



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO
Cistothorus apolinari apolinari* y *Cistothorus apolinari hernandezii
(AVES: TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt

MAURICIO PATIÑO HERNÁNDEZ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

2014

VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO
Cistothorus apolinari apolinari* y *Cistothorus apolinari hernandezi
(AVES: TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt

MAURICIO PATIÑO HERNÁNDEZ

Tesis presentada como requisito parcial para optar por el título de:
Magíster en Ciencias Biología

Director:

Ph. D. Luis Fernando García

Línea de investigación:
Genética

Grupo de Investigación:
Sistemática Molecular y Genética Evolutiva

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

*A todos los científicos
que siguen jugando lo que quieren,
en un pequeño instante, durante toda su vida*

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento a toda mi familia por siempre creer que era posible.

Al profesor Luis Fernando por brindarme todo su apoyo y conocimiento.

A Rita Baldrich, Henry Benítez, Oswaldo Cortes, Néstor Espejo, Alexander Galindo, Karen Rodríguez, Manuela García, Carolina Macana, Adriana Mesa, Gary Stiles, Johana Zuluaga y Andrea Ospina por su colaboración en campo y laboratorio.

A la Universidad Nacional de Colombia

Gracias

Resumen

Cistothorus apolinari el cucarachero de pantano es una especie endémica de la familia Troglodytidae que tiene alrededor de 33 especies en Colombia. La especie se encuentra amenazada en la categoría EN. En la actualidad se sugiere la existencia de subespecies distintas: la que habita en el páramo (*Cistothorus apolinari hernandezii*) y la de los humedales (*Cistothorus apolinari apolinari*). Secuencias de dos fragmentos de genes mitocondriales, el Citocromo B (CYB), la región control (D-LOOP) y un fragmento del intrón del gen nuclear 4 β Fibrinógeno (FIB) se utilizaron para evaluar la variabilidad genética entre las dos presuntas subespecies, y evidenciar mediante reconstrucción filogenética la existencia de una o dos unidades taxonómicas distintas. Muy bajos niveles de variabilidad fueron encontrados para comparaciones intraespecíficas e interespecíficas sugiriendo que las poblaciones han estado bajo posibles cuellos de botella que han disminuido su variabilidad. Todos los análisis de reconstrucción filogenética mediante parsimonia y modelos probabilísticos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana sugieren que el cucarachero de pantano y el de los humedales hacen parte de una única especie. Estimativos de tiempos de divergencia asumiendo tanto un reloj molecular estricto como relajado, indican que el cucarachero de pantano y su grupo hermano (*Cistothorus platensis*) tuvieron un ancestro común hace aproximadamente 5,85 MA.

Palabras claves: *Cistothorus apolinari*, Citocromo B, Región Control, Intrón 4 Fibrinógeno.

Abstract

Cistothorus apolinari the apolinar's wren is an endemic species from the Family Troglodytidae with around 33 species in Colombia. The species is under endangered category. Currently, it is suggested that there are two different subspecies: *Cistothorus apolinari hernandezi* which inhabits the paramo, and *Cistothorus apolinari apolinari* which inhabits the wetlands. Sequences from fragments of two mitochondrial genes, Cytochrome B (CYB), the control region (D-LOOP) and the intron of 4 β -fibrinogen nuclear gen (FIB) were used to evaluate the genetic variability between the two presumptive subspecies, and to evidence through phylogenetic reconstruction the existance of either one or two different taxonomic units. Very low levels of variability were observed for both intrasubspecific and intersubspecific comparsons, suggesting that populations could have been through bottlenecks which decrease variability. All phylogenetic reconstruction analyses through maximun parsimony, maximum likelihood and bayesian inference suggest that the paramo wren and the wetland wren are part of a single species, and are not different subspecies. Estimates of divergente times assuming a strict and a relaxed molecular clock, indicate that the apolinar 's wren and *Cistothorus platensis*, its sister group, had a common ancestror about 5,85 MA.

Key words: *Cistothorus apolinari*, Cytocrome B, Control Region, Intrón 4 Fibrinógeno.

Contenido

	Pág.
Abstract	X
Lista de figuras.....	XIV
Lista de Tablas	XVII
1. Introducción	1
2. Objetivos.....	5
2.1 Objetivo general	5
2.2 Específicos.....	5
3. Marco Teórico.....	7
3.1. Troglodytidae	7
3.2 Clasificación Taxonómica	8
3.3 <i>Cistothorus apolinari</i>	8
3.3.1 Nombre común	8
3.3.2 Distribución	9
3.3.3 Identificación	11
3.3.4 Voz	11
3.3.5 Ecología.....	12
3.3.6 Estatus y amenazas de la especie	13
3.3.7 ADN Mitocondrial	14
4. Metodología	17
4.1 Obtención de muestras	17
4.2 Fase de campo	19

XII **VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO**
Cistothorus apolinari apolinari y *Cistothorus apolinari hernandezi*
(AVES: TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

4.2.1. Sitios de estudio.....	19
4.2.2 Captura	23
4.3 Fase de laboratorio	30
4.3.1 Procedencia de las muestras y evaluación de tres métodos de extracción de ADN a partir de diferentes tejidos	30
4.3.2 Verificación de extracción a través de amplificación.....	33
4.3.3 Amplificación de los marcadores Citocromo B, Región control e intron 4 β Fibrinogeno	34
4.3.4 Visualización, purificación y secuenciación	36
4.3.5 Análisis de datos	36
5. RESULTADOS	45
5.1 Extracción de ADN	45
5.1.1 Extracción de ADN a partir de muestras provenientes del museo ICN, el MHNUS y de tejido fresco.....	45
5.2 Variación genética y análisis filogenético	48
5.3 Análisis de tiempo de divergencia	61
5.4 Registros del Cucarachero <i>C. apolinari</i> , durante este estudio	63
5.5 Aspectos generales sobre la ecología de la especie	65
5.6 Reproducción.....	67
5.7 Alimentación.....	70
6. Discusión de Resultados	73
6.1 Extracción de ADN a partir de pieles y tejido fresco.....	73
6.2. Análisis moleculares y filogenéticos	75

6.3. Registros	79
6.4 Ecología	81
6.4.1 Hábitat	81
6.4.2 Estructura social.....	82
6.4.3 Reproducción.....	83
6.4.4 Alimentación	86
7. Conclusiones y Recomendaciones	89
8. Bibliografía	91

Lista de figuras

	Pág.
Figura 3-1A Distribución en Colombia de <i>Cistothorus apolinari</i> especie endémica del altiplano cundiboyacense.	10
Figura 3-1B. Puntos de muestreo y áreas de distribución de <i>Cistothorus apolinari</i>	10
Figura 4-1. Páramo de Sumapaz. Sector donde se registraron poblaciones de <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i> . Laguna la Virginia, Laguna de Chisacal, Laguna Larga.	20
Figura 4-2. Sierra Nevada del Cocuy. Sector donde se obtuvieron muestras de <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i> . Valle de los Frailejones.	20
Figura 4-3. Lago de Tota. Sector donde se obtuvieron muestras de <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> . Vereda Santa Ines.	21
Figura 4-4. Laguna de Fúquene. Sector donde se obtuvieron muestras de <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> . Desde el sector del túnel al puerto.	21
Figura 4-5. Páramo de Pisba. Sector Laguna de los patos donde se obtuvieron muestras de <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i>	22
Figura 4-6. Páramo de Siscunsi. Sector donde se obtuvieron muestras de <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i>	22
Figura 4-7. Sierra Nevada del Cocuy. Sector Valle de los Frailejones. Guican Boyacá.....	26
Figura 4-8. Páramo de Sumapaz. Sector de Laguna larga. Cundinamarca	26
Figura 4-9. Páramo de Pisba. Sector Laguna de los patos. Socha Boyacá	27
Figura 4-10. Páramo de Siscunsi. Territorio de <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i>	27
Figura 4-11. Laguna de Fúquene. Sector del Túnel. Cundinamarca	28
Figura 4-12. Lago de Tota. Sector de Santa Inés. Aquitania Boyacá.	28
Figura 4-13. Redes Páramo de Sumapaz. Pasca Cundinamarca.....	29

Figura 4-14. Primers utilizados para amplificar fragmentos del Citocromo B (CYB).....	35
Figura 5-1. ADN genómico de <i>Cistothorus sp</i> en geles de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio a partir de tejido fresco hepático. Método de Qiagen (kit comercial) (Carriles 1, 6-8), método de chelex (Carriles 2-3), método fenol-cloroformo (Carriles 4-5).....	46
Figura 5-2. Amplificaciones de gen mitocondrial CYB (carriles 1-4) y gen nuclear FIB (Carriles 5-8) en muestras de <i>Cistothorus apolinari</i> obtenidas con kit de extracción Quiagen.....	47
Figura 5-3. Saturación de nucleótidos en la 1era, 2da y 3era posición para el gen <i>Citb</i> con distancia de Tamura Nei.....	49
Figura 5-4. Frecuencia de sustitución de nucleótidos para transiciones (AG, CT) y transversiones (AC, AT, CG, y GT). Primera posición (rosado), segunda posición (verde), tercera posición (amarillo).....	50
Figura 5-5A. Árbol para CYB. La topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. Soportes de valores bootstrap (100) en color rojo para Maxima parsimonia (Paup) en azul para Maxima verosimilitud (Garli). El modelo de sustitución proviene de Jmodeltest que correspondió a:TIM3+I+G.....	53
Figura 5.5B. Red de haplotipos generada con secuencias de CYB con TCS 1.21. Máximo número de pasos permitido para conectar haplotipos es de 14 (0.95%). Ocho haplotipos fueron encontrados; <i>Cistothorus platensis</i> , <i>Cistothorus palustris</i> , <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> 11 (Compartido con <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> 27), <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> 23 (Compartido con <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i> 25 y <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> 31), <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i> 24, <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> 26, <i>Cistothorus apolinari hernandezi</i> 28, <i>Cistothorus apolinari</i>	

XVI VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO
Cistothorus apolinari apolinari y *Cistothorus apolinari hernandezi*
(AVES: TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

<i>hernandezi</i> 29 (Compartido con <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> 30 y <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> 32).	54
Figura 5-6. Árbol para D-loop. La topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. Soportes de valores bootstrap (100) en color rojo para Maxima parsimonia (Paup) en azul para Maxima verosimilitud (Garli). El modelo de sustitución proviene de Jmodeltest que correspondió a: TrN+G.....	55
Figura 5-7. Árbol para FIB. La topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. Soportes de valores bootstrap (100) en color rojo para Maxima parsimonia (Paup) en azul para Maxima verosimilitud (Garli). El modelo de sustitución proviene de Jmodeltest que correspondió a: TIM3+I+G.....	56
Figura 5-8. Árbol para CYB y FIB. La topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. Soportes de valores bootstrap (100) en color rojo para Maxima parsimonia (Paup) en azul para Maxima verosimilitud (Garli). El modelo de sustitución proviene de Jmodeltest que correspondió a: TIM3+I+G.....	57
Figura 5-9. Topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. El árbol se construyó con ayuda de la pagina www.birdtree.org	59
Figura 5-10. Tiempos de divergencia para la familia Troglodytidae obtenidos por inferencia bayesiana en BEAST. Topología y estimativos fueron muy similares en r8s.	62
Figura 5-11. <i>C. a. apolinari</i> , laguna de Fúquene, Cundinamarca.....	64
Figura 5-12. <i>C. a. apolinari</i> , lago de Tota, Boyacá.....	64
Figura 5-13. <i>C. a. apolinari</i> , lago de Tota, Boyacá.....	65
Figura 5-14. <i>C. a. hernandezi</i> , Socha, Boyacá.....	65

Figura 5-15. Nido de <i>C. apolinari apolinari</i> , humedal La Conejera, Bogotá, D. C.	68
Figura 5-16. Huevos de <i>M. bonariensis</i> en nido de <i>C. apolinari apolinari</i> , humedal La Conejera	68
Figura 5-17. Polluelo de <i>M. bonariensis</i> en nido de <i>Cistothorus apolinari apolinari</i>	69
Figura 5-18. Nido estropeado de <i>Cistothorus apolinari apolinari</i>	69
Figura 5-19. Individuo de la garza del ganado <i>Ardeola ibis</i> , en los juncales en donde se ubicaba el nido en el humedal La Conejera	70
Figura 5-20. Contenido estomacal de <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> (Laguna de Fúquene), a-g. Fragmentos de artrópodos; h-i. Fragmentos vegetales.	71

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 4-1. Muestras de <i>Cistothorus apolinari apolinari</i> y <i>Cistothorus apolinari hernandezii</i> utilizadas para este estudio.	18
Tabla 4-2. Secuencia de los primers utilizados para la amplificación de citocromo b, β fibrinogeno y región control.	35
Tabla 4-3. Números de acceso de secuencias del gen citocromo B depositadas en Gen Bank....	38
Tabla 4-4. Números de acceso de secuencias de los marcadores intrón 4 de B fibrinógeno y la región D loop depositadas en Gen Bank	39
Tabla 5.1 Porcentaje de divergencias genéticas dentro y entre subespecies de cucarachero. Promedio y rango de comparaciones se muestran usando distancia absoluta *100.	49
Tabla 5-2. Parámetros bajo parsimonia para los Genes (ADNmt, D-LOOP y FIB) de <i>Cistothorus apolinari</i>	51
Tabla 5-3. Comparación bajo MP y MV de topologías para la existencia de una única especie vs dos subespecies en el cucarachero (<i>Cistothorus apollinari</i>). Bajo MP la comparación se realiza en longitud del árbol, y para MV mediante valores de verosimilitud. KH y SH se refieren a pruebas t de una y dos colas respectivamente. El p valor para tener significancia en la prueba (0,05).	60
Tabla 5-4. Sitios de registro de <i>Cistothorus apolinari</i>	63

1. Introducción

Colombia es uno de los países más megadiversos en distintos grupos, incluyendo las aves, tanto migratorias como aquellas distribuidas exclusivamente en regiones biogeográficas colombianas. Sin embargo, por diferentes presiones incluyendo las antrópicas, muchas de esas especies y sus poblaciones se encuentran diezmadas, y en algún grado de vulnerabilidad. Una de estas especies es *Cistothorus apolinari*, denominado comúnmente cucarachero de pantano o cucarachero de apolinar, es endémica de Colombia perteneciente a la familia Troglodytidae.

La familia Troglodytidae abarca alrededor de 85 especies de aves (Kroodsma y Brewer, 2005; Lara *et al.*, 2012), generalmente pequeñas, activas, insectívoras y altamente vocales. La familia está limitada en su distribución al nuevo mundo (excepto *Troglodytes troglodytes*), con un centro de diversidad en América Central (Brewer *et al.*, 2001). Los cucaracheros son pequeños, rechonchos y de pico delgado, a menudo con colas cortas y erectas. (Härlid & Arnason, 1999). En Colombia se reportan un total de 33 especies (Remsen *et al.*, 2013); dentro de las cuales se encuentra *Cistothorus apolinari* descrita por Chapman en 1917 (Chapman, 1917).

2 VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO *Cistothorus apolinari apolinari* y *Cistothorus apolinari hernandezi* (AVES: TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

Borrero en 1953 sugirió dos posibles formas de esta especie: la del páramo entre 3800-3900 metros sobre el nivel del mar (msnm) y la de los humedales alcanzando los 3010 msnm en el Lago Tota y los 2450-2650 msnm en la Sabana de Bogotá. Las diferencias sugeridas por Borrero incluyen tamaño, ecología y estructura social. Sin embargo, este autor consideró que las diferencias morfológicas no eran suficientes para ser tenidas en cuenta como carácter sub-específico diferencial (Borrero, 1953).

En el 2002 *Cistothorus apolinari hernandezi* fue nombrado como subespecie (Stiles y Caycedo, 2002), las dos subespecies tienen una distribución restringida de la cordillera Oriental desde el Páramo de Sumapaz hasta el Lago de Tota y la Sierra Nevada del Cocuy en los Departamentos de Cundinamarca y Boyacá (Collar *et al.*, 1992; Stiles, 1998; Stattersfield *et al.*, 1998). Dentro de las diferencias encontradas por Stiles (Stiles y Caycedo, 2002) entre *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezi* se hallan hábitat, vocalización y estructura social.

En el ámbito global, la especie se encuentra en peligro: EN (BirdLife International, 2013). Dada la baja densidad posiblemente encontrada en páramos y humedales, se estima que la población total podría estar por debajo de los 2500 individuos, ubicándose así peligro (EN C2a (i)) (Renjifo *et al.*, 2002). Por un lado, los humedales del Altiplano son considerados como los ecosistemas con mayor riesgo de desaparición en Colombia (Hernández *et al.*, 1992), en el último siglo las características de la Sabana de Bogotá se han modificado debido a la urbanización, la agricultura y la ganadería (Montañez *et al.*, 1992; Renjifo, 1992); además los humedales enfrentan problemas de contaminación por vertimiento de aguas residuales y eutroficación (Van Der Hamen, 2003). En la actualidad, el mayor impacto sobre los páramos andinos y africanos es generado por la agricultura, la

ganadería y las quemas asociadas a éstas, además una amenaza muy fuerte es la actividad minera (Hofstede, 2003). Además se ha observado en el humedal de la Conejera que *Cistothorus apolinari* está siendo parasitado por *Molothrus bonariensis* (Castro, 2011) y en el humedal El Jaboque (H.D. Benítez obs. Pers. 2004).

A la fecha no se tiene evidencia de tipo molecular que indique la posible existencia de dos subespecies: *C. a. apolinari* con poblaciones presentes en humedales (Laguna de Fúquene y Lago de Tota) y *C. a. hernandezii* con poblaciones de dos Páramos (Páramo de Sumapaz, Páramo de Siscunsi, Páramo de Pisba y Sierra Nevada del Cocuy). Estas dos subespecies enfrentan amenazas diferentes y los estudios moleculares pueden dar estrategias de manejo para cada una de las subespecies dependiendo del grado de amenaza de estas poblaciones.

Puesto que subespecies distintas tendrían historias evolutivas distintas, es importante evaluar mediante herramientas moleculares, la posible presencia de dos formas diferentes para el cucarachero: *C. a. apolinari* en poblaciones de los humedales y *C. a. hernandezii* en poblaciones de Páramos. Para ello se utilizaron fragmentos de 2 genes mitocondriales, el Citocromo B (CYB) y el centro de replicación de la mitocondria, (D-LOOP) con altas tasas de mutación dentro del genoma mitocondrial. Puesto que esta molécula se hereda de forma materna, la hace un marcador ideal para rastrear la historia evolutiva de los organismos.

También se utilizó un gen nuclear el Intrón 4 β Fibrinógeno (FIB) con tasas de mutación mucho más bajas que los genes mitocondriales, pero con la ventaja de su origen genómico nuclear que complementará la historia evolutiva evidenciada con un marcador molecular de herencia maternal. Se utilizaron tres métodos de reconstrucción para analizar los datos de los tres genes: máxima parsimonia,

4 **VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO**
Cistothorus apolinari apolinari y *Cistothorus apolinari hernandezi* (AVES:
TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

máxima verosimilitud e inferencia bayesiana. Estos permitieron evidenciar la historia evolutiva de *Cistothorus apolinari* y soportar una de las dos hipótesis acerca de la existencia de una o dos subespecies.

Este estudio busca determinar si hay diferencias entre las dos subespecies de tipo molecular que soporten la diferenciación de las dos subespecies, la que habita el páramo (*C. a. hernandezi*) y la que habita los humedales (*C. a. apolinari*).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el estado taxonómico de *Cistothorus apolinari apolinari* y *Cistothorus apolinari hernandezii*, mediante marcadores moleculares tipo ADNmt.

2.2 Específicos

Determinar el grado de diferencia genético a nivel de ADNmt entre *Cistothorus apolinari apolinari* de humedales y *Cistothorus apolinari hernandezii* de páramo en individuos capturados en campo y especímenes de colecciones ornitológicas.

Determinar la relación filogenética de *Cistothorus apolinari apolinari* y *Cistothorus apolinari hernandezii* mediante la secuencia de un fragmento de los genes Citocromo B, β -Fibrinógeno, D-Loop y secuencias disponibles en el gen bank.

Proporcionar datos de la historia natural de *Cistothorus apolinari apolinari* y *Cistothorus apolinari hernandezii*, en los Departamentos de Boyacá y Cundinamarca que permita enriquecer el conocimiento de la especie para su conservación.

6 VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO
Cistothorus apolinari apolinari y *Cistothorus apolinari hernandezi* (AVES:
TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

3. Marco Teórico

3.1. Troglodytidae

Los cucaracheros forman una familia bien conocida de aves del Nuevo Mundo, con tan solo una especie en el Viejo Mundo. Alcanza su mayor diversidad en centro y sur América. Muchos son excelentes cantores, especialmente las especies de *Cyphorhinus* y *Thryothorus*. En estos últimos las parejas a menudo cantan en dueto antifonal de gran precisión. En general, los cucaracheros son más bien pequeños, rechonchos y de pico delgado, a menudo con colas cortas y erectas. El plumaje usualmente es de algún tono café, con frecuencia con gris o blanco debajo y con barrado en alas y cola. Aunque son insectívoros activos, los hábitos escondidizos de algunos los hacen difíciles de observar. La mayoría construye nidos cerrados con entrada lateral y unos pocos regularmente anidan en cavidades; a menudo construyen nidos falsos que a veces usan como dormitorio. (Hilty & Brown, 1986)

3.2 Clasificación Taxonómica

Phylum: Chordata

Clase: Aves

Orden: Passeriformes

Familia: Troglodytidae

Género: *Cistothorus*

Especie: *Cistothorus apolinari*

Subespecies: *Cistothorus apolinari apolinari*

Cistothorus apolinari hernandezi

South American Classification Committee (4-09-2012)

3.3 *Cistothorus apolinari*

3.3.1 Nombre común

En inglés: Apolinar's Wren, en español: cucarachero de pantano, cucarachero de apolinar, Soterrey de apolinar.

