

EVALUACIÓN DEL ESTADO TAXONÓMICO DEL PINCHAFLOR NEGRO
Diglossa humeralis (AVES: THRAUPIDAE) EMPLEANDO INFORMACIÓN
ACÚSTICA, GENÉTICA Y MORFOLÓGICA

LUISA M. GONZÁLEZ-GARZÓN

Asesora

Catalina González-Quevedo PhD

Co-asesores:

Juan Luis Parra PhD

Héctor Fabio Rivera-Gutierrez PhD

Trabajo de grado para optar al título de
BIÓLOGA



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

1803

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Instituto de Biología

El Carmen de Viboral

2020

RESUMEN

El pinchaflor negro (*Diglossa humeralis*) es una especie de ave de la familia Thraupidae y tiene tres subespecies reconocidas: *D. h. nocticolor* que se distribuye al norte de Colombia en la Sierra Nevada de Santa Marta y en límites con Venezuela en la Serranía de Perijá, *D. h. humeralis* que se distribuye en la cordillera oriental de Colombia y suroccidente de Venezuela, y *D. h. aterrima* que se distribuye en la cordillera central y occidental de Colombia hasta Ecuador y el norte de Perú. *D. humeralis* hace parte del complejo de especies *D. carbonaria*, en el que también están incluidas *D. brunneiventris*, *D. gloriosa* y *D. carbonaria*. Teniendo en cuenta la polifilia encontrada entre las subespecies de *D. humeralis* en un estudio anterior y la ausencia de estudios taxonómicos específicos en *D. humeralis* integrando diferentes líneas de evidencia, el presente estudio busca proporcionar información sobre el estado taxonómico de las tres subespecies de *D. humeralis* bajo un enfoque de taxonomía integrativa, incluyendo datos morfológicos, genéticos y acústicos, y comprender las relaciones filogenéticas de *D. humeralis* dentro del complejo *D. carbonaria*. Los resultados filogenéticos encontrados aquí, mostraron que las subespecies de *Diglossa humeralis* no forman un grupo monofilético. De modo que *D. h. humeralis* y *D. h. aterrima* parecen estar más relacionadas con diferentes subespecies de *D. brunneiventris*. Por su parte, *D. h. nocticolor* formó un clado independiente altamente soportado en todas las topologías. Sin embargo, se encontró una baja diferenciación genética entre los taxones del complejo *D. carbonaria*, concordante con una radiación reciente con clasificación incompleta de los linajes como se ha propuesto en otros estudios. El análisis morfológico indicó diferenciación entre las subespecies de *D. humeralis* para todos los parámetros morfológicos analizados, mientras que para el análisis acústico no se encontró diferenciación para ninguna de las variables acústicas empleadas. Finalmente, se hace necesaria la inclusión de más datos tanto de las subespecies de *D. humeralis* como de los demás taxones del complejo *D. carbonaria*, lo que permitirá resolver con mayor claridad las relaciones filogenéticas entre los taxones del complejo *D. carbonaria* y determinar los límites de especie.

PALABRAS CLAVE: Cordillera de los Andes, *Diglossa humeralis*, especiación, filogeografía, taxonomía integrativa.

INTRODUCCIÓN

La identificación y delimitación de especies es crítica no sólo para la taxonomía sino también para comprender los procesos que conducen a la diversificación, para definir estrategias de conservación y en un intento por documentar la biodiversidad antes de su extinción (Costello *et al.* 2013). Sin embargo, la práctica taxonómica tradicional basada en la diagnosis morfológica trae consigo varias limitaciones, como identificaciones erróneas debido a la plasticidad fenotípica en los rasgos utilizados para el reconocimiento de las unidades taxonómicas o la subestimación en el número de taxones debido a la existencia de especies crípticas (Hebert *et al.* 2003), las cuales se definen como dos o más especies erróneamente clasificadas como una única entidad debido a su similitud morfológica (Duellman & Trueb 1988). Además, resulta un desafío taxonómico establecer los límites de especies en aquellas que están estrechamente relacionadas y cuya diagnosis sólo es posible mediante unos pocos caracteres con diferencias sutiles y complejas de describir (Meier 2008). En este sentido, se ha propuesto un enfoque de taxonomía integrativa en la cual se integran diferentes líneas de evidencia para delimitar, descubrir e identificar especies y taxones naturales en todos los niveles (Will *et al.* 2005, Padial *et al.* 2010), siendo este el enfoque más eficiente y teóricamente fundado para definir hipótesis robustas de delimitación de especies (de Queiroz 2007). Esta aproximación ha resultado en un mejor inventario de biodiversidad, al esclarecer relaciones taxonómicas complejas aumentando y disminuyendo el número de especies (Schlick-Steiner *et al.* 2010) y cuyos aumentos se han debido especialmente al descubrimiento de especies crípticas (Padial 2009, Krabbe *et al.* 2020).

Algunos autores sugieren elegir siempre la morfología para obtener información fenotípica dada la necesidad de valorarla como un elemento de discriminación en cualquier caso (Schlick-Steiner *et al.* 2010). Sin embargo, las vocalizaciones también han sido ampliamente utilizadas para evaluar el estado taxonómico de especies alopátricas y en análisis filogenéticos, lo que ha permitido el descubrimiento de nuevas especies (Alström *et al.* 2003). Esto se debe a que dichas señales acústicas tienen un papel importante en el reconocimiento entre individuos y pueden indicar estrechas relaciones evolutivas entre especies, consistente con su alta carga de señal filogenética (Wells 2007). Hay muchos casos de taxones alopátricos que han sido recategorizados desde el rango de subespecies a especies, entre otras cosas, por las diferencias en sus vocalizaciones (Krabbe & Cadena 2010, Cooper & Cuervo 2017). En este sentido, los caracteres acústicos constituyen una fuente importante de

información fenotípica que también puede ser empleada para el análisis filogenético dentro de un marco de taxonomía integrativa.

Por otro lado, los datos genéticos están desempeñando un papel cada vez más importante en la delimitación de las especies (Edwards *et al.* 2005), ya que han permitido en muchos casos la identificación y delimitación de especies crípticas mediante el uso de secuencias de ADN (Cooke *et al.* 2012, Giarla *et al.* 2014). Sin embargo, bajo este enfoque integrativo se recomienda el uso tanto de datos fenotípicos (*e.g.* morfología y vocalizaciones) como de datos genéticos, y a menudo, la congruencia entre estos (Dayrat 2005, Meier 2008).

Las montañas andinas están entre las regiones tropicales de tierras altas biológicamente más complejas (Graves 1982). La especiación en estas áreas se explica a menudo por el surgimiento de múltiples barreras de aislamiento y amplios gradientes de elevación, así como el aislamiento temporal por glaciaciones pleistocénicas, donde las presiones selectivas varían en periodos cortos de tiempo (Vuilleumier 1969). Estos procesos han dado lugar a una gran diversidad biótica que se puede reflejar incluso dentro de especies con variación poblacional por aislamiento geográfico, como sucede para muchas especies neotropicales ampliamente distribuidas (Harvey & Brumfield 2015, Cerqueira *et al.* 2016). En estos casos la descripción de subespecies ha servido como una forma de presentar dicha variación geográfica, haciendo referencia a las poblaciones taxonómicamente distintas y geográficamente separadas que pertenecen a la misma especie y que, por lo tanto, se cruzan libremente en las zonas de contacto (Mayr 1942, Wilson & Brown 1953).

El pinchaflor negro (*Diglossa humeralis*) (Fraser 1840) es una especie de ave de la familia Thraupidae (Orden Passeriformes), que habita en bosques altoandinos y páramos en los Andes de Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (ver IUCN 2020) (Fig. 1). Se encuentra desde los 1450 hasta los 3600 m s. n. m., aunque se ha reportado hasta los 4000 m s. n. m. en el Nevado del Ruíz (Hilty & Brown, 1986). *D. humeralis* tiene tres subespecies reconocidas (Hilty & Brown 1986), *D. h. nocticolor* (Bangs 1898) que se distribuye al norte de Colombia en la Sierra Nevada de Santa Marta y en límites con Venezuela en la Serranía de Perijá, *D. h. humeralis* (Fraser 1840) que se distribuye en la cordillera oriental de Colombia y suroccidente de Venezuela, y *D. h. aterrima* (Lafresnaye, 1846) que se distribuye en la cordillera central y occidental de Colombia hasta Ecuador y el norte de Perú.

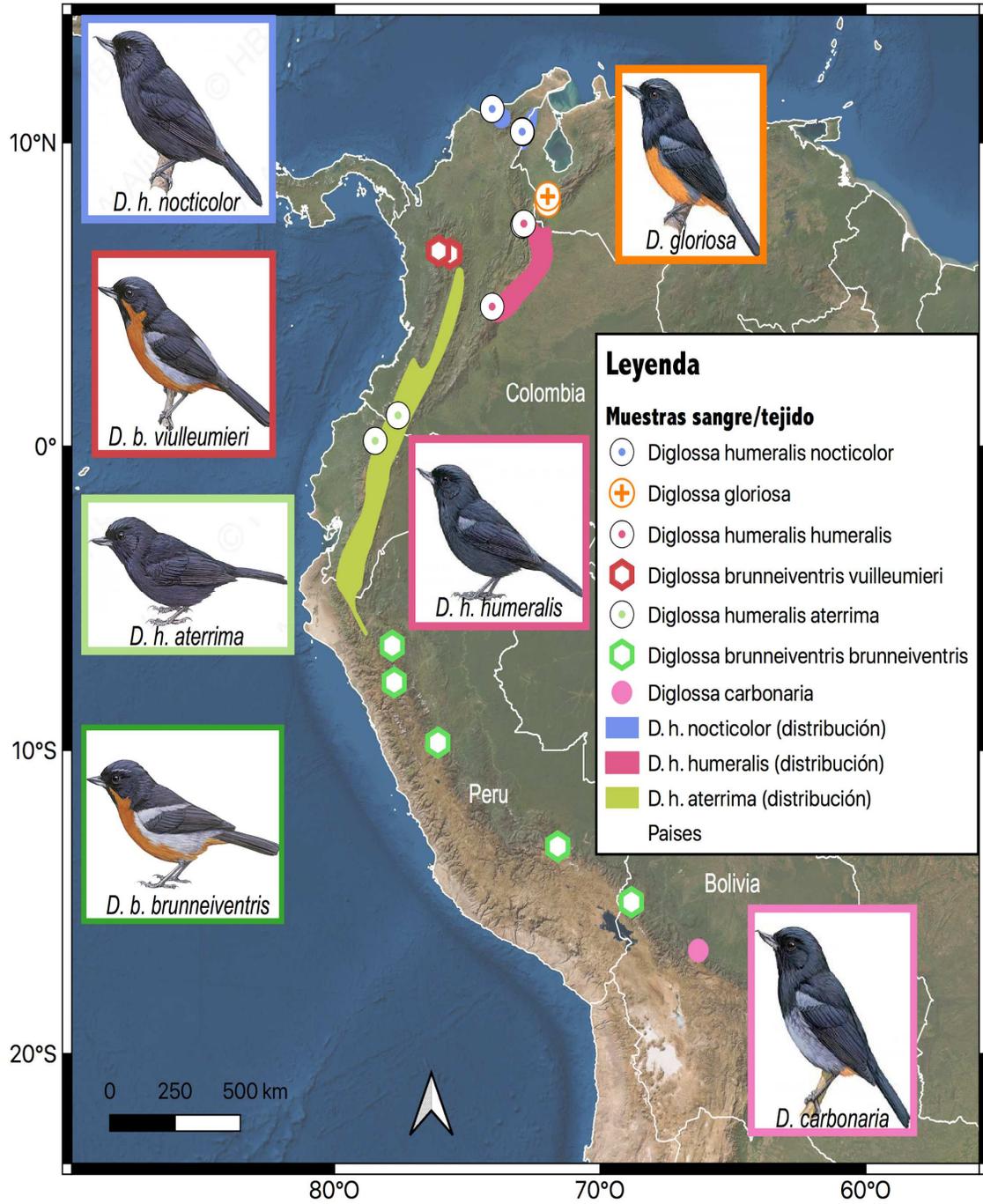


Figura 1. Distribución de *Diglossa humeralis* con los rangos de cada subespecie codificados por colores. Los puntos representan las localidades de las muestras de tejido y sangre utilizadas en este estudio de todos los taxones del complejo *Diglossa carbonaria*.

