313	CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC	Sorenson y col., 1999
MUSK	MUSKF3	GCTGTACTTCCATGCACTACAATG	Kimbal y col., 2009
MUSK	MUSKR3	ATCCTCAAATTTCCCGAATCAAG	Kimbal y col., 2009

4.3 Análisis filogenético

Las secuencias de ADN las editamos y alineamos a ojo empleando el software SeqMan II (DNASTAR). Para los análisis filogenéticos entre haplotipos empleamos como grupo externo a las especies *Adelomyia melanogenys* y *Taphrolesbia griseiventris*, las cuales están consideradas como las especies más relacionadas filogenéticamente con el género *Agelaiocercus* (Kirchman y col., 2009; Fig. 2.1). No incluimos secuencias de la especie *Heliangelus suzii* porque la información molecular disponible era muy poca en cuanto a la longitud de la secuencia de los genes que empleamos en este trabajo. De igual forma, incluimos secuencias de otras especies pertenecientes a cada uno de los linajes principales que caracterizan la radiación de la familia Trochilidae (McGuire y col., 2007) con el fin de evaluar la monofilia del género. Las secuencias genéticas de cada una de estas especies las obtuvimos directamente del autor (Jim McGuire, datos no publicados) o de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Los análisis filogenéticos los realizamos para ambos genes por separado y con ambos genes concatenados. Para el análisis filogenético de los genes concatenados empleamos muestras con ambos genes secuenciados (59 muestras; Anexo 1). Utilizamos los métodos de Máxima Parsimonia (MP, por sus siglas en inglés) y Máxima Verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés) mediante el uso de los programas MEGA versión 5 (Tamura y col., 2011) y RAxML 7.2.7 (Stamatakis, 2006; Stamatakis y col., 2008), apoyándonos para este último en el servicio ofrecido por el portal CIPRES (Miller y col., 2010; <http://www.phylo.org>). El uso de RaxML 7.2.7 se debe a

que éste implementa un algoritmo rápido de bootstrap que permite realizar una mayor cantidad de pseudorélicas (por ejemplo, 1000) en un período de tiempo rápido (Stamatakis y col., 2008), lo que otorga una gran ventaja cuando se trabaja con matrices que incluyen gran número de secuencias y caracteres.

El análisis de Máxima Parsimonia se realizó con *MEGA* versión 5 mediante una búsqueda heurística de árboles parsimoniosos, con adición aleatoria de taxa, empleando el método de bisección y reconexión del árbol (TBR, por sus siglas en inglés). Este algoritmo reduce el tiempo de búsqueda al producir un árbol que corta y produce dos subárboles (el principal y el subárbol). Luego reconecta el subárbol al principal en todas las posibles ramas y si alguno de los nuevos árboles generados resulta más parsimonioso será seleccionado para luego volver a ser cortado generando dos nuevos árboles y uniéndolos. El proceso se continúa hasta encontrar el árbol más parsimonioso (Nei y Kumar, 2000; Tamura y col., 2011). El soporte para los nodos del árbol lo estimamos con 1000 pseudorélicas de muestro con reemplazo (“bootstrap”; Felsenstein, 1985).

Para el análisis de Máxima Verosimilitud utilizamos el programa RAxML 7.2.7 (Stamatakis, 2006; Stamatakis y col., 2008) el cual implementa el modelo de sustitución nucleotídica GTR+GAMMA al considerar que cualquiera de los otros modelos son casos especiales del modelo GTR. El programa RAxML fue creado para la inferencia filogenética de grandes conjuntos de datos, con un riesgo de sobreparametrización bajo, y considera que la búsqueda topológica más exhaustiva tiene mayor impacto en la calidad del árbol final de lo que tiene la escogencia del modelo de evolución molecular (Stamatakis, 2008). Este programa fue utilizado tanto para genes individuales como concatenados. En el caso donde empleamos ambos genes concatenados el programa es capaz de asignar y estimar diferentes parámetros para modelos separados de los genes que analizamos (particiones). Esto permite analizar la matriz concatenada sin utilizar una

prueba de congruencia en señal filogenética entre estos genes (lo que normalmente se hacía con una prueba de ILD (Incongruence Length Difference Test, Farris y col., 1994), cuya utilidad ha sido cuestionada previamente (Barker y Lutzoni, 2002). Finalmente, evaluamos el soporte de los nodos realizando un análisis de remuestreo (bootstrap) con 1000 pseudoréplicas.

4.4 Contraste de hipótesis filogenéticas

La validez de la hipótesis filogenética obtenida con las hipótesis de monofilia del género y de la especie más variable geográficamente, *A. kingi*, fue evaluada en este trabajo. Empleamos el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) y realizamos la prueba de Shimodaira-Hasegawa (Shimodaira 2002) utilizando 1000 réplicas de bootstrap. Esta prueba evalúa la hipótesis nula de que todas las topologías explican de igual manera los datos o, dicho de otra manera, si una hipótesis filogenética obtenida en una búsqueda heurística con restricciones (basadas en taxonomía o distribución, por ejemplo) explica de igual manera los datos que una hipótesis obtenida sin restricciones (Shimodaira y Hasegawa, 1999).

4.5 Índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, red de haplotipos y análisis demográficos

La diversidad genética a lo largo de la distribución geográfica del género *Aglaiocercus* la caracterizamos mediante el uso de índices de diversidad haplotípica y nucleotídica. El índice de diversidad de haplotipos mide la probabilidad de que dos haplotipos de la misma muestra sean escogidos al azar y sean diferentes, mientras que el índice de diversidad de nucleótidos es una medida de diferencias de pares de nucleótidos por sitio entre las muestras de haplotipos (Nei, 1987). También calculamos las distancias genéticas promedio entre y dentro de cada uno de los linajes evolutivos encontrados en este estudio empleando *MEGA 5* (Tamura y col., 2011). Utilizamos la distancia “p” como modelo y realizamos 1000 pseudoréplicas de bootstrap para

calcular los valores del error estándar. La distancia genética fue calculada para poder estimar los tiempos de divergencia entre cada linaje.

Las redes de haplotipos nos permiten una mejor representación de las relaciones evolutivas entre haplotipos poco divergentes, así como una herramienta para visualizar patrones geográficos en la estructura genética de linajes evolutivos. Para cada linaje evolutivo identificado en nuestra hipótesis filogenética para el género *Aglaiocercus*, construimos una red de haplotipos a partir de la parsimonia estadística utilizando el programa TCS, versión 1.13 (Clement y col., 2000). En una red de haplotipos la conexión entre haplotipos está basada en diferencias pareadas y este método permite vincular haplotipos que difieren por una única mutación con una probabilidad mayor al 95%, probabilidad basada en la teoría de coalescencia. De igual forma, este método estima la probabilidad de que un haplotipo pueda ser utilizado como haplotipo ancestral con base en las frecuencias observadas y la correlación esperada de las frecuencias con la edad del haplotipo (Clement y col., 2000).

Las distribuciones de diferencias pareadas entre haplotipos o distribuciones desajustadas ("mismatch distribution", en inglés) son útiles para investigar los cambios históricos en la demografía de los linajes (Rogers, 1995; Rogers y Harpending, 1992). Con el objetivo de evaluar señales de expansión demográfica a nivel histórico construimos distribuciones desajustadas para aquellos linajes en los cuales teníamos un número mínimo de muestras ($N \geq 8$) que consideramos apropiado para obtener un resultado potencialmente informativo. Cuando se compara el modelo de distribución desajustada con un modelo de expansión poblacional se puede tener una visión de la historia demográfica de los linajes. Si las poblaciones han pasado por episodios de expansión o declinación poblacional repentina el patrón observado será una curva que mostrará una forma de onda (distribución unimodal) o, si por el contrario, han tenido un tamaño poblacional constante el

patrón estará representado por una curva con varios picos (distribución multimodal; Rogers y Harpending, 1992). La significancia estadística para el patrón de expansión poblacional se evaluó utilizando simulaciones basadas en coalescencia empleando el estadístico R_2 (Ramos-Omsins y Rozas, 2002), el cual se basa en la diferencia entre el número de mutaciones simples y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre secuencias en una muestra poblacional. Igualmente, utilizamos la prueba F_s de Fu (Fu, 1997), la cual evalúa la desviación de la neutralidad en las secuencias obtenidas y distingue entre patrones observados en poblaciones estacionarias y aquellas resultantes de una expansión poblacional (exceso de mutaciones raras y jóvenes en secuencias no recombinantes) revelando la historia de eventos demográficos en la especie. Valores negativos de F_s son indicativos de una expansión poblacional reciente y, por el contrario, valores positivos indican una disminución poblacional reciente (cuello de botella) o una selección sobredominante; solo los valores de F_s con una probabilidad de $P < 0,02$ deben considerarse como significativos (Holsinger, 2006). Las distribuciones desajustadas y la prueba F_s de Fu las realizamos utilizando el programa DnaSP, versión 5.0 (Librado y Rozas, 2009).

4.6 Tiempos de divergencia

Las inferencias sobre la edad de divergencia de los linajes (para el gen ND2) se realizaron probando la homogeneidad de tasas de sustitución molecular a lo largo del árbol filogenético obtenido (ajuste al reloj molecular). Para probar la homogeneidad de las tasas de sustitución a lo largo del árbol empleamos el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002). Calculamos el valor de verosimilitud, con y sin el supuesto de que las tasas de sustitución molecular encontradas se ajustan al reloj molecular, para la hipótesis obtenida mediante el método de máxima verosimilitud. Para esto empleamos todos los linajes evolutivos encontrados en la hipótesis filogenética. La utilización de este número de muestras se debió principalmente a una

optimización de tiempo en la realización del análisis sin perder información sobre la variación genética intraespecífica observada. Las diferencias en valores de verosimilitud de estas hipótesis se compararon con una prueba de Cociente de Verosimilitud y su significancia estimada con base en una distribución χ^2 ($\alpha = 0,05$).

En aves, niveles de divergencia molecular entre 1,6% y 2,0% en genes mitocondriales (específicamente con el gen citocromo *b*) se han asociado (mediante el uso de datos biogeográficos o fósiles) con una divergencia temporal aproximada de un millón de años de evolución (Fleischer y col., 1998; Shields y Wilson, 1987). La aplicación de un reloj molecular basado en pocos datos (los dos estudios anteriores) ha sido algo criticada (García-Moreno, 2004) pero su uso se recomienda para proveer información sobre edades relativas de divergencia (Lovette, 2004). Recientemente, un estudio integral basado en la calibración de 90 relojes moleculares para aves, empleando el gen mitocondrial citocromo *b*, obtuvo un valor consenso de 2,1% de divergencia molecular por millón de años; sin embargo, entre los grupos evaluados se incluyó al colibrí *Lampornis castaneiventris*, para el que se encontró una divergencia molecular de 1,72% por millón de años (Weir y Schluter, 2008), sugiriendo la necesidad de considerar un intervalo de valores para estimar tiempos de divergencia. Como consecuencia, para calibrar las divergencias genéticas obtenidas utilizamos valores de 1,72% y 2,1% de divergencia en el gen mitocondrial ND2 por cada millón de años. De esta manera generamos un intervalo de confianza para el marco temporal de evolución. Se ha propuesto (Smith y Klicka, 2010) que el gen mitocondrial ND2 evoluciona 1,25 veces más rápido que el gen citocromo *b*, razón por la cual los valores de divergencia que obtuvimos fueron divididos por dicho valor con el fin de ajustar los resultados a la tasa de sustitución molecular propuesta para el gen ND2. La aplicación de un reloj molecular a los valores de divergencia genética encontrados nos permitió explorar el patrón

temporal de diferenciación entre linajes del género *Aglaiocercus* y evaluar si éste es congruente con el período Pleistoceno propuesto por Schuchmann y Duffner (1993).

5 Resultados

De las 126 muestras que empleamos en este trabajo (Anexo 1) obtuvimos 112 secuencias para el gen mitocondrial ND2 (1041 pares de bases con 222 sitios variables de los cuales 184 fueron parsimoniosamente informativos) que correspondieron a 61 haplotipos únicos. Igualmente, obtuvimos 73 secuencias para el gen nuclear MUSK (598 pares de bases con 41 sitios variables de los cuales 32 fueron parsimoniosamente informativos) para un total de 37 haplotipos únicos. Secuencias para ambos genes se obtuvieron solo para 59 muestras. Para 53 muestras logramos secuenciar únicamente el gen ND2 y, para 14 muestras, solamente logramos secuenciar el gen MUSK.

5.1 Análisis filogenéticos

La hipótesis filogenética obtenida para el gen ND2 por los métodos de Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (MV) no permite inferir relaciones filogenéticas entre grupos de especies de *Agelaiocercus* y entre éstas y *Taphrolesbia griseiventris* (politomía; Fig. 5.1) ya que el soporte estadístico para las relaciones filogenéticas entre los grupos principales es bajo (Valores de bootstrap, VB < 75%). Sin embargo, esta hipótesis no se diferencia estadísticamente de una hipótesis donde el género *Agelaiocercus* o la especie *A. kingi* representen grupos monofiléticos ($p > 0.05$, prueba Shimodaira-Hasegawa).