3.3.2 Distribución

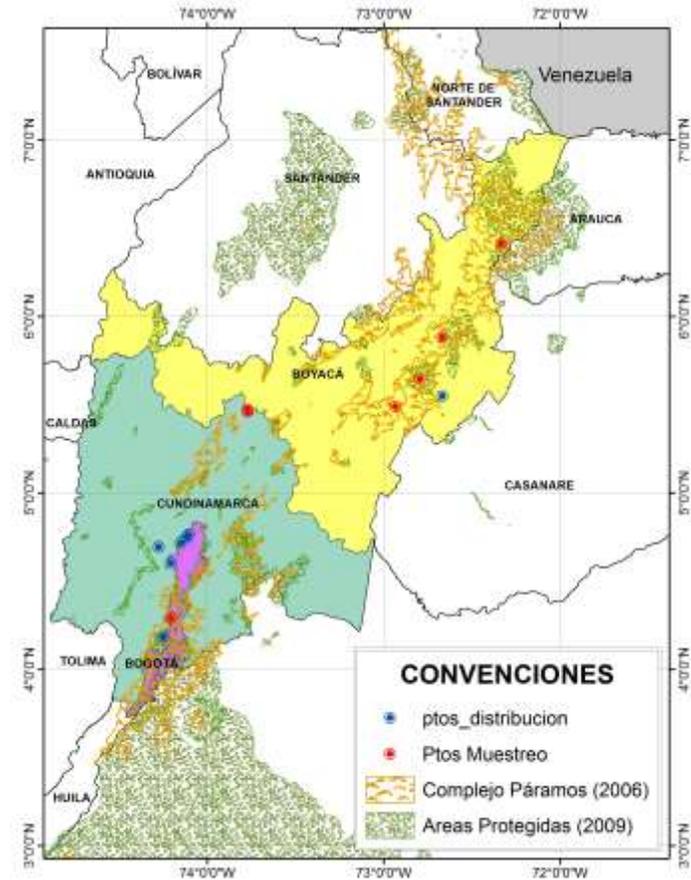
El cucarachero de apolinar *Cistothorus apolinari* es una especie endémica con distribución restringida en la altiplanicie cundiboyacense, cordillera oriental colombiana, desde el Páramo de Sumapaz hasta el Lago de Tota y la Sierra Nevada del Cocuy en los Departamentos de Cundinamarca y Boyacá (Collar *et al.*, 1992; Stattersfield *et al.*, 1998; Stiles, 1998). *C. a. hernandezise* distribuye en elevaciones entre 3600 a 4000 m en los páramos del oriente de la altiplanicie en Cundinamarca y Boyacá y *C. a. apolinari* se distribuye en la altiplanicie cundiboyacense en humedales entre 2550 y 2700 m (3015 en la laguna de Tota). (Hilty & Brown, 1986; Stiles y Caycedo, 2002; ABO, 2000). (Figura 3-1A, 3-1B).

Figura 3-1A Distribución en Colombia de *Cistothorus apolinari* especie endémica del altiplano cundiboyacense.



Fuente: Mauricio Patiño H

Figura 3-1B. Puntos de muestreo y áreas de distribución de *Cistothorus apolinari*



Fuente: Mauricio Patiño H

3.3.3 Identificación

El cucarachero de pantano (*Cistothorus apolinari*) tiene una medida promedio de 13 cm, es un poco más grande que el cucarachero común, con un patrón más contrastante, una voz muy áspera y distintiva. Adultos: coronilla y línea ocular gris cafecinos, ceja gris claro (no muy contrastante), espalda negruzca rayada con blanco, rabadilla café claro alas y cola cafés, barreteados con negro. Por debajo blanquecino, el pecho lavado con ante opaco, los flancos y coberteras infracaudales anteados. Picos y patas color cuerno. En el caso de *C. a. hernandezii* tiene el pecho más blanquecino comparado con el de *C. a. apolinari* y la cola mucho más corta (Hilty & Brown, 1986; Stiles y Caycedo, 2002; ABO, 2000).

3.3.4 Voz

Canto enérgico, es muy rítmico y áspero, recuerda mucho el sonido de una matraca; es un dúo entre macho y hembra; el macho canta una enérgica serie de 1-3 frases burbujeantes de 3 a 6 notas *tou-a-tuii*, bastante bajas y rítmicas, a veces alternando con notas cortas *chir* o *chup*, mientras la hembra acompaña con un *chrrrrrrrrrrrr...* largo y áspero, chirriante que sube y baja en tono. A veces todo un grupo familiar canta, los jóvenes (probablemente de ambos sexos) contribuyendo con frases similares a los de los machos pero generalmente más cortas. En alarma una persistente serie de notas *churr*. (Hilty & Brown, 1986; ABO, 2000). Los machos de *C. a. hernandezii* tiene un mayor repertorio de cantos que *C. a. apolinari*. En promedio los grupos de *C. a. hernandezii* tienen 11 cantos diferentes comparados con 6 o 7 de *C. a. apolinari* Además los cantos individuales de *C. a. hernandezii*, suelen ser más largos y complejos (más sílabas y tipos de notas). Muy pocos cantos

son compartidos por las subespecies, las poblaciones de una misma subespecie comparten la mayoría de cantos sin importar que estén separados varios kilómetros. (Caycedo, 2001). En ambas poblaciones, el desarrollo de repertorios de cantos fue probablemente por imitación en lugar de invención, como era de esperar, dada su naturaleza sedentaria (Kroodsma *et al.*, 1999).

3.3.5 Ecología

Cistothorus apolinari hernandezi habita cerca de "bosques enanos" y arbustos de *Diplostephium revolutum* (Asteraceae); rosetones altos del "frailejón", *Espeletia grandiflora* (Asteraceae) y *Chusquea tessellata* (Swallenochloa) que al parecer es requerido para la elaboración de nidos. También, es común encontrarla en presencia de musgo de *Sphagnum*, con pequeñas piscinas de agua abierta en el páramo de Sumapaz (Stiles y Caycedo, 2002).

Cistothorus apolinari hernandezi habita los juncales (*Scirpus californicus*, *Typha* sp.) de los humedales del altiplano cundiboyacense (Renjifo et al, 2002).

Se alimentan principalmente de insectos que buscan activamente en la vegetación. En el lago de Tota se registró el consumo de insectos acuáticos como chironómidos, arañas, bracónidos, cilicidos, zygópteros y larvas de *lepidópteros* (Varty et al., 1986).

3.3.6 Estatus y amenazas de la especie

El cucarachero de apolinar *C. apolinaris*, era considerada como un “ave común” en las orillas o bordes de lagos y lagunas desde los 2500 a los 4000 msnm (Borrero, 1953), actualmente es una especie considerada en peligro de extinción (**EN**) en el ámbito nacional (Resolución 383 de 2010 – Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, anterior Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial; (Renjifo *et al.*, 2002) y global (BirdLife International, 2013).

Se estima que el cucarachero ha perdido un 62% de su hábitat, pero es probable que la disminución de su población exceda esta proporción debido al deterioro y contaminación de los humedales así como la degradación de los páramos. Se estima que esta especie ha perdido al menos el 30% de su población en 10 años y que este proceso de disminución continuará. Por las anteriores razones, el cucarachero califica como vulnerable (VU A2ace + 3ace). Su extensión de presencia es de unos 50.000 Km² y la extensión de su hábitat potencial es de 806 Km². Se estima que su área de ocupación es inferior a 500 Km² pues tiene una distribución local en el páramo de Sumapaz y está ausente de algunos humedales del altiplano cundiboyancense, debido a lo anterior ésta especie califica como en peligro (**EN** B2ab (ii, iii, iv, v)). El tamaño total de la población no ha sido evaluado, no obstante debido a la baja densidad detectada tanto en Sumapaz como en los humedales del altiplano se estima que la población total está por debajo de los 2500 individuos, lo cual hace de esta una especie en peligro (EN C2a(i)) (Renjifo *et al.*, 2002).

Dentro de las amenazas que enfrentan los humedales de la Sabana de Bogotá se encuentra el progresivo deterioro por acción del hombre (Van Der Hammen, 1986). De las 50.000 ha estimadas en 1950 quedan aproximadamente 700 ha (Rodríguez-Mahecha, 2000). Por un lado, los humedales del Altiplano son considerados como los ecosistemas con mayor riesgo de desaparición en Colombia (Hernández *et al.*, 1992), en el último siglo las características de la Sabana de Bogotá se han modificado debido a la urbanización, la agricultura y la ganadería (Montañez *et al.*, 1992; Renjifo, 1992); además los humedales enfrentan problemas de contaminación por vertimiento de aguas residuales y eutroficación (Van Der Hamen, 2003). En la actualidad, el mayor impacto sobre los páramos andinos y africanos es generado por la agricultura, la ganadería y las quemadas asociadas a éstas, además una amenaza muy fuerte es la actividad minera. (Hofstede, 2003). Otra de las amenazas que enfrenta *Cistothorus apolinari apolinari* es que sus poblaciones están siendo parasitadas por el Chamón *Molothrus bonariensis* (Castro, 2011; Villaneda-Rey & Rosselli, 2011).

3.3.7 ADN Mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) se hereda de forma materna, lo que le convierte en un material ideal para analizar los linajes y filogenias maternas. Además, al heredarse por una única vía con la inexistencia de recombinación, posee tasas de evolución de cinco a diez veces mayores que los genes nucleares lo que potencia este ADN como un excelente marcador para filogenias de especies no muy distantes (Shields & Wilson, 1987). Los cambios por mutación en el ADNmt, usualmente, se dan en forma de cambios únicos de pares de bases nucleotídicas, o por pequeñas deleciones e inserciones, cuya detección es crucial para la conservación biológica,

ya que permite identificar unidades evolutivas que pueden ser tratadas como unidades de manejo conservacionista en el seno de las especies. Con el ADNmt se obtienen haplotipos diferentes, que en el caso de darse, mostrarán la existencia de linajes maternos *independientes*. Obtenidos los datos crudos de secuencias, es posible utilizar métodos de inferencia por máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana dando un enfoque integral para el planteamiento de filogenias tanto entre poblaciones como entre especies diferentes describiendo, así, las historias evolutivas y características propias de cada una de esas unidades taxonómicas (Avice, 1986; Avice, 1989 y Felsenstein, 2004). La existencia de genes en el ADNmt con tasas de evolución diferentes permite la elección de los mismos de acuerdo al tiempo de divergencia aproximado para las especies a estudiar y posteriormente generar análisis con criterios diferenciales debido a modos de evolución moleculares distintos. Los genes de evolución más lenta servirán para analizar problemas filogenéticos entre unidades taxonómicas alejadas, mientras que los de evolución más rápida (como la región D-LOOP) servirán para diferenciar poblaciones muy cercanas genéticamente. Especialmente, interesante son los estudios empleando esta región altamente variable, ya que en muchas ocasiones se puede detectar una relación filogeográfica entre diferentes especies, lo que permite detectar estructuras significativas de colonización, o áreas por las cuales el flujo génico se está produciendo, o se produjo, entre diferentes poblaciones (Avice *et al.*, 1987).

De esta manera, como lo resume Wayne (Wayne *et al.*, 1994), el ADNmt desde el punto de vista de conservación juega un papel trascendental en la determinación de la identificación de unidades taxonómicas con diferencias génicas importantes desde la perspectiva sistemática. (Avice & Nelson, 1989; Avice & Ball, 1990).

La secuenciación del ADNmt es uno de los métodos más precisos, especialmente, en el caso del diseño de filogenias. Por primera vez, (Higuchi *et al.*, 1984) extrajeron ADN de una piel preservada de una cebra que se creía extinta desde 1883, la cuaga de Sudáfrica (*Equus burchelli quagga*). Higuchi *et al* clonaron fragmentos de ADN extraídos de la piel seca y del tejido conectivo, obteniendo una secuencia de mtDNA de 229 pares de bases. Higuchi *et al.*, demostraron que la extinta cuaga de Sudáfrica tenía una relación fuerte con la cebra de Burchell (*Equus burchelli*) y presentaba relaciones filogenéticas más divergentes con la cebra de Grevy (*Equus grevy*) y, especialmente con la cebra de montaña (*Equus zebra*). A diferencia de lo que siempre se había creído hasta ese momento no presentaba especial afinidad con el grupo de los caballos. El ADNmt es muy sensible a los procesos demográficos de índole estocásticos, tales como la fragmentación de las poblaciones y del hábitat, aislamiento y cuellos de botellas. Avise y colaboradores mostraron que una población en aislamiento durante 4 Nef generaciones (4 x número efectivo de hembras) acabará reteniendo un único haplotipo mitocondrial. (Avise *et al.*, 1984). Adicionalmente una de las virtudes de la genética molecular de poblaciones es que mide directamente como la variabilidad genética está distribuida dentro y entre las poblaciones de esas especies que pueden estar en peligro de extinción, proveyendo aspectos determinantes de la probabilidad de supervivencia a largo plazo de esas especies de interés conservacionista.

Además, las técnicas moleculares y los métodos y modelos matemáticos genético poblacionales, son vitales para la determinación de unidades taxonómicas, que conjuguen aspectos simultáneos de la definición biológica y filogenética de especie, con el potencial incluido de la determinación de otras unidades jerárquicamente inferiores a la definición de especie.

4. Metodología

4.1 Obtención de muestras

En este estudio se utilizaron muestras obtenidas en campo y procedentes de museos. En el campo se utilizaron redes de niebla para la captura de los individuos según metodología de Ralph (Ralph *et al.*, 1993); se recolectaron individuos de *C. a. apolinari.*, en la Laguna de Fúquene y en el Lago de Tota. En el caso de *C. a. hernandezii.*, se recolectaron individuos en los Páramos de Pisba, Siscunsi, Sumapaz y Sierra nevada del Cocuy como se muestra en la figura 3.1B.

En los individuos capturados se tomaron muestras de tejido (corazón, hígado y músculo pectoral) en alcohol al 70 y al 96%. Las pieles fueron depositadas en la colección ornitológica del Instituto de Ciencias Naturales (ICN) de la Universidad Nacional de Colombia. Para las muestras de museo se obtuvo tejido a partir de almohadillas plantares y de plumas de pieles de *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezii*, depositadas en la colección ornitológica del ICN de la Universidad Nacional de Colombia y del museo de Historia Natural de la Universidad de la Salle (MHNUS) procedentes de diferentes localidades. Se obtuvieron un total de 32 muestras de individuos como se referencia en la tabla 4-1.

Tabla 4-1. Muestras de *Cistothorus apolinari apolinari* y *Cistothorus apolinari hernandezi* utilizadas para este estudio.

No	Institución	Individuo	Localidad	No Colección
1	ICN-UN	<i>C.a. hernandezi</i>	SUMAPAZ (Cundinamarca)	3366
2	ICN-UN	<i>C.a. hernandezi</i>	SUMAPAZ (Cundinamarca)	3371
3	ICN-UN	<i>C.a. hernandezi</i>	SUMAPAZ (Cundinamarca)	6798
4	ICN-UN	<i>C.a. hernandezi</i>	GUICAN (Boyacá)	22991
5	ICN-UN	<i>C.a. hernandezi</i>	SUMAPAZ (Cundinamarca)	14012
6	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	LA CARO (Cundinamarca)	3376
7	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	LA CARO (Cundinamarca)	3372
8	ICN-UN	<i>C.a. hernandezi</i>	SUMAPAZ (Cundinamarca)	3375
9	MHN-UD	<i>C.a. hernandezi</i>	SUMAPAZ (Cundinamarca)	MUD 027
10	MHN-UD	<i>C.a. hernandezi</i>	COCUY (Boyacá)	MUD357
11	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	L. FUQUENE (Cundinamarca)	35982
12	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	L. FUQUENE (Cundinamarca)	35982
13	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	L. TOTA (Boyacá)	35983
14	UN	<i>C..a. apolinari</i>	L.TOTA (Boyacá)	Lab
15	UN	<i>C.a. hernandezi</i>	COCUY (Boyacá)	Lab
16	ICN-UN	<i>C.a. apolinari</i>	LA CARO (Cundinamarca)	3374
17	ICN-UN	<i>C.a. apolinari</i>	LA CARO (Cundinamarca)	3377
18	MHNUS	<i>C.a. hernandezi</i>	EL VERJON (Cundinamarca)	5277
19	MHNUS	<i>C..a. apolinari</i>	FONTIBON (Cundinamarca)	5273
20	MHNUS	<i>C..a. apolinari</i>	TIBABITA (Cundinamarca)	5276
21	MHNUS	<i>C.a. apolinari</i>	TIBABITA (Cundinamarca)	5275
22	ICN-UN	<i>C.a. apolinari</i>	L. TOTA (Boyacá)	3615
23	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	L TOTA (Boyacá)	Esqueleto
24	ICN-UN	<i>C.a. hernandezi</i>	P. PISBA (Boyacá)	37042

25	UN	<i>C.a. hernandesi</i>	COCUY (Boyacá)	LAB
26	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	L. FUQUENE (Cundinamarca)	37600
27	ICN-UN	<i>C..a. apolinari</i>	L. FUQUENE (Cundinamarca)	37601
28	ICN-UN	<i>C. apo hern</i>	SISCUNSI (Boyacá)	Pendiente
29	ICN-UN	<i>C. apo hern</i>	SUMAPAZ (Cundinamarca)	38254
30	UN	<i>C..a. apolinari</i>	L TOTA	LAB
31	UN	<i>C..a. apolinari</i>	(Boyacá)	LAB
32	UN	<i>C..a. apolinari</i>	L TOTA	LAB

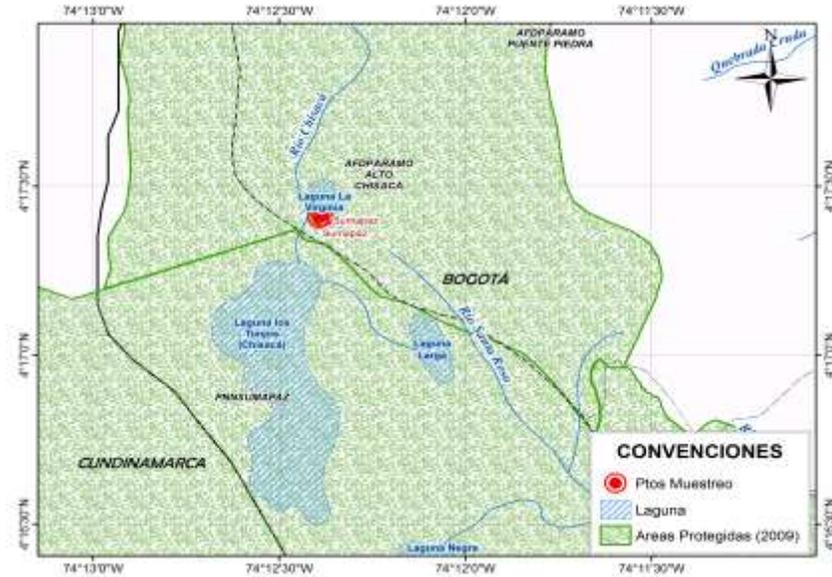
ICN: Instituto de Ciencias naturales Universidad Nacional. MHNUS: Museo de Historia Natural Universidad de la Salle. LAB: Laboratorio SMGE UN. *C. a. apolinari*: *Cistothorus apolinari apolinari*, *C. a. hernandesi*: *Cistothorus apolinari hernandesi*.

4.2 Fase de campo

4.2.1. Sitios de estudio

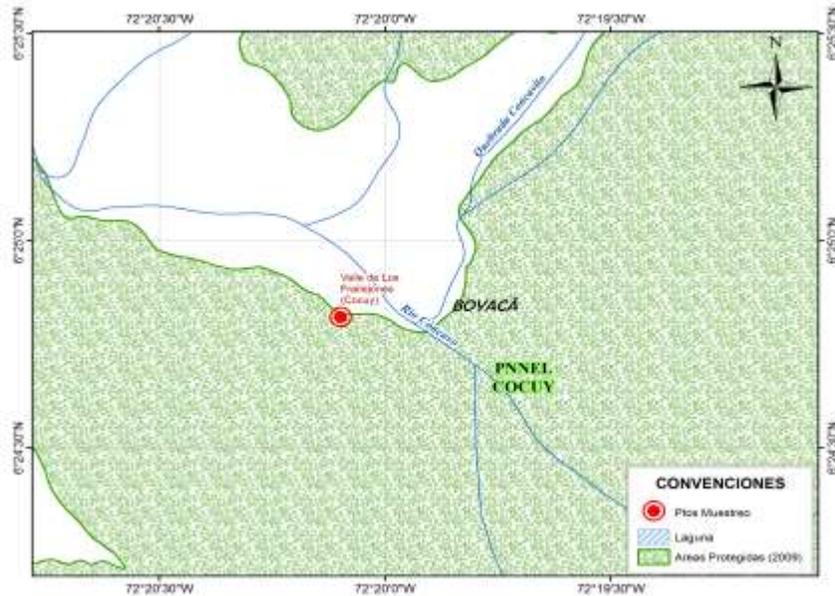
Parque Nacional Natural Sumapaz Localidad 20 Bogotá (Cundinamarca)(Figura 4-1); Parque Nacional Natural Cocuy (Boyacá)(Figura 4-2); Laguna de Fúquene (Cundinamarca) (Figura 4-3); Lago de Tota (Boyacá) (Figura 4-4); Páramo de Pisba (Boyacá) (Figura 4-5); Páramo de Siscunsi (Boyacá)(Figura 4-6).