Diglossa humeralis hace parte del complejo *D. carbonaria*, el cual fue formalmente considerado una sola especie (*Diglossa carbonaria*) (Zimmer 1929, Hellmayr 1935, de Schauensee 1970). Sin embargo, en estudios posteriores por Vuilleumier (1969) y Graves (1982) fueron reconocidas cuatro especies dentro del complejo con base en patrones de morfología y coloración, además de una revisión completa de las zonas de contacto: *D. gloriosa*, *D. humeralis*, *D. brunneiventris* y *D. carbonaria* (Fig. 1). Mauck & Burns (2009) usaron secuencias mitocondriales para estudiar las relaciones filogenéticas dentro del género *Diglossa*, y probaron la monofilia del complejo *D. carbonaria* con gran soporte. Sin embargo, encontraron también que las especies dentro del complejo *D. carbonaria* están débilmente diferenciadas. Además, Gutiérrez-Zuluaga *et al.* (En revisión), en un estudio acerca de la diferenciación ecológica y genética de las subespecies de *Diglossa brunneiventris*, encontraron una posible polifilia de *D. humeralis* cuyas subespecies se relacionaron más estrechamente con otras especies del complejo que entre ellas. Dado que no se han hecho estudios taxonómicos específicos en *D. humeralis* integrando varias líneas de evidencia, el presente estudio busca proporcionar información sobre el estado taxonómico de las tres subespecies de *D. humeralis* bajo un enfoque de taxonomía integrativa que incluya datos morfológicos, genéticos y acústicos, y comprender las relaciones filogenéticas de *D. humeralis* dentro del complejo *D. carbonaria*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis morfométrico

Se tomaron un total de siete medidas morfológicas (ancho y alto del pico, tarso, hallux, longitud de la cola, longitud del ala, distancia primarias-secundarias) en milímetros y el peso en gramos a individuos durante trabajo de campo en el páramo de Santurbán (N=5) y la Sierra Nevada de Santa Marta (N=5). Adicional a las medidas tomadas durante trabajo de campo, se incluyeron medidas de las tres subespecies a partir de la base de datos morfológicos de aves de Colombia (Montoya *et al.* 2018) y medidas de un individuo de la Sierra Nevada de Santa Marta proporcionadas por Paulo Pulgarín, para un total de 59 individuos de *D. h. humeralis*, 25 individuos de *D. h. aterrima* y 8 individuos de *D. h. nocticolor*.

Para evaluar si existen diferencias morfológicas entre las subespecies de *D. humeralis* se realizó un ANOVA no paramétrico (test de Kruskal wallis) entre pares de subespecies para cada una de las variables morfológicas empleadas y posteriormente un análisis de componentes principales que permite visualizar la variación morfológica presente en las tres subespecies y observar la posición en espacio morfológico de cada uno de los individuos.

Análisis acústico

Las grabaciones de canto de las tres subespecies de *Diglossa humeralis* fueron obtenidas de las plataformas Xeno-canto (www.xeno-canto.com) y Macaulay Library (Cornell Laboratory of Ornithology, NY, USA).

Se analizaron un total de 27 grabaciones (13 de *D. humeralis aterrima*, 8 de *D. humeralis humeralis* y 6 de *D. humeralis nocticolor*) y 118 cantos (71 de *D. humeralis aterrima*, 24 de *D. humeralis humeralis* y 23 de *D. humeralis nocticolor*). Se obtuvo un promedio de los valores de cada variable en cada una de las grabaciones, las cuales fueron previamente editadas empleando Audacity V.2.3.2 (Audacity® Cross-Platform Sound Editor). El análisis incluyó un total de 6 variables del canto (Duración, Frecuencia pico, Frecuencia mínima, Frecuencia máxima, Ancho de banda y Número de pulsos) (Tabla 2), las cuales fueron medidas utilizando el programa Avisoft-SASLab (Avisoft, Berlin, Germany; parámetros: FFT length 512, frame size 100% y overlap de 50%). El número de pulsos se midió de forma automática mediante la herramienta *Pulse train analysis* de Avisoft-SASLab (Time constant 10 ms, threshold -12.4 dB, hysteresis 12). La estadística descriptiva (promedio, desviación estándar, valores mínimos y máximos) se calculó para cada parámetro. Para establecer si existe variación acústica entre las subespecies se interpretaron los datos mediante un ANOVA no paramétrico (test de Kruskal wallis) entre pares de subespecies para cada una de las variables acústicas empleadas y se graficaron diagramas de cajas para visualizar las diferencias entre las subespecies respecto a cada variable. Finalmente, se generaron los espectrogramas usando el paquete Seewave V.2.1.3 (Sueur *et al.* 2008) de R (R Development Core Team 2019).

Tabla 2. Descripción de las variables usadas en el análisis acústico.

Variable	Descripción
Duración (s)	Duración de cada canto de principio a fin.
Frecuencia pico (kHz)	Frecuencia de máxima potencia dentro de toda la duración del canto.
Frecuencia mínima (kHz)	Frecuencia mínima durante toda la duración del canto.
Frecuencia máxima (kHz)	Frecuencia máxima durante toda la duración del canto.
Ancho de banda (kHz)	Diferencia entre las frecuencias máxima y mínima.
Número de pulsos	Conteo de ráfagas de sonido en cada canto.

Análisis molecular

Se obtuvieron muestras de sangre mediante punción de la vena braquial de individuos de *Diglossa humeralis* capturados con redes de niebla durante trabajo de campo en la Sierra Nevada de Santa Marta (Magdalena, Colombia) y el Páramo de Santurbán (Santander, Colombia). Las muestras de sangre se almacenaron en buffer de lisis Queen (Seutin *et al.* 1991) a temperatura ambiente. Con el fin de obtener una mayor cantidad de información también fueron usadas muestras de tejido de *D. humeralis* depositadas en la colección de tejidos del Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt (IAvH) y en la colección de tejidos de la Universidad de Los Andes. Para incluir todos los taxones del complejo *D. carbonaria* se obtuvieron muestras de tejido provenientes de diferentes colecciones de museos. Como grupo externo se utilizaron muestras de un individuo de *Diglossa albilatera* capturado durante trabajo de campo en el Páramo del Sol (Urrao, Antioquia, Colombia) (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras de tejido y sangre utilizadas para análisis moleculares. GEEV: Grupo de Ecología y Evolución de Vertebrados, IAvH: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, IZET-COP: Instituto de zoología y ecología tropical (IZET) y colección ornitológica Phelps (COP), LSUMZ B: Louisiana State University Museum of Zoology, MUUA; Museo de la Universidad de Antioquia, Uniandes: Universidad de los Andes.

Taxón	Colección	Nº	Nombre en figuras	País	Estado	Localidad
<i>Diglossa albilatera</i>	GEEV	Ur16	<i>D.albilatera1</i>	Colombia	Antioquia	Mun. Urrao, bosque de niebla, Páramo del sol
<i>Diglossa gloriosa</i>	IZET-COP	1001	<i>D.gloriosa1</i>	Venezuela	Táchira	P.N Páramos El Batallón y La Negra
<i>Diglossa gloriosa</i>	IZET-COP	1113	<i>D.gloriosa2</i>	Venezuela	Táchira	P.N Páramos El Batallón y La Negra
<i>Diglossa carbonaria</i>	LSUMZ B	106752	<i>D.carbonaria1</i>	Bolivia	Cochabamba	Quebrado Major
<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	MUUA	1007	<i>D.b.vuilleumieri-Cen1</i>	Colombia	Antioquia	Mun. Bello, San Felix. Serranía de las Baldías
<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	GEEV	Ba12	<i>D.b.vuilleumieri-Cen2</i>	Colombia	Antioquia	Mun. Bello, San Felix. Serranía de las Baldías
<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	GEEV	Ur4	<i>D.b.vuilleumieri-Occ1</i>	Colombia	Antioquia	Mun. Urrao. Páramo del Sol

<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	GEEV	Ur8	<i>D.b.vuilleumieri-Occ2</i>	Colombia	Antioquia	Mun. Urrao. Páramo del Sol
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	LSUMZ B	72390	<i>D.b.brunneiventris1</i>	Perú	Huanuco	Mayobamba alta
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	LSUMZ B	72539	<i>D.b.brunneiventris2</i>	Perú	La libertad	Prov. Sanchez Carrion
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	LSUMZ B	72550	<i>D.b.brunneiventris3</i>	Perú	Amazonas	Prov. Chachapoya, Duraznopampa
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	FMNH	430118	<i>D.b.brunneiventris4</i>	Perú	Cuzco	Paucartambo, Pillahuata
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	AMNH	DOT2892	<i>D.b.brunneiventris5</i>	Bolivia	La Paz	Prov. Franz Tamayo, P.N Apolobamba
<i>Diglossa humeralis aterrima</i>	IAvH	12730	<i>D.h.aterrima- Nariño</i>	Colombia	Nariño	Páramo de Paja Blanca
<i>Diglossa humeralis aterrima</i>	USNM	B-03015	<i>D.h.aterrima-Ec1</i>	Ecuador		
<i>Diglossa humeralis aterrima</i>			<i>D.h.aterrima-Ec2</i>	Ecuador		Alto Perú
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST56	<i>D.h.humeralis-ST1</i>	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán

<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST59	<i>D.h.humeralis-ST2</i>	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST64	<i>D.h.humeralis-ST3</i>	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST121	<i>D.h.humeralis-ST4</i>	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	Uniandes	T1613	<i>D.h.humeralis-ST5</i>	Colombia	Santander	California, Angostura. Los laches, Páramo de Santurbán
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	Uniandes	T345	<i>D.h.humeralis-Bog</i>	Colombia	Cundinamarca	Universidad de los Andes
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	SN22	<i>D.h.nocticolor-SNSM1</i>	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo. Sierra Nevada de Santa Marta
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	DhSN-2019	<i>D.h.nocticolor-SNSM2</i>	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo. Sierra Nevada de Santa Marta
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	SN9	<i>D.h.nocticolor-SNSM3</i>	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo. Sierra Nevada de Santa Marta
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	SN58	<i>D.h.nocticolor-SNSM4</i>	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo. Sierra Nevada de Santa Marta
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	IAvH	11363	<i>D.h.nocticolor-Perijál</i>	Colombia	Cesar	Mun. Manaure, Vereda El Cinco, Serranía de Perijá

<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	IvH	11382	<i>D.h.nocticolor-Perijá2</i>	Colombia	Cesar	Mun. Manaure, Vereda Sabana Rubia, Serranía de Perijá
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	Uniandes	T729	<i>D.h.nocticolor-Perijá3</i>	Colombia	Cesar	Mun. Manaure, Serranía de Perijá

Se realizaron extracciones de ADN a partir de las muestras de sangre y tejido ya mencionadas. Para la extracción de ADN de muestras de tejido se usó el kit de extracción para tejidos de MO BIO, mientras que para las muestras de sangre se siguió el protocolo para extracción de ADN a partir de sangre usando un método de precipitación con cloruro de sodio. Una vez obtenido el ADN, se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se secuenciaron los genes mitocondriales citocromo B (Cyt-B) usando los primers L14990 (Kocher *et al.* 1989) y H16065 (Lougheed *et al.* 2000), y nicotinamida deshidrogenasa subunidad 2 (ND2) usando los primers L5219 y H6313 (Sorenson *et al.* 1999). Los fragmentos de ADN fueron amplificados en reacciones de 20 µL usando 0.2 mM de dNTP's, 1X de Taq buffer, 2 mM de MgCl₂, 1 unidad de Taq polimerasa y aproximadamente 30 ng de ADN. Para la amplificación de Cyt-B se utilizaron 0.5 µM de cada primer y para ND2 0.4 µM de cada primer y albúmina de suero bovino (BSA) al 0.4%. El perfil térmico de las PCRs incluyó un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 3 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C (1 minuto para Cyt-B y 30 segundos para ND2), anillamiento a 60°C (1 minuto para Cyt-B y 30 segundos para ND2) y extensión a 72°C por 70 segundos para ambos marcadores, finalizando con una última etapa de extensión a 72°C durante 10 minutos. Las reacciones se purificaron con fosfatasa alcalina y exonucleasa I y posteriormente se enviaron para su secuenciación por el método de Sanger en Macrogen Inc. (Korea).