La hipótesis filogenética permite identificar cinco grupos monofiléticos (linajes) con un alto soporte estadístico (VB > 75%). Si bien no obtuvimos muestras de cada una de las localidades limítrofes (márgenes de la distribución geográfica) que se proponen para los taxones aceptados actualmente, los clados que obtuvimos se corresponden con los límites geográficos propuestos para cada forma (Schuchmann, 1999; Fig. 5.2): (1) *berlepschi* ubicado al noroeste de Venezuela y potencialmente aislado por la Depresión de Unare; (2) un clado integrado por las subespecies

margarethae y *caudata*, ambos conformando grupos monofiléticos, distribuidas en la Cordillera de la Costa de Venezuela y la Cordillera de los Andes venezolanos y del norteste de Colombia, respectivamente. Estas dos formas se encuentran separadas por la Depresión Turbio – Yaracuy; (3) ambas subespecies de *coelestis* (*aethereus* y *coelestis*) ubicadas en la Cordillera Occidental de Colombia y Los Andes de Ecuador (en ambos países hacia la vertiente oeste de la Cordillera); (4) un linaje conformado por las formas *kingi* (norte de los Andes Orientales de Colombia), *emmae* (sur de los Andes Occidentales de Colombia) y *mocoo* (en la vertiente este de los Andes Orientales de Ecuador y región noroccidental de Los Andes de Perú, en la provincia de Cajamarca). En este grupo obtuvimos una secuencia (ID-A78; Fig. 5.1, Anexo 1) que por la ubicación geográfica de la misma (Huila, Colombia) se encuentra en una región que pudiera representar o bien los límites definidos para la subespecie *mocoo* o para la subespecie *emmae* (Schuchmann, 1999) pero que según nuestros análisis se encuentra más relacionada a las subespecies *kingi* y/o *emmae*; (5) el clado conformado por la subespecie *smaragdinus*, la cual se distribuye desde los Andes de Perú hasta Bolivia. Este último grupo se subdivide en dos clados definidos geográficamente: un grupo que abarca la región montana del norte y el centro de Perú (desde el Departamento Amazonas hasta el Departamento Ayacucho) separado de otro por el valle de Urubamba, el cual abarca desde Cusco hasta Cochabamba, en Bolivia.

La diferencia más notable entre el uso del gen nuclear y el gen mitocondrial fue el hecho de que a partir del gen MUSK no observamos el patrón de fuerte estructura poblacional observado entre las poblaciones cercanas geográficamente (Fig. 5.1). Los árboles obtenidos mostraron una mezcla de haplotipos a nivel geográfico con poca resolución en las relaciones filogenéticas entre los mismos. Este resultado se debió potencialmente a la baja resolución o señal filogenética de este gen e igualmente a la falta de grupos externos cercanos para el análisis.

El análisis concatenado (Fig. 5.1) de las muestras para las cuales teníamos ambos genes secuenciados (1639 pares de bases) generó resultados similares (baja resolución en nodos basales) a los obtenidos para el gen ND2 pero al haber menos ejemplares y falta de grupos externos cercanos se pierde resolución a nivel de algunos grupos. A diferencia del caso en el cual empleamos el gen ND2 de manera individual, en este caso no incluimos ninguna secuencia de la subespecie *k. kingi* y los haplotipos pertenecientes a la subespecie *k. mocoa* quedaron separado en dos grupos. A su vez, a diferencia de la hipótesis que obtuvimos para el gen ND2, la subespecie *mocoa* quedó separada de la subespecie *k. emmae*. Otra diferencia significativa entre la hipótesis filogenética que obtuvimos mediante el análisis concatenado de los datos y la hipótesis que obtuvimos para el gen ND2 es que, en el árbol de los datos concatenados, el soporte estadístico para el nodo que establece las relaciones entre los ejemplares de *smaragdinus* que se ubican al norte del Valle Urubamba (Perú) fue menor al 75%.

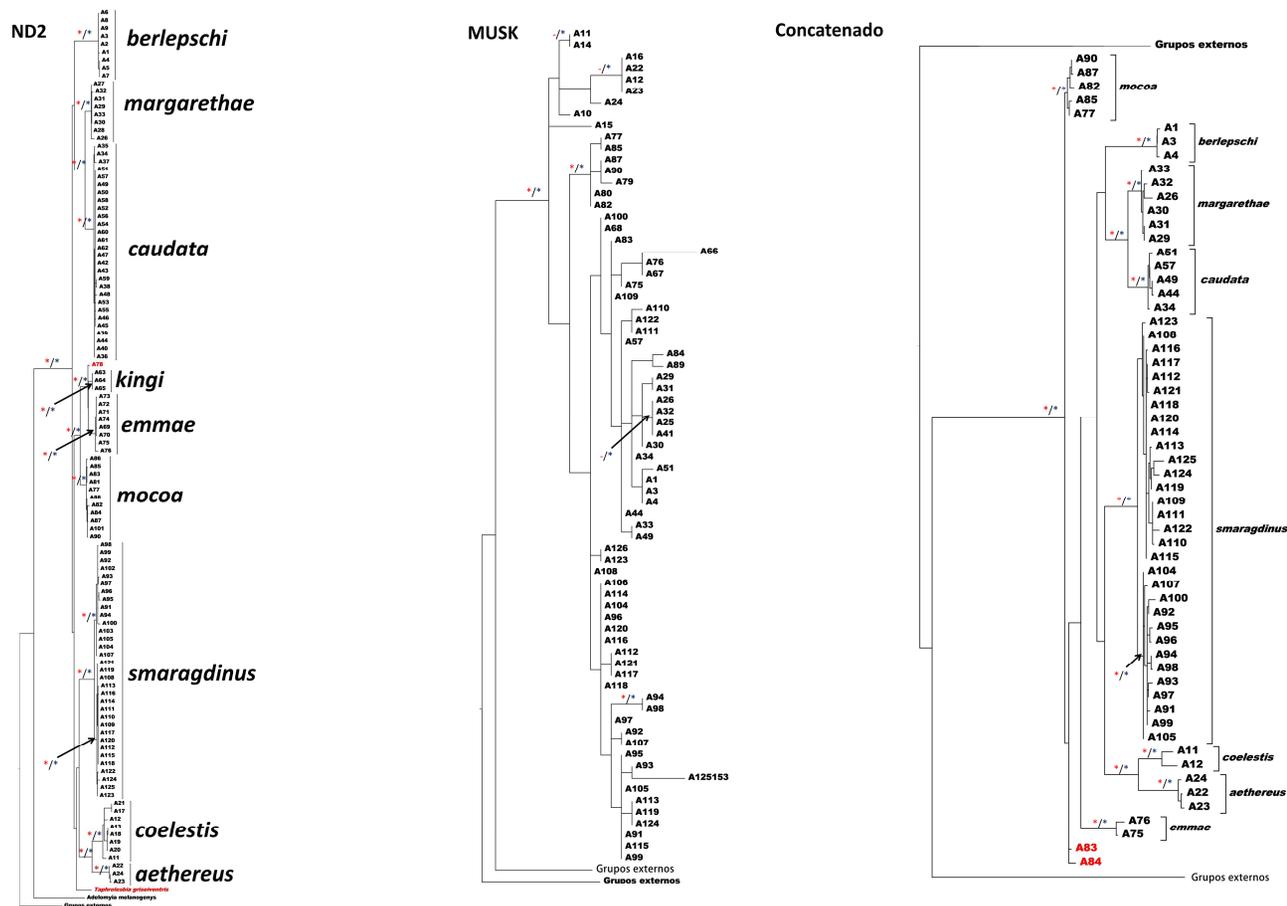


Figura 5.1. Hipótesis de relaciones filogenéticas entre linajes del género *Aglaiocercus* para los genes ND2, MUSK y ambos genes concatenados empleando los métodos de MP y MV. En todos los casos se muestra el árbol obtenido por el método de MV. Los asteriscos rojos y azules sobre los nodos representan valores de bootstrap mayores a 75% (MP/MV). Los códigos corresponden a las muestras empleadas (Anexo 1). En letra roja se resaltan la especie *Taphrolesia griseiventris* (hipótesis obtenida para el gen ND2) y los haplotipos ID: A78 (hipótesis obtenida para el gen ND2), A83 y A84 (hipótesis obtenida para ambos genes concatenados; ver texto).

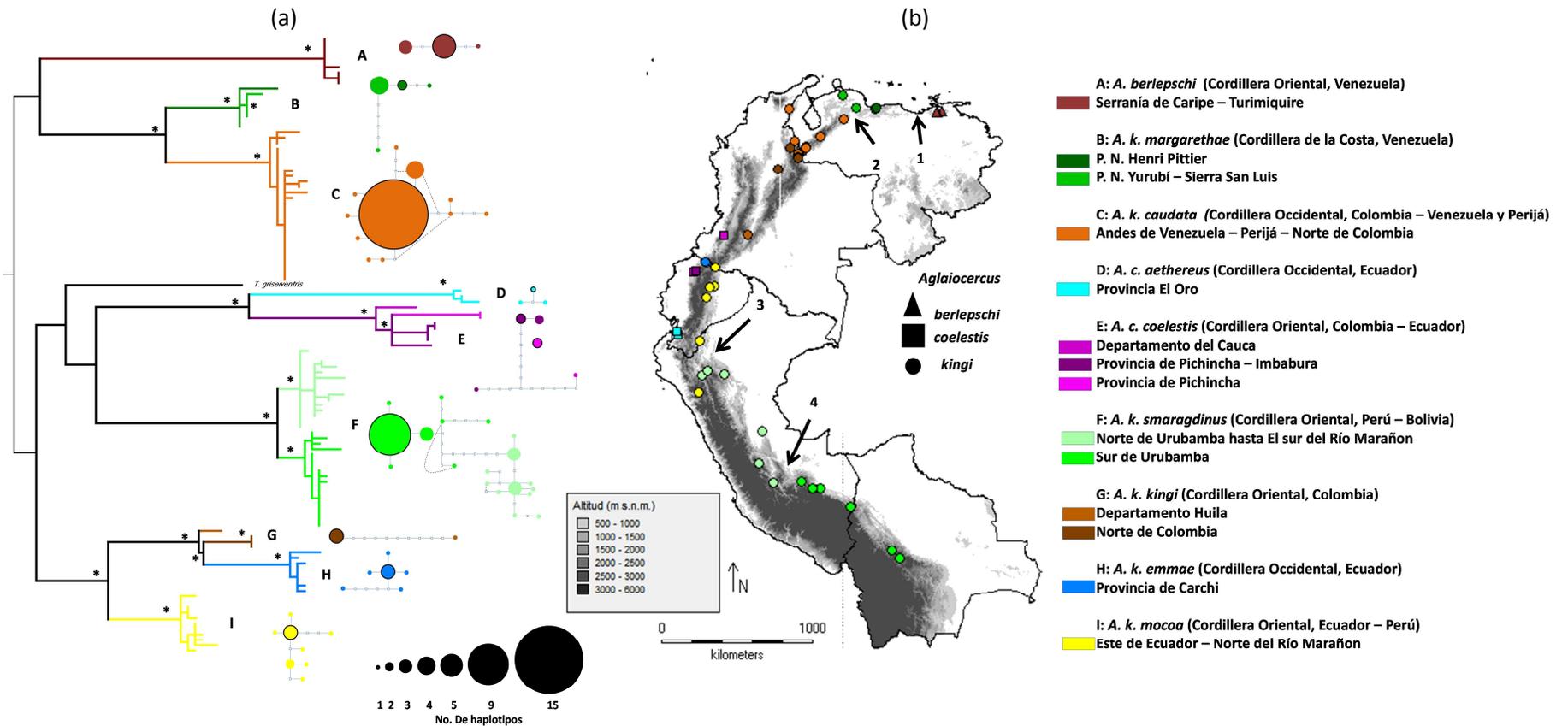


Figura 5.2. (a) Hipótesis de relaciones filogenéticas entre los principales linajes del género *Aglaiocercus* obtenidas por el método de MV para el gen ND2. Los asteriscos sobre los nodos indican un soporte mayor al 75%. Red de haplotipos de los principales linajes (A – I). Cada color indica la ubicación geográfica de las muestras. El haplotipo con borde negro indica condición ancestral del haplotipo. (b) Mapa de ubicación geográfica de las muestras. Los números indican las principales barreras geográficas que podrían estar impidiendo el flujo genético entre poblaciones. (1) Depresión de Unare; (2) Depresión Turbio – Yaracuy; (3) Valle del Río Marañón; (4) Valle Urubamba.

Al contrastar la hipótesis filogenética que obtuvimos para el gen ND2 con caracteres morfológicos de los machos (coloración de la garganta y la cola) empleados para definir límites entre especies observamos una falta de señal filogenética en los mismos (Fig. 5.3). Diferencias en las tonalidades de coloración en la garganta (verde y morada) y los patrones de coloración de la cola se observan en tres de los grupos monofiléticos presentes en *Agelaiocercus*, indicando el carácter homoplásico de estas características del plumaje.