Figura 4-1. Páramo de Sumapaz. Sector donde se registraron poblaciones de *Cistothorus apolinari hernandezi*. Laguna la Virginia, Laguna de Chisacal, Laguna Larga.



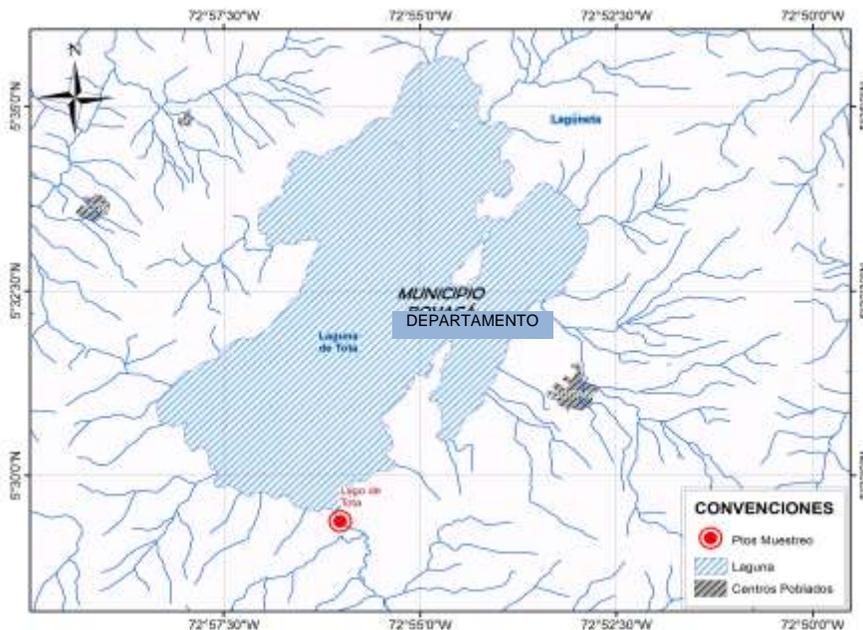
Fuente: Mauricio Patiño Hernández

Figura 4-2. Sierra Nevada del Cocuy. Sector donde se obtuvieron muestras de *Cistothorus apolinari hernandezi*. Valle de los Frailejones.



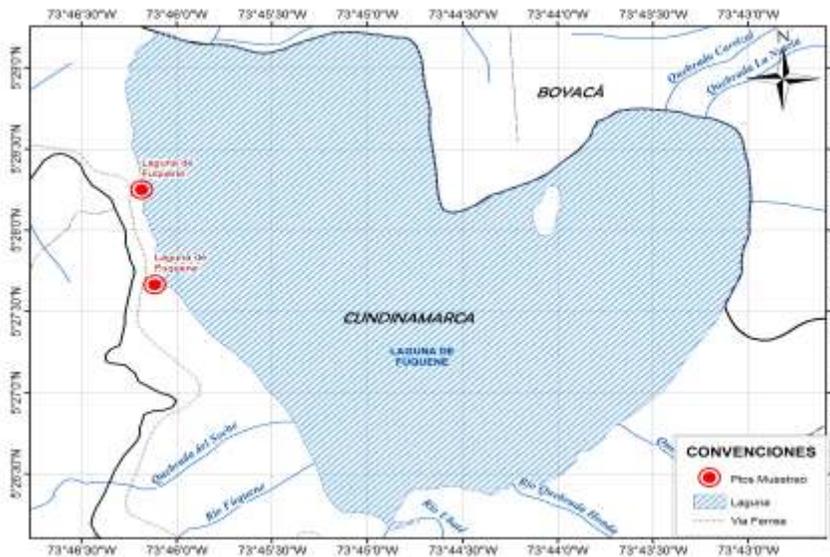
Fuente: Mauricio Patiño Hernández

Figura 4-3. Lago de Tota. Sector donde se obtuvieron muestras de *Cistothorus apolinari apolinari*. Vereda Santa Ines.



Fuente: Mauricio Patiño Hernández

Figura 4-4. Laguna de Fúquene. Sector donde se obtuvieron muestras de *Cistothorus apolinari apolinari*, Desde el sector del túnel al puerto.



Fuente: Mauricio Patiño Hernández

4.2.2 Captura

Previamente determinados los territorios, sitios de percha, residencia y refugio de la especie en estudio, mediante observación y seguimiento, se instalaron 6 redes de niebla de 10 m de largo y 2,5 m de alto con ojo de malla de 36 mm, para facilitar la captura se hizo *play back* lo que atraía los individuos hacia las redes de niebla. Las redes se ubicaron cerca de los juncales (*Scirpus californicus*, *Typha* sp.) en las riveras en el caso de los humedales (Figura 4-11 y 4-12). En el páramo, cerca de "bosques enanos" y unidades densas de arbustos *Diplostegium revolutum* (Asteraceae) y en el páramo abierto dominado por los rosetones altos del "frailejón", *Espeletia grandiflora* (Asteraceae) (Figura 4-8); y en territorios de bambú *Chusquea tessellata* (Swallenochloa). También, donde se hallaba musgo de *Sphagnum*, con pequeñas piscinas de agua se colocaron redes de 6 m de largo y 2.5 m de alto.

La captura con redes de niebla ha sido utilizada o propuesta como método para realizar inventarios de aves en varias regiones del Neotrópico. Posteriormente a su captura el animal se sacó cuidadosamente de la red para evitarle daño. Las redes se colocaron lo suficientemente concentradas como para que no se tardara más de 10 ó 15 min en recorrerlas si no hay capturas (Ralph *et al.*, 1993). Las redes eran revisadas cada 20 minutos; además, el trabajo se complementó con censos visuales a lo largo de los diferentes transectos, utilizando binoculares 8 X 42 marca (Bushnell Waterproof y Nikon Prostaff 7).

Al hacer la captura de un individuo, se tuvieron en cuenta las siguientes normas para que el animal no se viera afectado. Para su manipulación, el ave se sujetó suavemente pero con firmeza, además con el pulgar de la mano izquierda y cualquier otro dedo, haciendo pinza, se procuró inmovilizar la cabeza sujetando ambos lados del pico. De esta forma para cualquier exploración que se realizaba al animal, se sujeta al ave con la mano derecha y se manipulaba con la izquierda en el punto objeto de la observación. Una vez capturado el individuo se verificó la especie y aspectos como estado del pluma o evidencia reproductiva.

Se procedió a extraer algunas plumas de su parte distal o como método alternativo de las alas; inmediatamente, las plumas se colocaron en tubos falcón, con el rotulo informativo del animal capturado y sus correspondientes características. Se les colocó un anillo para poder identificar los posibles individuos que sean recapturados. En algunos casos fue necesario capturar el animal para ser llevado al Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (ICN).

La elevada irrigación que necesitan las plumas en crecimiento, permite utilizarlas para obtener ADN. Pero para ello es muy importante identificarlas de manera correcta. Las plumas en crecimiento presentan un cañón más oscuro, grueso y son de tamaño más corto.

Teniendo en cuenta que la técnica de obtención de las muestras no es invasiva según esta demostrado en estudios anteriores, el empleo de plumas y médula es efectivo en análisis genético, además es considerada como una técnica útil de muestreo no destructivo para estudios de comportamiento, ecología y evolución; se

debe tener en cuenta que en el sitio en donde se obtiene la pluma se induce un crecimiento de nuevas plumas en un periodo comprendido entre 11 y 14 días (Mendden y Stock, 1976) por lo cual es un método totalmente adecuado para el individuo en estudio. Al revisar técnicas como la extracción de sangre en vena braquial ulnar es posible que de no realizarse adecuadamente pueda ocasionar estrés en el animal, desencadenar un fuerte shock y provocar la muerte (Baker, 1981).

Las plumas en la etapa desarrollo total, reabsorben totalmente su médula, razón por la cual Ellen y Bernie (Ellen y Bernie, 1984) reportaron que las plumas con mejores condiciones para trabajo son las emergentes y/o en desarrollo.

Se realizaron salidas de campo a la Sierra Nevada del Cocuy (Figura 4-7), Páramo de Sumapaz (Figura 4-8), Páramo de Pisba (Figura 4-9), Páramo de Siscunsi (Figura 4-10), Laguna de Fúquene (Figura 4-11) y Lago de Tota (Figura 4-12), en el caso del Páramo de Sumapaz se realizaron 3 salidas que se vieron afectadas por la situación de orden público y las restricciones a la visita de parques naturales; se realizaron dos salidas donde no se lograron capturas de aves por los fuertes vientos que dificultaban que los individuos quedaran atrapados en la redes, ya que estas se hacían visibles o se caían por acción del viento (Foto 4-13). Adicionalmente se obtuvieron muestras de individuos de colecciones ornitológicas de las cuales se extrajo ADN geonómico total a partir de piel de las almohadillas plantares y de plumas de las pieles de colección.

Figura 4-7. Sierra Nevada del Cocuy. Sector Valle de los Frailejones. Guican Boyacá.



Fuente: Mauricio Patiño H.

Figura 4-8. Páramo de Sumapaz. Sector de Laguna larga. Cundinamarca



Fuente: Mauricio Patiño H.

Figura 4-9. Páramo de Pisba. Sector Laguna de los patos. Socha Boyacá



Fuente: Mauricio Patiño H.

Figura 4-10. Páramo de Siscunsi. Territorio de *Cistothorus apolinari hernandezi*



Fuente: Mauricio Patiño H.

Figura 4-11. Laguna de Fúquene. Sector del Túnel. Cundinamarca



Fuente: Mauricio Patiño H.

Figura 4-12. Lago de Tota. Sector de Santa Inés. Aquitania Boyacá.



Fuente: Mauricio Patiño H.

Figura 4-13. Redes Páramo de Sumapaz. Pasca Cundinamarca

Fuente: Mauricio Patiño H.

Se hicieron observaciones intensivas no sistemáticas en la cobertura reportada como habitat del cucarachero de apolinar *C. a. apolinaris* y el cucarachero de páramo *C. a. hernandezii*. Las subespecies fueron observadas y escuchadas, usando binoculares 10 x 42 (Bushnell Waterproof y Nikon Prostaff 7) cámaras fotográficas semiprofesionales, una grabadora de audio digital (Sony ICD-PX720) y un micrófono unidireccional (ATR-6550) para almacenar las vocalizaciones de las aves. Cuando fue posible se anotaron datos ecológicos y de comportamiento, como características del plumaje, estrategias de alimentación, refugios y cantidad de individuos presentes por grupo familiar. Dichas observaciones se realizaron en todas las localidades registradas en el presente estudio entre las 06:00-11.30h, el tiempo podía variar de acuerdo al sitio por razones de seguridad o de logística.

4.3 Fase de laboratorio

4.3.1 Procedencia de las muestras y evaluación de tres métodos de extracción de ADN a partir de diferentes tejidos

Para éste estudio se tuvo acceso a 17 individuos pertenecientes a la colección ornitológica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional (ICN) de los cuales se disponían plumas y almohadillas plantares para realizar la extracción de ADN y a 4 individuos pertenecientes al museo de Historia Natural de la Universidad de la Salle (MHNUS). Además, 11 muestras frescas fueron incluidas en este estudio de las cuales se disponía los tejidos de hígado, músculo pectoral, y corazón. Debido a las diferentes procedencias de las muestras tres diferentes metodologías de extracción de ADN se evaluaron para garantizar la pureza y la concentración mínima de la molécula para poder amplificar los fragmentos de interés de los genes estudiados.

Puesto que en algunos casos se hicieron modificaciones a los protocolos originales, se describen brevemente los protocolos utilizados.

- Evaluación del kit de QIAGEN®

Este kit está diseñado para purificación de ADN total para tejidos animales. El método consistió en cortar aproximadamente 25 mg de músculo pectoral o hígado en trozos pequeños, que se introdujeron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se adicionaron 360 µl de Buffer ATL y 30 µl de proteinasa K y se mezcló brevemente por vortex. Posteriormente se incubó a 55°C de 2 a 3 horas o en algunos casos se

extendió hasta por 48 horas hasta asegurar que la mezcla estaba completamente homogénea y el tejido completamente degradado. Se agitaron los tubos continuamente, en algunos casos se introdujo una broca plástica estéril hasta que permitía una mezcla homogénea y una degradación óptima del tejido. Posterior a la digestión, se mezcló por vortex por 15 segundos y se adicionó 400 μ l de buffer AL. Luego se mezcló e incubó a 70°C durante 10 minutos. Después, se adicionaron 300 μ l de Etanol 96% y se mezcló por vortex. El contenido se transfirió a una columna del kit con tubo colector, luego se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Al producto de la columna se le realizaron dos lavados, el primero con 500 μ l de buffer AW1, seguido por una centrifugación a 8000 rpm durante 1 minuto. El segundo lavado con 500 μ l de buffer AW2 seguido por una centrifugación a 14.000 rpm durante 3 minutos. Finalmente se agregó al centro de la columna 70 ml de buffer AE, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8.000 rpm durante 1 minuto. El ADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

- Método de extracción Fenol: Cloroformo (Maniatis, 1982)

Se humedeció 0.5 cm^3 de muestra proveniente de músculo pectoral o hígado en buffer de lisis (Tris HCl pH 8 50, mM, EDTA 1mM, Tween 20). Se maceró hasta dejar fibras delgadas y posteriormente se transfirió a un tubo eppendorf hasta completar un volumen de 0.5 ml con buffer de lisis. En algunos casos fue necesario macerar con pistilo de plástico cuando el tejido no se degrada totalmente. Se recomienda para lograr una degradación total dejar la muestra en buffer de lisis durante 1 hora.

Se tomó entre 50 μ l a 100 μ l del producto de digestión y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Se adicionó 500 μ l de fenol saturado y se hizo vortex vigorosamente hasta homogenizar la mezcla. Posteriormente se centrifugó a 14000

r.p.m. durante 5 minutos. Se retiró la fase acuosa con micropipeta a un nuevo tubo, adicionando 500 µl de fenol, y mezclando con ayuda del vortex. Se repitieron los dos últimos pasos y se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos. Luego se retiró nuevamente la fase acuosa y fue transferida a un nuevo tubo. Se adicionó 500 µl de Cloroformo-Isoamilalcohol (96:4%) y mezcló suavemente antes de una centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos. Luego se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se adicionaron 1000 µl de Etanol al 70% a -20°C, mezclando por inversión y se dejó a -20°C durante 1 hora. Se centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos, y se descartó el sobrenadante y dejando secar completamente el Etanol. Posteriormente se rehidrató la muestra con 50 µl de buffer TE, posteriormente se cuantificó y se visualizó.

- Método de extracción Chelex (Sean *et al.*, 1991)

En un tubo de 1,5 ml se tomó aproximadamente 20 mg de tejido (fresco o de museo) y 1 ml de chelex 20%, se homogenizó la solución de chelex antes de usarla evitando que quedaran sedimentos en el fondo. Posteriormente se incubó a 56°C y se dejó en continua agitación por 24 horas. Una hora antes del final de la incubación se agregaron 5 µl de proteinasa K 10mg/ml (diluida en 50mM de tris-HCL pH 7,5, 5mM CaCl₂, TAE 10X) se dejó en incubación el tiempo restante. Para inactivar la proteinasa K se incubó la muestra a 94°C por 5 minutos. Se centrifugó 14.000 rpm por 3 minutos y se almacenó a 4°C hasta su posterior cuantificación o valoración por PCR.

- Validación de los métodos de extracción

Las muestras de ADN extraídas por los métodos descritos previamente se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, con tinción en bromuro de etidio y visualización en transiluminador con luz UV. Otra aproximación fue la de cuantificar el ADN por espectrofotometría basada en absorbancia de 260/280 nm en el equipo NanoDrop 2000/2000c.

Si se encontraba evidencia de ADN, se evaluaba la muestra por amplificación de los fragmentos de los genes CYB y D-LOOP y el FIB de acuerdo a la metodología de amplificación por PCR que se describe más adelante. Los ajustes de la técnica de PCR para éstos marcadores se realizaron previamente con ADN de buena calidad aislado de tejido fresco.

4.3.2 Verificación de extracción a través de amplificación

Luego de detectar niveles de ADN ya sea por visualización directa o mediante cuantificación, se procedió a hacer ensayos de amplificación de genes (uno mitocondrial y uno nuclear). Para una de las muestras para cada gen, el fragmento fue secuenciado en ambas direcciones, usando los mismos primers que los utilizados para la PCR, ello permitió verificar que correspondía al gen amplificado.

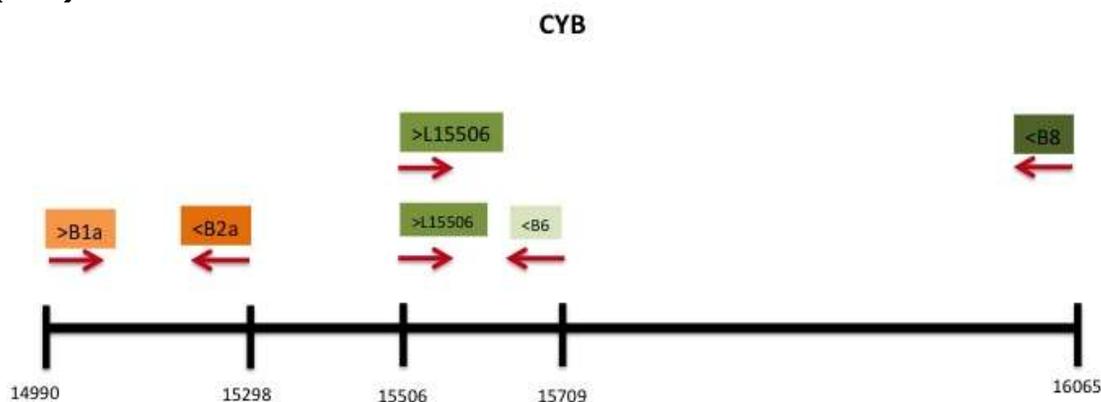
El individuo marcado con el número de colección del ICN 35982 identificado como *Cistothorus apolinari apolinari* del cual se obtuvieron muestras de hígado y musculo pectoral, con las cuales se realizaron extracciones de ADN por el método de Quiagen

dando como resultado una concentración de ADN de 1394,6 ng/μl fue utilizado como control positivo en todas las amplificaciones, esta muestra se secuenció para el fragmento de CYB, D-LOOP y FIB, se realizó un blast con el genoma de *Gallus gallus*, además se realizaron alineamientos con la secuencias para estos fragmentos de *Cistothorus palustris* que se encuentran en GenBank (Barker, 2004).

4.3.3 Amplificación de los marcadores Citocromo B, Región control e intron 4 β Fibrinogeno

Para el CYB y con el fin de obtener secuencias del gen completo se utilizaron diferentes combinaciones de primers. El gen a amplificar corresponde a las posiciones 14990-16065 de *Gallus gallus* (Desjardins y Morais, 1990). Esta estrategia fue utilizada tanto para tejido fresco como para muestras de museo en que se esperaba obtener ADNs degradados que imposibilitaban la amplificación de un fragmento de gran tamaño. Un primer fragmento amplificado corresponde a los primers b1a-B2a (308 pb); un segundo fragmento correspondió a la amplificación de L15506-B6 (203 pb) y un tercer fragmento amplificado con L15506-B8 (559 pb) (Helm-Bychowski y Cracraft, 1993) (Figura 4-14) (Tabla 4-2). Estos fragmentos luego fueron ensamblados para obtener un fragmento de 867 pb. No fue posible obtener secuencias para el fragmento entre las posiciones 15299-15505, ya que no se pudo obtener amplificado de este segmento presumiblemente porque no funcionaron los primers:

Figura 4-14. Primers utilizados para amplificar fragmentos del Citocromo B (CYB)



Para el D-LOOP se amplificó un fragmento aproximado de 350 bp mediante los primers H1261-F304 (Baker y Marshall, 1997). Para FIB se utilizaron los primers FIB 3 y FIB 4 para obtener un fragmento aproximado de 583 pb (Chung *et al.*, 1990. Tabla 4-2

Tabla 4-2. Secuencia de los primers utilizados para la amplificación de citocromo b, β fibrinogeno y región control.

PRIMERS	SECUENCIA (5'-3')	REFERENCIA
B1a	ccatccaacatctcagcatgatgaaa	Helm - Bychowski y Cracraft (1993)
B2a	cccctcagaatgatattgtcctca	Helm - Bychowski y Cracraft (1993)
L15506	ctcaccttctacacgaaacagg	Helm - Bychowski y Cracraft (1993)
B6	gcgtaggcgaataggaagtatca	Helm - Bychowski y Cracraft (1993)
B8	ggagtcttcagtctctggtttacaagac	Helm - Bychowski y Cracraft (1993)
FIB3	ctgtaatatccgggtggttcagg	(Chung, Harris, & Davie, 1990).
FIB4	atctcagatgtttcacctcctttc	(Chung, Harris, & Davie, 1990).
H1261	aggtaccatcttggcatcttc	(Baker y Marshall 1997)
F304	cttgacactgatgcacttg	(Baker y Marshall 1997)

B1a, B2a, L15506; B6 y B8: CYB; FIB: Intron 4 β fibrinogeno; H1261, F304: Región control, F: Universal (Forward), L: Cadena pesada (Heavy strand), H: Cadena liviana (Light strand).