Adicional a las secuencias provenientes de las muestras de tejido y sangre previamente mencionadas (Tabla 1), también se incluyeron en el análisis filogenético secuencias de dos individuos de *D. humeralis aterrima* disponibles en Genbank, uno para ND2 (EU647933) y otro para Cyt-B (AF310050) y secuencias de dos individuos de *D. brunneiventris brunneiventris* para ambos marcadores (EU647929, EU647896, EU647928 y EU647895).

Las secuencias fueron editadas, alineadas mediante la metodología Clustal W y concatenadas en el programa Geneious prime 2019 (Kearse *et al.* 2012). Posteriormente se buscó el mejor modelo molecular para cada partición por gen y por cada posición de condón usando ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017), siguiendo el criterio de información bayesiano. Las particiones de acuerdo a la posición en nuestro alineamiento fueron: Cyt-B posición 1=1-817/3, Cyt-B posición 2=2-817/3, Cyt-B posición 3=3-817/3, ND2 posición 1=818-1759/3, ND2 posición 2=819-1759/3, ND2 posición 3=820-1759/3). En el software BEAST V.1.8.3 (Suchard *et al.* 2018) se realizó el análisis filogenético mediante la metodología de inferencia bayesiana por medio de una búsqueda de 10.000.000 de generaciones. Para obtener el árbol con la topología de máxima credibilidad se usó el programa TreeAnnotator V.1.8.3 (Drummond & Rambaut 2007) limitándolo a obtener las topologías con una probabilidad posterior igual o mayor a 0.5 y eliminando el 20% de los árboles como burn-in. Por último, el árbol de máxima credibilidad obtenido fue editado en el programa FigTree V.1.4.2 (Rambaut 2010). También se realizó inferencia filogenética mediante la metodología de máxima verosimilitud usando el programa IQtree (Nguyen *et al.* 2015), y el algoritmo ultrafast bootstrap (Minh *et al.* 2013) con 10.000 replicaciones, en el que se corrieron tanto análisis con las secuencias previamente concatenadas y particionadas así como análisis independientes para cada uno de los marcadores mitocondriales Cyt-B y ND2. Estos árboles también fueron editados en el programa FigTree V.1.4.2 (Rambaut 2010). Además, se construyeron redes de haplotipos para Cyt-B y ND2 en PopART (Leigh & Bryant 2015) para visualizar las relaciones evolutivas entre los haplotipos mitocondriales y se calcularon las distancias genéticas (p-distance) usando el programa MEGA X (Tamura *et al.* 2013).

RESULTADOS

Análisis morfométrico

El test de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre las subespecies para todas las variables analizadas, con valores $p < 0.05$ (Tabla 3). Específicamente, se encontró que las variables alto del pico y distancia primarias-secundarias difieren entre todas las subespecies, mientras que el resto de variables difieren entre al menos un par de subespecies.

Tabla 3. Resultados del test de Kruskal Wallis por pares de subespecies para las variables morfológicas. Los valores resaltados en negrita indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

	<i>D. h. humeralis/</i> <i>D. h. nocticolor</i>		<i>D. h. humeralis/</i> <i>D. h. aterrima</i>		<i>D. h. nocticolor/</i> <i>D. h. aterrima</i>	
	χ^2	Valor <i>p</i>	χ^2	Valor <i>p</i>	χ^2	Valor <i>p</i>
Peso	8.89	0.00	2.56	0.11	9.83	0.00
Alto del pico	13.25	0.00	5.60	0.01	8.29	0.00
Ancho del pico	7.63	0.00	3.76	0.05	1.75	0.18
Longitud del ala	0.04	0.84	13.40	0.00	1.60	0.20
Longitud de la cola	0.03	0.86	18.19	0.00	2.43	0.12
Distancia primarias- secundarias	5.18	0.02	10.03	0.00	9.72	0.00
Tarso	0.49	0.49	21.76	0.00	2.97	0.08
Hallux	11.21	0.00	34.30	0.00	2.85	0.09

Por otro lado, el análisis de componentes principales generó 8 componentes (CP) de los cuales fueron seleccionados los 3 primeros, obteniéndose un porcentaje de explicación de varianza del 62% (32% del CP1, 18% del CP2 y 12% del CP3). Este análisis indicó diferenciación de las subespecies de *Diglossa humeralis* en el espacio morfológico multivariado, la cual ocurre principalmente a lo largo del CP1 en el que hay una separación entre *D. h. humeralis* y *D. h. aterrima* y el CP2 en el que hay una separación sutil entre *D. h. nocticolor* y las demás subespecies (Fig. 2)

La tabla 4 muestra cada componente con su porcentaje de varianza y los parámetros morfológicos correlacionados con cada componente. Las variables longitud de la cola, longitud del ala y tarso son las de mayor contribución para la formación del CP1, las variables peso, ancho del pico y hallux son las de mayor contribución al CP2 y las variables longitud de la cola y distancia primarias-secundarias son las de mayor contribución al CP3. Esto también puede observarse gráficamente en la figura 2, en la que las variables mencionadas están asociadas a los vectores de mayor longitud y más alejados del centro.

Tabla 4. Resultados del análisis de componentes principales (ACP) para las variables morfológicas. Los valores del ACP indican la correlación de cada variable con cada componente principal. Las últimas tres filas indican los valores propios y la proporción de varianza explicada y acumulada por cada eje.

	CP1	CP2	CP3
Peso	-0.24	0.49	-0.22
Alto del pico	-0.31	-0.33	0.18
Ancho del pico	-0.24	-0.47	-0.12
Longitud del ala	-0.43	0.36	-0.10
Longitud de la cola	-0.44	0.12	-0.56
Distancia primarias-secundarias	-0.31	0.30	0.72
Tarso	-0.43	-0.09	0.24
Hallux	0.37	0.43	0.04
Valores propios	2.56	1.52	0.93
Proporción de varianza explicada (%)	31.97	18.97	11.57
Proporción de varianza acumulada (%)	31.97	50.94	62.51

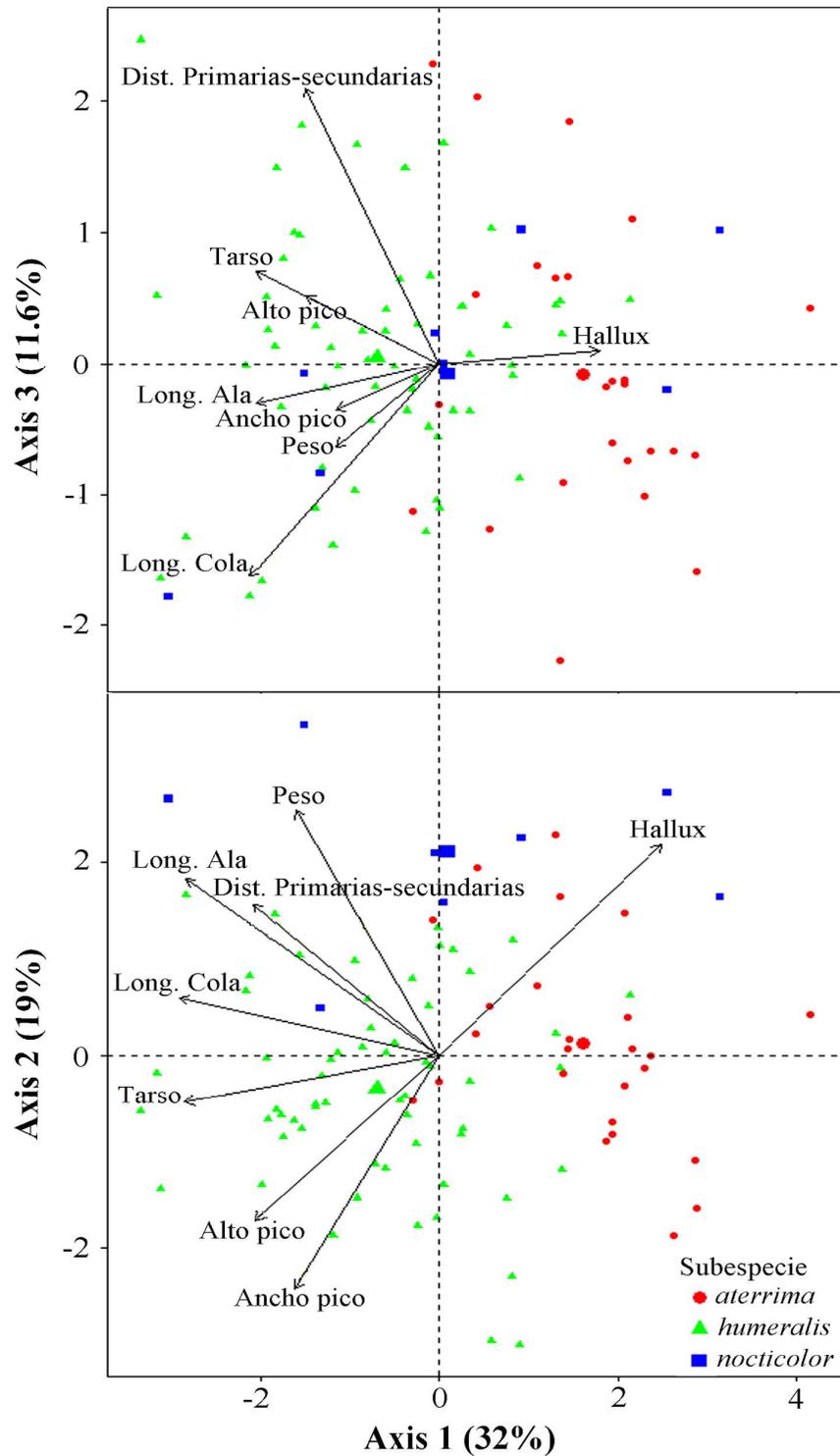


Figura 2. Representación gráfica del análisis de componentes principales mostrando la magnitud y dirección de la correlación de cada variable morfológica y la ubicación de todos los individuos en el espacio morfológico multivariado, con el CP1 y CP2 representados en la parte inferior de la figura y el CP1 y CP3 en la parte superior.