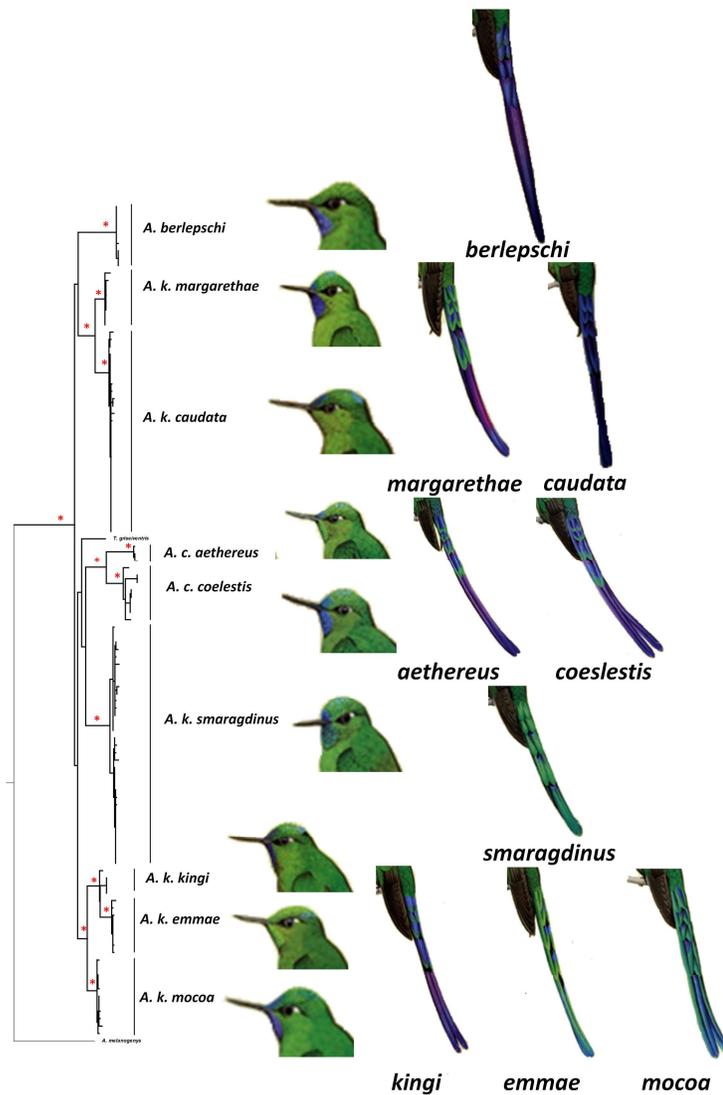


Figura 5.3. Hipótesis filogenética obtenida para el gen ND2 y patrones de coloración de la garganta y la cola de los machos en el género *Agelaiocercus*. Los asteriscos rojos sobre los nodos indican un soporte estadístico mayor al 75%.

5.2 Índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, red de haplotipos y análisis demográficos

Adicionalmente a la marcada estructura filogeográfica que obtuvimos para el gen ND2, todas las poblaciones mostraron valores altos de diversidad haplotípica y nucleotídica (Tabla 2). La diversidad nucleotídica fue similar entre las distintas poblaciones pero un poco mayor en el linaje *coelestis*. Esto puede deberse al hecho de haber obtenido un haplotipo que no se relacionó con ningún otro haplotipo dentro de dicho linaje (Fig. 5.2).

La prueba de distribución desajustada realizada para cada uno de los linajes obtenidos no mostró resultados significativos para el modelo de expansión poblacional ni para la prueba de neutralidad para la mayoría de los grupos (Fig. 5.4; Tabla 2), por lo que inferimos que las poblaciones han permanecido estables en el tiempo, con la excepción de *caudata*. Adicionalmente, si separamos el linaje *smaragdinus* en dos grupos definidos por la ubicación geográfica de los ejemplares, teniendo que aquellos ubicados al norte del Valle Urubamba, en Perú, los denominamos *smaragdinus(a)*, y aquellos ubicados al sur del mismo los definimos como *smaragdinus(b)*, obtuvimos que para el primer grupo mencionado los valores de la prueba de distribución desajustada son estadísticamente significativos. Es decir, tanto para *caudata* como para *smaragdinus(a)* los datos se ajustan al patrón esperado bajo un modelo de expansión poblacional (Fig. 5.4; Tabla 2). De hecho, para ambas poblaciones observamos, en la red de haplotipos (Fig. 5.2), un haplotipo central en alta frecuencia del cual se derivan otros haplotipos menos frecuentes y con pocas diferencias con respecto al haplotipo central (patrón estrellado). Esta información fue consistente con los datos obtenidos para la prueba de neutralidad (F_s).

Tabla 5.1. Índices de diversidad haplotípica, nucleotídica y pruebas de neutralidad para cada uno de los linajes obtenidos en los análisis filogenéticos realizados para el gen ND2. En rojo se muestran aquellos valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$). Los linajes definidos como *smaragdinus (a)* y *smaragdinus (b)* corresponden a ejemplares de dicho grupo ubicadas al norte y al sur del Valle Urubamba respectivamente.

Linaje	N	h	Hd	π	R_2	F_s
<i>berlepsi</i>	9	3	0,639	0,00143	0,2008	1,0733
<i>coelestis</i>	8	4	0,750	0,01082	0,1665	4,1762
<i>aethereus</i>	3	3	1,000	0,00221	-	-
<i>margarethae</i>	8	3	0,607	0,00233	0,2792	1,3288
<i>caudata</i>	28	10	0,548	0,00141	0,0655	-5,3759
<i>kingi</i>	3	1	0,000	0,000000	-	-
<i>mocoo</i>	12	9	0,939	0,00608	0,1716	-1,9871
<i>emmae</i>	8	6	0,893	0,00237	0,1382	-2,1226
<i>smaragdinus (a)</i>	15	11	0,876	0,00248	0,0909	-3,5211
<i>smaragdinus (b)</i>	18	8	0,686	0,00218	0,1078	0,13039

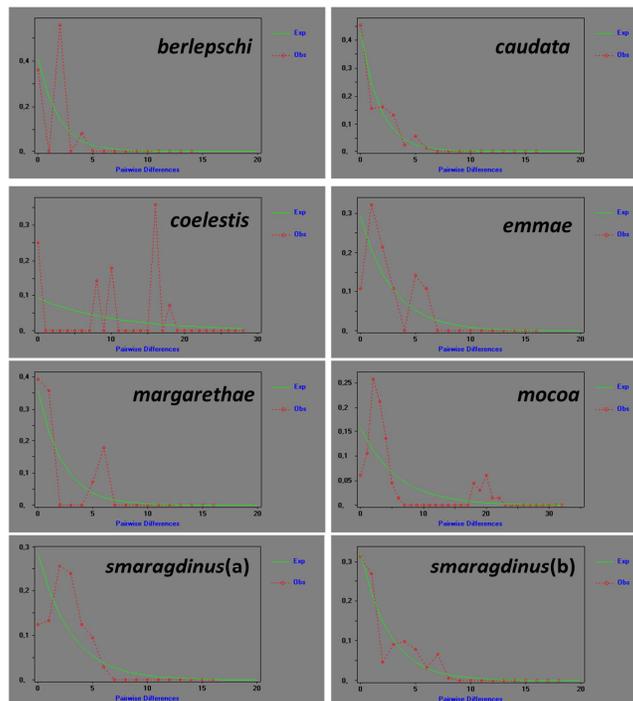


Figura 5.4. Distribución desajustada de los haplotipos pertenecientes a los distintos linajes definidos para el gen ND2, asumiendo un modelo de crecimiento poblacional. Se representan tanto las distribuciones observadas (línea roja punteada) como las esperadas bajo un modelo de expansión poblacional (línea verde continua). Ver Tabla 5.1 para la significancia estadística de estos resultados.

Los patrones de relación entre haplotipos del gen nuclear MUSK (Fig. 5.5) no son tan claros como los encontrados con el gen mitocondrial. Obtuvimos un patrón donde observamos que en varios casos se generaron bucles (loops, en inglés) que se generan como consecuencia de

homoplasia y nos indican que, en los sitios donde se generan, una conexión alternativa e igual de parsimoniosa existe. Sin embargo, pudimos apreciar cómo, a pesar de tener la presencia de haplotipos compartidos y de bucles, existe cierta congruencia entre las relaciones de los haplotipos y su ubicación geográfica lo que conlleva a que también exista una correspondencia taxonómica. Observamos un gran haplotipo representado exclusivamente por muestras que corresponden al linaje *smaragdinus* y del cual se derivan el resto de los haplotipos correspondientes a los demás linajes. También observamos que el complejo *aethereus* – *coelestis* se agrupa, con tres cambios nucleotídicos, de manera separada al resto de los linajes y que obtuvimos un haplotipo compartido entre ambos linajes. Observamos una tendencia hacia el ordenamiento (agrupamiento parcial de haplotipos correspondientes a las especies aceptadas actualmente) por parte de los linajes *margarethae* y *caudata* (parte izquierda de la figura) y que lo mismo ocurre con *mocoa* y *emmae* ya que si consideramos los bucles podríamos reordenar la red, agrupando los haplotipos de estos dos linajes (*mocoa* y *emmae*) hacia la izquierda quedando estos más relacionados entre sí.

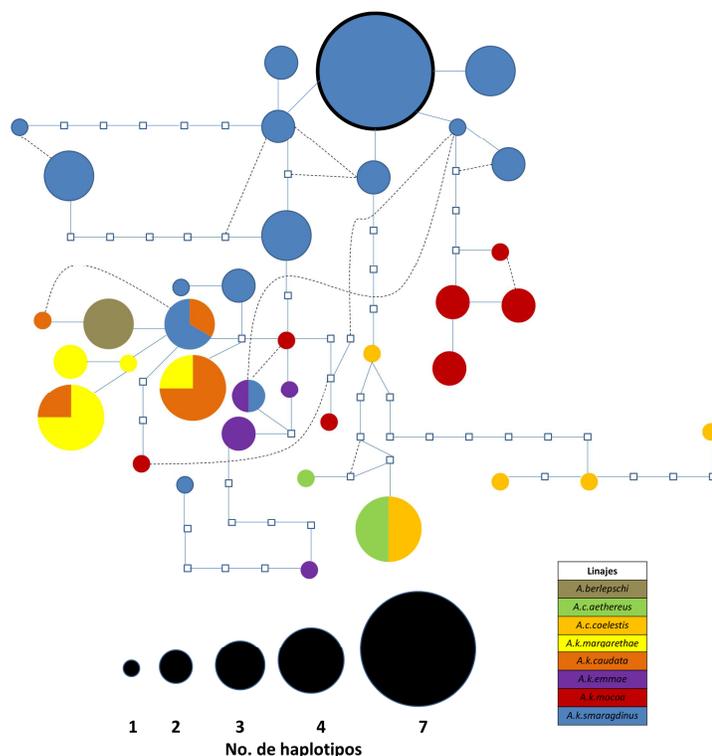


Figura 5.5. Red de haplotipos del género *Aglaiocercus* para el gen nuclear *MUSK* de todas las muestras secuenciadas. La circunferencia bordeada en negro representa el haplotipo potencialmente ancestral.

El valor de divergencia genética general promedio (distancia-p) para el gen ND2 fue de 6,1%. La divergencia genética entre los nueve linajes obtenidos (que corresponden a cada taxón reconocido actualmente) para dicho gen varió desde 1,1% (*emmae* – *kingi*) hasta 7,5% (*berlepschi* – *aethereus*) y resultaron, en la mayoría de los casos, más altos que las divergencias obtenidas dentro de cada linaje, las cuales variaron desde 0% (*kingi*) hasta un valor máximo de 1,3% (*coelestis*). Los mayores valores de divergencia genética entre linajes los presentó el linaje 3 (*aethereus*), presentando valores que van desde 5,1% con el linaje 2 (*coelestis*), de quien es el grupo hermano, hasta 7,5% con el linaje 1 (*berlepschi*). Los valores de divergencia más bajo se presentaron en el grupo conformado por *kingi*, *emmae* y *mocoa*. Para estas formas obtuvimos

valores que van desde 1,1% (entre *kingi* y *emmae*) hasta 2,8% (entre *emmae* y *mocoa*). El resto de los grupos presentan valores similares de divergencia entre ellos (entre 5% y 7%; Tabla 3).

Tabla 5.2. Valores de divergencia genética (distancia-p), expresada en porcentaje, para los distintos linajes obtenidos para el género *Aglaiocercus* empleando el gen ND2. La diagonal en color rojo indica los valores de divergencia genética dentro de cada linaje.

	N	linaje	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>berlepschi</i>	9	1	0,1									
<i>coelestis</i>	8	2	7,1	1,3								
<i>aethereus</i>	3	3	7,5	5,1	0,2							
<i>margarethae</i>	8	4	5,5	6,8	7,3	0,3						
<i>caudata</i>	28	5	5,4	6,0	7,3	2,8	0,1					
<i>kingi</i>	3	6	6,1	6,5	7,1	5,9	6,4	0				
<i>mocoa</i>	12	7	5,1	6,1	7,1	5,2	5,3	2,6	0,8			
<i>emmae</i>	8	8	6,1	6,7	7,2	6,1	6,6	1,1	2,8	0,2		
<i>smaragdinus</i>	15	9	6,5	6,7	6,3	5,0	5,5	5,3	5,2	5,5	0,5	
<i>Taphrolesbia</i>	18	10	5,4	4,8	6,0	5,4	5,3	5,1	5,0	5,3	4,7	0

5.3 Tiempos de divergencia

Estimamos los tiempos de origen y divergencia del género para dos posibles situaciones.

(1) Considerando a la especie *T. griseiventris* como la especie más cercana al resto de las formas que conforman al género *Aglaiocercus* obtuvimos valores de divergencia que van desde 1,94 Ma hasta 2,37 Ma, durante el Pleistoceno. (2) Si el cálculo de tiempo divergencia considera a la especie *A. melanogenys* como el taxón más cercana al género, el valor de divergencia que obtuvimos varió entre 3,43 Ma y 4,19 Ma, durante el Plioceno Medio. Finalmente, utilizamos el valor de divergencia genética general promedio de las formas que conforman el género *Aglaiocercus* para calcular cual pudo ser el tiempo de divergencia aproximado entre linajes y el resultado que obtuvimos fue de valores de divergencia que van de 2,32 Ma hasta 2,84 Ma, durante el Plioceno Tardío y principios del Pleistoceno.