Los parámetros de amplificación incluyeron una desnaturalización inicial (94 °C-3 min); 35 ciclos (94 °C-45 seg; 50 °C-45 seg, 72 °C- 1 min), y una extensión final (72 °C-5 min). En el caso de DLOOP y FIB las condiciones para la PCR fueron similares, excepto que la temperatura de alineamiento de los primers fue de 52 °C.

4.3.4 Visualización, purificación y secuenciación

Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa 1,5% teñidos con Bromuro de Etidio (2µl/50ml gel). De ser exitosa la amplificación, los productos de PCR se purificaron con columnas QIAquick™ (Quiagen), con una posterior visualización en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio con condiciones similares a las descritas anteriormente. Esto para asegurar el éxito de la limpieza antes de realizar la secuenciación. Las muestras fueron secuenciadas en MacroGen Corea por el método de Sanger y en ambas direcciones utilizando los mismos primers de la amplificación.

4.3.5 Análisis de datos

Las secuencias fueron editadas y analizadas en Sequencher 5.0 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan). Una secuencia consenso fue obtenida en el mismo software para cada individuo utilizando los diferentes combinaciones de primers para CYB o las dos secuencias en direcciones opuestas para D-LOOP y FIB. Para los fragmentos de los tres genes se utilizaron secuencias homologas obtenidas de Genbank. Así un total de 66 secuencias se obtuvieron para los analisis de CYB: 60 pertenecen a la familia Troglodytidae y 6 a las familias Sittidae, Polioptilidae, Certhidae, Cisticolidae,

Pipridae y Parulidae. Adicionalmente para este gen se incluyen tres secuencias para *Thryothorus rufalbus castanonotus*, *Thryothorus rufalbus minlosi* y *Thryothorus rufalbus cumanensis* suministradas por Andrés Cuervo provenientes de muestras de museo (Lara *et al.*, 2012) dado que aún no se encontraban disponibles en Genbank.

En el caso de DLOOP, se obtuvieron un total de 24 secuencias para los diferentes análisis: 23 de ellas pertenecen a la familia Troglodytidae y un representante de la familia Sturnidae.

Finalmente para los análisis con FIB, se dispuso de un total de 38 secuencias; 32 de ellas pertenecientes a la familia Troglodytidae y 6 a las familias (Sittidae, Polioptilidae, Certhidae, Cisticolidae, Pipridae y Parulidae).

Las secuencias fueron descargadas de GenBank, la especie a la cual pertenecen, el número de acceso o el lugar de procedencia se relacionan en la tabla 4-3 y 4-4.

Tabla 4-3. Números de acceso de secuencias del gen citocromo B depositadas en Gen Bank

No. Acceso	Especie	No. Acceso	Especie
AY352534.1	<i>Pipra pipra</i>	DQ415698.1	<i>Thryothorus rutilus hyperythrus</i>
AY352520.2	<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>	DQ415687.1	<i>Thryothorus mystacalis mystacalis</i>
AY352521.2	<i>Campylorhynchus megalopterus</i>	DQ415682.1	<i>Thryothorus genibarbis genibarbis</i>
AY352533.1	<i>Odontorchilus cinereus</i>	DQ415711.1	<i>Troglodytes musculus intermedius</i>
AY352537.1	<i>Salpinctes obsoletus</i>	DQ415685.1	<i>Thryothorus sclateri paucimaculatus</i>
AY352522.1	<i>Catherpes mexicanus</i>	DQ415693.1	<i>Thryothorus leucopogon leucopogon</i>
AY352531.1	<i>Catherpes sumichrasti</i>	JK02027_Quetzaltenango	<i>Thryophilus rufalbus rufalbus</i>
AY352525.1	<i>Cinnycerthia peruana</i>	DQ415705.1	<i>Thryothorus rufalbus castanonotus</i>
AY352526.1	<i>Cistothorus platensis</i>	JPL304_Tachira(VE)	<i>Thryophilus rufalbus minlosi</i>
AY352541.2	<i>Thryomanes bewickii</i>	ICN34937_Cordoba (CO)	<i>Thryophilus rufalbus cumanensis</i>
AY352542.1	<i>Thryothorus coraya</i>	JX013497.1	<i>Thryophilus nicefori</i>
AY352546.1	<i>Thryothorus maculipectus</i>	JX013499.1	<i>Thryophilus sernai (sex male)</i>
AY352545.2	<i>Thryothorus ludovicianus</i>	JX013498.1	<i>Thryophilus sernai</i>
AY352544.2	<i>Thryothorus leucotis</i>	JX013500.1	<i>Thryophilus sernai (sex female)</i>
AY352543.1	<i>Thryothorus guarayanus</i>	DQ004892.1	<i>Campylorhynchus yucatanicus</i>
AY352547.1	<i>Troglodytes aedon</i>	DQ004886.1	<i>Campylorhynchus jocosus</i>
AY352530.1	<i>Henicorhina leucosticta</i>	DQ004882.1	<i>Campylorhynchus chiapensis</i>
AY352532.1	<i>Microcerculus marginatus</i>	DQ004890.1	<i>Campylorhynchus turdinus unicolor</i>
AY352527.1	<i>Cyphorhinus aradus</i>	DQ004891.1	<i>Campylorhynchus turdinus hypostictus</i>
AY352538.1	<i>Sitta pygmaea</i>	DQ004880.1	<i>Campylorhynchus albobrunneus</i>
AY352523.1	<i>Certhia familiaris</i>	DQ415699.1	<i>Thryothorus semibadius</i>
AY352535.1	<i>Polioptila caerulea</i>	DQ415692.1	<i>Thryothorus thoracicus</i>
AY352536.1	<i>Prinia bairdii</i>	DQ415694.1	<i>Thryothorus modestus zeledoni</i>
AY352548.1	<i>Zeledonia coronata</i>	DQ415704.1	<i>Thryothorus fasciatoventris melanogaster</i>
AY352524.1	<i>Cistothorus palustris</i>	DQ415684.1	<i>Thryothorus euophrys euophrys</i>
DQ415690.1	<i>Thryothorus pleurostictus nisorius</i>	DQ415696.1	<i>Thryothorus atrogularis</i>
DQ415689.1	<i>Thryothorus sinaloa sinaloa</i>	DQ415697.1	<i>Thryothorus felix felix</i>

No. Acceso	Especie	No. Acceso	Especie
DQ415701.1	<i>Thryothorus nigricapillus schotti</i>		

Tabla 4-4. Números de acceso de secuencias de los marcadores intrón 4 de B fibrinógeno y la región D loop depositadas en Gen Bank

Gen β fibrinógeno		D-Loop de la región control	
No. Acceso	Especie	No. Acceso	Especie
AY352555.1	<i>Cistothorus palustris</i>	HQ263640.1	<i>Sturnus vulgaris</i>
AY352578.1	<i>Troglodytes aedon</i>	AY463988.1	<i>Henicorhina leucophrys</i>
AY352564.1	<i>Odontorchilus cinereus</i>	DQ004867.1	<i>Campylorhynchus rufinucha humilis</i>
AY352572.1	<i>Thyomanes bewickii</i>	DQ004857.1	<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>
AY352561.1	<i>Henicorhina leucosticta</i>	DQ004876.1	<i>Campylorhynchus fasciatus</i>
AY352552.1	<i>Campylorhynchus megalopterus</i>	DQ004859.1	<i>Campylorhynchus chiapensis</i>
AY352556.1	<i>Cinnycerthia peruana</i>	DQ004861.1	<i>Campylorhynchus griseus</i>
AY352558.1	<i>Cyphorhinus aradus</i>	DQ004870.1	<i>Campylorhynchus yucatanicus</i>
AY352551.1	<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>	DQ004856.1	<i>Campylorhynchus albobrunneus</i>
DQ415714.1	<i>Thryothorus albinucha albinucha</i>	DQ004872.1	<i>Campylorhynchus zonatus zonatus</i>
AY352573.1	<i>Thryothorus coraya</i>	DQ004869.1	<i>Campylorhynchus turdinus hypostictus</i>
AY352563.1	<i>Microcerculus marginatus</i>	DQ004875.1	<i>Campylorhynchus zonatus vulcanius</i>
AY352576.1	<i>Thryothorus ludovicianus</i>	DQ004868.1	<i>Campylorhynchus turdinus unicolor</i>
AY352577.1	<i>Thryothorus maculipectus</i>		
AY352575.1	<i>Thryothorus leucotis</i>		
AY352562.1	<i>Catherpes sumichrasti</i>		
AY352553.1	<i>Catherpes mexicanus</i>		
AY352574.1	<i>Thryothorus guarayanus</i>		
AY352568.1	<i>Salpinctes obsoletus</i>		
DQ415713.1	<i>Thryothorus sinaloa sinaloa</i>		
AY352557.1	<i>Cistothorus platensis</i>		
AY352566.1	<i>Polioptila caerulea</i>		
AY352579.1	<i>Zeledonia coronata</i>		
AY352554.1	<i>Certhia familiaris</i>		

40 **VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO**
Cistothorus apolinari apolinari y *Cistothorus apolinari hernandezi* (AVES:
 TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

Gen β fibrinógeno		D-Loop de la región control	
No. Acceso	Especie	No. Acceso	Especie
AY352569.1	<i>Sitta pygmaea</i>		
AY352567.1	<i>Prinia bairdii</i>		
AY352565.1	<i>Pipra pipra</i>		

Thryothorus rufalbus castanonotus, *Thryothorus rufalbus minlosi* y *Thryothorus rufalbus cumanensis* suministradas por Andrés Cuervo provenientes de muestras de museo.

Se construyeron tres matrices, una para cada fragmento de gen. Los alineamientos se hicieron mediante Clustal X versión 2.1 (Larkin *et al.*, 2007) usando los parámetros *default* del programa. Para el gen codificante y con el fin de verificar el correcto marco de lectura, se tradujo la proteína a partir del alineamiento de nucleótidos en el programa MacClade Versión 4.06 (Madison y Madison, 2005). Análisis de distancias genéticas, frecuencia de nucleótidos, frecuencia de sustituciones, homogeneidad en la composición de bases se realizaron en PAUP * (Swofford, 2002) y Mega Versión 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

Se construyeron árboles filogenéticos mediante los métodos de máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) e Inferencia bayesiana (IB). Los análisis de MP se realizaron en PAUP* (Swofford, 2002) mediante búsquedas heurísticas con 1000 réplicas al azar y la opción de intercambio de ramas TBR. Puesto que no hubo evidencia de fuertes señales de saturación de nucleótidos, en especial de las terceras posiciones tipo transición del CYB que han demostrado ser fuente frecuente de homoplasia, todos los caracteres fueron considerados para el análisis y tratados como no ordenados. Cuando se encontró más de un árbol igualmente parsimonioso, se calculó un árbol de consenso de la mayoría (MRCT con sus siglas en inglés). Soportes en los distintos clados se calcularon por remuestreo con un bootstrap de 1000 (Felsenstein, 1985) con condiciones similares a los análisis regulares de MP. Para MV e IB que utilizan modelos probabilísticos, se determinó primero el modelo

de sustitución que mejor se ajusta a los datos mediante el criterio AIC de jModeltest (Posada, 2008). Para CYB correspondió a TIM3+I+G (frecuencia bases=0.3329, 0.4094, 0.0771, 0.1806; nst=6; rmat=0.6718, 12.9799, 1.0000, 0.6718, 8.3136, 1.0000; rates=gamma shape=0.6920; ncat=4; pinvar=0.4440). Para FIB también correspondió a TIM3+I+G (frecuencia bases=0.3035, 0.1742, 0.1820, 0.3403); nst=6; rmat=1.5439, 3.8250, 1.0000, 1.5439, 3.2754, 1.0000); rates=gamma shape=3.6070; ncat=4; pinvar=0.0230). Finalmente para D-LOOP el modelo seleccionado fue TrN+G (frecuencia bases=0.3545, 0.2932, 0.0559, 0.2965); nst=6; rmat=1.0000, 3.5189, 1.0000, 1.0000, 5.5387, 1.0000; rates=gamma shape=0.4130; ncat=4 pinvar=0.

Los análisis de MV fueron obtenidos con Garli 0.951 (Zwickl, 2006) especificando en las opciones del programa el modelo de sustitución al obtenido con jModeltest según cada caso y especificando búsquedas con soporte de bootstrap de 100 réplicas. Los análisis bayesianos se realizaron con MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) versión 3.1.2. Se corrieron 10 millones de generaciones en dos análisis separados e independientes, muestreando cada 1000 generaciones, para un total de 10000 muestras. La convergencia se evaluó en Tracer del paquete Beast (Drummond y Rambaut, 2007) y revisando la desviación estándar de frecuencias divididas ($<0,01$). Los árboles eliminados (*burn-in*) correspondieron al 25% de las muestras generadas, el 75% restante se utilizó para construir un árbol de consenso de la mayoría mediante TreeAnnotator (del paquete Beast). Finalmente se visualizaron los árboles y probabilidades posteriores mediante FigTree del paquete Beast. Con el fin de probar la hipótesis de la existencia de una única especie, se construyeron bajo MP y MV topologías forzando la existencia de un cluster único para los individuos colectados de *C. a. apolinari* y otro para *C. a. hernandezii*, y se compararon con los árboles generados sin forzar una topología en particular. Para

MP la comparación consistió en el número de pasos de árboles alternos, mientras que para MV se hizo la comparación de valores de verosimilitud de los árboles generados. El nivel de significancia para la diferencia en longitudes o verosimilitudes de pares de árboles se hizo mediante pruebas t de Hishino-Hasegawa y Shimodaira-Hasegawa, todas implementadas en PAUP (Swofford, 2002). Finalmente una topología de interés era la resultante de la combinación de dos genes de historias evolutivas distintas: el CYB del ADN mitocondrial y el FIB del ADN nuclear. Se utilizó la prueba de ILD (*incongruence length difference*) (Farris *et al.*, 1995) que compara la longitud del árbol más parsimonioso de los datos combinados con la longitud de árboles generados de matrices de igual tamaño que la original, pero resultantes de un submuestreo de las particiones de genes originales.

Adicionalmente se compararon las topologías resultantes con las generadas usando la base de datos www.birdtree.org (Jetz *et al.*, 2012) que genera para los taxones de interés las filogenias con datos genéticos publicados a la fecha. Dichos árboles provienen de análisis bayesianos con un set de 1000 árboles con 9993 OTUS cada uno.

Para evidenciar posibles diferencias en la distribución de haplotipos para cada una de las presuntas dos especies de cucarachero, se construyó una red de haplotipos usando las secuencias del gen CYB mediante TCS 1.2.1 (Clement *et al.* 2000)

- Estimación de tiempos de divergencia con inferencia bayesiana

Con el fin de determinar los tiempos de divergencia aproximados para los clados resultantes en los análisis filogenéticos para el grupo de estudio, se utilizaron dos

enfoques, ambos con la matriz de secuencias del CYB puesto que incluía la mayor parte de taxones.

En el primero se utilizó un reloj molecular relajado con el programa BEAST (Drummond y Rambaut, 2007) y se asumieron tasas de sustitución variables en las diferentes ramas del árbol de acuerdo a los resultados de j-modeltest que sugieren heterogeneidad en la tasa de evolución molecular de CYB. Se especificaron los valores a priori para los parámetros del análisis y el reloj molecular se calibró utilizando dos puntos de divergencia: (1) 22.8 MA para el ancestro común más reciente entre las familias Trogloditidae y Polioptilidae (*Troglodytes aedon* y *Polioptila cerulea*) de acuerdo a Zuccon *et al.*, (2006), y (2) 77 MA para el ancestro común más reciente entre las familias Trogloditidae y Pipridae (*Troglodytes aedon* y *Pipra pipra*) de acuerdo a Barker *et al.*, (2004). Se hicieron análisis incluyendo solamente uno o los dos puntos de calibración. Los tiempos de divergencia fueron tomados en la página de “The TimeTree of Life” (<http://www.timetree.org/book.php>), un servicio público de información sobre tiempos evolutivos de la vida que realiza una búsqueda de los tiempos de divergencia de los organismos en la literatura publicada (Hedges *et al.*, 2006). El segundo método utilizó los mismos puntos de calibración mencionados anteriormente, pero utilizando el método de NPRS (*nonparametric rate-smoothing method*) implementado en r8s (Sanderson, 2003). Este algoritmo tiene en cuenta la variación de tasas a lo largo de los linajes y relaja o suaviza el supuesto de reloj molecular estricto.

44 VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO
Cistothorus apolinari apolinari y *Cistothorus apolinari hernandezi* (AVES:
TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

5. RESULTADOS

5.1 Extracción de ADN

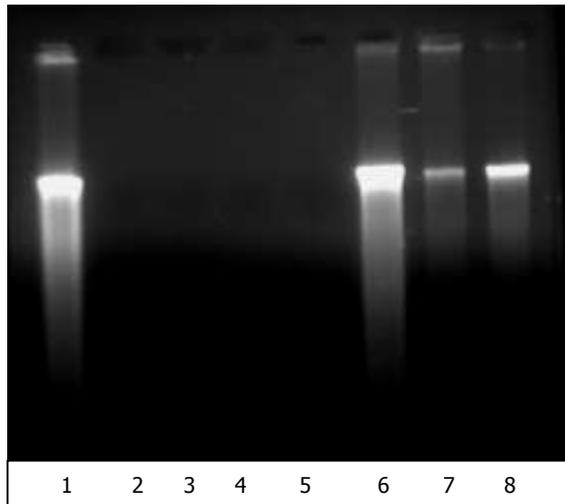
5.1.1 Extracción de ADN a partir de muestras provenientes del museo ICN, el MHNUS y de tejido fresco.

Las 21 muestras de pieles de colección que se tuvieron a disposición habían sido recolectadas entre 1932 a 1999, las cuales fueron tratadas químicamente para su conservación. Por otro lado, debido a regulaciones de las colecciones, era permitido tomar tejido de una muy pequeña porción de almohadilla plantar que corresponde al punto de apoyo de los miembros posteriores de las aves, que normalmente tiene poca irrigación y es tejido altamente queratinizado, además de una cantidad limitada de plumas donde el tejido epitelial ubicado en el punto de inserción era el material disponible para realizar la extracción de ADN. Debido a la limitación de la muestra se hicieron ensayos individuales tanto con almohadillas como con plumas, donde en geles de agarosa se observaban productos degradados, baja concentración o ausencia total de ADN (Fig. 5-1).

Las muestras fueron cuantificadas en el nanodrop encontrándose concentraciones entre 1.9 ng/ μ l a 11.8 ng/ μ l por el método de Qiagen, 2.7 a 7.9 ng/ μ l por el método de Fenol:cloroformo y con el método de chelex no se observó ADN en los geles de agarosa y la cuantificación de ADN no arrojó valores que indicaran la presencia de

ADN. Igualmente, las curvas de absorbancia 260/280 muestran que los ácidos nucleicos presentan impurezas (Fig. 5-1).

Figura 5-1. ADN genómico de *Cistothorus sp* en geles de agarosa (1%) teñidos con bromuro de etidio a partir de tejido fresco hepático. Método de Qiagen (kit comercial) (Carriles 1, 6-8), método de chelex (Carriles 2-3), método fenol-cloroformo (Carriles 4-5).

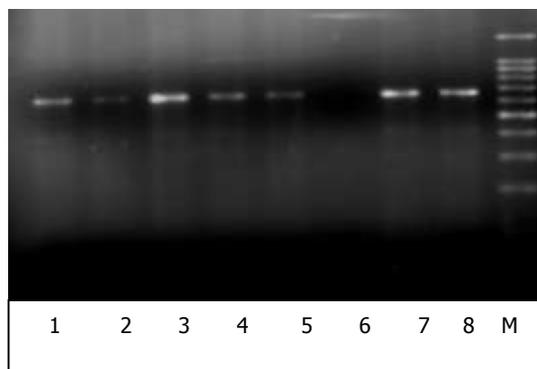


A pesar de las bajas concentraciones de ADN en las extracciones de las muestras procedentes de museo se realizaron ensayos de amplificación del fragmento del CYB, donde se modificaron en las condiciones de PCR (concentración de $MgCl_2$, temperatura de hibridación, tiempos de extensión y número de ciclos). La visualización en geles de agarosa no detectó productos de amplificación por lo cual no se pudo obtener secuencias para las muestras procedentes de museo.

Con muestras de tejido fresco (corazón, hígado y músculo pectoral) recolectadas en un periodo no mayor a dos años y preservadas en alcohol al 70 o 95% se obtuvo ADN utilizando los métodos de extracción de Qiagen con concentraciones entre 1.9 a 838.2 ng/ μ l y el método de extracción orgánica de fenol:cloroformo con concentraciones entre 83,2 a 1394,68 ng/ μ l. Con el método de chelex, como se

esperaba no se observó ADN en la electroforesis con geles de agarosa. La eficiencia del método de extracción con el kit Qiagen se incrementó ampliando el tiempo de incubación hasta por 48 horas, agregando 10 μ l de proteinasa K pasadas las primeras 24 horas y haciendo vortex durante el proceso. Sin embargo, los ensayos de amplificación de los fragmentos por PCR solo arrojaron resultados positivos con las muestras extraídas con el kit Qiagen. En la figura 5-2, se observan los amplificadores de las muestras de *Cistothonus* provenientes de tejido (corazón, hígado y músculo pectoral) donde se aprecia un fragmento de CYB de aproximadamente 559 pb y un fragmento de 583 pb correspondiente a FIB.