Análisis acústico

El canto de *Diglossa humeralis* consiste en una serie rápida de notas cortas y a menudo fragmentos de pulsos agudos y repetidos. La estadística descriptiva de cada variable acústica (media, desviación estándar y valores máximos y mínimos) para cada subespecie se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Características acústicas del canto de las tres subespecies de *Diglossa humeralis* (Los valores se presentan como promedio \pm SD y rango).

	<i>D. h. aterrima</i> (n=13)	<i>D. h. humeralis</i> (n=8)	<i>D. h. nocticolor</i> (n=6)	Total (n=27)
Duración (s)	1.45 \pm 0.23 (1.22-1.82)	1.28 \pm 0.20 (0.96-1.66)	1.16 \pm 0.29 (0.79-1.50)	1.34 \pm 0.26 (0.79-1.82)
Frecuencia pico (kHz)	5.73 \pm 0.45 (4.72-6.36)	5.62 \pm 0.26 (5.28-5.91)	6.26 \pm 0.79 (5.34-7.49)	5.82 \pm 0.54 (4.72-7.49)
Frecuencia mínima (kHz)	2.36 \pm 0.49 (1.31-3.09)	3.05 \pm 0.90 (2.36-4.81)	2.46 \pm 0.81 (1.50-3.37)	2.59 \pm 0.74 (1.31-4.81)
Frecuencia máxima (kHz)	8.60 \pm 0.55 (7.36-9.84)	8.78 \pm 1.12 (7.59-10.80)	9.39 \pm 3.14 (7.53-15.76)	8.83 \pm 1.57 (7.36-15.76)
Ancho de banda (kHz)	6.23 \pm 0.74 (4.60-7.37)	5.72 \pm 1.54 (3.89-8.25)	6.93 \pm 3.24 (4.56-13.30)	6.23 \pm 1.76 (3.89-13.3)
Número de pulsos	13.12 \pm 2.23 (10.25-18.00)	11.35 \pm 3.28 (6.33-15.00)	13.81 \pm 4.04 (8.33-18.00)	12.75 \pm 3.04 (6.33-18.00)

El test de Kruskal-Wallis indicó que no existen diferencias significativas entre las subespecies para los parámetros acústicos analizados, con valores $p > 0.05$ en todos los casos, excepto para la variable duración que mostró diferencias entre *D. h. nocticolor* y *D. h. aterrima* (Tabla 6). Esta falta de diferenciación también puede ser observada en los diagramas de cajas para todas las variables analizadas (Fig. 3). Sin embargo, las subespecies *D. h. humeralis* y *D. h. nocticolor* presentan cantos con fragmentos compuestos por pulsos muy repetidos ausentes en el canto de *D. h. aterrima* (Fig. 4).

Tabla 6. Resultados del test de Kruskal Wallis por pares de subespecies para las variables acústicas. Los valores resaltados en negrita indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

	<i>D. h. humeralis</i> / <i>D. h. nocticolor</i>		<i>D. h. humeralis</i> / <i>D. h. aterrima</i>		<i>D. h. nocticolor</i> / <i>D. h. aterrima</i>	
	χ^2	Valor <i>p</i>	χ^2	Valor <i>p</i>	χ^2	Valor <i>p</i>
Duración	0.82	0.37	2.00	0.16	4.07	0.04
Frecuencia pico	2.84	0.09	1.03	0.31	1.85	0.17
Frecuencia mínima	0.71	0.40	2.78	0.10	0.28	0.60
Frecuencia máxima	0.27	0.61	0.06	0.80	0.93	0.33
Ancho de banda	0.60	0.44	1.03	0.31	0.49	0.48
Número de pulsos	1.67	0.20	0.53	0.47	0.33	0.57

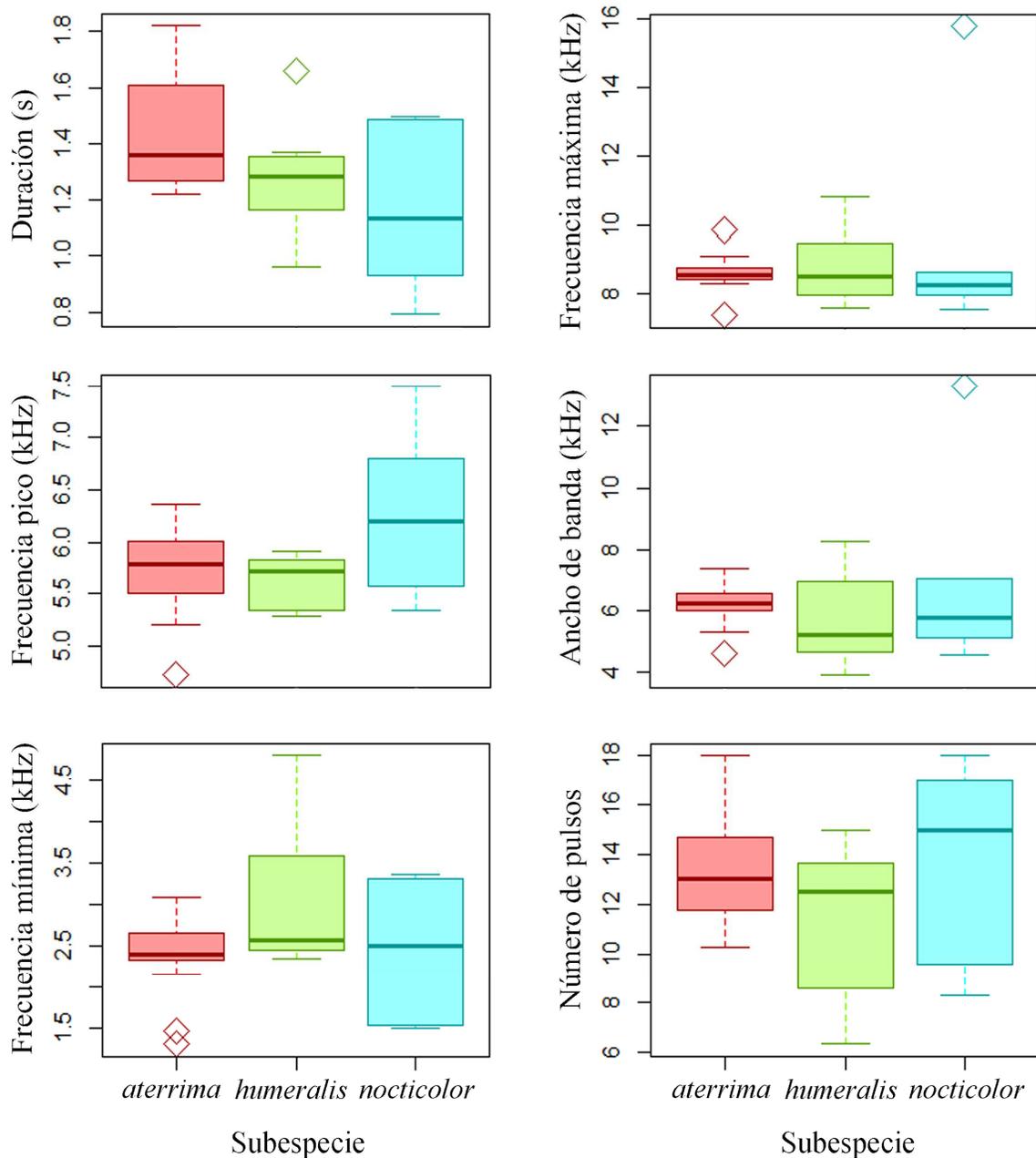


Figura 3. Diagramas de cajas de todas las variables acústicas analizadas para cada subespecie. La línea más gruesa indica la mediana, las otras dos líneas horizontales de la caja representan el primer y tercer cuartil, las líneas más delgadas superior e inferior indican los valores máximo y mínimo y los rombos representan datos atípicos.

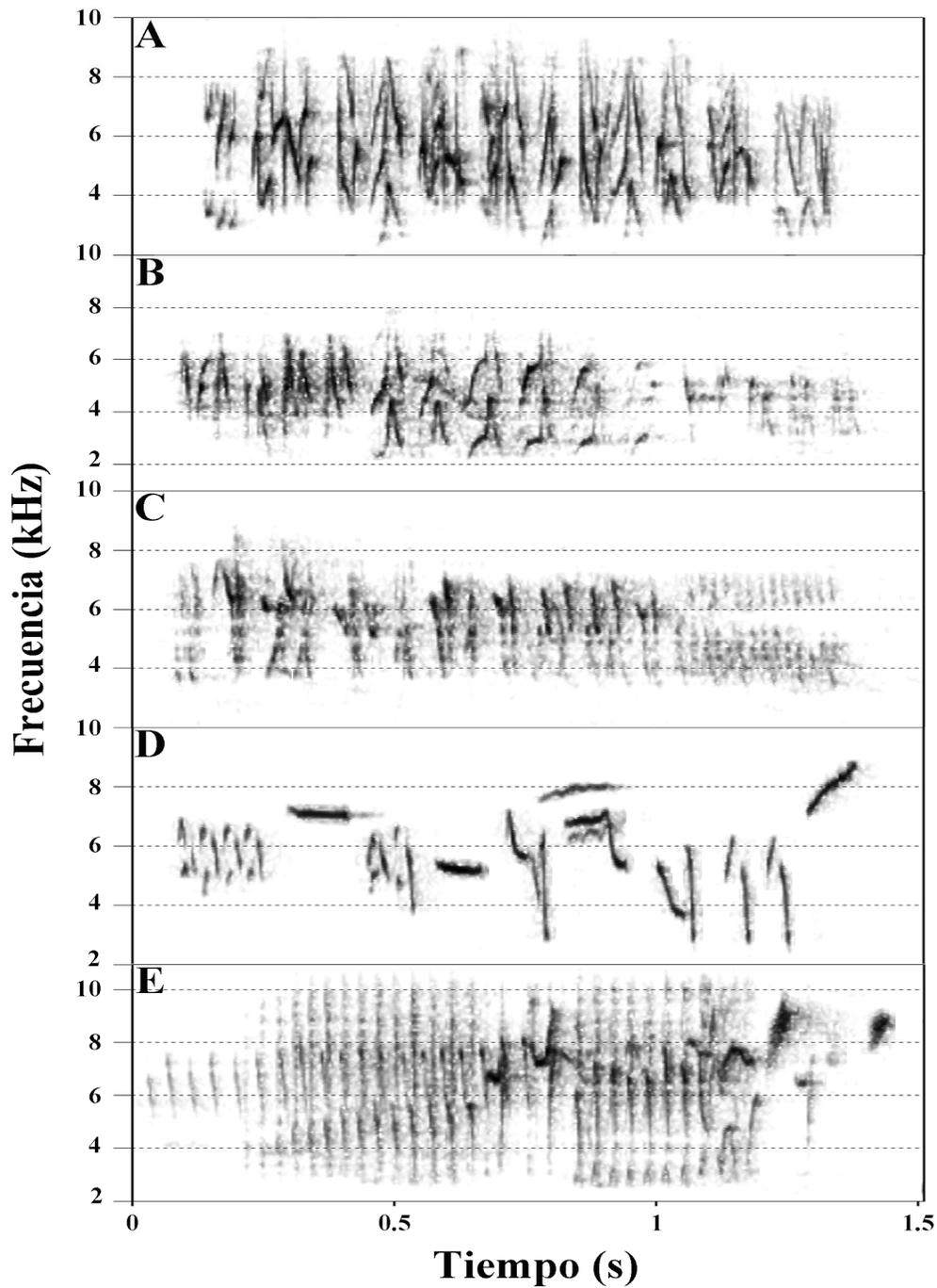


Figura 4. Cantos de *Diglossa humeralis* (Parámetros: $f=44100$ Hz, $wl=512$, $overlap=90\%$). (A) Canto típico de *D. h. aterrima*, (B) Canto de *D. h. humeralis* compuesto por notas cortas, (C) Canto de *D. h. humeralis* con un fragmento de pulsos rápidos al final, (D) Canto de *D. h. nocticolor* compuesto por notas cortas y separadas, (E) Canto de *D. h. nocticolor* compuesto por dos fragmentos de pulsos rápidos.