6 Discusión

Los resultados de nuestros análisis filogenéticos sugieren que *Aglaiocercus* y *Taphrolesbia* son géneros cercanos, al punto tal que no pudimos demostrar la monofilia para el primer género. De igual manera, la baja resolución a nivel de nodos basales (politomía) nos impidió establecer las relaciones de parentesco entre los distintos linajes que logramos reconstruir. La alta diversidad genética que obtuvimos dentro de cada población en conjunto con la longitud de las ramas (las internas cortas y aquellas que soportan los distintos clados largas) sugiere que la divergencia poblacional ocurrió en período corto de tiempo y que posteriormente las distintas poblaciones se han mantenido aisladas por un tiempo relativamente largo.

6.1 Monofilia del género *Aglaiocercus*

La reconstrucción filogenética que obtuvimos para el gen mitocondrial ND2 resultó en una politomía que no nos permitió establecer las relaciones entre los géneros *Aglaiocercus* y *Taphrolesbia*. En un estudio previo (Kirchman y col. 2009; Fig. 2.1), al emplear pequeños segmentos de la secuencia de cuatro genes (entre ellos el gen mitocondrial ND2), obtuvieron como resultado una politomía en la que las especies *T. griseiventris* y *H. zusii* fueron las más cercanas al género *Aglaiocercus*, indicando la relación estrecha entre estos géneros. Aparte de este trabajo, no se tiene más información genética, o de otro tipo, sobre las relaciones filogenéticas entre ambos géneros.

La especie *T. griseiventris* es endémica de Perú y se encuentra en los Andes del norte y centro de dicho país (2750 – 3800 m s. n. m.). Hay registros de ejemplares para nueve localidades ubicadas en la ladera del Pacífico de la Cordillera en Cajamarca, en la cuenca del río Marañón en Cajamarca y en el Departamento de Huánuco (BirdLife International, 2013). *Taphrolesbia* se distribuye en regiones semiáridas y rocosas (Schulenberg y col., 2007) mientras que *Aglaiocercus*

habita en otra variedad de hábitats que incluyen, claros en el bosque húmedo, bordes de bosque, plantaciones, y bosques secundarios (Hilty, 2003).

A lo largo de la historia taxonómica de ambos géneros (*Agelaiocercus* y *Taphrolesbia*) se llegó a considerar que estos formaban parte de un mismo género. La especie *T. griseiventris* (Simon, 1918) tiene una historia taxonómica que no resulta tan extensa y complicada como la del género *Agelaiocercus*. Taczanowsky (1883) la incluyó dentro del género *Cynanthus* (Swainson, 1837), siendo éste un género que incluía a varios grupos que hoy forman géneros distintos (entre ellos *Agelaiocercus*). Posteriormente, se incluyó dentro de *Cyanolesbia* (Stejneger, 1885; Salvin, 1892) pero, Hartert (1898), confirmando la propuesta realizada por Simon (1897), excluye a *C. griseiventris* del género por las diferencias en las características del pico, coloración de ambos sexos y ancho de las rectrices y se incluye junto con la especie *caroli* dentro del género *Polyonymus* (del cual sabemos actualmente que no está relacionado filogenéticamente; Kirchman y col. 2009) Es en este momento (año 1898) cuando la historia taxonómica de ambos grupos (*Agelaiocercus* y *Taphrolesbia*) se separa ya que en una revisión posterior se crea el género monotípico *Taphrolesbia* (Simon, 1918), en función de sus caracteres morfológicos.

Morfológicamente ambas especies son diferentes. Las diferencias más notorias entre *Taphrolesbia* y *Agelaiocercus*, para los machos, son: (1) la longitud (más larga en *Agelaiocercus*) y coloración de la cola (verde con puntos dorados – anaranjados en *Taphrolesbia* mientras que en *Agelaiocercus* varía entre verde, azul y púrpura), (2) la coloración de la región inferior (verde en *Agelaiocercus* y gris en *Taphrolesbia*). Entre las semejanzas se puede resaltar la coloración de la garganta que es azul en *Taphrolesbia* al igual que en varias de las formas del género *Agelaiocercus*. Con respecto a las hembras, también hay diferencias notables ya que la hembra de *Taphrolesbia* es muy parecida al macho de la especie, difiriendo de este último en que no presenta la coloración

azul en la garganta y que posee la cola más corta mientras que la hembra de *Aglaiocercus* difiere del macho tanto en coloración de la garganta como de la parte inferior y la longitud de la cola.

Por las diferencias morfológicas y uso de hábitat pareciera que efectivamente *Aglaiocercus* y *Taphrolesbia* corresponden a dos géneros distintos. Sin embargo, nuestro análisis filogenético resultó en una politomía que, dependiendo de las causas, puede clasificarse como “suave” o “dura” (Maddison, 1989). Para poner a prueba si la politomía que obtuvimos es de un tipo u otro, necesitaríamos incorporar una mayor cantidad de muestras y genes (especialmente lo segundo) correspondientes a la especie *Taphrolesbia*. De igual forma, al no saber si la politomía encontrada es suave o dura no podemos descartar la opción de que *Taphrolesbia* se ubica dentro del género *Aglaiocercus* y que nos encontramos ante un caso de parafilia. Sin embargo, los resultados que obtuvimos de la prueba de Shimodaira – Hasegawa (Shimodaira, 2002) para la hipótesis de monofilia del género *Aglaiocercus* indicó que estadísticamente no podemos rechazar la hipótesis de que efectivamente el género es monofilético.

6.2 Relaciones filogenéticas entre las distintas formas del género *Aglaiocercus*

Nuestros análisis filogenéticos no lograron generar información sobre las relaciones entre los cinco linajes principales que obtuvimos. A pesar de no tener resolución a nivel basal encontramos un alto soporte estadístico para nueve taxa que corresponden a aquellos que se reconocen actualmente. Las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos de los análisis filogenéticos realizados para el gen mitocondrial ND2 y el gen nuclear MUSK probablemente respondan a que el tiempo de coalescencia de los genes mitocondriales es, aproximadamente, cuatro veces menor que para los genes nucleares (Zink y Barrowclough, 2008). Esto se debe a que, como el genoma mitocondrial se hereda únicamente de la madre y es haploide, el tamaño poblacional efectivo es un cuarto del que es para los genes nucleares (Moore, 1995). Esto ocasiona

que el ADN nuclear sea un indicador retardado (en comparación con el ADN mitocondrial) de la divergencia filogeográfica. Es decir, que las variaciones del ADN mitocondrial pueden capturar una señal de vicarianza que con un análisis de ADN nuclear se perdería. De igual manera, el ADN nuclear no sería muy efectivo en reconocer patrones filogeográficos recientes y debe, casi siempre, apoyarse en información obtenida de análisis de genes mitocondriales o caracteres morfológicos para generar inferencias filogenéticas (Barrowclough y Zink, 2009).

La polifilia encontrada en el análisis filogenético para el gen nuclear MUSK puede deberse a la separación incompleta de los linajes (incomplete lineage sorting, en inglés). Durante el inicio de proceso de especiación los alelos polimórficos que posee una especie parental son divididos de forma aleatoria en cada especie hija y, por esta razón, éstas tendrán ciertos alelos que se encuentran más relacionados con los alelos de la otra especie hija. Al pasar el tiempo, algunos alelos se pierden por deriva genética y se generan otros por mutación por lo que al final del proceso de especiación sólo un alelo de los ancestrales sobrevive en cada especie hija (Funk y Omland, 2003). Hasta que este proceso no culmina tendremos alelos compartidos entre ambas especies ocasionando la polifilia que obtuvimos. Una forma de resolver este problema sería generar varios árboles para varios genes (árboles de genes), y su tiempo de coalescencia individual, de manera que se pueda hacer una comparación entre éstos y ver si existe concordancia o no, en los resultados obtenidos, al emplear diversos genes y generar un árbol de especies (Maddison, 1997).

El resultado obtenido para el gen ND2 es similar al obtenido al concatenar ambos genes. Esto nos indica que la mayor parte de la información filogenética se encuentra en el gen mitocondrial. La presencia de la politomía en ambos resultados se podría deber a razones diferentes a las que generaron dicho resultado en el gen nuclear. Si la razón por la cual obtuvimos

la politomía como resultado se debe a que la cantidad de datos que empleamos (número de individuos, de genes o la cantidad de pares de bases del mismo) es poca para reconstruir las relaciones entre los haplotipos nos encontramos frente a una politomía suave. Algunos investigadores asumen que las politomías son de este tipo y que las mismas pueden resolverse mediante la incorporación de una mayor cantidad de datos y aplicando el tratamiento adecuado a los mismos (DeSalle y col., 1994; Maddison, 1989). Por otro lado, si la razón por la cual obtuvimos la politomía se debe a que el linaje ancestral de ambas especies generó tres o más linajes descendientes al mismo tiempo (las relaciones de ambas especies con *H. zussi* tampoco es clara; Kirchman y col., 2009), nos encontramos frente a un evento de especiación simultánea múltiple, el cual daría como resultado una politomía dura (Madisson, 1989). Se ha sugerido que los cambios geológicos (glaciaciones o cambios en el nivel del mar) pueden aislar a varias poblaciones, de una especie con amplia distribución geográfica, iniciando la divergencia y especiación de las mismas a través de procesos alopátricos (Hoelzer y Melnick, 1994).

Las radiaciones antiguas rápidas conducen a la reconstrucción de filogenias con un bajo soporte en las relaciones basales (Withfield y Lockhart, 2007). El patrón obtenido como consecuencia de una radiación rápida puede confundirse con una politomía suave y se podría solucionar de distintas maneras. Se ha propuesto que una posible solución para el problema de las politomías a nivel basal, por efecto de una rápida radiación, es el uso de caracteres que inicialmente evolucionen tan rápido como los linajes divergentes, pero luego evolucionen más lentamente (Donoghue y Sanderson, 1992). Por otra parte, se ha propuesto que de existir una estructura geográfica en la distribución de la variabilidad genética de la especie ancestral (que los alelos no se distribuyeran de manera aleatoria) no se podría resolver la politomía encontrada ya que, si la especiación ocurrió por aislamiento de poblaciones periféricas de diferentes partes del intervalo de distribución de la especie ancestral cada una de las especies hijas capturarían

diferentes subgrupos de la variación genotípica ancestral y sería imposible reconstruir el patrón de especiación (politomía dura; Hoelzer y Melnick, 1994). Este tipo de politomía, resultante de una rápida radiación, también se ha encontrado en otros grupos de aves de la Región Neotropical (Cadena y col., 2007; Pérez – Emán, 2005).

6.3 Caracteres genéticos, morfológicos y geografía: su implicación taxonómica.

La superposición de caracteres morfológicos presentes en los machos sobre la hipótesis evolutiva del género sugiere la falta de señal filogenético en estos caracteres. Por ejemplo, *margarethae* y *caudata* presentan coloración diferente de la garganta y de las rectrices de la cola y resultaron ser especies emparentadas. Por el contrario, la cercanía evolutiva entre taxones tiene mayor correspondencia con la cercanía geográfica de las distintas poblaciones. Por otra parte, los nueve linajes reconstruidos se encuentran dentro de los límites geográficos que se habían propuesto para las distintas formas que conforman el género (Schuchmann y Duffner, 1993; Zimmer, 1952).

Propuestas de especies basadas en el plumaje, como la coloración de la garganta agrupando a las formas *k. emmae* y *k. caudata* en una especie (Peters, 1945), pueden ser evaluadas con nuestra hipótesis filogenética. Nuestro análisis mostró que la forma *k. caudata* se encuentra más relacionada con la forma *k. margarethae*, la cual es una de las más cercanas geográficamente (la otra es *k. kingi*) y que la forma *k. emmae* se encuentra más relacionada con la forma *k. kingi* la cual posee una distribución adyacente a *k. emmae* en los Andes colombianos. También se ha propuesto la intergradación morfológica entre las formas que se encuentran más próximas geográficamente (Zimmer, 1952). Sin embargo, la fuerte estructura poblacional (para el gen ND2) encontrada, sugiere un bajo, o nulo, flujo genético entre poblaciones (altos valores de divergencia genética entre linajes) lo que pareciera indicar una baja probabilidad de hibridización.

Sin embargo, se requiere evaluar ejemplares de las regiones geográficas en las cuales las poblaciones de las distintas formas son más cercanas para observar si, a nivel genético y morfológico, se obtiene evidencia de hibridización. De ser cierta la propuesta realizada por Zimmer (1952) deberíamos encontrar haplotipos compartidos, entre los linajes para los cuales se propuso la intergradación, y que dichos haplotipos correspondan a las localidades más próximas entre tales formas.

Definir los límites entre especies dentro del género *Agelaiocercus* es, y ha sido, difícil debido al complejo patrón de variación en la coloración del plumaje que ha ocasionado que históricamente se hayan generado distintas agrupaciones de especies y subespecies. De acuerdo al concepto de especie que empleemos obtendremos una interpretación distinta de las variaciones geográficas y la especiación (Zink y Remsen, 1986). Basados en el concepto morfológico de especies (que pareciera ser el que se ha empleado hasta el momento para definir los límites entre especies dentro del género *Agelaiocercus*) tendremos que cada especie es morfológicamente diagnosticable de sus parientes cercanos. En este sentido, el surgimiento de determinadas características morfológicas (por ejemplo, coloración, tamaño, ornamentos, entre otras), o de cualquier otro tipo, eventualmente, podría ocasionar el aislamiento reproductivo (dependiendo de la respuesta comportamental de las especies a dichos caracteres). Sin embargo, no existe una relación exacta entre las diferencias morfológicas (o genéticas) y el aislamiento reproductivo (Ayala, 1982). Un ejemplo de cómo las variaciones morfológicas no pueden ser empleadas, por sí solas, para definir los límites entre especies se encuentra en el trabajo realizado por Banks (1964). En esta investigación se encontró que, luego de examinar las variaciones geográficas de una especie de gorrión (*Zonotrichia leucophrys*), las diferencias en coloración y longitud del ala no pueden ser consideradas como indicativo de diferenciación específica ya que no son caracteres indicativos del aislamiento reproductivo. Si bien las distintas formas de dicha especie presentaban

características ecológicas, comportamentales y fisiológicas similares (por lo que podrían entrecruzarse) el hecho de que durante la época de apareamiento las distintas formas no coinciden geográficamente no permite poner a prueba si las diferencias morfológicas, efectivamente, tiene un efecto de aislamiento.