Figura 5-2. Amplificaciones de gen mitocondrial CYB (carriles 1-4) y gen nuclear FIB (Carriles 5-8) en muestras de *Cistothonus apolinari* obtenidas con kit de extracción Quiagen.



Para CYB se obtuvieron 11 secuencias, pertenecientes a *Cistothonus apolinari* (7 pertenecientes a la subespecie *C. a. apolinari*, y 4 a *C. a. hernandezí*.) con un tamaño entre 800 a 867 pb. En el caso de D-LOOP, se obtuvieron 11 secuencias que pertenecen a *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezí* con un tamaño entre 332-350 pb; y finalmente 11 secuencias de FIB para *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezí* con un tamaño entre 468 a 633 pb.

5.2 Variación genética y análisis filogenético

Distancias genéticas dentro de cada subespecie y entre subespecies son sorprendentemente bajas y se muestran en la Tabla 5.1 Para los genes mitocondriales las distancias para secuencias de individuos de *C. a apolinari* están en promedio en 0,34, 0,37 y 0,227 para los genes CYB, DLOOP y FIB respectivamente. En el caso de comparaciones para individuos de *C. a hernandezi* los valores encontrados fueron 0,16, 0,65 y 0.197 respectivamente para los mismos genes. La magnitud de la distancia en comparaciones entre las dos especies mostraron valores similares a los encontrados en distancias intrasubespecíficas: 0,26 para CYB, 0,32 para DLOOP y 0,1881 para FIB. Esta es una primera línea de evidencia que los individuos muestreados pueden estar haciendo parte de la misma entidad taxonómica y no dos subespecies distintas. En ningún caso, las comparaciones superaron un 1% de divergencia.

Tabla 5.1 Porcentaje de divergencias genéticas dentro y entre subespecies de cucarachero. Promedio y rango de comparaciones se muestran usando distancia absoluta *100.

	Dentro de <i>C. a. apolinari</i>	Dentro de <i>C. a. hernandezi</i>	Entre subespecies
CYB	0,34 (0-1,3)	0,16 (0,1-0,25)	0,26 (0-0,83)
DLOOP	0,37 (0-0,98)	0,65 (0-1,29)	0,32 (0-1,3)
FIB	0,227 (0-0,51)	0,197 (0-0,5)	0,188 (0-0,34)

Señales de saturación en las posiciones del codón utilizando el modelo de Tamura-Nei 1993 fueron evidentes para las transiciones en tercera posición (Fig.5-3). Por otra parte, se observó una mayor frecuencia de substitución nucleotídica tipo transición, con alrededor del 30% las de tipo C-T. (Fig. 5-4).

Figura 5-3. Saturación de nucleótidos en la 1era, 2da y 3era posición para el gen Citb con distancia de Tamura Nei.

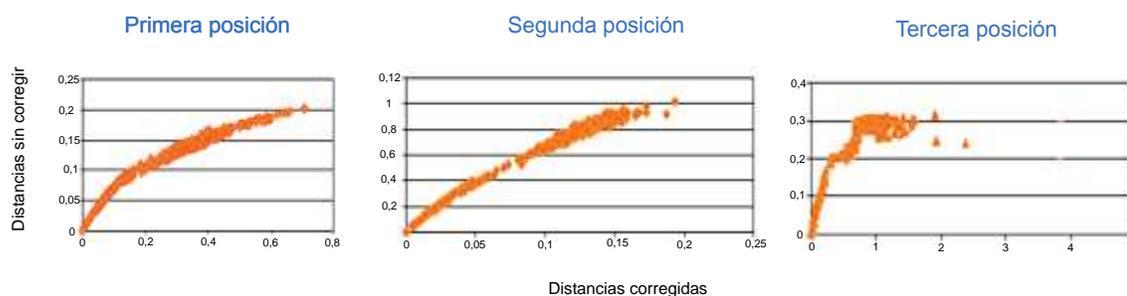
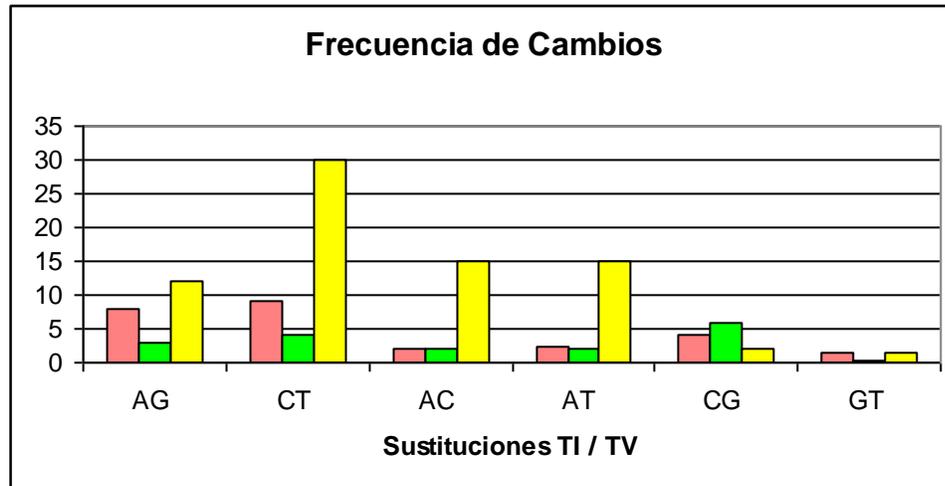


Figura 5-4. Frecuencia de sustitución de nucleótidos para transiciones (AG, CT) y transversiones (AC, AT, CG, y GT). Primera posición (rosado), segunda posición (verde), tercera posición (amarillo).



Algunos parámetros bajo parsimonia de las secuencias de los tres genes analizados se muestran en la tabla 5-2. El gen con caracteres más informativos es CYB con 72.44%, mientras que el gen que alcanzó un porcentaje más bajo de informatividad corresponde a FIB con un 18.65%. Combinando los genes CYB y FIB se alcanzó un porcentaje de 30.54.

Tabla 5-2. Parámetros bajo parsimonia para los Genes (ADNmt, D-LOOP y FIB) de *Cistothorus apolinari*

Frag-Gen	No de taxones	No de caracteres totales	No de caracteres informativos	No de árboles obtenidos	No de pasos	IC	IR	Porcentaje de caracteres informativos
CYB	66	606	439	2480	3044	0.253	0.48	72.44
FIB	38	638	119	880	241	0.685	0.833	18.65
CR	24	414	130	6	309	0.615	0.832	31.40
CYB-CR	37	1683	514	444	2225	0.376	0.476	30.54

La figura 5-5A muestra el árbol resultante del análisis con el gen CYB bajo inferencia bayesiana. La familia Troglodytidae aparece monofilética al igual que 6 de los siete géneros para los cuales se tenía más de una especie. La excepción es *Pheugophedius* que aparece parafilético. Las especies de *Cistothorus* forman también un clado, pero los especímenes de las dos presuntas subespecies no forman clusters distintos. Este cluster tiene un soporte de 83 en *bootstrap* para Máxima verosimilitud, y de probabilidad a posteriori de 1 para inferencia bayesiana. La red de haplotipos construida con los datos de este gen no mostró diferencias en estructura para diferenciar los haplotipos de las dos subespecies; por el contrario se evidenciaron 8 haplotipos compartidos por secuencias de ambas especies (Fig 5.5B). *C. palustris* y *C. platensis* no se conectan a la red por superar el número de pasos bajo parsimonia (95% probabilidad).

La topología generada con las secuencias de D-LOOP (Figura 5-6) muestra también un único cluster para *C. a. apolinari* y para *C. a. hernandezi* los valores que soportan este clúster son altos tanto para bootstrap de MP y bootstrap de ML (100 y 69 respectivamente). En este árbol el género *Campylorhincus* no aparece como un grupo monofilético.

La tercera topología que evidencia que las dos presuntas subespecies de *Cistothorus* forman un único clúster proviene de las secuencias de FIB (Figura 5-7). Con este marcador la agrupación de los individuos de *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezi*, forman un único cluster soportados por bootstrap de MP (100) y por bootstrap de ML (95). En este análisis *Cistothorus*, *Campylorhicus* y *Catherpes* aparecen como monofiléticos, mientras que el género *Thryothorus* aparece como parafilético.

La prueba ILD (*Incongruent length difference*) sugirió que los datos se pueden combinar ($p=0.05$). Al igual que la topología de los genes individuales, esta topología de los datos combinados (CYB y FIB) refleja la filogenia de la familia Troglodytidae con altos soportes de los tres métodos utilizados. Así mismo se refleja la separación de linajes del género *Cistothorus* observada previamente.

En cuanto a las subespecies de *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezi* se encuentra que se agrupan en un único clado sin resolución evidente que separe a los dos linajes sub-específicos. (Figura 5-8).

Figura 5.5B. Red de haplotipos generada con secuencias de CYB con TCS 1.21. Máximo número de pasos permitido para conectar haplotipos es de 14 (0.95%). Ocho haplotipos fueron encontrados; *Cistothorus platensis*, *Cistothorus palustris*, *Cistothorus apolinari apolinari* 11 (Compartido con *Cistothorus apolinari apolinari* 27), *Cistothorus apolinari apolinari* 23 (Compartido con *Cistothorus apolinari hernandezi* 25 y *Cistothorus apolinari apolinari* 31), *Cistothorus apolinari hernandezi* 24, *Cistothorus apolinari apolinari* 26, *Cistothorus apolinari hernandezi* 28, *Cistothorus apolinari hernandezi* 29 (Compartido con *Cistothorus apolinari apolinari* 30 y *Cistothorus apolinari apolinari* 32).

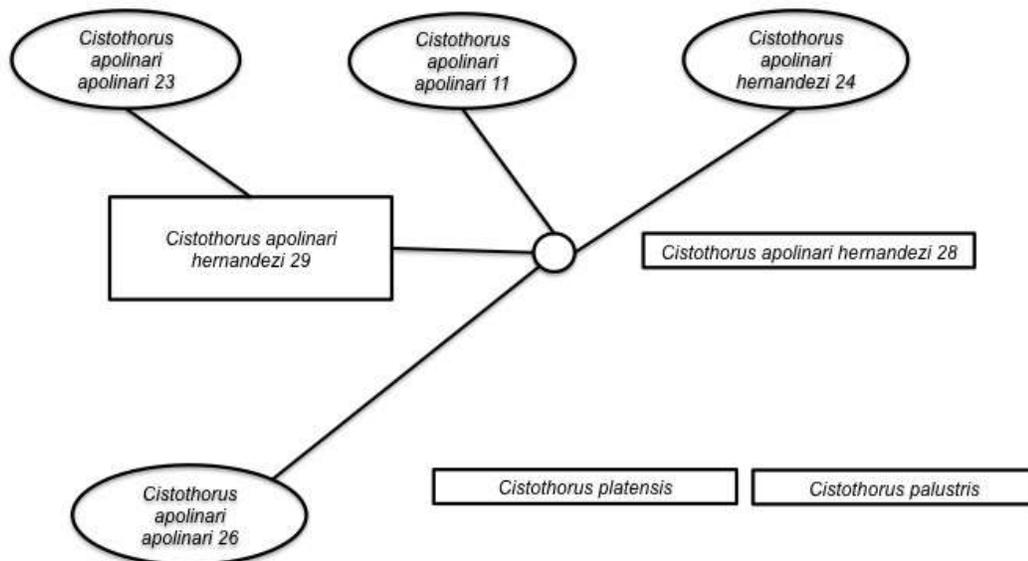


Figura 5-6. Árbol para D-loop. La topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. Soportes de valores bootstrap (100) en color rojo para Maxima parsimonia (Paup) en azul para Maxima verosimilitud (Garli). El modelo de sustitución proviene de Jmodeltest que correspondió a: TrN+G

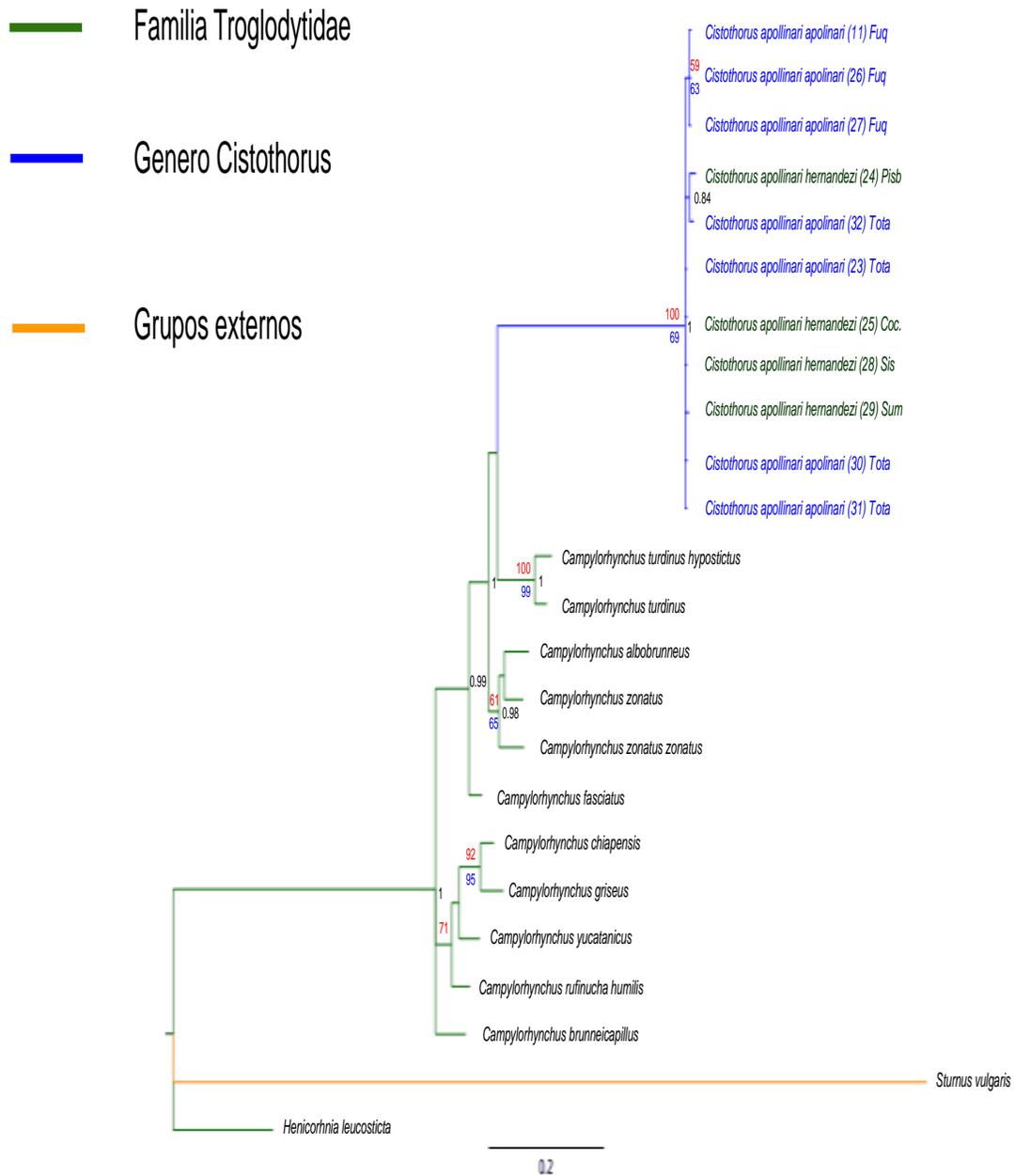
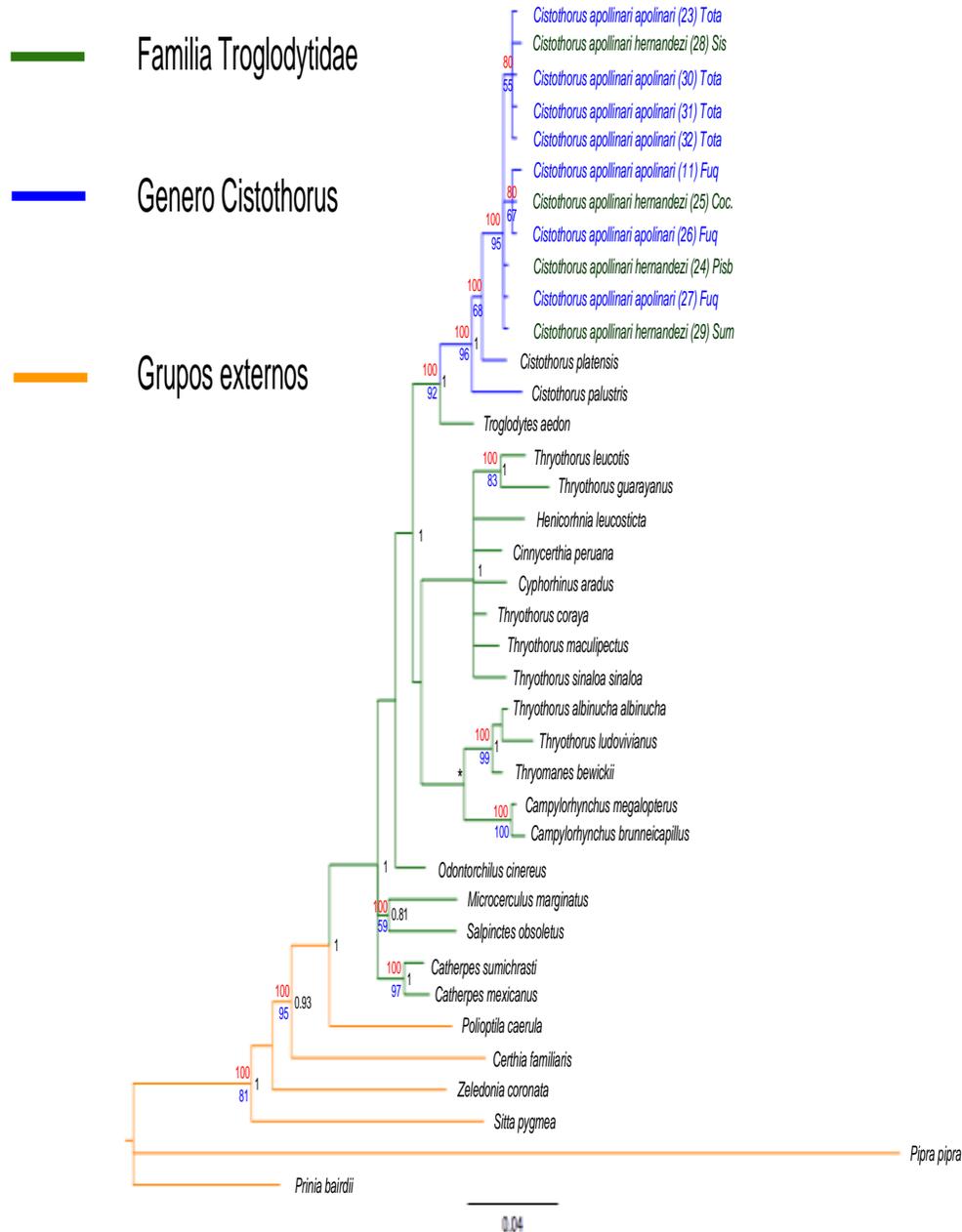
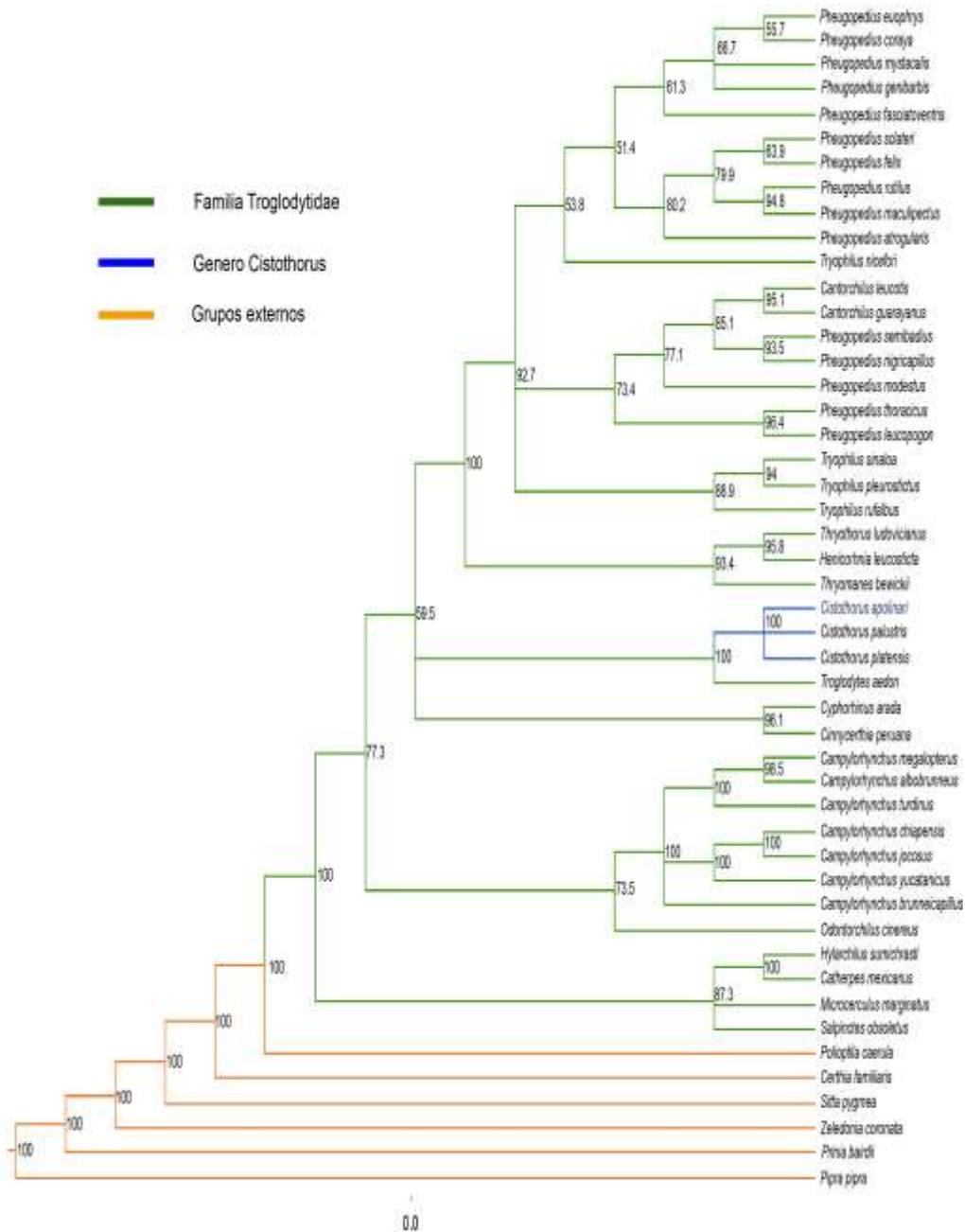


Figura 5-7. Árbol para FIB. La topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. Soportes de valores bootstrap (100) en color rojo para Maxima parsimonia (Paup) en azul para Maxima verosimilitud (Garli). El modelo de sustitución proviene de Jmodeltest que correspondió a: TIM3+I+G



La topología resultante de los datos de las especies de este estudio y obtenida de www.birdtree.org (Jetz *et al*/2012), muestra las especies del género *Cistothorus* en un único cluster (soporte de probabilidad a posteriori de 100%), además de la monofilia de la familia Troglodytidae (probabilidad a posteriori de 100%). Con un soporte por inferencia bayesiana de 100%, el grupo hermano de *Cistothorus* es *Troglodytes aedon*. (Figura 5-9).