Análisis molecular

La topología de inferencia bayesiana con las secuencias concatenadas confirmó la monofilia del complejo *D. carbonaria* con gran soporte (Probabilidad posterior (PP) =1) (Fig. 5). Tanto la topología de inferencia bayesiana, como las topologías de máxima verosimilitud sugieren que las poblaciones de *Diglossa humeralis* no forman un grupo monofilético (Figs. 5 y 6). La subespecie *D. h. humeralis* con distribución en la cordillera oriental de Colombia parece estar más estrechamente relacionada con *D. b. vuilleumieri* (Figs. 5 y 6) cuya distribución se restringe al norte de la cordillera central y occidental (PP=0.9 para el análisis bayesiano, ultrafast bootstrap (UF)=76% para el análisis de máxima verosimilitud con las secuencias concatenadas y UF bootstrap=90% para el análisis de máxima verosimilitud con secuencias de ND2), con una distancia genética de 0.28% (Tabla 7). La topología de inferencia bayesiana (Fig. 5) sugiere que la subespecie del norte de Colombia (*D. h. nocticolor*) es el grupo hermano del resto de especies dentro del complejo *D. carbonaria* (PP=1), relación que también se rescata de la topología de máxima verosimilitud con las secuencias de ND2 (UF bootstrap=76%) (Fig. 6C), conformándose como el clado más diferenciado dentro del complejo *D. carbonaria* con una distancia genética promedio de 1.84% respecto al resto de taxones del complejo, incluyendo otras subespecies de *D. humeralis* (Tabla 7). Además, este último clado altamente soportado se rescata como monofilético en todas las topologías. Por otro lado, las relaciones filogenéticas de *D. h. aterrima* (cuya distribución se extiende desde las cordilleras occidental y central en Colombia hasta Ecuador y el Norte de Perú) dentro del complejo *D. carbonaria*, no son muy claras dado el poco muestreo realizado sobre esta subespecie. Sin embargo, la topología de inferencia bayesiana (Fig. 5) rescata un clado altamente soportado (PP=1) conformado por un individuo de esta subespecie proveniente del Sur de Colombia (Departamento de Nariño) y poblaciones de *D. b. brunneiventris* provenientes de la parte más Sur de su distribución, relación que también se rescata en la topología de máxima verosimilitud con las secuencias de ND2 (UF bootstrap=86%) (Fig. 6C), siendo la distancia genética entre estos dos taxones de 0.35% (Tabla 7).

Además, en concordancia con los árboles, las redes de haplotipos tanto para las secuencias concatenadas (Fig. 7A), como para las secuencias de Cyt-B y ND2 por separado (Fig. 7A-B), muestran que los haplotipos de las tres subespecies de *D. humeralis* están más relacionados con los de otras especies dentro del complejo *D. carbonaria*. Dicho así, los haplotipos encontrados para *D. h. humeralis* están más estrechamente relacionados con los haplotipos de

D. b. vuilleumieri que con los haplotipos de otras subespecies de *D. humeralis*, los haplotipos de *D. h. aterrima* están más relacionados con los de *D. b. brunneiventris* que con los de otras subespecies de *D. humeralis* y los haplotipos de *D. h. nocticolor* son los más divergentes, mostrando una menor relación con el resto de haplotipos presentes dentro del complejo *D. carbonaria* y con el mayor número de cambios en toda la red.

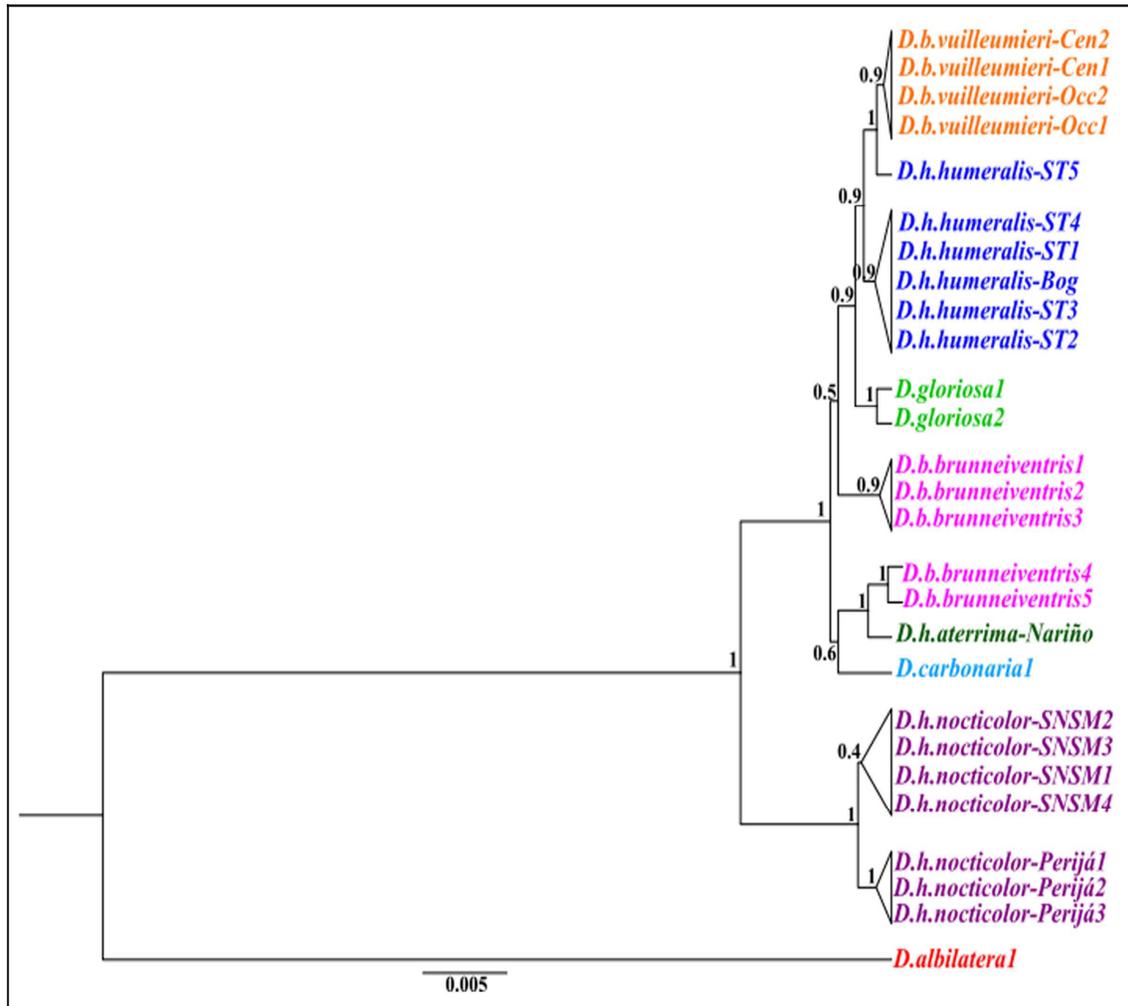


Figura 5. Árbol de inferencia bayesiana para las secuencias concatenadas de Cyt-B y ND2. Bog: Bogotá, Cen: Cordillera central, Occ: Cordillera Occidental, Perijá: Serranía de Perijá, SNSM: Sierra Nevada de Santa Marta, ST: Santurbán. Los colores indican las especies y subespecies del complejo *Diglossa carbonaria*.

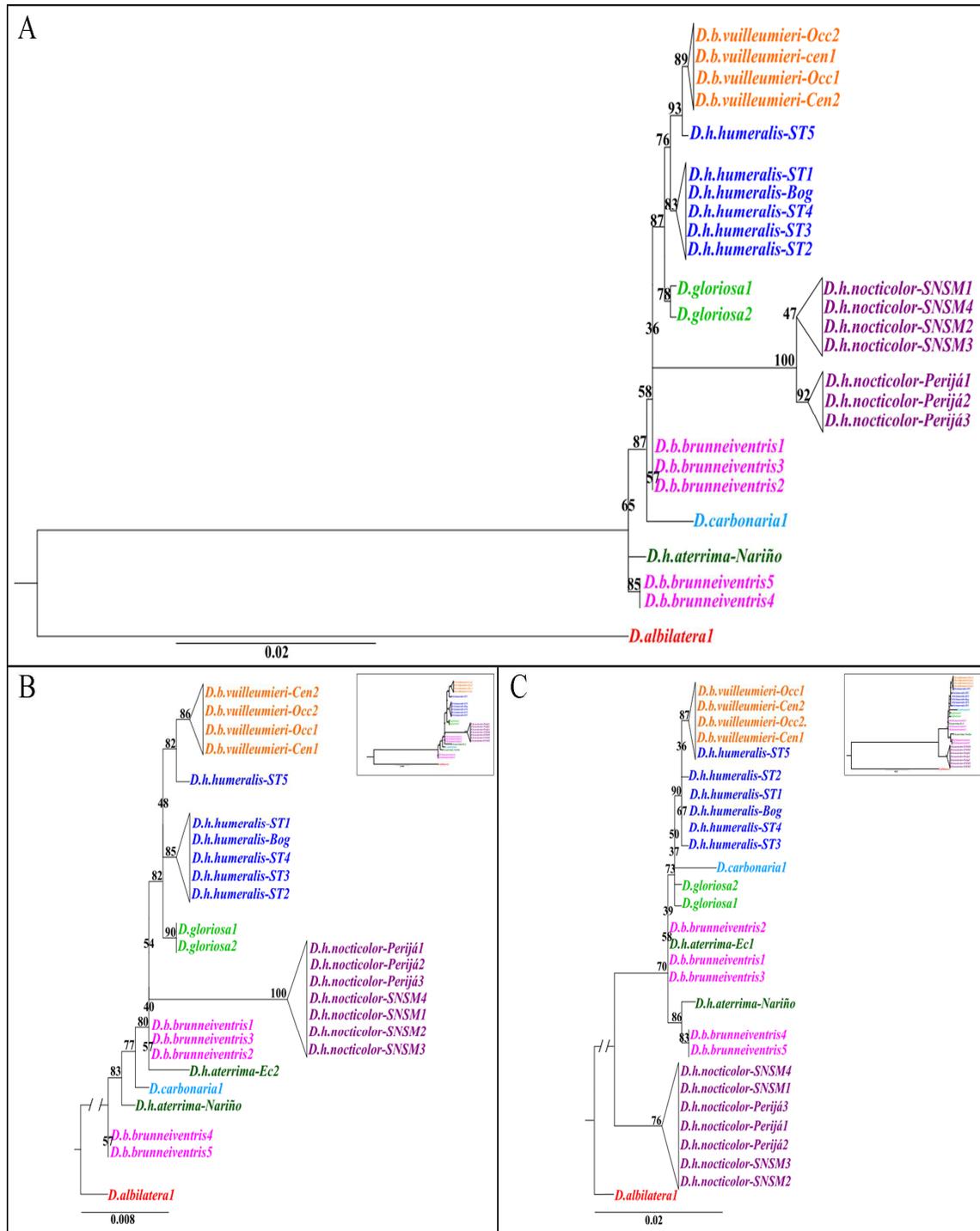


Figura 6. Árboles de máxima verosimilitud para las secuencias concatenadas de Cyt-B y ND2 (A), y las secuencias por separado de Cytb-B (B) y ND2 (C). Bog: Bogotá, Cen: Cordillera central, Ec: Ecuador, Occ: Cordillera Occidental, Perijá: Serranía de Perijá, SNSM: Sierra Nevada de Santa Marta, ST: Santurbán. Los colores indican las especies y subespecies del complejo *Diglossa carbonaria* y los recuadros dentro de las figuras B y C indican la longitud de rama del grupo externo.