Generalmente, la significancia biológica de las diferencias entre los caracteres es valorada de acuerdo a si las mismas funcionan como mecanismo de aislamiento reproductivo (Mayr, 1942). En este sentido, pareciera que los límites entre especies dentro del género *Aglaiocercus* se han definido dentro de tal criterio ya que, al menos en la propuesta donde se sugiere la intergradación entre diversas formas, es razón para establecer el estatus de subespecie a todas las formas (Zimmer, 1952). Lo mismo puede sugerirse de la propuesta que plantea que las formas que conforman la especie *kingi* se agrupan dentro de la misma debido a que caracteres como la coloración de la cola y de la garganta varían de forma clinal (de sur a norte; Schuchmann y Duffner, 1993).

Plantear los límites de especies (entendiendo esto como una medida de la relación filogenética que puede haber entre las formas) en función de caracteres morfológicos puede no ser el método más efectivo para el género *Aglaiocercus*. Los caracteres morfológicos empleados para definir los límites de especies entre poblaciones de *Aglaiocercus* no representan caracteres homólogos sino que, por el contrario, son caracteres homoplásicos que han aparecido y desaparecido de manera independiente en distintas poblaciones. Es decir, las características morfológicas de las distintas formas del género *Aglaiocercus* no parecen aportar información filogenética que permita establecer las relaciones de parentesco entre ellas. Este resultado, donde los caracteres morfológicos de plumaje no aportan una señal filogenética, ha sido encontrado en diversos estudios filogenéticos de aves (Chaves y Smith, 2011; Cheviron y col., 2005; García –

Moreno y col., 1999; Hackett y Rosenberg, 1990; Pérez – Emán, 2005). En estos casos se ha propuesto que la diferenciación genética es un mejor indicador de la historia evolutiva de los grupos ya que, probablemente, es una mejor representación de las subdivisiones poblacionales y por lo tanto permitiría hacer inferencias más certeras acerca de los procesos de diversificación (Zink, 2004).

Si bien pareciera que los caracteres morfológicos de los machos del género *Aglaiocercus* no aportan una señal filogenético, los resultados obtenidos de nuestros análisis filogenéticos, en conjunto con las descripciones morfológicas hechas por autores previos (Schuchmann, 1999) y la información geográfica sobre los límites de distribución de cada forma, nos permiten inferir que cada uno de los grupos que se han propuesto (Schuchmann y Duffner, 1993) y se aceptan actualmente (Remsen y col., 2013) representan unidades taxonómicas independientes. Sin embargo, debido a que no logramos obtener resolución a nivel basal y, por lo tanto, no logramos establecer las relaciones de parentesco entre todas las formas, no podemos contrastar nuestros resultados con las propuestas previas que establecen el rango taxonómico de cada grupo.

Si nos basamos en el concepto evolutivo de especie que propone que cada población que se encuentre lo suficientemente aislada, bien sea genéticamente o geográficamente, representa un linaje evolutivo independiente y por tanto es una especie (Wiley, 1981) podríamos indicar que, de acuerdo al resultado que obtuvimos de nuestro análisis filogenético (para el gen ND2) y los valores de divergencia genética entre los distintos linajes, que indican una fuerte estructura poblacional asociada a un flujo genético prácticamente nulo, efectivamente, cada uno de los clados obtenidos representa una unidad evolutiva independiente y, por tal razón, cada uno puede considerarse como una especie dentro del género *Aglaiocercus*.

Nuestros análisis filogenéticos sugieren un arreglo taxonómico de las distintas formas que actualmente conforman el género que no se asemeja a aquellas propuestas anteriormente por otros autores que se basaron, exclusivamente, en caracteres morfológicos (Fig. 6.1). las únicas semejanzas con respecto a la hipótesis taxonómica actual la conforman el linaje que conformado por las formas *aethereus* y *coelestis* las cuales resultaron más emparentadas según nuestros análisis filogenéticos y por lo tanto proponemos que las mismas mantengan el rango taxonómico actual (una especie, *coelestis*, con dos subespecies). También sugerimos que la forma *berlepschi* mantenga el rango taxonómico de especie. Por otra parte, nuestros resultados sugieren que las formas *kingii*, *emmae* y *mocoo* están más emparentada y por lo tanto proponemos que las mismas se agrupen, como subespecies, dentro de *kingii*. De igual manera las formas *caudata* y *margarethae* son agrupadas como subespecies de la última forma mencionada y *smaragdinus* resultó en un linaje para el cual no pudimos reconstruir sus relaciones filogenéticas y por tal razón sugerimos que se le asigne el rango taxonómico de especie. Destacamos el hecho de que la realización de análisis posteriores, que nos permitan resolver la politomía obtenida, podrían generar un rearrreglo de la hipótesis sugerida en este trabajo.

A. k. kingii
A. k. emmae
A. k. mocoo
A. m. margarethae
A. m. caudata
A. smaragdinus
A. berlepschi
A. c. coelestis
A. c. aethereus

Figura 6.1. Hipótesis taxonómica sugerida para las distintas formas del género *Aglaiocercus* en función de los resultados obtenidos de nuestros análisis filogenéticos.

6.4 Evolución y biogeografía

El posible tiempo de origen del género *Agelaiocercus* varió significativamente dependiendo de cuál taxón consideráramos como género hermano (*Adelomyia* o *Taphrolesbia*). Si consideramos a la especie *Adelomyia* como género hermano del género *Agelaiocercus* el resultado obtenido nos ubica en el Plioceno Medio. Por otra parte si consideramos a *Taphrolesbia* como el grupo más cercano la divergencia entre estos dos género ocurrió durante el Pleistoceno. Posteriormente, el género *Agelaiocercus* diversificó entre el Plioceno Tardío y principios del Pleistoceno.

Se ha sugerido que el género *Agelaiocercus* se originó durante el Pleistoceno y colonizó Los Andes, desde tierras bajas (Amazonía). Los cambios climáticos ocurridos durante dicho período de tiempo tuvieron como consecuencia que los bosques montanos se desplazaran a altitudes menores permitiendo la colonización de los mismos por parte de lo que se denominó un “Proto – *Agelaiocercus*” (Schuchmann y Duffner, 1993). Nuestros resultados sugieren un origen del género durante el Plioceno. Se ha propuesto que durante este último período ocurrió un levantamiento importante del altiplano andino y de la Cordillera Oriental de los Andes Centrales (Gregory – Wodzicki, 2000). De igual manera, ocurrió un cambio en las zonas de vida de las regiones montanas, las cuales se comprimieron y expandieron repetidamente durante los periodos fríos y cálidos, respectivamente (Haffer, 1969). La glaciación extensiva fragmentó los hábitats de las zonas montanas altas, generando barreras no solo asociadas a valles ribereños o interandinos, sino entre vertientes orientales y occidentales de las diferentes zonas montanas (Weir, 2006). Estos eventos pudieron ocasionar el aislamiento de las poblaciones que comenzaron a divergir generándose las formas que actualmente existen. Este periodo de tiempo coincide con otros trabajos que proponen que la mayor tasa de diversificación en aves de Los Andes ocurrió durante

el Plioceno tardío y el Pleistoceno (Fjeldså, 1994; García – Moreno y col., 1999; García – Moreno y Fjeldså, 2000; Weir, 2006).

Por otra parte, los tiempos de divergencia obtenidos para la radiación del género se asemejan a aquel propuesto por autores previos para explicar la radiación del género (Schuchmann y Duffner, 1993). En dicho trabajo se propuso que el género es un grupo filogenéticamente joven (probablemente generado durante el Pleistoceno) y que por tal razón las variaciones morfológicas eran escasas. De igual manera, dichos autores sugirieron que debido a que la radiación del género comenzó durante el Pleistoceno la distribución actual del mismo coincide con los “refugios” climáticos propuestos para dicho período (Haffer, 1969). Se ha propuesto, con base en evidencia geológica, que tanto el Plioceno como el Pleistoceno en Suramérica fueron períodos de tiempo muy dinámicos, tanto geológicamente como ambientalmente (Colinvaux, 1996; Gregory – Wodzicki, 2000). La actividad orogénica ocurrida durante el Plioceno, en conjunto con los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno, pudieron promover la rápida diversificación de género al influenciar tanto la dispersión (por el movimiento, hacia abajo, de los pisos altitudinales debido al clima frío durante los periodos glaciales y que conectó distintas cadenas montañosas) como el aislamiento de distintas poblaciones (debido al movimiento, hacia arriba, de los pisos altitudinales durante los periodos interglaciales calientes). Este período de tiempo ha sido propuesto como marco temporal de la diversificación de otros grupos de aves (*Buarremon*, Cadena y col., 2007; *Pionus*, Ribas y col., 2007; *Myioborus*, Pérez – Emán, 2005).

Los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno Tardío son sugeridos como elemento importante que promovió la diversificación de las aves (Haffer, 1974). La fuerte estructura genética poblacional que encontramos sugiere que los cambios climáticos ocurridos

durante los periodos glaciares del Pleistoceno Tardío no tuvieron un efecto en la diversificación de *Agelaiocercus* ya que, para la mayoría de los linajes evolutivos presentes en nuestra hipótesis filogenética, el tiempo estimado de divergencia es previo al Pleistoceno. Únicamente el clado conformado por *kingi* – *emmae* – *mocoa*, taxa que mostraron los menores valores de divergencia genética en comparaciones pareadas, parece haber sido afectado por tales cambios climáticos. Este resultado concuerda con otros trabajos que han indicado que la mayor diversificación de aves en las montañas de la Región Neotropical ocurrió en periodos previos al Pleistoceno Tardío (García – Moreno y Fjeldså, 2000; Gutiérrez – Pinto y col., 2012; Klicka y Zink, 1997; Pérez – Emán, 2005). De igual manera, los resultados obtenidos de los análisis demográficos nos indican que la mayoría de los linajes analizados permanecieron estables en el tiempo. La excepción al caso lo representan las poblaciones de *caudata* y *smaragdinus*(a) donde los valores obtenidos, y los resultados de la red de haplotipos, sugieren un evento de expansión poblacional reciente, durante el Pleistoceno Tardío (Rogers y Harpending, 1992). Sin embargo, debido a que para algunos linajes el muestreo fue reducido en cuanto a número de muestras y localidades incluidas (por ejemplo, *kingi*, *coelestis* y *emmae*) las inferencias realizadas sobre estabilidad poblacional deben considerarse con precaución hasta que no se incluyan una mayor cantidad de muestras y representantes de distintas localidades.

Las formas *berlepschi* y *coelestis*, según la hipótesis biogeográfica de Schuchmann y Duffner (1993), fueron las primeras en quedar aisladas geográficamente del resto de las formas del género *Agelaiocercus*. La presencia de una politomía en la hipótesis filogenética del género obtenida en este estudio no permite realizar inferencias acerca de los posibles escenarios de colonización. De igual manera, ya que los resultados de divergencia genética son muy similares entre la mayoría de los grupos, no podemos contrastar la hipótesis de divergencia temprana de los grupos *berlepschi* y *coelestis*.

La distribución del género *Agelaiocercus* abarca distintas regiones geográficas que podrían actuar como barreras para el flujo de individuos. Una de estas barreras es la Depresión de Unare (noroeste de Venezuela) la cual parece impedir el flujo genético entre *berlepschi* y *k. margarethae*. La diferenciación genética de taxa presentes en el Sector Oriental de la Cordillera de la Costa de Venezuela (Turimiquire, Península de Paria) ya se había propuesto anteriormente para esta especie (Schuchmann y Duffner, 1993) y otros taxa (*Basileuterus tristriatus*, Gutiérrez – Pinto y col., 2012; *Premnoplex*, Pérez – Emán y col., 2010). Otra barrera geográfica que parece estar interrumpiendo el flujo de individuos entre las poblaciones adyacentes a la misma sería la Depresión Turbio – Yaracuy (región centro - occidental de Venezuela), siendo ésta una barrera sugerida para otros grupos de aves (Buarremon, Cadena y col., 2007; *Adelomyia*, Chaves y Smith, 2011). Lo mismo ocurre con la presencia del Valle del Río Marañón (Norte de Perú) y el Valle del Urubamba (Sur de Perú), los cuales también afectan el flujo de individuos en otros grupos de aves (Chaves y col., 2011; Gutiérrez – Pinto y col., 2012). El patrón biogeográfico obtenido para el género *Agelaiocercus* es consistente con el patrón encontrado en otros estudios filogeográficos de colibríes de la región (Chaves y Smith, 2011; García – Moreno y col., 1999) y de aves en general (Cadena y col., 2007; Gutiérrez – Pinto y col., 2012; Pérez – Emán, 2005; Weir y col., 2008) donde se observó que las barreras previamente mencionadas, así como otras más que no parecen afectar al género *Agelaiocercus* (por ejemplo, la Depresión del Táchira, en Venezuela, y la Cordillera de Vilcanota, en Perú; Gutiérrez – Pinto y col., 2012), afectan la estructura poblacional de diversos grupos de aves generando diferenciación geográfica tanto a nivel morfológico como molecular.