Figura 5-9. Topología es basada en análisis de inferencia Bayesiana con soportes de probabilidad a posteriori en negro. El árbol se construyó con ayuda de la pagina www.birdtree.org



Para las comparaciones de árboles generados en los análisis regulares versus aquellos obtenidos forzando una topología en que muestras de cada subespecie formaban grupos únicos, los resultados mostraron que en todos los casos la topología que consideraba dos clusters sub-específicos era más larga en longitud bajo parsimonia o menos verosímil bajo máxima verosimilitud. Esto ocurrió sin importar la prueba realizada, aunque en todos los casos el valor p no fue significativo (Tabla 5-3).

Tabla 5-3. Comparación bajo MP y MV de topologías para la existencia de una única especie vs dos subespecies en el cucarachero (*Cistothorus apollinari*). Bajo MP la comparación se realiza en longitud del árbol, y para MV mediante valores de verosimilitud. KH y SH se refieren a pruebas t de una y dos colas respectivamente. El p valor para tener significancia en la prueba (0,05).

	Gen o combinación	Árbol este estudio	Árbol forzando topología de dos clusters subespecíficos	Valor p	
				Prueba Kishino-Hasegawa	Prueba Shimodaira-Hasegawa
MP (longitud)	CYB	3049	3044	0,5590	0,58584
	D-LOOP	310	309	0,3192	0,3173
	FIB	243	241	0,4818	0,4795
	CYB y FIB	243	241	0,5376	0,5371
MV (verosimilitud)	CYB	14433,139	14417,92	0,5590	0,5584
	D-LOOP	2171,353	2116,152	0,3192	0,3173
	FIB	3384,774	3370,134	0,4818	0,4795
	CYB y FIB	14111,833	14100,399	0,5376	0,5371

5.3 Análisis de tiempo de divergencia

La Figura 5-10 muestra los tiempos de divergencia para los diferentes grupos de interés usando como puntos de calibración del reloj molecular el ancestro común más reciente de las familias Troglodytidae y Polioptilidae (*Troglodyes aedon* y *Poliopitla cerulea* en 22.8 MA), y el ancestro común más reciente de las familia Troglodytidae y Pipridae (*Troglodyes aedon* y *Pipra pipra* en 77 MA). Los tiempos inferidos fueron casi idénticos cuando se usó uno o dos puntos de calibración y sin importar si el enfoque era de reloj relajado bajo inferencia bayesiana en BEAST o por máxima verosimilitud en r8s. El ancestro común más reciente de *Cistothorus apolinari* y *Cistothorus platensis* ocurre hace 9,38 MA mientras que la divergencia de *Cistothorus apolinari* ocurre aproximadamente hace 5,95 MA. Al igual que en los análisis anteriores, el árbol resultante muestra todas las secuencias de *Cistothorus apolinari* en un único cluster y no hay distinción de clados para las dos presuntas subespecies conocidas hoy.

5.4 Registros del Cucarachero *C. apolinari*, durante este estudio

Durante el transcurso del trabajo se hicieron registros del cucarachero *C. apolinari* en los sitios visitados lo que permitió corroborar la presencia de la especie con base en las referencias consultadas. Los sitios visitados en donde se evidenció la presencia de la especie se muestran en la Tabla 5-4.

Tabla 5-4. Sitios de registro de *Cistothorus apolinari*

SITIO	AÑOS DE REGISTRO	OBSERVACIONES
Humedal La Conejera (Bogotá)	2007-2009	Registro de al menos dos parejas (4°45'44"N, 74°6'19"O).
Humedal Tibanica (Bogotá)	2006-2009	4°36'11"N, 74°12'18"O) (Bosa): registro de tres parejas.
Humedal La Florida (Cundinamarca).	2008-2009	Registro de una pareja.
Laguna La Herrera (Cundinamarca).	2012	Registro de dos parejas, (4°41'40"N, 74°16'29"O).
Laguna de Fúquene (Cundinamarca).	2004-2006, 2009 y 2011	Registro de seis a ocho parejas.
Páramo de Sumapaz (Bogotá y Cundinamarca).	2011-2012	Registro de tres parejas Pasca - Parque Sumapaz, Laguna Los Colorados (4°22'N4°13'O 3.610 m), Laguna Larga (4°11'N74°15'O 3.763 m), Laguna Negra (4°11'N74°15'O 3.739 m) y la Lagunilla (4°11' N74°15'O 3.763 m).
Lago de Tota	2004-2006, 2009 y 2012	Registro de seis a ocho parejas.
Sierra Nevada del Cocuy	2006	Sector Valle de los Frailejones: Registro de tres parejas.
Páramo de Pisba	2010-2011	Observando grupos activos de tres a seis individuos (5°33' N72°40'O).
Páramo Siscunsi	2011-2012	2 parejas 5°35'N72°49'O

Fuente: Mauricio Patiño H

Como se mencionó, estos registros permitieron corroborar la presencia de la especie en los lugares visitados, optimizando datos de distribución, los cuales también sirvieron de aporte para la segunda edición del Libro Rojo de Aves de Colombia, actualmente en preparación.

Se recolectaron un total de 11 individuos, se depositaron en la colección del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia a los cuales se extrajo muestras de tejidos (Corazón, hígado y músculo pectoral) (Figura 5-11 a 5-14).

Figura 5-11. *C. a. apolinari*, laguna de Fúquene, Cundinamarca



Fuente: Patiño (2010)

Figura 5-12. *C. a. apolinari*, lago de Tota, Boyacá



Fuente: Patiño (2008)

Figura 5-13. *C. a. apolinari*, lago de Tota, Boyacá



Fuente: Patiño (2012)

Figura 5-14. *C. a. hernandezii*, Socha, Boyacá



Fuente: Patiño (2010)

5.5 Aspectos generales sobre la ecología de la especie

En los humedales visitados en Bogotá, Cundinamarca y Boyacá, se observaron individuos que se refugiaron entre parches de junco, principalmente (*Schoenoplectus californicus*) de alto porte (2 m); también se le observó cerca de enea o espadaña (*Typha* spp.). Este tipo de vegetación le sirve como sitio de

refugio, como soporte para la reproducción y al parecer facilita la búsqueda de alimento.

De otra parte, en los páramos visitados, se observaron individuos entre vegetación típica de estos ambientes tales como *Diplostephium revolutum*, *Chusquea tessellata*, *Hypericum* sp y *Espeletia* sp. De igual manera, así como los juncos, esta vegetación les sirve como sitio de refugio, percha, facilita el forrajeo y posibilita la reproducción.

Durante las visitas realizadas a los páramos de Sumapaz y de Pisba se observaron grupos de hasta siete individuos de *C. a. hernandezi*, mientras que en el Valle de los Frailejones (Nevado del Cocuy y Güican) no se detectaron grupos de más de cinco individuos. En lo que respecta a *C. a. apolinari*, se observaron grupos de cinco a seis individuos en el lago de Tota, mientras que para la laguna de Fúquene, por lo general se observó un grupo de ocho individuos vocalizando activamente.

En el humedal La Conejera, tan solo se hizo el registro de dos parejas en los últimos cinco años. Para el censo Neotropical de aves acuáticas realizado en el 2013 no se registró la especie para este humedal (Caguazango com.pers).

5.6 Reproducción

En el humedal La Conejera y como parte del apoyo dado a un estudio que se llevó a cabo en este humedal, se le hizo un seguimiento a un nido que fue registrado en julio de 2007; de otra parte, para enero de 2010 fue observado un individuo en etapa juvenil evidente por su plumaje inmaduro, en la laguna de Fúquene, lo cual indicó reproducción entre noviembre o diciembre del año anterior; en el mismo humedal, también se registraron actividades de cortejo en septiembre.

Del nido registrado en el humedal de La Conejera, se observó que éste era de forma ovalada y con una sola entrada lateral, el nido estaba ubicado sobre parches de junco *Scirpus californicus* (*Schoenoplectus californicus*). El nido estaba compuesto por material vegetal (*Schoenoplectus californicus*) principalmente y material animal con plumas aparentemente de la garza ganadera (*Ardeola ibis*) y pelo probablemente de ganado vacuno, lo que en conjunto fue utilizado como recubrimiento interno desde la entrada lateral hasta llegar a la cámara interna del nido.

Dicho nido estaba ubicado a una altura de 160 cm del suelo (fondo) y entre 65 a 70 cm del nivel del agua (Figura 5-15).

Figura 5-15. Nido de *C. apolinari apolinari*, humedal La Conejera, Bogotá, D. C.



Fuente: Cortesía Castro (2007)

En este nido, se registraron siete huevos, de los cuales tres pertenecían a *C. a. apolinari*, y los cuatro restantes a *M. bonariensis*, superando la proporción de huevos del hospedador, amenazando la supervivencia de huevos del mismo y su eficiencia reproductiva (Foto 5-16).

Figura 5-16. Huevos de *M. bonariensis* en nido de *C. apolinari apolinari*, humedal La Conejera



Fuente: Cortesía Castro (2007)

Al cabo de diez días, se registraron tres polluelos del parásito y los tres huevos originales de *C. apolinari* permanecían en el nido. Finalmente, las observaciones quedaron truncadas al hallar una colonia numerosa de garzas vaqueras o ganaderas (*Ardeola ibis*) perchando sobre los juncales de ubicación de este nido, por lo que aparentemente fue destruido por el peso de las aves, hallándose estropeado, abandonado y sin rastros de huevos ni polluelos (Figuras 5-17 a 5-19).

Figura 5-17. Polluelo de *M. bonariensis* en nido de *Cistothorus apolinari apolinari*



Fuente: Cortesía Castro (2007)

Figura 5-18. Nido estropeado de *Cistothorus apolinari apolinari*



Fuente: Cortesía Castro (2007)

Figura 5-19. Individuo de la garza del ganado *Ardeola ibis*, en los juncos en donde se ubicaba el nido en el humedal La Conejera

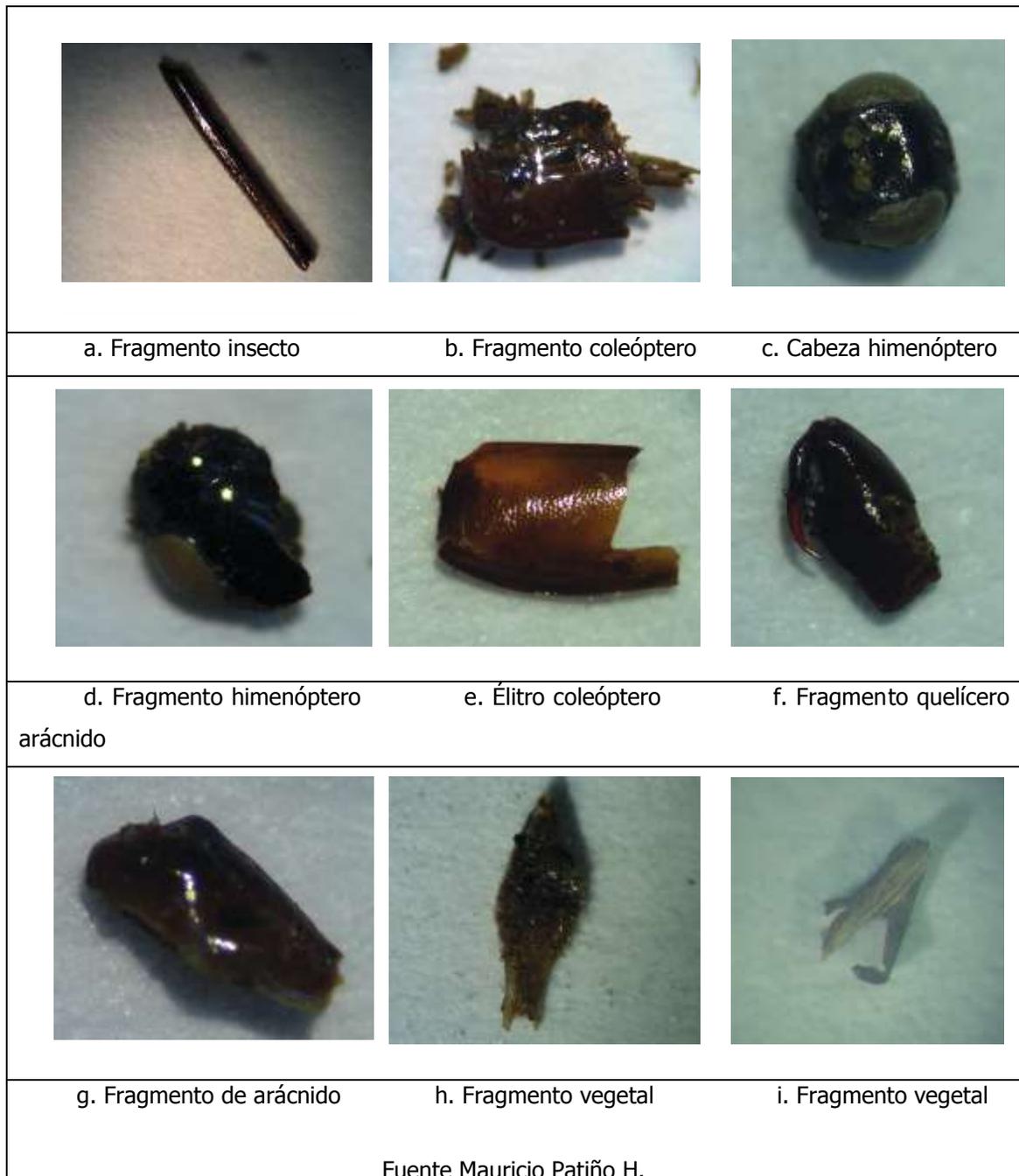


Fuente: Cortesía Castro (2007)

5.7 Alimentación

Durante el monitoreo realizado en la laguna de Fúquene, se observó que para alimentarse, los individuos se posaban entre los juncos (*S. californicus*) de 25 segundos a dos minutos, daban pequeños saltos y forrajeaban entre los tallos y en la base de este tipo de vegetación y en menor medida en las inflorescencias; de esta manera, los individuos capturan artrópodos tales como arácnidos e insectos. Así mismo, el análisis de tres muestras de contenido estomacal provenientes de la misma localidad permitió corroborar estas observaciones, hallando un 64% de insectos, 27% arácnidos y 8% de restos vegetales como partes de semillas que posiblemente los individuos engullen accidentalmente durante la captura e ingesta de los artrópodos (Figura 5-20 a-i).

Figura 5-20. Contenido estomacal de *Cistothorus apolinari apolinari* (Laguna de Fúquene), a-g. Fragmentos de artrópodos; h-i. Fragmentos vegetales.



Como puede observarse en la figura 5-20 a-g, el alto porcentaje de artrópodos hallados en los análisis de contenido estomacal, permite suponer que estos representan la fuente proteica para los individuos y constituyen la base de la alimentación de la especie. De otra parte, los fragmentos vegetales (Figura 5-20 h-i) fueron posiblemente ingeridos por accidente durante el forrajeo entre los juncales, ya que al forrajear los individuos rebuscan e introducen el pico entre hojas, ramas e inflorescencias en busca de artrópodos.

6. Discusión de Resultados

6.1 Extracción de ADN a partir de pieles y tejido fresco

Algunos taxidermistas consultados y los manuales de tratamiento de pieles (Hasluck, 1901; Wagstaffe y Fidler, 1968) refieren que en el tratamiento de las pieles se utiliza una amplia gama de compuestos químicos que se han utilizado en este procedimiento. Dentro de los conservantes se incluyen el trióxido de arsénico (As_2O_3 y As_4O_6), alumbre ($AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$), bórax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$), salitre (KNO_3), sal ($NaCl$) y agentes químicos tales como el cromo, aluminio o sales de circonio. A su vez, una amplia gama de sustancias para el lavado inicial, la limpieza de pieles y el secado posterior incluyen sustancias como dettol, fenol, jabón, aserrín, harina de maíz y magnesio que pueden afectar el proceso de extracción de ADN, inhibir la proteinasa K, degradar los tejidos y las moléculas de ADN e inhibir la PCR. (Hall *et al.*, 1997). No se tiene certeza de los métodos utilizados para conservar las pieles que se encuentran en las colecciones ornitológicas del museo del ICN de la Universidad Nacional de Colombia y del museo de historia natural de la Universidad de la Salle por lo cual resulta difícil determinar el compuesto o la interacción que inhiben los procedimientos y plantear una estrategia metodológica para recuperar los ácidos nucleicos.

La poca cantidad y calidad del ADN puede ser el resultado de una alta fragmentación generada por los agentes químicos lo que imposibilita la amplificación de los genes, que correspondían a tamaños relativamente grandes (559 pb para el ADN mt y 583 pb para el gen nuclear). Para fragmentos relativamente más pequeños como los

microsatelites ha funcionado la extracción utilizando el kit comercial Quiagen donde se modificó la incubación durante 20 horas a 56 °C para piel y plumas provenientes de museo (Woodruff *et al.*, 1997), para las muestras provenientes de museo objeto de nuestro estudio se probaron variaciones de tiempo de incubación de 12, 24, 36 y 48 horas sin obtener resultados favorables en la amplificación de fragmentos de cerca de 600 pb. Estos ensayos sugieren que la edad de la muestra, la técnica de conservación y el método de extracción influyen de manera importante en el éxito de la amplificación.

El método de extracción de ADN que alcanzó una mayor eficiencia para muestras de tejido (corazón, hígado y músculo pectoral) fue el de QIAGEN logrando una eficiencia alrededor del 100%. Esta alta eficiencia con el protocolo de QIAGEN se ha reportado previamente para extracciones a partir de sangre periférica (Woodruff *et al.*, 1997), Desloire *et al.*, 2006 reporta una eficiencia del 100% para extracciones a partir de ácaros para el mismo método. El método de fenol:cloroformo permitió extraer el ADN; sin embargo, en los ensayos se observó que hay una inhibición de la PCR y con el tratamiento con Chelex no se logró recuperar el ADN. Estos resultados ponen en evidencia que la conservación y el manejo de las muestras son claves para realizar los análisis moleculares, por lo cual se recomienda que en las colecciones biológicas se preserven tejidos que proporcionen una buena fuente para realizar extracciones de ADN, tales como corazón, hígado y músculo que en algunos casos se desechan, este tipo de colección brinda la posibilidad de obtener extracciones de ADN de buena calidad para lograr amplificaciones de fragmentos de 500 pb; la preservación de estos tejidos se viene realizando en la colección ornitológica del ICN.

El rendimiento de la extracción de ADN puede verse afectado por varios factores, como son el origen de la muestra, el tiempo y los métodos de conservación incidiendo negativamente en la capacidad de extraer, amplificar y secuenciar el ADN (Hall *et al.*, 1997 y Tang, 2006)

6.2. Análisis moleculares y filogenéticos

Varias líneas de evidencia provenientes de datos de secuencias de dos genomas distintos (mitocondrial y nuclear) en muestras del cucarachero de humedales *C. a. apolinari* y el cucarachero de páramo *C. a. hernandezii* sugieren que se trata de la misma unidad taxonómica y no dos subespecies distintas. En primer lugar los niveles de variabilidad son muy bajos y similares tanto en comparaciones intra-subespecíficas como inter-subespecíficas. En ningún caso la comparación superó el 1%. En trabajos similares se han encontrado valores de divergencia mucho mayores entre subespecies como *Thryophilus rufalbus minlosi* y *Thryophilus rufalbus castanonotus* de 3,85%; *Thryophilus rufalbus cumanensis* y *Thryophilus rufalbus castanonotus* de 3%; *Thryophilus rufalbus cumanensis* y *Thryophilus rufalbus minlosi* de 2,6%. Además se reportaron valores de divergencia para *Thryophilus sernai* y subespecies de *Thryophilus rufalbus* de 6,3% mientras que la divergencia mínima fue de 2,7% con *Thryophilus rufalbus cumanensis* del norte de Colombia). La divergencia con *Thryophilus nicefori* y *Thryophilus rufalbus minlosi* fue de 3,8% y 3,6% respectivamente (Lara *et al.*, 2012). Así relativo a otros grupos, los niveles de variación no corresponden a aquellos encontrados para diferentes subespecies o especies e incluso para poblaciones distintas, en aves y otros vertebrados.