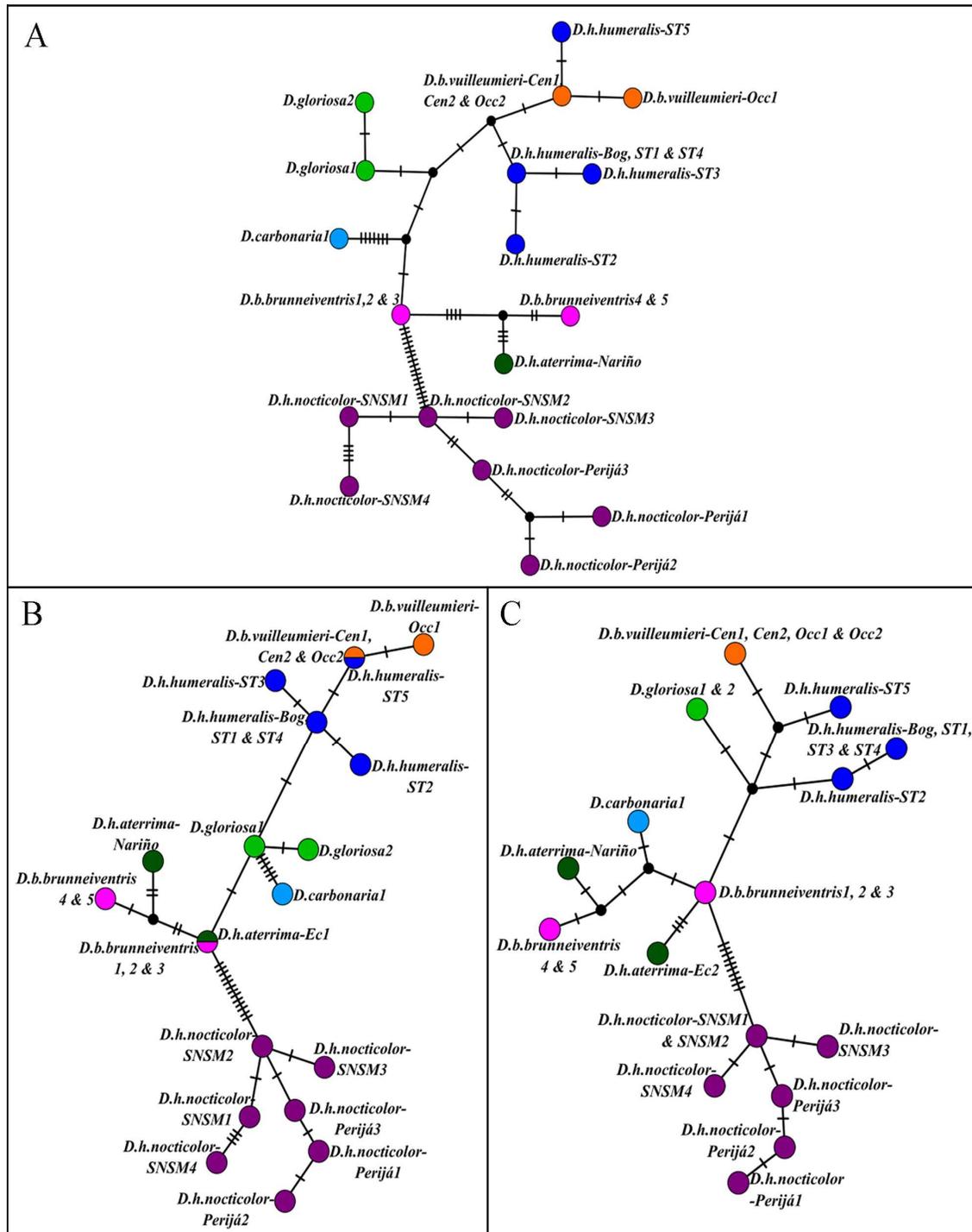


Figura 7. Redes de haplotipos para las secuencias concatenadas de Cyt-B y ND2 (A), y las secuencias por separado de ND2 (B) y Cyt-B (C). Bog: Bogotá, Cen: Cordillera central, Ec: Ecuador, Occ: Cordillera Occidental, Perijá: Serranía de Perijá, SNSM: Sierra Nevada de Santa Marta, ST: Santurbán. Los colores indican las especies y subespecies del complejo *Diglossa carbonaria*.

Tabla 7. Matriz de distancia genética (p-distance) entre todos los taxones del complejo *D. carbonaria* para las secuencias concatenadas de Cyt-B y ND2.

	<i>D. h. humeralis</i>	<i>D. h. aterrima</i>	<i>D. h. nocticolor</i>	<i>D. b. vuilleumieri</i>	<i>D. b. brunneiventris</i>	<i>D. carbonaria</i>	<i>D. gloriosa</i>
<i>D. h. humeralis</i>	-						
<i>D. h. aterrima</i>	0.70	-					
<i>D. h. nocticolor</i>	1.80	1.92	-				
<i>D. b. vuilleumieri</i>	0.28	0.75	1.87	-			
<i>D. b. brunneiventris</i>	0.44	0.35	1.65	0.61	-		
<i>D. carbonaria</i>	0.70	0.80	2.04	0.75	0.60	-	
<i>D. gloriosa</i>	0.30	0.63	1.75	0.36	0.36	0.63	-

Discusión

La delimitación de especies es una labor fundamental de la sistemática que busca caracterizar la biodiversidad y comprender su evolución (Wiens 2007). Sin embargo, establecer los límites de especies a menudo se convierte en un desafío de gran complejidad, especialmente para poblaciones alopátricas de divergencia reciente (Mayr & Ashlock 1991). Tal es el caso de muchos taxones con distribución en las montañas de los Andes, un área de extraordinaria biodiversidad (Myers *et al.* 2000) y cuyas barreras geográficas juegan un papel clave en la estructuración de las poblaciones de aves (Hazzi *et al.* 2018). En estos casos, el uso de la taxonomía integrativa, es decir, la delimitación de especies mediante la integración de múltiples enfoques (*e.g.* datos morfológicos, vocales, ecológicos, biogeográficos y genéticos), se convierte en una valiosa herramienta que ha ayudado a superar tales

dificultades en la delimitación de especies de aves (Cadena & Cuervo 2010, Krabbe *et al.* 2020). Dicho así, el presente estudio se suma al creciente número de estudios en que la implementación de diferentes líneas de información ayuda a comprender las relaciones filogenéticas entre taxones estrechamente relacionados y revelar su enorme complejidad (Cadena & Cuervo 2010, Isler *et al.* 2012, Gutierrez-Pinto *et al.* 2019, Krabbe *et al.* 2020).

Una de las conclusiones taxonómicas a las que llegó Graves (1982) en su estudio sobre los patrones de especiación dentro del complejo *Diglossa carbonaria*, fue el reconocimiento de *Diglossa humeralis* como especie y a los taxones *humeralis*, *nocticolor* y *aterrima* como subespecies de esta con base en sus patrones de coloración (*D. h. humeralis* con la base de la mandíbula gris azulada, rabadilla y hombros grises, *D. h. nocticolor* con la base de la mandíbula gris azulada, rabadilla gris y hombros negros y *D. h. aterrima* completamente negra) (Graves 1982) y en una revisión completa de las zonas de contacto entre todas las especies del complejo previamente propuesta por Vuilleumier (1969). Sin embargo, previo al presente estudio no habían sido evaluadas las diferencias entre las subespecies de *D. humeralis* usando medidas morfológicas ni otras fuentes de información fenotípica diferentes a la descripción de la coloración del plumaje. Los resultados obtenidos aquí son consistentes con el nivel de diferenciación previamente descrito en los patrones de coloración para las tres subespecies, indicando diferencias significativas para todas las medidas morfológicas analizadas y una ubicación diferencial de las subespecies dentro del espacio morfológico multivariado. Específicamente, se encontró que los individuos de *D. h. humeralis* y *D. h. nocticolor* presentaron valores mayores de longitud del ala, cola y tarso, *D. h. humeralis* presentó valores mayores de ancho y alto del pico, *D. h. nocticolor* presentó los valores más altos respecto a la variable peso y distancia primarias-secundarias y *D. h. aterrima* presentó los valores más bajos para todas las variables estudiadas, excepto para la variable hallux, cuyos valores fueron mayores para esta subespecie. Debido al aislamiento geográfico presente entre las tres subespecies, estas diferencias morfológicas podrían ser explicadas por adaptaciones a las diferentes condiciones ecológicas de los hábitats que ocupan (Seeholzer *et al.* 2017) como la adquisición de recursos (Lack 1971), estrategias de alimentación (Grant & Grant 1993, Felice 2019) o tolerancias climáticas (Rice 2003, Cortés-Ramírez 2019). Además, se sabe que el pico de las aves del género *Diglossa* es un carácter distintivo adaptado al robo de néctar, por lo que las diferencias en las dimensiones de este (Como se encontró para *D. h. humeralis* que presentó valores mayores en el alto y ancho del pico) podrían indicar a su vez diferencias en la oferta o morfología floral de los ambientes que

ocupan. Por ejemplo, en un estudio realizado por Schondube & Martínez del Río (2003), se modificó experimentalmente la longitud del gancho del pico a individuos de *Diglossa baritula* para determinar si la variación entre los tamaños afectaba la accesibilidad a los alimentos, y se encontró que los individuos con ganchos grandes eran más eficientes para alimentarse del néctar de flores tubulares largas, mientras que los individuos con ganchos pequeños eran más eficientes para alimentarse de frutos (Schondube & Martínez del Río, 2003). Por otro lado, las diferencias morfológicas encontradas también podrían estar asociadas a diferentes orígenes evolutivos, ya que, como se encontró en este estudio, las subespecies de *D. humeralis* no forman un grupo monofilético por lo que es probable que tengan medidas morfológicas más similares a las de las subespecies del complejo con las que están más relacionadas. Esto es consistente con lo encontrado por Gutiérrez-Zuluaga *et al.* (2016), quienes compararon medidas morfológicas de *D. b. brunneiventris* y *D. b. vuilleumieri* y encontraron que la subespecie *D. b. vuilleumieri* tiene caracteres del pico de mayor tamaño (Gutiérrez-Zuluaga *et al.* 2016). Dado que *D. b. vuilleumieri* parece ser el linaje más relacionado con *D. h. humeralis* es probable que ambas subespecies se asemejen en los caracteres del pico, con medidas más grandes de este. Sin embargo, se requiere de la inclusión de información morfológica para las demás subespecies del complejo que permita comprender si las diferencias morfológicas están asociadas con los diferentes orígenes evolutivos. Además, la inclusión de información ecológica (*e.g.* modelado de nicho ecológico), podría ayudar a comprender si las tres subespecies de *D. humeralis* tienen nichos ecológicos distintos y de ser así, si estas diferencias podrían estar asociadas con las encontradas a nivel morfológico.