La concordancia en la distribución geográfica de distintos grupos de aves (y en general de animales y plantas) en el sistema montañoso andino, así como el hecho de que los límites poblacionales, de tales grupos, coincidan con las mismas barreras geográficas, ha permitido definir áreas de endemismo dentro Los Andes (Weir, 2009). En dicho trabajo se observó que las barreras

que implican la presencia de tierras bajas (por ejemplo, valles) son las que generan los mayores niveles de divergencia genética entre especies. Este resultado es consistente con lo que encontramos para el género *Aglaiocercus* donde observamos que las cuatro barreras geográficas que claramente se asocian con una interrupción del flujo genético entre poblaciones adyacentes a las mismas corresponden a regiones de tierras bajas.

Nuestros resultados apoyan la idea de que la compleja topografía de los Andes tiene un papel importante en la generación y mantenimiento de la biodiversidad presente en dicha región, ya que surgimiento del sistema montañoso andino generó cambios significativos en la topografía de la región. En el caso del género *Aglaiocercus*, a través de este estudio resaltamos la importancia de la topografía Andina en promover y mantener la diversidad dentro del género el cual, al estar distribuido en los hábitats ubicados en las partes altas de la cadena montañosa, presenta poblaciones adyacentes aisladas por la presencia de diversas barreras (por ejemplo, profundos valles). Este paisaje ha, sin duda, promovido la diferenciación geográfica y, consecuentemente, la generación de nuevas especies. Los resultados de este estudio refuerzan la idea de que Los Andes, así como otras regiones montañas como la Cordillera de la Costa en Venezuela, representan áreas que han favorecido la diversificación de diversos organismos, sugiriendo la necesidad de realizar una mayor cantidad de estudios biogeográficos en la región a fin de entender los procesos que generaron los patrones de biodiversidad que allí se encuentran.

7 Conclusiones

1. La reconstrucción filogenética que obtuvimos para el gen mitocondrial ND2 resultó en un politomía y no permite evaluar la hipótesis de monofilia del género *Agelaiocercus*.
2. La hipótesis filogenética del género *Agelaiocercus* muestra una fuerte estructura genética y la presencia de cinco grupos monofiléticos. Sin embargo, las relaciones entre estos clados no pueden ser evaluadas debido a la politomía que caracteriza a dicha hipótesis.
3. La superposición de características morfológicas (patrones de coloración del plumaje en machos) en la hipótesis filogenética basada en caracteres moleculares sugiere que los caracteres de plumaje evaluados son homoplásicos.
4. El origen del género *Agelaiocercus* se estima ocurrió en el periodo comprendido entre el Plioceno Temprano y el Pleistoceno, diversificándose principalmente durante este último periodo.
5. Los resultados de los análisis filogenéticos sugieren una larga historia de aislamiento para la mayoría de los linajes en el género *Agelaiocercus*, lo cual generó la fuerte estructura poblacional que observamos hoy día. Sin embargo, este patrón varía espacialmente con señales de expansión geográfica en los Andes Centrales (*smaragdinus*) y del Norte (*caudata*).
6. La fuerte estructura genética presente entre diferentes poblaciones del género *Agelaiocercus* a lo largo de su distribución geográfica sugiere un aislamiento efectivo de estas poblaciones por el efecto de barreras geográficas.

8 Bibliografía

- Areta, J. I. 2007. Behavior and phylogenetic position of *Premnoplex* barbtails (Furnariidae). *The Condor* **109**: 399 – 407.
- Avise, J. C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol. Ecol.* **7**: 371 – 379.
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA, E. U. A.
- Avise, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* **36**: 3 – 15.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. y Saunders, N. C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA Bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 489 – 522.
- Ayala, F. J. 1982. Gradualism versus punctualism in speciation: Reproductive isolation, morphology, genetics. Págs. 51-66 en; Barigozzi, C. (ed.) Mechanisms of speciation. Alan R. Liss, Inc. New York, Estados Unidos.
- Banks, R. C. 1964. Geographic variation in the White-crowned Sparrows *Zonotrichia leucophrys*. Univ. California Publ. Zool. **70**: 1 – 123.
- Barker, F. K. y Lutzoni, F. M. 2002. The utility of the incongruence length difference test. *Syst. Biol.* **51**: 625 – 637.
- Barrowclough, G. F. y Zink, R. M. 2009. Funds enough, and time: mtDNA, nuDNA and the discovery of divergence. *Mol. Ecol.* **18**: 2934 – 2936.
- Bates, J. M. y Zink, R. M. 1994. Evolution into the Andes: molecular evidence for species relationships in the genus *Leptopogon*. *The Auk* **111**: 507 – 515.
- Benham, P. M. 2012. The roles of geological history, topography, and environmental heterogeneity in the diversification of an endemic Andean radiation the *Metallura*

hummingbirds. Tesis de maestría. Universidad de Nuevo México, Albuquerque, Estados Unidos.

- Berlepsch, H. V. 1892. Neue südamerikanische vogelarten: *Upucerthia harterti*, *Cyanolesbia emmae*, *Cyanolesbia caudata*, *Crypturus garleppi*, *Nothoprocta mocbuisi*. *J. Ornithol.* **40**: 443 - 456.
- Bleiweiss, R. 1998. Origin of hummingbird faunas. *Biol. J. Linn. Soc.* **65**: 77 – 97.
- Bleiweiss, R., Kirsch, J. A. W. y Matheus, J. C. 1997. DNA Hybridization evidence for the principal lineages of hummingbirds (Aves: Trochilidae). *Mol. Biol. Evol.* **14**: 325 – 343.
- Boissonneau, A. 1840. Travaux inédits. Oiseaux nouveaux ou peu connus de Santa – Fé de Bogotá. *Revue Zool.* 2 - 8.
- Boucard, A. 1895. Genera of humming birds. Londres, Inglaterra.
- Browne, P. 1756. The civil and natural history of Jamaica in three parts. Capítulo IV, Sección, VI, Londres, Inglaterra.
- Brumfield, R. T. 2005. Mitochondrial variation in Bolivian populations of the variable antshrike (*Tamnophilus caerulescens*). *The Auk* **122**: 414 – 432.
- Brumfield, R. T. y Remsen, J. V. Jr. 1996. Geographic variation and species limits in *Cinnycerthia* wrens of the Andes. *Wilson Bull.* **108**: 205 – 227.
- Cabanne, G. S., d’Horta, F. M., Sari, E. H. R., Santos, F. R. y Miyaki, C. y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* **49**: 760 – 773.
- Cadena, C. D. y Cuervo, A. M. 2010. Molecules, ecology, morphology, and songs in concert: how many species is *Arremon torquatus* (Aves: Emberizidae)? *Biol. J. Linn. Soc.* **99**: 152 – 176.

- Cadena, C. D., Klicka, J. y Ricklefs, R. E. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush – finches (Aves, Emberizidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **44**: 993 – 1016.
- Chapman, F. M. 1917. The distribution of bird life in Colombia. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **36**: 1 – 169.
- Chapman, F. M. 1925. Descriptions of new birds from Ecuador and Peru. *American Museum Novitates.* **187**: 1 – 9.
- Cháves, J. A., Pollinger, J. P., Smith, T. B. y LeBuhn, G. 2007. The role of geography and ecology in shaping the phylogeography of the speckled hummingbird (*Adelomyia melanogenys*) in Ecuador. *Mol. Phylogenet. Evol.* **43**: 795 – 807.
- Cháves, J. A. y Smith, T. B. 2011. Evolutionary patterns of diversification in the Andean hummingbird genus *Adelomyia*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **60**: 207 – 218.
- Cheviron, Z. A., Hackett, S. J. y Capparella, A. P. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Mol. Phylogenet. Evol.* **36**: 338 – 357.
- Clement, M., Posada, D. y Crandall, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657-1660.
- Colinvaux, P. A. 1996. Quaternary environmental history and forest diversity in the Neotropics. Págs. 359 – 405. En: Jackson, J. B. C., Budd, A. F. y Coates, A. G. (eds.) *Evolution and environment in tropical America*, University of Chicago Press, Chicago.
- Cracraft, J. 1985. Historical biogeography and patterns of differentiation within the South America avifauna: Areas of endemism. *Ornithological Monographs.* **36**: 49 – 84.

- Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. Págs. 27 – 59. en: Otte, D. y Endler, J. A. (eds.), *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Crochet, P. A., Bonhomme, F. y Lebreton, J. D. 2000. Molecular phylogeny and plumage evolution in gulls (Larini). *J. Evol. Biol.* **13**: 47 – 57.
- DeSalle, R., Absher, R. y Amato, G. 1997. Speciation and phylogenetic resolution. *Tree* **9**: 297 – 298.
- Díaz de Gamero, M. L. 1996. The changing course of the Orinoco River during the Neogene: a review. *Palaeogeogr. Palaeocl.* **123**: 385 – 402.
- Domínguez – Domínguez, O. y Vázquez – Domínguez, E. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* **32**: 59 – 70.
- Donoghue, M. J. y Sanderson, M. J. 1992. The suitability of molecular and morphological evidence in reconstructing plant phylogeny. Págs. 340 – 368. En: Soltis, D., Soltis, P. y Doyle, J. (eds.) *Molecular systematics in plants*. Chapman and Hall. New York, Estados Unidos.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, G. y Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315 – 319.
- Feinsinger, P., Wolfe, J. A. y Swarm, L. A. 1982. Island ecology: reduced hummingbird diversity and the pollination biology of plants, Trinidad and Tobago, West Indies. *Ecology* **63**: 494 – 506.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

- Fjeldså, J. 1994. Geographical patterns for relict and Young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodivers. Conserv.* **3**: 207 – 226.
- Fleischer, R. C., Mcintosh, C. E. y Tarr, C. L. 1998. Evolution on a volcanic conveyor belt: using phylogeographic reconstructions and K-Ar-based ages of the Hawaiian Islands to estimate molecular evolutionary rates. *Mol. Ecol.* **7**: 533-545.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical test of neutrality against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics* **147**: 915-925.
- Funk, D. J. y Omland, K. E. 2003. Species – level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **34**: 397 – 423.
- García – Moreno, J. 2004. Is there a universal mtDNA clock for birds? *J. Avian. Biol.* **35**: 465 – 468.
- García – Moreno, J. y Fjeldså, J. 2000. Chronology and mode of speciation in the Andean avifauna. *Bonn. Zool. Monogr.* **46**: 25 – 46.
- García – Moreno, J., Arctander, P. y Fjeldså, J. 1999. Strong diversification at the treeline among *Metallura* hummingbirds. *The Auk* **116**: 702 – 711.
- García – Moreno, J., Cortés, N., García – Deras, G. M. y Hernández – Baños, B. E. 2006. Local origin and diversification among *Lampornis* hummingbirds: A Mesoamerican taxon. *Mol. Phylogenet. Evol.* **38**: 488 – 498.
- Graham, C. H., Parra, J. L., Rahbek, C. y McGuire, J. A. 2009. Phylogenetic structure in tropical hummingbird communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**: 19673 – 19678.
- Graves, G. R. 1993. Relic of a lost world: a new species of sunangel (Trochilidae: *Heliangelus*) from “Bogotá”. *The Auk* **110**: 1 – 8.

- Greenberg, R., Cordero, P. J., Droege, S. y Fleischer, R. C. 1998. Morphological adaptation with no mitochondrial DNA differentiation in the coastal plain swamp sparrow. *The Auk* **115**: 706 – 712.
- Gregory – Wodzicki, K. M. 2000. Uplift history the Central and Northern Andes: a review. *Geol. Soc. Am. Bull.* **112**: 1091 – 1105.
- Gutiérrez – Pinto, N., Cuervo, A. M., Miranda, J., Pérez – Emán, J. L., Brumfield, R. T. y Cadena, C. D. 2012. Non – monophyly and deep genetic differentiation across low – elevation barriers in a Neotropical montane bird (*Basileuterus tristriatus*; Aves: Parulidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **64**: 156 – 165.
- Hackett, S. T. y Rosenberg, K. V. 1990. Comparison of phenotypic and genetic differentiation in South American antwrens (Formicariidae). *The Auk* **107**: 473 – 489.
- Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian forest birds. *Science* **165**: 131 – 137.
- Haffer, J. 1974. Avian speciation in tropical South America, with a systematic survey of the tucans (Ramphastidae) and jacamars (Galbulidae). *Publ. Nutall. Ornithol. Club* no. 14.
- Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. *Biodivers. Conserv.* **6**: 451 – 476.
- Haffer, J. y Prance, G. T. 2001. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: On the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana* **16**: 579 – 605.
- Hartert, E. y Hartert, C. 1894. On a collection of humming – birds from Ecuador and Mexico. *Novit. Zool.* **1**: 43 – 64.
- Hartert, E. 1897. Various notes on humming – birds. *Novit. Zool.* **4**: 529 - 533.
- Hartert, E. 1897. Various notes on humming-birds. *The Ibis* **39**: 423 – 435.
- Hartert, E. 1898. Further notes on humming – birds. *Novit. Zool.* **5**: 514 – 520.