En segundo lugar todos los análisis de reconstrucción filogenética mediante MP, MV e IB agrupan consistentemente a todas las muestras de *Cistothorus* sp. en un único clado, y no en clusters distintos para cada subespecie. Teniendo en cuenta que se trata de tres métodos de reconstrucción que operan bajo supuestos muy diferentes, pero que buscan reconstruir una única historia evolutiva de los organismos, la evidencia es contundente en sugerir que el cucarachero de pantano y páramo es la misma unidad taxonómica. En tercer lugar, el forzar la monofilia recíproca de *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezi* no mostró árboles más cortos o más verosímiles que cuando todas las secuencias hacían parte de un único cluster. La red de haplotipos obtenida con secuencias del gen CYB tampoco mostró evidencia de entidades distintas para cada subespecie, por el contrario mostró alto número de haplotipos compartidos.

No fue posible obtener secuencias de *C. meridae*, pero es conocido que *C. apolinari* y *C. meridae* pueden tener su origen de invasiones separadas por parte de *Cistothorus platensis*, especie que en este trabajo aparece consistentemente como grupo hermano de *C. apolinari*. Las invasiones fueron sugeridas por primera vez por Vuilleumier y Simberloff (1980) para explicar la simpatría entre *C. meridae* y *C. platensis* y entre *C. apolinari* y *C. platensis*. Al igual que se reportan como subespecies distintas a *C. a. apolinari* y *C. a. hernandezi* por diferencias en morfología distribución y estructura social, también en la actualidad se reportan varias subespecies de *C. platensis* por sus diferencias morfológicas. Este trabajo sugiere que la divergencia de *C. apolinari* del ancestro común con *C. platensis* pudo haber ocurrido aproximadamente hace 5,95 MA, previo al levantamiento de la Cordillera de Los Andes.

Las poblaciones de *C. apolinari* de los humedales han sufrido una reducción tan drástica que prácticamente han desaparecido de humedales como Jaboque y Juan Amarillo. Adicionalmente se ha reportado que en humedales como Tibanica, Conejera y La Florida están en un riesgo muy alto de desaparecer por acción antrópica y por causa del parasitismo del Chamón *Molotrus bonairensis* cuyas poblaciones son más densas en los humedales urbanos que en los rurales, lo que puede estar afectando de manera seria a las escasas poblaciones remanentes del Cucarachero de Apolinar (Villaneda-Rey y Rosselli, 2011). *C. a. apolinari*, puede ser la especie más amenazada de los humedales bogotanos y será muy difícil que sus poblaciones se recuperen. La disminución de las poblaciones principalmente de los individuos presentes en los humedales (*C. a. apolinari*) puede estar provocando un efecto de cuello de botella.

A pesar de que las diferencias genéticas entre las subespecies no son evidentes es de gran importancia tratar de preservar las poblaciones presentes en los ecosistemas urbanos; ya que debido a su deterioro están altamente afectadas y podrían desaparecer en los próximos años, se debe tratar de realizar programas de conservación en humedales como Tibanica, la Conejera y la Florida que aún presentan poblaciones. Además de tratar de conservar hábitats donde existen poblaciones más grandes como la Laguna de Fúquene y el Lago de Tota.

Adicionalmente análisis de reconstrucción evolutiva basada en Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, encontraron fuerte evidencia que las poblaciones de páramo y humedades corresponden a la misma entidad taxonómica y no a subespecies distintas como ha sido sugerido por otros autores. Análisis que sugieren la existencia de subespecies distintas resultan en árboles mucho menos

parsimoniosos que aquellos que sugieren una misma subespecie. En todos los análisis buenos soportes basados en pseudoréplicas (bootstrap) para parsimonia y verosimilitud o probabilidades a posteriori para inferencia bayesiana, sugieren un único cluster y no dos como se esperaba para dos presuntas subespecies. Adicionalmente, los genes mitocondriales sugieren la posible relación evolutiva de esta subespecie con otras especies de *Cistothorus*: *Cistothorus platensis*.

Aunque el tamaño de la muestra sugiere limitaciones en las inferencias, particularmente en cuanto al estado de conservación de las poblaciones, es posible sugerir que los niveles de variabilidad extremadamente bajos podrían indicar poblaciones diezmadas y bajo fuertes efectos antrópicos y posibles cuellos de botella. La degradación de los ecosistemas asociados a los hábitats de esta especie han sido de gran efecto tanto en los páramos como en los humedales.

La utilización de material de museo en lugar de material fresco es una poderosa herramienta para este tipo de estudios, teniendo en cuenta que para muchas especies como el cucarachero, la disponibilidad de muestras en especies vulnerables es extremadamente difícil. Aunque la calidad del ADN por los métodos de preservación de las pieles puede resultar en ADN altamente digeridos, es posible amplificar porciones parciales que posteriormente son alineadas para establecer *contigs* únicos de genes.

6.3. Registros

Mediante visitas realizadas a los humedales La Conejera, Tibanica, La Florida y Gualí en Bogotá y La Sabana, se corroboró la presencia de la especie, así como en la laguna de Fúquene (Cundinamarca) y en el lago de Tota (Boyacá). En estas últimas localidades, se han hecho registros continuos mediante visitas constantes realizadas en los últimos ocho años; dentro de este estudio los registros recientes datan de 2009 a 2011; no se observó en el humedal Juan Amarillo, aunque en este humedal se hicieron registros auditivos de una pareja (Rosselli, 2011) y (Benítez-Castañeda obs.pers.). De igual manera, en este estudio no se hicieron registros en el humedal Jaboque entre 2010, 2011 y 2012; lo que coincide con reportes realizados por otros investigadores (Benítez- Castañeda, 2004; Zerda *et al.*, 2005; Lopez y Otalora, 2005) quienes la registraron entre 2004 a 2005; no obstante, al parecer no ha sido observada nuevamente en los últimos ocho años (Benítez-Castañeda, com. pers.).

Cabe destacar que *C. apolinari* se observó y su presencia fue evidenciada a través de detección por vocalizaciones en la laguna de La Herrera – Cundinamarca como lo ha mencionado también Benítez-Castañeda (com. pers), además para este estudio se tienen registros auditivos y visuales de una pareja en el Humedal de La Conejera (Rosselli, 2011). Humedal de Tibanica registro auditivo y visual de dos parejas (Rosselli, 2011) y (Benítez-Castañeda obs.pers.), humedal La Florida, registro visual y auditivo de una pareja (H. Benítez-Castañeda, V. Samaniego & J. Linero, obs. pers.) y humedal de Gualí, municipio de Funza (4°42'24"N 74°10'53"O) registros auditivos de por lo menos tres parejas (Rosselli, 2011).

Durante este estudio se confirmó el registro de *C. a. hernandezi* en inmediaciones de Pasca - Parque Sumapaz, laguna Los Colorados (4°22'N4°13'O 3.610 m), Laguna Larga (4°11'N74°15'O 3.763 m), Laguna Negra (4°11'N74°15'O 3.739 m) y la Lagunilla (4°11' N74°15'O 3.763 m) (Zuluaga-Bonilla obs.pers.). Fue registrada también para este estudio en el Parque Nacional Natural Pisba, El Cocuy (Valle de los Frailejones). Lo anterior, permitió corroborar registros hechos en El Cocuy y Sumapaz (Stiles y Caycedo, 2002; Briceño y Cortés, 2004) y posteriormente en 2009 (Cortés-Herrera com. pers.,) Por su parte, (Espinosa-Blanco *et al.*, 2009) registraron la subespecie en una localidad intermedia en el páramo de Siscunsi (Boyacá 5°35'N72°49'O) en el año 2005, En visita realizada al páramo de Siscunsi se corroboró su presencia.

En 2007, Hernández-Jaramillo registró dos grupos entre tres a cinco individuos en el páramo de Ocetá (Boyacá 5°33'N72°49'O) y en 2008 encontró 14 grupos conformados entre tres y nueve individuos en los cerros de Usme y Pasquilla (Cundinamarca 4°17'N74°13'O) (Hernández-Jaramillo, 2008). Zuluaga-Bonilla *et al.*, (2010) registró la especie en el Parque Nacional Natural Pisba (5°33' N72°40'O), observando grupos activos de tres a seis individuos. Entre estas localidades, solo se registró en el PNN Pisba dentro de este estudio, aunque no se descarta que la especie resida en las otras localidades mencionadas.

Mediante observaciones realizadas en 2006, en el sector conocido como el Valle de los Frailejones en El Cocuy (Güican) a 4000 m, se hizo el registro de al menos dos parejas que se ubicaban entre la vegetación y aunque el terreno es húmedo y con neblina, el cuerpo de agua más cercano era un pequeño arroyo que se encontraba

a una distancia de aproximadamente 100 metros, alrededor de terreno húmedo; lo anterior concuerda con las descripciones de Stiles & Caycedo (Stiles y Caycedo, 2002) quienes mencionaron que *C. a. hernandezi* a veces forrajea lejos de lagos y cuerpos de agua pero siempre asociado con terreno pantanoso o muy húmedo. (Morales- Rozo y De la Zerda, 2004) afirmaron que *C. a. hernandezi* se ubica en profundidades inferiores a las de *C. a. apolinari* (<1m); de acuerdo con esto, los individuos observados perchaban, forrajeaban y vocalizaban entre alturas de 80, 100 y 120 cm del suelo entre la vegetación circundante.

6.4 Ecología

6.4.1 Hábitat

Las dos subespecies difieren en cuanto a uso de hábitat; teniendo en cuenta que *C. a. apolinari* está asociado a humedales con parches densos de junco (*Schoenoplectus californicus*) de alto porte (± 2 m), (Morales- Rozo y De la Zerda, 2004) y junco de esteras (*Juncus effusus*) (Benítez- Castañeda, 2004) en aguas de ± 1 m de profundidad y también con presencia de enea (*Typha* spp.) en menor cantidad (Macana, 2007; Morales-Rozo *et al.*, 2007) y pequeños arbustos entre los que ocasionalmente percha, canta y busca alimento, principalmente insectos. El uso de los juncales en los humedales de Bogotá es evidente y al parecer vital para la supervivencia de la especie, de acuerdo con los registros de (Roselli, 2011), en éste tipo de hábitat. En las localidades visitadas durante este estudio, se corroboró el uso de junco, principalmente *S. californicus*.

Por su parte, *C. a. hernandezi* se encuentra en los páramos empantanados en donde se asocia con vegetación típica de esas elevaciones (*Diplostephium revolutum*, *Chusquea tessellata*, *Hypericum lycopodioides*, *H. laracifolium* y *Espeletia* spp.), con cobertura de *Sphagnum* en el suelo en donde forrajea (Borrero, 1953; Stiles y Caycedo, 2002; Morales-Rozo y De la Zerda, 2004; Espinosa-Blanco *et al.*, 2009; Zuluaga-Bonilla *et al.*, 2010). En este estudio, en los páramos de Sumapaz, Socha y en el PNN El Cocuy, se observó actividad entre asociaciones vegetales con predominio de *Diplostephium revolutum*, *Chusquea tessellata*, *Hypericum* sp y *Espeletia* sp.

6.4.2 Estructura social

La estructura social puede estar conformada por adultos de ambos sexos, y juveniles; en lo que respecta a *C. a. hernandezi*, se han contado grupos de cinco a diez individuos que pueden incluir un mayor número de hembras que de machos; mientras que en los humedales se han encontrado individuos de *C. a. apolinari* distribuidos en parejas o grupos de tres a seis individuos, siendo mayor el número de machos. Igualmente, se pueden encontrar individuos solitarios. (Morales-Rozo y De la Zerda, 2004; Stiles y Caycedo, 2002). Estos grupos incluyen machos, hembras y juveniles, son bastante estables y sedentarios y sus miembros cooperan en la alimentación de los pichones de la única pareja que pone huevos y la defensa de territorios (Stiles y Caycedo, 2002; Morales-Rozo y De la Zerda, 2004). Los integrantes de los grupos se mantienen en contacto con reclamos y cantos que son diferentes entre machos y hembras.

En el humedal La Florida se observó la presencia de al menos una pareja en los últimos tres años como lo ha mencionado Benítez-Castañeda (com. pers.). De igual manera, en el humedal La Conejera, se ha hecho registro de solo dos parejas en los últimos cinco años, lo cual coincide con las observaciones de Calero *et al.*, (2007) y Benítez-Castañeda (Com. pers.). Estas observaciones indican que el deterioro de los humedales incide en el número de individuos por grupo familiar afectando la estructura social, presentando un número menor de individuos al de otros humedales un poco menos intervenidos, afectando el recambio generacional y la distribución a otras áreas del mismo humedal que pudiera albergar a la especie. En contraste se observaron grupos de cinco a seis individuos en el lago de Tota, mientras que para la laguna de Fúquene, por lo general se observó un grupo de ocho individuos vocalizando activamente; Morales-Rozo mencionó grupos compuestos entre seis a diez individuos en la laguna de Fúquene. (Morales - Rozo, 2005)

Durante las visitas realizadas a los páramos de Sumapaz y de Pisba, se observaron grupos de hasta siete individuos de *C. a. hernandezi*, siendo este número de individuos, coincidente con lo mencionado por (Morales-Rozo y De la Zerda, 2004; Stiles y Caycedo, 2002), mientras que en el Valle de los Frailejones (Nevado del Cocuy y Guican) no se detectaron grupos de más de cinco individuos.

6.4.3 Reproducción

Se ha descrito que las poblaciones de *C. apolinari* en la Sabana de Bogotá y el valle de Ubaté anidan en marzo y a finales de agosto (ABO, 2000). En este estudio se observaron machos y hembras de esta especie abriendo las plumas de la cola y alas

en abanico en la laguna de Fúquene en agosto y septiembre, lo cual se consideró como el despliegue que hace parte del cortejo en la época reproductiva (Morales-Rozo y De la Zerda, 2004). El nido que fue encontrado y al que se le hizo un seguimiento en el humedal de La Conejera (Castro *et al.*, 2007), fue registrado en julio de 2007, es decir, fuera del periodo citado por los autores; de otra parte, para enero de 2010 fue observado un individuo en etapa juvenil evidente por su plumaje inmaduro, en la laguna de Fúquene, lo cual indicó reproducción entre noviembre o diciembre del año anterior; en el mismo humedal.

En lo que respecta a la estructura de los nidos, se tiene que el nido registrado en el humedal de La Conejera era de forma ovalada y con una sola entrada lateral, el nido estaba ubicado sobre *Scirpus californicus* (*Schoenoplectus californicus*) como lo describe Morales-Rozo, (2005). Dicho nido estaba ubicado a una altura de 160 cm del suelo (fondo) y entre 65 a 70 cm del nivel del agua (figura 5-15), encontrándose entre el rango documentado para otros humedales de la Sabana (Morales-Rozo, 2005). Un nido hallado por Benítez-Castañeda en el humedal Jaboque, estaba ubicado a menos de dos metros de la ronda y en una zona muy urbanizada, lo cual según el autor, lo hacía vulnerable ante depredadores y a ser fácilmente destruido; este nido estaba elaborado principalmente con trozos de hojas secas de otra especie de junco, conocido como el junco de esteras (*Juncus efusus*) Benítez- Castañeda, 2004).

En la laguna de Chisacá al sur de Bogotá, fueron observadas colonias de jóvenes en el mes de octubre (Morales-Rozo y De la Zerda, 2004; Caycedo, 2001).

Acerca de *C. a. hernandezise* se ha documentado que anida a cerca de 90cm del suelo en chuscales densos de 1-2 m de altura, cuyas especies dominantes son *Chusquea tessellata* y *Sphagnum* sp., cerca de lagunas. (Espinosa- Blanco *et al.*, 2009) hallaron 11 nidos en el páramo de Siscunsi, ubicados en lugares con vegetación densa de 1-2 m de altura, muy cerca de cuerpos de agua (aprox. 3m). Según los autores, los nidos estaban contruidos en su mayoría en el centro de arbustos de *Chusquea tessellata*, a una altura (promedio \pm desviación estándar) de 93.2 ± 29.1 cm. Los nidos estaban contruidos con material seco de *C. tessellata* y *Calamagrostis* spp. En la misma localidad, en diciembre de 2009 (Zuluaga-Bonilla *et al.* 2010) encontraron tres nidos situados en *C. tessellata*, a una altura de 165 cm, contruidos a una distancia promedio de 10 a 12m aproximadamente del cuerpo de agua. Los nidos eran de forma ovalada y contruidos con hojas secas de *C. tessellata* en el exterior y en su interior con tricomas de *Espeletia lopezii*; en este estudio no se hallaron nidos ni evidencia de reproducción en los páramos visitados.

Se ha documentado parasitismo por parte del chamón *Molothrus bonariensis* hacia *C. apolinari* en los humedales laguna de La Herrera (Naranjo, 1995), Jaboque Benítez- Castañeda, 2004; Lopez y Otalora, 2005) y La Conejera (Velásquez-Tibatá *et al.*, 2000; Caycedo y Renjifo, 2002; Castro *et al.*, 2007); cabe destacar que se hizo acompañamiento a este último registro de parasitismo en el humedal La Conejera en el año 2007, dentro de un estudio adelantado en esa localidad sobre el parasitismo nidial del chamón *M. Bonariensis* (Castro, 2011), evidenciándose que de un total de siete huevos, tres pertenecían a *C. apolinari*, y los cuatro restantes a *M. bonariensis*, superando la proporción de huevos del hospedador, amenazando la supervivencia de huevos del mismo y su eficiencia reproductiva tal como argumenta (Reboreda *et al.*, 2003) que afirmó que los hospedadores de menor tamaño corporal tiene una reducción del éxito reproductivo en un 81% mientras los de tamaño corporal similar o mayor están el rango de 30-55% de reducción.

El registro de tres polluelos del parásito y tres huevos originales de *C. apolinari* que permanecían en el nido luego de 10 días del periodo de incubación para este nido, se justifica con lo descrito por Briskie y Sealy, (1990) y Hauber, (2003) quienes afirmaron que los parásitos tienen periodos de incubación relativa que permiten que sus polluelos salgan del cascaron más temprano, lo cual posibilita el que los anfitriones u hospedadores dejen de empollar sus huevos; no obstante, las observaciones quedaron limitadas porque el nido fue estropeado aparentemente por una colonia de garzas del ganado (*Ardeola ibis*) que perchaba en el mismo sector. Posteriormente, no se obtuvieron nuevos registros de anidación en los ecosistemas acuáticos visitados.

6.4.4 Alimentación

Es breve la documentación existente acerca de la alimentación de *C. apolinari*, entre la que se destaca que los individuos se alimentan de arañas y pequeños insectos que capturan en el suelo y las cañas caídas del pantano, en este caso los (Varty *et al.*, 1986) también describieron consumo de macroinvertebrados acuáticos, entre ellos insectos como chironómidos, bracónidos, cilícidos, zigópteros y larvas de lepidópteros, además de arañas; según los autores, los odonatos son las presas predilectas de *C. a. apolinari*; no obstante (Morales-Rozo y De la Zerda, 2004) resaltan frente a este aspecto que los odonatos son insectos depredadores que dependen de otros insectos acuáticos y al considerar que en varios humedales contaminados de la Sabana las comunidades de macroinvertebrados acuáticos son muy pobres y en consecuencia la oferta de alimento para *C. a. apolinari*, sería muy pobre. Así, las autoras sugieren la utilidad e importancia de evaluar la relación entre la disponibilidad de alimento para *C. a. apolinari* en humedales con diferentes

grados de contaminación, ya que la disponibilidad de juncales sin oferta de alimento tampoco garantizaría la supervivencia de la subespecie. Morales-Rozo y De la Zerda, 2004).

Como se mencionó con los análisis de los contenidos estomacales se presentó un alto porcentaje de artrópodos lo que permite suponer que estos representan la fuente proteica para los individuos y constituyen la base de la alimentación de la especie.

88 VARIABILIDAD GENÉTICA EN DOS SUBESPECIES DE CUCARACHERO
Cistothorus apolinari apolinari y *Cistothorus apolinari hernandezi* (AVES:
TROGLODYTIDAE) MEDIANTE ADNmt.

7. Conclusiones y Recomendaciones

Este trabajo evaluó el estatus taxonómico de dos presuntas subespecies del cucarachero de páramo mediante el uso de secuencias de 2 genes mitocondriales y un gen nuclear. Ambos genomas con historias evolutivas distintas, proporcionarían datos para hacer inferencias en cuanto a la existencia de una o dos subespecies. La evidencia de los datos y análisis obtenidos permite concluir que:

1. Genes de ambos genomas presentan una muy baja variación genética. Aunque hay un limitante en número de muestras y este trabajo no incluyó un elemento poblacional, es posible sugerir que la baja variación encontrada puede deberse al efecto directo sobre poblaciones diezmadas, posibles efectos de cuellos de botella y en general el efecto antropogénico directo sobre estas poblaciones.