Respecto al análisis acústico, no fueron encontradas diferencias significativas para ninguno de los parámetros acústicos empleados. Sin embargo, se observaron fragmentos compuestos por pulsos bastante rápidos y repetidos en algunos de los cantos de *D. h. humeralis* y *D. h. nocticolor*, los cuales estaban ausentes en todos los cantos de *D. h. aterrima* que fue la subespecie con mayor cantidad de cantos disponibles para la realización de los análisis. Además, también se encontraron cantos bastante atípicos para *D. h. nocticolor* en comparación con los de los demás taxones del complejo, compuestos por notas mucho más separadas que los cantos de *D. h. humeralis* y *D. h. aterrima*. Debido a que la mayoría de passeriformes oscinos pueden tener repertorios vocales amplios (Krebs & Kroodsma 1980), es muy probable que dicha variación en los cantos dentro de cada subespecie estuviera enmascarando la variación del canto entre subespecies. Además, no fue posible hacer

comparaciones sólo entre algún tipo de canto en particular dada la cantidad limitada de información disponible, en especial para *D. h. nocticolor* de la cual se tenía la menor cantidad de archivos disponibles y la variación más alta de tipos de canto. Bajo este escenario y dado el hecho de que no se han realizado estudios previos incluyendo información acústica de ninguna de las especies del complejo *D. carbonaria*, se hace necesaria la obtención de una mayor cantidad de grabaciones, lo que permitiría la comparación entre tipos de cantos particulares. Además, la inclusión de información acústica de las demás subespecies del complejo podría ayudar a comprender los patrones de especiación dentro de este y evaluar si en realidad existen diferencias acústicas y si estas están asociadas a las relaciones entre linajes.

Los resultados filogenéticos encontrados aquí, demuestran que las subespecies de *Diglossa humeralis* no forman un grupo monofilético. *D. h. humeralis* parece ser el linaje hermano de *D. b. vuilleumieri*, mientras que *D. h. aterrima* parece ser el linaje hermano de *D. b. brunneiventris*, aunque esta última relación debe ser confirmada mediante la inclusión de muestras adicionales de *D. h. aterrima*. Por su parte, la subespecie *D. h. nocticolor* forma un clado independiente altamente soportado en todas las topologías. De igual manera, las redes de haplotipos rescatan una relación más estrecha entre los haplotipos de *D. h. humeralis* y *D. b. vuilleumieri* y los haplotipos de *D. h. aterrima* y *D. b. brunneiventris*, mientras que los haplotipos de *D. h. nocticolor* son los más divergentes, mostrando el mayor número de cambios en toda la red. No obstante, nuestros resultados también sugieren una diferenciación débil entre los taxones del complejo, dado que una de las muestras de *D. h. humeralis* se anida en el mismo clado de *D. b. vuilleumieri* en todas las topologías y *D. carbonaria* y algunas muestras de *D. b. brunneiventris* y de *D. h. aterrima* se anidan de forma incongruente entre las topologías sin la conformación de alguna relación evidente con los demás taxones del complejo. Esto demuestra una baja resolución filogenética resultado de la poca diferenciación entre secuencias, además de las bajas distancias genéticas encontradas. Nuestros resultados son consistentes con lo encontrado por Mauck & Burns (2009) en su estudio sobre la filogenia, biogeografía y evolución de los tipos de pico de *Diglossa* y *Diglossopsis*, quienes también sugirieron que las especies dentro del complejo *D. carbonaria* estaban débilmente diferenciadas y además estimaron que la diversificación del complejo data de menos de un millón de años (0.475 ma) (Mauck & Burns 2009). Teniendo en cuenta que los patrones de coloración del plumaje que se encuentran dentro del complejo *D. carbonaria* son los más variables respecto al resto de complejos de especies dentro del género

Diglossa, este escenario muestra una radiación reciente en la cual ha ocurrido una rápida divergencia de plumaje y poca divergencia en el ADN mitocondrial, como se ha sugerido para otros grupos de aves (Zink *et al.* 2003, Kondo *et al.* 2004, Milá *et al.* 2007, Campagna *et al.* 2011, Palacios *et al.* 2019). Esta falta de resolución filogenética podría ser atribuida a procesos de hibridación, introgresión o clasificación incompleta de los linajes como ha sido reportado en otros estudios sobre radiaciones recientes de aves (Freeland & Boag 1999, Campagna *et al.* 2011). Sin embargo, los procesos de especiación con flujo de genes son poco probables en este caso ya que sólo existen dos zonas de contacto secundario entre los taxones del complejo *D. carbonaria* (Vuilleumier 1969, Graves 1982) y en solo una de ellas existen especímenes con fenotipos intermedios (Vuilleumier 1969, Graves 1982), la cual ocurre entre *D. b. brunneiventris* y *D. carbonaria* al noroeste de Bolivia. La otra zona de contacto secundario se da al norte de Perú entre *D. h. aterrima* y *D. b. brunneiventris* en la que ambas subespecies habitan en parapatría con mecanismos de aislamiento reproductivo aparentemente establecidos antes del contacto secundario (Graves 1982). Dado este escenario, resulta más probable la clasificación incompleta de los linajes como mecanismo potencial asociado a la ausencia de resolución filogenética encontrada. La inclusión de más marcadores y más muestras de las subespecies con menor representación en este estudio, como *D. h. aterrima*, provenientes de la mayor parte de su distribución, podría ayudar a resolver con mayor claridad la filogenia del complejo *D. carbonaria*.

Por otro lado, los resultados filogenéticos obtenidos también sugieren que *D. h. nocticolor* representa un linaje independiente, lo que conlleva a implicaciones importantes en términos de conservación dado que sus poblaciones están restringidas a las tierras altas de la Sierra Nevada de Santa Marta, la cual es reconocida por ser un centro de endemismos para múltiples grupos de animales y plantas (Hernández-Camacho *et al.* 1992, Todd & Carriker 1922) y la Serranía de Perijá donde la perturbación antropogénica continúa ejerciendo la conversión de los restos del hábitat natural en pastos y campos agrícolas (López-O *et al.* 2014). En esta área también ocurren especies endémicas, principalmente en las franjas subandina y páramo (Campbell 1989) donde precisamente habitan estas poblaciones de *D. humeralis*.

En conclusión, con base en los resultados obtenidos aquí sugerimos que *D. h. nocticolor* debe ser elevada al nivel de especie y las subespecies *D. h. humeralis* y *D. h. aterrima* deberían anidarse en los taxones respectivos de mayor cercanía. Sin embargo, ambas hipótesis requieren mayor investigación para ser confirmadas, especialmente la segunda por tener una

menor evidencia. Dicho así, es necesario llevar a cabo un mayor esfuerzo de muestreo para los análisis mediante estudios colaborativos en los que se estandaricen las metodologías y equipos para minimizar los posibles errores que se puedan generar (*e.g.* errores de medición morfológica). Estos esfuerzos deben estar enfocados hacia la inclusión de más cantos y medidas morfológicas en especial para *D. h. nocticolor*, así como más secuencias de ADN para *D. h. aterrima* que estuvo poco muestreada en los análisis filogenéticos, lo que podría ayudar a resolver con mayor claridad las relaciones filogenéticas entre los taxones del complejo *D. carbonaria*. Además, la inclusión de datos morfológicos y acústicos de los demás taxones del complejo *D. carbonaria* también podría ayudar a determinar los límites de especie y las relaciones entre los linajes y con esto la re-evaluación del estado de conservación de las entidades dentro del complejo para su debida protección.

AGRADECIMIENTOS

A Laura Hoyos y Julián Llano por su asistencia en campo, a Paulo Pulgarín, Santiago David Rivera y Edwin Múnera por su contribución con muestras, medidas morfológicas y grabaciones para el desarrollo de los análisis, a Diego Ospina por su ayuda y participación en la edición de las figuras, al Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt por proporcionar algunas muestras de tejido requeridas y al Grupo de Ecología y Evolución de vertebrados y al fondo de becas Marco Antonio Serna de la Sociedad Antioqueña de Ornitología por su contribución en la financiación de este proyecto.

REFERENCIAS

- Alström, P., & Ranft, R. (2003). The use of sounds in avian systematics and the importance of bird sound archives. *Bull. B.O.C.* 123A, 114-135.
- Bangs (1898). *Diglossa nocticolor*. Proceedings of the biological society of Washington. 12, p. 180

- Cadena, C. D., & Cuervo, A. M. (2010). Molecules, ecology, morphology, and songs in concert: how many species is *Arremon torquatus* (Aves: Emberizidae)? *Biological Journal of the Linnean Society* 99, 152-176. doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01333.x
- Campagna, L., Benites, P., Loughheed, S. C., Lijtmaer, D. A., Di Giacomo, A. S., Eaton, M. D. et al. (2011). Rapid phenotypic evolution during incipient speciation in a continental avian radiation. *Proc. R. Soc. B.* 279, 1847-1856. doi: 10.1098/rspb.2011.2170
- Campbell, D. G. (1989). The importance of floristic inventory in the tropics. In: Campbell, D. G. & Hammond, H. D. (eds.), *Floristic inventory of tropical countries*; 5-30. Pub. New York Botanical Garden. New York.
- Cerqueira, P., Santos, M., & Aleixo, A. (2016). Phylogeography, interspecific limits and diversification of *Turdus ignobilis* (Aves: Turdidae). *Mol Phylogenet Evol.* 97, 177-186. doi: 10.1016/j.ympev.2016.01.005
- Cooke, G. M., Chao, N. L., & Beheregaray, L. B. (2012). Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). *Journal of Biogeography* 39, 724-738. doi: 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x
- Cooper, J. C., & Cuervo, A. M. (2017). Vocal variation and species limits in the *Sclerurus mexicanus* complex. *The Wilson J. of Ornithology* 129, 13-24. doi: 10.1676/1559-4491-129.1.13
- Cortés-Ramírez, G., Ríos-Muñoz, C. A., & Navarro-Sigüenza, A. G. (2019). Influence of phylogenetic structure and climate gradients on geographical variation in the morphology of Mexican flycatcher forests assemblages (Aves: Tyrannidae). *PeerJ.* 7:e6754. doi: 10.7717/peerj.6754
- Costello, M., May, R., & Stork, N. (2013). Response to Comments on "Can We Name Earth's Species Before They Go Extinct?". *Science* 339, 413-416. doi: 10.1126/science.1237381

- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85, 407-417. doi: 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x
- De Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Syst Biol.* 56, 879-886. doi: 10.1080/10635150701701083
- De Schauensee, R. M. (1970). A guide to the birds of South America. Chicago, University of Chicago Press.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol.* 7, 214. doi: 10.1186/1471-2148-7-214
- Duellman, W. E., & Trueb, L. (1988). Cryptic species of hylid marsupial frogs in Perú. *Journal of Herpetology* 22, 159-179. doi: 10.2307/1563995
- Edwards, S., Kingan, S., Calkins, J., Balakrishnan, C., Jennings, W., Swanson, W., *et al.* (2005). Speciation in birds: Genes, geography, and sexual selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 6550-6557. doi: 10.1073/pnas.0501846102
- Felice, R. N., Tobias, J. A., Pigot, A. L., & Goswami, A. (2019). Dietary niche and the evolution of cranial morphology in birds. *Proc. R. Soc. B.* 286, 20182677. doi: 10.1098/rspb.2018.2677
- Fraser (1840). *Agrilorhinus humeralis*. Proceedings of the zoological society of London. London: Academic Press, pt.4-8 (1836-1840): páginas 22-23.
- Freeland, J., & Boag, P. (1999). The Mitochondrial and Nuclear Genetic Homogeneity of the Phenotypically Diverse Darwin's Ground Finches. *Evolution* 53, 1553-1563. doi:10.2307/2640900
- Giarla, T. C., Voss, R. S., & Jansa, S. A. (2014). Hidden diversity in the Andes: Comparison of species delimitation methods in montane marsupials. *Mol Phylogenet Evol.* 70, 137-151. doi: 10.1016/j.ympev.2013.09.019
- Grant, B. R., & Grant, P. R. (1993). Evolution of Darwin's finches caused by a rare climatic event. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 251, 111-117. doi: 10.1098/rspb.1993.0016