- Hartert, E. 1922. Types of birds in the Tring Museum. B. Types in the general collection. *Trochili. Novitat. Zool.* **29**: 403 – 412.
- Heine, F. 1863. Trochilidica. *J. Ornithol.* **11**: 173-217.
- Hilty, S. 2003. Birds of Venezuela. Segunda edición. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, E. U. A.
- Hoelzer, G. A. y Melnick, D. J. 1994. Patterns of speciation and limits to phylogenetic resolution. *Tree* **9**: 104 – 107.
- Holsinger, K. E. 2006. Tajima's D, Fu's F_s , Fay and Wu's H, and Zeng et al.'s E. Selection Statistics.
- Houston, J. y Hartley, A. J. 2003. The Cenral Andean west – slope rainshadow and its potential contribution to the origin of hyper – aridity in the Atacama Desert. *Int. J. Climatol.* **23**: 1453 – 1464.
- Isler, M. L., Isler, P. R., Whitney, B. M. y Walker, B. 2001. Species limits in antbirds: the *Thamnophils punctatus* complex continued. *The Condor* **103**: 278 – 286.
- Isler, M. L., Isler, P. R. y Brumfield, R. T. 2005. Clinal variation in vocalizations of an antbird (Thamnophilidae) and implications for defining species limits. *The Auk* **122**: 433 – 444.
- Kimball, R. T., Braun, E. L., Barker, F. K., Bowie, R. C. K., Braun, M. J., Chojnowski, J. L., Hackett, S. J., Han, K., Harshman, J., Heimer – Torres, V., Holznagel, W., Huddleston, C. J., Marks, B. D., Miglia, K. J., Moore, W. S., Reddy, S., Sheldon, F. H., Smith, J. V., Witt, C. C. y Yuri, T. 2009. A well-tested set of primers to amplify regions spread across the avian genome. *Mol. Phylogenet. Evol.* **50**: 654 – 660.
- Kirchman, J. J., Witt, C. C., McGuire, J. A. y Graves, G. R. 2009. DNA from a 100 – year – old holotype confirms the validity of a potentially extinct hummingbird species. *Biol. Lett.* **6** : 112 – 115.

- Klicka, J. y Zink, R. M. 1997. The importance of recent ice ages in speciation: a failed paradigm. *Science* **277**: 1666 – 1669.
- Lesson, R. P. 1832. Index general et synoptique des oiseaux du genre *Trochilus*. Arthus Bertrand, París, Francia.
- Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451- 1452.
- Linnaeus, C. 1758. Systema naturae per regna tria naturae, secundum clases, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio Decima. Reformata. Holmiae, Impensis Direct. Laurentii salvii.
- Lovette, I. J. 2004. Mitochondrial dating and mixed support for the “2% rule” in birds. *The Auk* **121**: 1 – 6.
- Maddison, W. 1989. Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. *Cladistics* **5**: 365 – 377.
- Maddison, W. 1997. Gene trees in species trees. *Syst. Biol.* **46**: 523 – 536.
- Marks, B. D., Hackett, S. J. y Capparella, A. P. 2002. Historical relationships among Neotropical lowland forest areas of endemism as determined by mitochondrial DNA sequence variation within the wedge – billed woodcreeper (Aves: Dendrocolaptidae: *Glyphorynchus spirurus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **24**: 153 – 167.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia University Press. New York, Estados Unidos.
- Mayr, E. 1970. Population, species, and evolution. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Mayr, G. 2004. Old World fossil record of modern – type hummingbirds. *Science* **304**: 861 – 864.

- McGuire, J. A., Witt, C. C., Altshuler, D. L. y Remsen, J. V. Jr. 2007. Phylogenetic systematics and biogeography of hummingbirds: Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. *Syst. Biol.* **56**: 837 – 856.
- Milá, B., Smith, T. B. y Wayne, R. K. 2007. Speciation and rapid phenotypic differentiation in the yellow – rumped warbler *Dendroica coronate* complex. *Mol. Ecol.* **16**: 159 – 173.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W. y Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES science gateway for inference of large phylogenetic trees. En: Proceedings of the gateway computing environments workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1 – 8.
- Moore, W. S. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial – gene trees versus nuclear – gene trees. *Evolution* **49**: 718 – 726.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nei, M. y Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. New York, Estados Unidos.
- Omland, K. E. y Lanyon, S. M. 2000. Reconstructing plumage evolution in orioles (*Icterus*): repeated convergence and reversal in patterns. *Evolution* **54**: 2119 – 2133.
- Parra, J. L., Remsen, J. V. Jr., Alvarez – Rebolledo, M. y McGuire, J. A. 2009. Molecular phylogenetics of the hummingbird genus *Coeligena*. *Mol. Phylogenet. Evol.* **53**: 425 – 434.
- Pérez – Emán, J. L. 2005. Molecular phylogenetics and biogeography of the Neotropical redstarts (*Myioborus*; Aves, Parulinae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **37**: 511 – 528.
- Pérez – Emán, J. L., Mumme, R. L. y Jabłoński, P. G. 2010. Phylogeography and adaptive plumage evolution in Central American subspecies of the slate – throated redstart (*Myioborus miniatus*). *Ornithological Monographs* **67**: 90 – 102.

- Peters, J. L. 1945. Check-List of Birds of the World. Cambridge University Press, London. **V**: 123-125.
- Ramos-Onsins, S. E. y Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 2092-2100.
- Remsen, J. V., Jr., Cadena, C. D., Jaramillo, A., Nores, M., Pacheco, J. F., Pérez – Emán, J., Robbins, M. B., Stiles, F. G., Stotz, D. F. y Zimmer, K. J. 2013. A classification of the bird species of South America. American Ornithologists' Union. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>
- Rogers, A. R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* **49**: 608-615.
- Rogers, A. R. y Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **9**: 552-569.
- Ribas, C. C., Moyle, R. G., Miyaki, C. Y. y Cracraft, J. 2007. The assembly of montane biotas: linking Andean tectonics and climatic oscillations to independent regimes of diversification in *Pionus* parrots. *Proc. R. Soc. B.* **274**: 2399 – 2408.
- Salvin, O. 1892. Catalogue of the birds in the British Museum. **16**: 140 – 141.
- Schulenberg, T. S., Stotz, D. F., Lane, D. F., O'Neill, J. P. y Parker III, T. A. 2007. *Birds of Peru*. Princeton University Press. Princeton, Nueva Jersey.
- Shields, G. F. y Wilson, A. C. 1987. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J. Mol. Evol.* **24**: 212-217.
- Schuchmann, K. L. 1999. Family Trochilidae (hummingbirds). Págs. 468 – 680. en: J. Del Hoyo, A. Elliot y J. Sargatal (eds.), Handbook of the birds of the world, volumen 5, Barn – owls to hummingbirds. Lynx Editions. Barcelona, España.

- Schuchmann, K. L. y Duffner, K. 1993. Geographische variation und speziationmuster der andinen Kolibrigattung *Agelaiocercus* Zimmer 1930. *Ann. Orn.* **17**: 75 – 92.
- Shimodaira, H. 2002. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst. Biol.* **51**: 492-508.
- Shimodaira, H. y Hasegawa, M. 1999. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1114-1116.
- Simon, E. 1921. Histoire naturelle des Trochilidae (synopsis et catalogue). Enciclopedia Roret. Paris, Francia.
- Simpson, B. B. 1975. Pleistocene changes in the flora of the high tropical Andes. *Paleobiology* **1**: 273 – 294.
- Simpson, B. B. y Haffer, J. 1978. Speciation patterns in Amazonian forest biota. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **9**: 497 – 518.
- Smith, B. T. y Klicka, J. 2010. The profound influence of the Late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of New World birds. *Ecography* **33**: 333 – 342.
- Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T. y Mindell, D. P. 1999. Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol. Phylogenet. Evol.* **12**: 105-114.
- Spellman, G. M., Riddle, B. y Klicka, J. 2007. Phylogeography of the mountain chickadee (*Poecile gambeli*): diversification, introgression, and expansion in response to Quaternary climate change. *Mol. Ecol.* **16**: 1055 – 1068.
- Stamatakis, A. 2006. RAxML – VI – HPC: maximum likelihood – based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* **22**: 2688 – 2690.
- Stamatakis, A.: The RAxML 7.0.4 Manual. The Exelixis Lab, LMU Munich. (Abril 2008).

- Stamatakis, A., Hoover, P. y Rougemont, J. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Syst. Biol.* **57**: 758 – 771.
- Stejneger, L. 1885. Analecta Ornithologica: fourth series. *The Auk* **2**: 43 – 52.
- Stiles, F. G. 1975. Ecology, flowering phenology, and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecology* **56**: 285 – 301.
- Stone, W. 1907. Some changes in the current generic names of North American birds. *The Auk* **24**: 189 – 199.
- Swainson, W. 1827. A synopsis of the birds discovered in Mexico by W. Bullock F. L. S. and H. S., and Mr. William Bullock, jun. *Philos. Mag. Series 2.* **1**: 433 – 442.
- Swainson, W. 1837. The natural history and classification of birds. Cabinet Cyclopaedia. Vol II. Londres, Inglaterra.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP version 4.0b10: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Sinauer. Sunderland, Massachusetts.
- Taczanowski, M. L. 1883. Description des espèces nouvelles de la collection péruvienne de M. le Dr. Raimondi de Lima. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 70 - 72.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, D., Stecher, N., Nei, M. y Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2731 - 2739
- Vuilleumier, F. 1969. Pleistocene speciation in birds living in the high Andes. *Science* **223**: 1179 – 1180.
- Vuilleumier, B. S. 1971. Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science* **173**: 771 – 780.
- Weir, J. T. 2006. Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland Neotropical birds. *Evolution* **60**: 842 – 855.

- Weir, J. T. 2009. Implications of genetic differentiation in Neotropical montane forest birds. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **96**: 410 – 433.
- Weir, J. T. y Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Mol. Ecol.* **17**: 2321 – 2328.
- Weir, J. T., Bermingham, E., Miller, M. J., Klicka, J. y González, M. A. 2008. Phylogeography of a morphologically diverse Neotropical montane species, the Common Bush – Tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **47**: 650 – 664.
- Wesselingh, F. P., Hoorn, C., Kroonenberg, S. B., Antonelli, A., Lundberg, J. G., Vonhof, H. B. y Hooghiemstra, H. 2010. On the origin of Amazonian landscapes and biodiversity: a synthesis. Págs. 421 – 431. En: C. Hoorn y F. P. Wesselingh (eds.), *Amazonia, landscape and species evolution: A look in the past*. Blackwell Publishing, Primera Edición, Hoboken, Nueva Jersey, Estados Unidos.
- Whitfield, J. y Lockhart, P. 2007. Deciphering ancient rapid radiations. *Trends. Ecol. Evol.* **22**: 258 – 265.
- Wiley, E. O. 1981. *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics*. Wiley Interscience. Nueva York, Estados Unidos.
- Zink, R. M. y Barrowclough, G. F. 2008. Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Mol. Ecol.* **17**: 2017 – 2121.
- Zimmer, J. T. 1930. Birds of the Marshall Field Peruvian Expedition 1922 - 1923. *Field. Mus. Nat. Hist.* **XVII**: 290 – 291. Chicago, Estados Unidos.
- Zimmer, J. T. 1952. Studies of Peruvian birds. No. 62. The genera *Patagona*, *Sappho*, *Polyonymus*, *Ramphomicron*, *Metallura*, *Chalcostigma*, *Taphrolesbia*, and *Agelaiocercus*. *Amer. Mus. Novitates.* **1595**: 23 – 29.

- Zimmer, K. J. 2002. Species limits in olive – backed foliage – gleaners (*Automolus*: Furnariidae). *Wilson Bull.* **114**: 20 – 37.
- Zink, R. M. 2004. The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **271**: 561 – 564.
- Zink, R. M. y Remsen, J. V. Jr. 1986. Evolutionary processes and patterns of geographic variation in birds. Págs. 1 - 69 en: R. F. Johnston (ed.), *Current Ornithology*, Vol. 4, Plenum Press. Nueva York, Estados Unidos.
- Zink, R. M., Rising, J. D., Mockford, S., Horn, A. G., Wright, J. M., Leonard, M. y Westberg, M. C. 2005. Mitochondrial DNA variation, species limits, and rapid evolution of plumage coloration and size in the savannah sparrow. *The Condor* **107**: 21 – 28.
- "Zoonomen Nomenclatural data" (2013) Alan P. Peterson <http://www.zoonomen.net> Septiembre, 2013.

Anexo 1. Lista de taxa, número de tejido y/o catálogo, museo o colección, localidades y genes secuenciados de las muestras pertenecientes al género *Agelaiocercus* que se emplearon en este proyecto.