2. Tres métodos distintos de reconstrucción con supuestos evolutivos muy distintos como máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana indican la existencia de un único cluster para individuos de las dos presuntas subespecies y no dos separados como se esperaba (*C. a. apolinari* y *C. a. hernandezii*). Soportes basados en pseudoréplicas (*bootstrap*) y probabilidades a posteriori indican siempre un clado para individuos de las dos subespecies conocidas hoy.

3. Independientemente del estatus taxonómico evidenciado con datos moleculares y dada baja variabilidad genética encontrada, se deben realizar programas de conservación en humedales como Tibanica, La conejera y la Florida que aun presentan poblaciones de *Cistothorus apolinari apolinari*. Además de tratar de

conservar hábitats donde existen poblaciones más grandes como la Laguna de Fúquene y el Lago de Tota.

4. La utilización de material de museo en lugar de material fresco es una poderosa herramienta para este tipo de estudios, teniendo en cuenta que para muchas especies como el cucarachero, la disponibilidad de muestras en especies vulnerables es extremadamente difícil. Aunque la calidad del ADN por los métodos de preservación de las pieles puede resultar en ADN altamente digeridos, es posible amplificar porciones parciales que posteriormente son alineadas para establecer *contigs* únicos de genes.

5. Se realizaron algunas observaciones generales sobre la historia natural del cucarachero y se evidenció que el cucarachero de pantano *Cistothorus apolinari apolinari* está siendo parasitado por el chamon *Molurus bonaerensis*, lo que afecta las poblaciones de esta ave, sumado a factores como pérdida de hábitat y contaminación de los humedales.

8. Bibliografía

ABO. Aves de la Sabana de Bogotá, Asociación Bogotana de Ornitología y Corporación Autónoma regional de Cundinamarca. 2000.

AVISE JC. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philos Trans R Soc London [Biol]*. 1986; 312: 325–342.

AVISE JC. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends Ecol evolut*. 1989; 4(9): 279–281.

AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA, SAUNDERS NC. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst*. 1987; 18: 489–522.

AVISE JC AND BALL RM. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. En: FUTUYMA D, ANTONOVICS J (Eds). *Oxford Surveys in evolutionary biology*. Oxford University. 1990; 7: 45-67.

AVISE JC, NEIGEL WS AND ARNOLD J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *J Mol Evol*. 1984; 20: 99–105.

AVISE JC, NELSON WS. Molecular genetic relationships of the extinct dusky seaside sparrow. *Science*; 1989; 243: 646-648.

BAKER MC. A muscle biopsy procedure for use in electrophoretic studies of birds. *Auk*. 1981; 98: 392–393.

BAKER, A. J., AND MARSHALL, H. D. Mitochondrial control-region sequences as tools for understanding the evolution of avian taxa. *In* "Avian Molecular Systematics and Evolution" (D. P. Mindell, Ed.). Academic Press, New York. 1997; 49–80.

BARKER, F.K., A. CIBOIS, P. SCHIKLER, J. FEINSTEIN, AND J. CRACRAFT, Phylogeny and diversification of the largest avian radiation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, 101(30):11040-11045.

BARKER, F.K. Monophyly and relationships of wrens (Aves: Troglodytidae): a congruence analysis of heterogeneous mitochondrial and nuclear DNA sequence data. *Mol Phylogenet and Evol*, 2004. 31(2): 486–504.

BENÍTEZ-CASTAÑEDA HD. Composición de especies de fauna presente en el humedal "El Jaboque" de Engativá. Aves. En: ADESSA. Plan de manejo integral y comunitario para la recuperación y protección del Humedal El Jaboque ubicado en la localidad de Engativá. Informe final. Fondo para la acción ambiental. ECOFONDO. 2004; 38–63.

BIRDLIFE INTERNATIONAL [Internet]. Species factsheet: *Cistothorus apolinari*. Consultado el 28 de octubre de 2013. Disponible en URL: <http://www.birdlife.org/datazone/sowbsearchresults.php?a=nsySearchTerms=Cistothorus+apolinari>.

BORRERO, JI. Estatus actual de *Zenaida auriculata* y *Leptotila plumbeiceps* en el departamento de Caldas y *Cistothorus apolinari* en la región de Bogotá. Lozanía (Acta Zool. Colomb.). 1953; 6: 1-6.

BREWER D, MCMINN S, MACKAY BK. Wrens, Dippers, and Thrashers: A Guide to the wrens, Dippers, and Thrashers of the World: Christopher Helm. 2001.

BRICEÑO E Y CORTES O. Evaluación del estado actual del cucarachero de apolinar *Cistothorus apolinari* en el Parque Nacional Natural El Cocuy [tesis de pregrado]. Bogotá: Facultad de ciencias y educación. Proyecto de licenciatura en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2004.

BRISKIE JV, SEALY S. Evolution of short incubation periods in the parasitic cowbirds, *Molothrus* spp., Auk. 1990; 107:789-794.

CALERO P, CAMPOS E Y BENÍTEZ-CASTAÑEDA HD. Evaluación del uso de hábitat de la avifauna endémica amenazada en zonas restauradas del humedal La Conejera. Restauración ecológica, Humedal La Conejera Bogotá. 2007; 13-21.

CASTRO JA., BENÍTEZ-CASTAÑEDA HD, MORALES JE. Y CAMPOS E. Primer registro parasitismo de cría por parte del "chamón" (*Molothrus bonariensis*) al cucarachero de pantano (*Cistothorus apolinari*; familia Troglodytidae), en el humedal La Conejera, Bogotá. Restauración ecológica, Humedal La Conejera. 2007; 30-33.

CASTRO JA. Registro de las actividades parásitas del Chamón *Molothrus bonariensis* y su influencia en los nidos de la monjita *Chrysomus icterocephalus bogotensis* (AVES:ICTERIDAE) en el Humedal La Conejera [tesis de pregrado]. Bogotá: Departamento de Licenciatura en Biología. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2011.

CAYCEDO P. Estudio comparativo de canto entre las poblaciones del Soterrey de Apolinar (*Cistothorus apolinari*, Troglodytidae) en la Cordillera Oriental de los Andes Colombianos [tesis pregrado]. Facultad de Ciencias. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2001.

CAYCEDO P. Y RENJIFO LM. *Cistothorus apolinari*. En: RENJIFO LM, FRANCO-MAYA AM, AMAYA-ESPINEL JD, KATTAN GH y B. LÓPEZ-LANÚS B. Libro rojo de aves de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá,

Colombia. Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente.; 2002: 379-382

CHAPMAN FM. The distribution of the bird-life in Colombia. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 1917., 36

CHUNG, DW, HARRIS, JE. y DAVIE, EW. Nucleotide sequences of the three genes coding for human fibrinogen. Adv Exp Med Biol. 1990; 281:39–48.

CLEMENT M, POSADA y CRANDALL KA. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. Molecular Ecology 9 (10): 1657-1660.

COLLAR NJ, GONZAGA LP, KRABBE N, MADROÑO A, NARANJO LG, PARKER TE *et al.* Threatened Birds of the Americas: The UICN/ICBP Red Data Book. Cambridge OK. The Internacional Council for Bird Preservation.; 1992.

DESJARDINS P. AND MORAIS R. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. J Mol Bio. 1990;212: 599–634.

DESLOIRE S, VALIENTEC, CHAUVE C, ZENNERL. Comparison of four methods of extracting DNA from D. Gallinae (Acari:Dermamyssidae). Vet. Res. 2006; 37,725-732.

DRUMMOND, AJ. and A. RAMBAUT. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology. 2007; 7: 214.

ELLEN M, BERNIE M. Feather pulp: a non-destructive sampling technique for studies of birds. Auk, 1984; 101: 173–176.

ESPINOSA-BLANCO AS, SALAMANCA JR y RODRÍGUEZ-A P. Una nueva localidad para el cucarachero de Pantano (*Cistothorus apolinari*: Troglodytidae) en Sogamoso, Boyacá. Ornitología Colombiana. 2009; 8:78–82.

FARRIS JS, KALLERSJO M, KLUGE AG y BULT C. Testing significance of incongruence. Cladistics. 1995; 10: 315–319. revisar citacion

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 1985; 39:783-791.

FELSENSTEIN J. Inferring Phylogenies. Sinauer Assoc. J Classification. 2004; 1(22):139-142.

HALL LM, WILLCOX MS, JONES DS. Association of enzyme inhibition with methods of museum skin preparation. Bio Techniques, 1997; 22(5),928–934.

HÄRLID A y ARNASON U. Analyses of mitochondrial DNA nest ratite birds within the Neognathae : supporting a neotenus origin of ratite morphological characters. Proc. R. Soc. Lond. 1999; (266):305-309.

HASLUCK PN. Taxidermy : comprising the skinning, stuffing, and mounting of birds, mammals, and fish / edited by Paul N. Hasluck.London. 1901.

HAUBER. Hatching asynchrony nestling competition and the cost of interspecific brood parasitism. Behav Ecol. 2003; 14: 227-225.

HEDGES SB, DUDLEY J, KUMAR S. TimeTree: a public knowledge-base of divergence times among organisms. *Bioinformatics*. 2006; 22: 2971-2

HELM-BYCHOWSKI K, CRACRAFT J. Recovering phylogenetic signal from DNA sequences: relationships within the corvini assemblage (Class Aves) as inferred from complete sequences of the mitochondrial DNA cytochrome-b gene. Mol. Biol. Evol. 1993;(10),1196-1214.

HERNÁNDEZ-JARAMILLO. Caracterización de la estructura y composición del ensamblaje de aves en los diferentes tipos de coberturas vegetales de la microcuenca de las quebradas Hoya Onda y La Leona. Convenio de Cooperación No. 053-2007 de la localidad de Usme-SDA. 2008.

HERNÁNDEZ J, HURTADO A, ORTIZ R y WALSCHBURGER TH. Vulnerabilidad y estrategias para la conservación de algunos biomas de Colombia. En: Halffter G, editor. La Diversidad Biológica De Iberoamérica I. México: Instituto de Ecología Xalapa; 1992; 191-202.

HIGUCHI R, BOWMAN B, FREIBERGER M, RYDER OA, WILSON AC. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*. 1984; 312: 282–284.

HILTY SL AND BROWN WL. *Aves de Colombia*. 2 Ed. Bogotá. 1986.

HOFSTEDE R. Los páramos en el mundo: su diversidad y sus habitantes. En: HOFSTEDE R, MENA P, SEGARRA P. (Eds.). *Los páramos del mundo*. Proyecto Atlas Mundial de los Páramos. Global Peatland Initiative/NC-IUCN/EcoCiencia. Quito. 2003; 27-28.

HUELSENBECK JP AND F RONQUIST. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001; 17: 754-755.

JETZ W, THOMAS GH, JOY JB, HARTMANN K AND MOOERS AO. The global diversity of birds in space and time. *Nature*. 2012; 491: 444–448.

KROODSMA DE, DA SILVA ML, GOODWIN E, SÁNCHEZ J, STEMPLER DW, VIELLIARD JME. . Sedentary life style of neotropical Sedge Wrens promotes song imitation. *Anim Behav*. 1999; 57(4),855-863.

KROODSMA DF AND BREWER D. Family Troglodytidae (wrens). En: DEL HOYO J, ELLIOTT A AND CHRISTIE DA (Eds). *Handbook of the Birds of the World: Cuckoos to Thrushes*. Lynx Edicions, SPAIN. Barcelona. 2005; vol (10).

LARA CE, CUERVO AM, VALDERRAMA SV, CALDERON D, CADENA CD. A new species of wren (Troglodytidae: *Thryophilus*) from the dry Cauca River Canyon, northwestern Colombia. *The Auk*. 2012;129(3),537–550.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, CHENNA R, MCGETTIGAN PA, MCWILLIAM H, VALENTIN F, WALLACE IM, WILM A, LOPEZ R, THOMPSON JD, GIBSON TJ AND DG HIGGINS. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23: 2947-2948.

LOPEZ HF Y OTALORA A. Evaluación de las amenazas para la fauna silvestre vertebrada presente en el humedal Jaboque y desarrollo de propuestas para su mitigación. EN: RANGEL-CH JO, (Director) y PARRA LN. (Coor. Científico). *Investigación aplicada en restauración ecológica en el Humedal del Jaboque. Convenio de cooperación científica y técnica entre la Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá y la Universidad Nacional de Colombia. Informe Final. Empresa de Acueducto y Alcantarillado*. 2005; 387–427.

MACANA D. C. Composición, estado y perspectivas de conservación de la avifauna acuática del lago de Tota, Boyacá, Colombia [tesis de pregrado]. Tunja: Facultad de Ciencias. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 2007.

MADDISON D. AND MADISON W. MacClade 4,08. Analysis of Phylogeny and Character Evolution (Version 4.08). Sinauer Associates, Inc. Publishers. 2005.

MANIATIS T, FRITSCH EF AND SAMBROOK J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, USA. New York.1982.

MENGDEN GA, STOCK AD. A preliminary report on the application of current cytological techniques to sexing birds. International Zoo Yearbook, 1976; 16:1748

MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL. RESOLUCIÓN NÚMERO (383) 23 de febrero de 2010 "Por la cual se declaran las especies silvestres que se encuentran amenazadas en el territorio nacional y se toman otras determinaciones". Colombia, 2010.

MONTAÑEZ G, ARCILA O, PACHECHO JC, HERNÁNDEZ Y, GRACIA J y H. LANCHEROS H. ¿Hacia dónde va la Sabana de Bogotá?: Modernización, conflicto, ambiente y sociedad. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, SENA.1992

MORALES-ROZO A. Notas sobre los sitios de anidación del Cucarachero de Pantano *Cistothorus apolinari*. Boletín SAO. 2005; 15: 61-68.

MORALES-ROZO A. Y DE LA ZERDA S. Caracterización y uso del hábitat del Cucarachero de Pantano *Cistothorus apolinari* (Troglodytidae) en humedales de la Cordillera Oriental de Colombia. Ornitología Colombiana. 2004; 2:4-18.

MORALES ROZO A, ANDRADE G Y ROSAS ML. Aves acuáticas en las lagunas de Fúquene, Cucunubá y Palacio. Inventario, estado actual e importancia para la conservación. En: FRANCO L. Y ANDRADE G. (Eds.). Fúquene, Cucunubá y Palacio. Conservación de la biodiversidad y manejo sostenible en un ecosistema lagunar Andino. Fundación Humedales e Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia. 2007; 169-362.

NARANJO LG. Patrones de reproducción en dos poblaciones aisladas de *Agelaius icterocephalus* (Aves Icteridae). Caldasia. 1995; 18(86): 89–100.

POSADA D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. 2008; 25: 1253-1256.

RALPH JC, GEUPEL GR, PYLE P, MARTIN TE, DESANTE DF, BORJA M. Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR- 159. Albany,CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture. 1993.

REBOREDA JC, MEMOZ ME, MASSON V, ASTIE A, RABUFFETTI F. Impacto del parasitismo del tordo renegrado (*Molothrus bonariensis*) sobre el éxito reproductivo de sus hospedadores. Universidad de Buenos Aires. Hornero: 2003; 18(2): 77-88.

REMSEN JV, CADENA CD, JARAMILLO A, NORES M, PACHECO JF, PÉREZ-EMÁN J, ROBBINS MB, STILES FG, STOTZ DF, AND KJ ZIMMER. [Internet]. Version [date]. A classification of the bird species of South América. American Ornithologists' Union. Consultado 28 de octubre de 2013. <http://www.museum.lsu.edu/~Remsen/SACCBaseline.html>.

RENJIFO, LM. Los humedales de la Sabana de Bogotá. Ambiente Capital. 1992;1 (1): 3-8.

RENJIFO LM, FRANCO-MAYA AM, AMAYA-ESPINEL JD, KATTAN GH y B. LÓPEZ-LANÚS B. Libro rojo de aves de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente.; 2002.

RODRÍGUEZ-MAHECHA, J.V. Síntesis del estado actual de los humedales de Bogotá. Recuperación de los humedales de la Sabana de Bogotá. Alternativa hacia su viabilidad ecológica y social. Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá (EAAB) y Conservación Internacional Colombia (CI). Bogotá. 2000.

ROSSELLI L. Factores ambientales relacionados con la presencia y abundancia de algunas especies de aves de los humedales de la Sabana de Bogotá [tesis doctoral]. Bogotá: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 2011.

SANDERSON MJ. r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a molecular clock. *Bioinformatics*. 2003; 19:301–302.

SEAN P, METZGER D Y HIGUCHI R. Ckelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 1991; 10(4): 506-513.

SHIELDS GF AND WILSON AC. Calibration of mitochondrial DNA evolution in geese. *J Mol Evol*, 1987; 24:212–217.

STATTERSFIELD AJ, CROSBY MJ, LONG AJ y WEGE DC. Endemic bird áreas of the world. Priorities for biodiversity conservation. Bird Life Conservation Series No. 7: Cambridge UK: BirdLife International.; 1998

STILES FG. Aves endémicas de Colombia. En: Chavés ME, Arango N, editores. Informe Nacional sobre el estado de la Biodiversidad en Colombia (Vol I). Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, PNUMA, Ministerio de Medio Ambiente; 1998. p. 378-385, 428-432.

STILES FG, CAYCEDO P. A new subspecies of apolinar's wren (*Cistothorus apolinari*, Aves: Troglodytidae), an endangered colombian endemic. *Caldasia*. 2002; 24(1):191-199.

SWOFFORD DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). [Programa de ordenador]. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2002.

TAMURA K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 1993; 10:512-526.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular. Mol Biol Evol*. 2011; 28: 2731-2739.

TANG, EPY. [Internet]. Path to Effective Recovering of DNA from Formalin-Fixed Biological Samples in Natural History Collections. In Summary The National Academies Press. 2006. Consultado 2011. Disponible en <http://www.nap.edu/catalog/11712.html>.

VAN DER HAMMEN, T. Los humedales de la Sabana: origen, evolución, degradación y restauración. Pp. 19-51 en GUARNIZO A, Y CALVACHI B. (Coord.). Los humedales de Bogotá y la Sabana. Acueducto de Bogotá, Conservación Internacional Colombia. Bogotá. 2003; Vol. 1.

VAN DER HAMEN T. La sabana de Bogotá y su lago en el pleniglacial medio. *Caldasia*. 1986; XV (1):71-75

VARTY N.J, ESPIN P AND HAMBLER C. An ornithological survey of Lake Tota, Colombia, Study report No. 12. ICBP, Cambridge. UK. 1986.

VELÁSQUEZ-TIBATÁ JI, GUTIÉRREZ A. Y CARRILLO E. Primer registro de parasitismo reproductivo en el Cucarachero de Pantano *Cistothorus apolinari* por el Chamón Maicero *Molothrus bonariensis*. *Cotinga*. 2000; 14:102-103.

VILLANEDA-REY M y ROSSELLI L. Abundancia del Chamón Parásito (*Molothrus bonariensis*, *Icteridae*) en 19 humedales de la Sabana de Bogotá, *Ornitología Colombiana*. 2011; 11: 37-48.

VUILLEUMIER F AND D SIMBERLOFF. Ecology versus history as determinants of patchy and insular distributions in high Andean birds. EN: HECHT M, STEERE WC,

WALLACE B, eds., *Evolutionary Biology*. New York. 1980; (12), 235-379.

WAGSTAFFE R AND FIDLER J. The preservation of Natural history Specimens. Vol II, London.1968.

WAYNE RK, BRUFORD MW, GIRMAN D, REBHOLZ ER, SUNNUCKS P, TAYLOR AC. Molecular genetics of endangered species. En: OLNEY PJS, MACE GM, FEISTNER ATC (Eds). Creative Conservation: Interactive management of wild and captive animals Chapman and Hall, ed., London. 1994. 92-117.

WOODRUFF, DS, UNITT P Y MUNDY NI. Skin From Feet of Museum Specimens as a Non-destructive Source of DNA for Avian Genotyping. Auk. 1997,(114), 126–129.

ZERDA E, Del VALLE-USECHE CM, HERNÁNDEZ V, RUEDA LE. Uso de hábitat de la avifauna del humedal Jaboque. EN: RANGEL-CH JO., (Director), Parra LN. (Coor. Científico). Investigación aplicada en restauración ecológica en el humedal de Jaboque. Convenio de cooperación científica y técnica entre la Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá y la Universidad Nacional de Colombia. Informe Final. Empresa de Acueducto y Alcantarillado. 2005; 476–511.

ZUCCON D, CIBOIS A, PASQUET E Y ERICSON PG. Nuclear and mitochondrial sequence data reveal the major lineages of starlings, mynas and related taxa. Mol Phylogenet Evol. 2006; Nov; 41(2):333-44.

ZWICKL D J. Genetic Algorithm Approaches for the Phylogenetic Analysis of Large Biological Sequence Datasets under the Maximum Likelihood Criterion. PhD thesis, Univ. Texas Austin. 2006.

ZULUAGA-BONILLA J, ESCANDÓN D, GIL J Y ROSERO LASPRILLA L. Caracterización de hábitat y estructura poblacional de *Cistothorus apolinari* (Aves: Troglodytidae) en el páramo de Siscunsi y el Parque Nacional Natural de Pisba. Informe Final Convocatoria 022 Apoyo con Capital Semilla 2009 a proyectos de investigación-D.I.N. UPTC. Grupo de Investigación Biología para la Conservación Uptc. Tunja. 2010.