ID	Especie	Subespecie	Museo	Catálogo	Muestra	Tipo	País	Estado/Departamento/Provincia	Localidad	Altura (m)	ND2	MUSK
A1	<i>berlepschi</i>	-	COP	81278	IC1168	Tejido	Venezuela	Monagas	Serranía de Caripe	1800	x	x
A2	<i>berlepschi</i>	-	COP	81279	IC1169	Tejido	Venezuela	Monagas	Serranía de Caripe	1800	x	
A3	<i>berlepschi</i>	-	COP	81280	IC1176	Tejido	Venezuela	Monagas	Serranía de Caripe	1865	x	x
A4	<i>berlepschi</i>	-	COP	-	JP360	Tejido	Venezuela	Monagas	Serranía de Turimiquire	1800	x	x
A5	<i>berlepschi</i>	-	IZET – UCV	-	AB1	Pluma	Venezuela	Monagas	Piedra de Moler	-	x	
A6	<i>berlepschi</i>	-	IZET – UCV	-	AB2	Pluma	Venezuela	Monagas	Piedra de Moler	-	x	
A7	<i>berlepschi</i>	-	IZET – UCV	-	AB3	Pluma	Venezuela	Monagas	Piedra de Moler	-	x	
A8	<i>berlepschi</i>	-	IZET – UCV	-	AB4	Pluma	Venezuela	Monagas	Piedra de Moler	-	x	
A9	<i>berlepschi</i>	-	IZET – UCV	-	AB6	Pluma	Venezuela	Monagas	Piedra de Moler	-	x	
A10	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	ICN	37452	JPL410	Cojinetes	Colombia	Cauca	El Tambo	2200		x
A11	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	ICN	37453	JPL411	Cojinetes	Colombia	Cauca	El Tambo	2270	x	x
A12	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	ZMUC	128024	OR15	Sangre	Ecuador	Imbabura	Cerca de Junin	1500	x	x
A13	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	ZMUC	128040	OR32	Sangre	Ecuador	Imbabura	Cerca de Junin	1500	x	
A14	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	ZMUC	128030	OR22	Sangre	Ecuador	Imbabura	Cerca de Junin	1500		x
A15	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	ZMUC	128041	OR33	Sangre	Ecuador	Imbabura	Cerca de Junin	1500		x
A16	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	ZMUC	128049	OR41	Sangre	Ecuador	Imbabura	Cerca de Junin	1500		x
A17	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	QCAZ	-	CARS159	Tejido	Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito	1900	x	
A18	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	QCAZ	-	CARS171	Tejido	Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito	1900	x	
A19	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	QCAZ	4040	CARS177	Tejido	Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito	1900	x	
A20	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	QCAZ	-	CARS168	Tejido	Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito	1900	x	
A21	<i>coelestis</i>	<i>coelestis</i>	QCAZ	-	CARS172	Tejido	Ecuador	Pichincha	Estación Científica Río Guajalito	1900	x	
A22	<i>coelestis</i>	<i>aethereus</i>	LSUMNH	7813	-	Tejido	Ecuador	El Oro	9.5 km camino a Pinas	900	x	x
A23	<i>coelestis</i>	<i>aethereus</i>	ZMUC	113486	NK19	Sangre	Ecuador	El Oro	9 km Oeste Pinas	900	x	x
A24	<i>coelestis</i>	<i>aethereus</i>	ZMUC	114795	NK7	Sangre	Ecuador	El Oro	9 km WNW de Pinas	900	x	x
A25	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	COP	-	JM49	Tejido	Venezuela	Aragua	P.N. Henri Pittier	1200		x
A26	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	COP	-	JM82	Tejido	Venezuela	Aragua	P.N. Henri Pittier	1200	x	x
A27	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	IZET - UCV	-	07NO133	Sangre	Venezuela	Aragua	P.N. Henri Pittier	1152	x	

Anexo 1. (Cont.).

ID	Especie	Subespecie	Museo	Catálogo	Muestra	Tipo	País	Estado/Departamento/Provincia	Localidad	Altura (m)	ND2	MUSK
A28	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	IZET - UCV	-	AK3	Pluma	Venezuela	Aragua	P.N. Henri Pittier	-	x	
A29	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	COP	-	JP383	Tejido	Venezuela	Yaracuy	P.N. Yurubí	1765	x	x
A30	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	COP	-	JP415	Tejido	Venezuela	Yaracuy	P.N. Yurubí	1765	x	x
A31	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	COP	-	JP476	Tejido	Venezuela	Yaracuy	P.N. Yurubí	1765	x	x
A32	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	COP	-	JP496	Tejido	Venezuela	Yaracuy	P.N. Yurubí	1765	x	x
A33	<i>kingi</i>	<i>margarethae</i>	COP	81314	IC994	Tejido	Venezuela	Falcón	P.N. Sierra de San Luis	1425	x	x
A34	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	IZET – UCV	-	07NO221	Sangre	Venezuela	Lara	P.N. Yacambú	1400	x	x
A35	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	IZET – UCV	-	07NO222	Sangre	Venezuela	Lara	P.N. Yacambú	1400	x	
A36	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	IZET – UCV	-	07NO224	Sangre	Venezuela	Lara	P.N. Yacambú	1400	x	
A37	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	IZET – UCV	-	07NO339	Sangre	Venezuela	Lara	P.N. Yacambú	1400	x	
A38	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	IZET – UCV	-	07NO455	Sangre	Venezuela	Mérida	La Mucuy	2200	x	
A39	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	IZET – UCV	-	07NO357	Sangre	Venezuela	Mérida	La Mucuy	2200	x	
A40	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	IZET - UCV	-	07NO383	Sangre	Venezuela	Mérida	La Mucuy	2200	x	
A41	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	81409	IC1111	Tejido	Venezuela	Barinas	Calderas	1250		x
A42	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	AMC1074	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	2450	x	
A43	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	AMC1231	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	2150	x	
A44	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	JM992	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	-	x	x
A45	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	JM1006	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	1800	x	
A46	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	JPL290	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	1800	x	
A47	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	KCC85	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	2300	x	
A48	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	KCC111	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	1800	x	
A49	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	YPL92	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	2150	x	x
A50	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	YPL95	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	2150	x	
A51	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	YPL121	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Páramos El Batallón y La Negra	-	x	x
A52	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	JPL314	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Chorro El Indio	1150	x	
A53	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	JM1053	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. Chorro El Indio	1200	x	

Anexo 1. (Cont.).

ID	Especie	Subespecie	Museo	Catálogo	Muestra	Tipo	País	Estado/Departamento/Provincia	Localidad	Altura (m)	ND2	MUSK
A54	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	KCC273	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. El Tamá	1900	x	
A55	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	JM1113	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. El Tamá	1675	x	
A56	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	YPL205	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. El Tamá	-	x	
A57	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	YPL226	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. El Tamá	-	x	x
A58	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	COP	-	YPL233	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N. El Tamá	-	x	
A59	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	ICN	37200	JPL255	Cojinetes	Colombia	Cesar	Manaure	1900	x	
A60	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	-	-	SS1172	Tejido	Colombia	Casanare	Orocué	-	x	
A61	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	-	-	SS1252	Tejido	Colombia	Casanare	Orocué	-	x	
A62	<i>kingi</i>	<i>caudata</i>	-	-	AMC1018	Tejido	Colombia	Norte de Santander	Asiria	-	x	
A63	<i>kingi</i>	<i>kingi</i>	IAvH	1780	SCC464	Tejido	Colombia	Norte de Santander	Norte de Santander Sector Sisavita	-	x	
A64	<i>kingi</i>	<i>kingi</i>	IAvH	1831	SCC461	Tejido	Colombia	Norte de Santander	Norte de Santander Sector Sisavita	-	x	
A65	<i>kingi</i>	<i>kingi</i>	IAvH	5331	AMU616	Tejido	Colombia	Santander	Santander Pie de Cuesta	-	x	
A66	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	ZMUC	113490	NK29	Sangre	Ecuador	Carchi	Por debajo de Laurel	2350		x
A67	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	ZMUC	113491	NK4	Sangre	Ecuador	Carchi	Por debajo de Laurel	2350		x
A68	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	ZMUC	113492	NK2	Sangre	Ecuador	Carchi	Por debajo de Laurel	2350		x
A69	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	QCAZ	3298	SEN31	Tejido	Ecuador	Carchi	Chilma	2056	x	
A70	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	QCAZ	3417	SEN49	Tejido	Ecuador	Carchi	Chilma	2056	x	
A71	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	QCAZ	-	SEN41	Tejido	Ecuador	Carchi	Chilma	2056	x	
A72	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	QCAZ	-	SEN57	Tejido	Ecuador	Carchi	Chilma	2056	x	
A73	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	QCAZ	3427	SEN55	Tejido	Ecuador	Carchi	Chilma	2056	x	
A74	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	QCAZ	-	SEN56	Tejido	Ecuador	Carchi	Chilma	2056	x	
A75	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	ZMUC	113488	NK5	Sangre	Ecuador	Carchi	Por debajo de Laurel	2350	x	x
A76	<i>kingi</i>	<i>emmae</i>	ZMUC	113489	NK23	Sangre	Ecuador	Carchi	Por debajo de Laurel	2350	x	x
A77	<i>kingi</i>	<i>mocoa</i>	ZMUC	114466	NK10	Sangre	Ecuador	Sucumbíos	Quebrada Las Ollas	2150	x	x
A78	<i>kingi</i>	<i>mocoa</i>	IAvH	1210	MAR1404	Tejido	Colombia	Huila	Huila Acevedo, Camino al pesebre		x	
A79	<i>kingi</i>	<i>mocoa</i>	ZMUC	114604	NK9	Sangre	Ecuador	Napo	Río Maspa Chico, 2,450 m	2450		x

Anexo 1. (Cont.).

ID	Especie	Subespecie	Museo	Catálogo	Muestra	Tipo	País	Estado/Departamento/Provincia	Localidad	Altura (m)	ND2	MUSK
A80	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	ZMUC	114704	NK25	Sangre	Ecuador	Napo	2200 m SC. Guacamayos	2200		x
A81	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	QCAZ	3309	SEN102	Tejido	Ecuador	Napo	Parque Nacional Napo-Galeras	2455	x	
A82	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	QCAZ	-	SEN146	Tejido	Ecuador	Napo	Parque Nacional Napo-Galeras	2455	x	x
A83	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	QCAZ	3433	SEN150	Tejido	Ecuador	Napo	Parque Nacional Napo-Galeras	2455	x	x
A84	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	ZMUC	114373	NK9	Sangre	Ecuador	Napo	Paso sur Cordillera Guacamayas	2200	x	x
A85	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	ZMUC	114473	NK8	Sangre	Ecuador	Napo	Paso sur Guacamayos	2200	x	x
A86	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	QCAZ	-	SEN686	Tejido	Ecuador	Pastaza	Rsva. Ankaku, Z. de Amortiguamiento de Llanganates	1679	x	
A87	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	QCAZ	-	SEN729	Tejido	Ecuador	Pastaza	Rsva. Ankaku, Z. de Amortiguamiento de Llanganates	2266	x	x
A88	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	ZMUC	113487	NK8	Sangre	Ecuador	Zamora-Chinchipe	Cerca de Chinapinza	1700	x	
A89	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	ZMUC	113493	NK14	Sangre	Ecuador	Zamora-Chinchipe	Cerca de Chinapinza	1700		x
A90	<i>kingi</i>	<i>mocoo</i>	ZMUC	113494	NK7	Sangre	Ecuador	Zamora-Chinchipe	Cerca de Chinapinza	1700	x	x
A91	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	163712	DCS 5978	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2240	x	x
A92	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	163815	DCS 6002	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2181	x	x
A93	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	167797	ABJ 2159	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2241	x	x
A94	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	167835	DCS 6146	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2100	x	x
A95	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	167895	DCS 6163	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2181	x	x
A96	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	167943	AQZ 185	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2131	x	x
A97	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	168055	DCS 6190	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	1997	x	x
A98	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	168057	AQZ 205	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2185	x	x
A99	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	168059	ABJ 2174	Tejido	Perú	Amazonas	4.5 km N Tullanya	2085	x	x
A100	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	ZMUC	146988	JGM4	Tejido	Perú	Amazonas	Cordillera Colán	-	x	x
A101	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	LSUMNH	33579	-	Tejido	Perú	Cajamarca	-	-	x	
A102	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	LSUMNH	44328	-	Tejido	Perú	San Martin	-	-	x	
A103	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	LSUMNH	8017	-	Tejido	Perú	Pasco	-	-	x	
A104	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	168250	CCW 1116	Tejido	Perú	Junín	2.3km Oeste de Calabaza	2440	x	x
A105	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	KUNHM	14714	-	Tejido	Perú	Junín	Junín; A lo largo de Río Satipo	2550	x	x

Anexo 1. (Cont.).

ID	Especie	Subespecie	Museo	Catálogo	Muestra	Tipo	País	Estado/Departamento/Provincia	Localidad	Altura (m)	ND2	MUSK
A106	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	KUNHM	16885	-	Tejido	Perú	Ayacucho	Ayacucho, Tutumbaro			x
A107	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	KUNHM	16676	-	Tejido	Perú	Ayacucho	Ayacucho, Tutumbaro		x	x
A108	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161038	CCW 1220	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A109	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161102	JNZ 78	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A110	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161103	JNZ 79	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A111	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161115	JNZ 85	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A112	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161187	ABJ 1740	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A113	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161264	JNZ 189	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A114	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161265	JNZ 190	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A115	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161309	ABJ 1793	Tejido	Perú	Cusco	A lo largo del Camino Manu	1304	x	x
A116	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161313	ABJ 1797	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A117	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161334	ABJ 1809	Tejido	Perú	Cusco	A lo largo del Camino Manu	1227	x	x
A118	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	161339	ABJ 1812	Tejido	Perú	Cusco	San Pedro	1395	x	x
A119	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	168386	EBO 1192	Tejido	Perú	Cusco	Abra Bella Vista	2858	x	x
A120	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	168432	ABJ 2258	Tejido	Perú	Cusco	Abra Bella Vista	2858	x	x
A121	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UNM	168469	ABJ 2264	Tejido	Perú	Cusco	Abra Bella Vista	2858	x	x
A122	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	KUNHM	18898	-	Tejido	Perú	Puno	Puno, sobre San Juan del Oro		x	x
A123	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	ZMUC	146166	JBK2	Sangre	Bolivia	Cochabamba	Cocapata		x	x
A124	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	ZMUC	146237	JF2	Sangre	Bolivia	Cochabamba	Pujyani, Cocapata		x	x
A125	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	UWBM	77153	RCF 2107	Tejido	Bolivia	Cochabamba	Prov. Chaparé-San Onofre-43 km oeste de Villa Tunari		x	x
A126	<i>kingi</i>	<i>smaragdinus</i>	ZMUC	146231	JBK11	Sangre	Bolivia	Cochabamba	Pujyani, Cocapata			x

Abreviaciones: IZET-UCV = Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela; COP = Colección Ornitológica Phelps; ICN = Instituto de Ciencias Naturales de Colombia; QCAZ = Museo de Zoología de la Universidad Católica de Ecuador; LSUMNH = Louisiana State University Museum of Natural History; IAvH = Instituto Alexander von Humboldt; UNM = University of New Mexico; KUNHM = Kansas University Natural History Museum; UWBM = University of Washington Burke Museum.