- Graves, G. (1982). Speciation in the Carbonated Flowerpiercer (*Diglossa carbonaria*) Complex of the Andes. *The Condor* 84, 1-14. doi: 10.2307/1367812
- Gutiérrez-Pinto, N., McCracken, K., Tubaro, P., Kopuchian, C., Astie, A., & Cadena, C. (2019). Molecular and morphological differentiation among Torrent Duck (*Merganetta armata*) populations in the Andes. *Zoologica Scripta* 48, 589-604. doi: 10.1111/zsc.12367
- Gutiérrez-Zuluaga, A. M., González-Quevedo, C., Oswald, J. A., Terrill, R. S., Pérez-Emán, & Parra, J. L. En revisión. Genetic data and niche differences suggest that disjunct populations of *Diglossa brunneiventris* are not sister lineage.
- Gutiérrez-Zuluaga A. M., González-Quevedo, C., Oswald, J. A., Terrill, R. S., Pérez-Emán, & Parra, J. L. (2016). Diferenciación genética, fenotípica y ecológica de las subespecies *Diglossa brunneiventris brunneiventris* y *Diglossa brunneiventris vuilleumieri*. Tesis de pregrado. Universidad de Antioquia
- Harvey, M., & Brumfield, R. (2015). Genomic variation in a widespread Neotropical bird (*Xenops minutus*) reveals divergence, population expansion, and gene flow. *Mol Phylogenet and Evol.* 83, 305-316. doi:10.1016/j.ympev.2014.10.023
- Hazzi, N. A., Moreno, J. S., Ortiz-Movliav, C., & Palacio, R. D. (2018). Biogeographic regions and events of isolation and diversification of the endemic biota of the tropical Andes. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 7985-7990. doi: 10.1073/pnas.1803908115
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci* 270, 313-321. doi: 10.1098/rspb.2002.2218
- Hellmayr, C. E. (1935). Catalogue of birds of the Americas. Part VIII, Alaudidae-Compothlypidae. Publications of the Field Museum of Natural History, Zoology Series 13, 1-542.
- Hernández-Camacho, J., Hurtado-Guerra, A., Ortiz-Quijano, R. & Walschburger, T. (1992). Centros de endemismo en Colombia. Halffter, G. (ed.). La Diversidad

Biológica de Iberoamérica Vol. I. *Acta Zoológica Mexicana*. 175-190. Xalapa, México.

Hilty, S. L., Brown, W. L. (1986). *A guide to the birds of Colombia*. New Jersey, Princenton University Press.

Isler, M. L., Cuervo, A. M., Bravo, G. A., & Brumfield, R. T. (2012). An integrative approach to species-level systematics reveals the depth of diversification in an Andean thamnophilid, the Long-tailed Antbird. *The Condor* 114, 571-583. doi: 10.1525/cond.2012.120012

IUCN 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-2. <https://www.iucnredlist.org>. Downloaded on 09 July 2020.

Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T., von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat methods* 14, 587-589. doi: 10.1038/nmeth.4285

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., *et al.* (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647-1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., *et al.* (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6196-6200. doi: 10.1073/pnas.86.16.6196

Kondo, B., Baker, J. M., & Omland, K. E. (2004). Recent speciation between the Baltimore oriole and the black-backed oriole. *The Condor* 106, 674-680. doi: 10.1650/7496

Krabbe, N., & Cadena, C. D. (2010). A taxonomic revision of the Páramo Tapaculo *Scytalopus canus* Chapman (Aves: Rhinocryptidae), with description of a new subspecies from Ecuador and Perú. *Zootaxa* 2354, 56-66. doi: 10.11646/zootaxa.2354.1.5

- Krabbe, N. K., Schulenberg, T. S., Hosner, P. A., Rosenberg, K. V., Davis, T. J., Rosenberg, G. H., *et al.* (2020). Untangling cryptic diversity in the High Andes: Revision of the *Scytalopus magellanicus* complex (Rhinocryptidae) in Perú reveals three new species. *The Auk* 137, ukaa003. doi: doi.org/10.1093/auk/ukaa003
- Krebs, J. R., & Kroodsma, D. E. (1980). Repertoires and Geographical Variation in Bird Song. *Advances in the Study of Behavior* 11, 143-177. doi: 10.1016/S0065-3454(08)60117-5
- Lack, D. (1971). Ecological isolation in birds. Oxford, U.K, Blackwell Press.
- Lafresnaye (1846). *Diglossa aterrima*. París, Revue zoologique par la Societe cuvierienne. p. 319
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). Popart: full feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol.* 6, 1110-1116. doi: doi.org/10.1111/2041-210X.12410
- López-O., J. P., Avendaño, J. E., Gutiérrez-Pinto, N. & Cuervo, A. M. (2014). The birds of the Serranía de Perijá: the northernmost avifauna of the Andes. *Revista Ornitología Colombiana* 14, 62-93.
- Lougheed, S. C., Freeland, J. R., Handford, P., & Boag, P. T. (2000). A molecular phylogeny of Warbling-Finches (Poospiza): Paraphyly in a neotropical emberizid genus. *Mol Phylogenet Evol.* 17, 367-378. doi: 10.1006/mpev.2000.0843
- Mauck, W. M., & Burns, K. J. (2009). Phylogeny, biogeography, and recurrent evolution of divergent bill type in the nectar-stealing flowerpiercer (Thraupidae: *Diglossa* and *Diglossopsis*). *Biological journal of the Linnean Society* 98,14-28. doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01278.x
- Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of the species from the viewpoint of a zoologist. New York, Columbia University Press.
- Mayr, E., & Ashlock, P. D. (1991). Principles of systematic zoology. McGraw-Hill, New York.

- Meier, R. (2008). DNA sequences in taxonomy: Opportunities and challenges. In: Wheeler QD (Ed.) *New Taxonomy*, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 95–127. doi:10.1201/9781420008562.CH7
- Milá, B., McCormack, J. E., Castañeda, G., Wayne, R. K., & Smith T. B. (2007). Recent postglacial range expansion drives the rapid diversification of a songbird lineage in the genus *Junco*. *Proc. R. Soc. B.* 274, 2653-2660. doi: 10.1098/rspb.2007.0852
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol.* 30:1188-1195. doi: 10.1093/molbev/mst024
- Montoya, P., González, M. A., Tenorio, E. A., López-Ordóñez, J. P., Pinto-Gómez, A., Cueva, D., *et al.* (2018). A morphological database for 606 Colombian bird species. *Ecology* 99, 1693. doi: 10.1002/ecy.2368
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858. doi: 10.1038/35002501
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 32, 268-274. doi: 10.1093/molbev/msu300
- Padial, J. M., & De La Riva, I. (2009). Integrative taxonomy reveals cryptic Amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society* 155, 97-122. doi: 10.1111/j.1096-3642.2008.00424.x
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Front Zool* 25, 7-16 . doi: 10.1186/1742-9994-7-16
- Palacios, C., García-R, S., Parra, J. L., Cuervo, A. M., Stiles, F. G., McCormack, J. E., *et al.* (2019). Shallow genetic divergence and distinct phenotypic differences between two Andean hummingbirds: Speciation with gene flow? *The Auk* 136, ukz046. doi: 10.1093/auk/ukz046

- Rambaut, A. (2010) FigTree V.1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rice, N. H., Martínez-Meyer, E., & Peterson, A. T. (2003). Ecological niche differentiation in the *Aphelocoma* jays: a phylogenetic perspective. *Biol. J. Linn. Soc.* 80, 369-383. doi: 10.1046/j.1095-8312.2003.00242.x
- Schlick-Steiner, B., Steiner, F., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., & Crozier, R. (2010). Integrative taxonomy: A multisource approach to exploring biodiversity. *Annu Rev Entomol.* 55, 421-438. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085432
- Schondube, J. E., & Martinez del Rio, C. (2003). The flowerpiercers' hook: an experimental test of an evolutionary trade-off. *Proc. R. Soc. B.* 270, 195-198. doi: 10.1098/rspb.2002.2231
- Seeholzer, G. F., Claramunt, S., & Brumfield, R. T. (2017). Niche evolution and diversification in a Neotropical radiation of birds (Aves: Furnariidae). *Evolution* 71, 702-715. doi: 10.1111/evo.13177
- Seutin, G., White, B., & Boag, P. (1991). Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology* 69, 82-90.
- Sorenson, M. D., Ast, J. C., Dimcheff, D. E., Yuri, T. Mindell, D. P. (1999). Primers for a PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Mol Phylogenet Evol.* 12, 105-114. doi: 10.1006/mpev.1998.0602
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evol* 4, vey016. doi: 10.1093/ve/vey016
- Sueur, J., Aubin, T., & Simonis, C. (2008). Seewave: a free modular tool for sound analysis and synthesis. *Bioacoustics* 18, 213-226. doi: doi.org/10.1080/09524622.2008.9753600

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30, 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
- Todd, W. E., & Carriker, M. A. (1922). The birds of the Santa Marta region of Colombia: A study in altitudinal distribution. *Annals of the Carnegie Museum* 14, 1-611. doi: 10.5962/bhl.title.56257
- Vuilleumier, F. (1969). Systematics and evolution in *Diglossa* (Aves, *Coerebidae*). *Am. Mus. Novit.* 2381, 1-44. doi: hdl.handle.net/2246/2591
- Wells, K. D. (2007). *The Ecology and Behavior of Amphibians*. Chicago, University Of Chicago Press.
- Wiens, J. J. (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology* 56, 875-878. doi: 10.1080/10635150701748506
- Will, K. W., Mishler, B. D., & Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Syst Biol* 54, 844-851. doi: 10.1080/10635150500354878
- Wilson, E. & Brown, W. (1953). The subspecies concept and its taxonomic application. *Systematic Zoology* 2, 97-111. doi: 10.2307/2411818
- Zimmer, J. T. (1929). Variation and distribution in two species of *Diglossa*. *The Auk* 46, 21-37. doi: doi.org/10.2307/4075775
- Zink, R. M., Drovetski, S. V., Questiau, S., Fadeev, I. V., Nesterov, E. V., Westberg, M., *et al.* (2003). Recent evolutionary history of the bluethroat (*Luscinia svecica*) across Eurasia. *Mol Ecol.* 12, 3069-3075. doi: 10.1046/j.1365-294x.2003.01981.

Material suplementario. Tabla 1. Muestras de tejido y sangre utilizadas para análisis moleculares.

Taxón	Colección	N°	Nombre en figuras	Tipo	País	Estado	Localidad	Latitud	Longitud	Elevación (m)	Fecha	Genbank
<i>Diglossa albilatera</i>	GEEV	Ur16	<i>D.albilatera1</i>	Sangre	Colombia	Antioquia	Mun. Urrao, bosque de niebla Páramo del sol	6,4265	-76,0784	2980	12-sep-15	
<i>Diglossa gloriosa</i>	IZET-COP	1001	<i>D.gloriosa1</i>	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N Páramos El Batallón y La Negra	8,0056	-71,9726	3100	23-may-05	
<i>Diglossa gloriosa</i>	IZET-COP	1113	<i>D.gloriosa2</i>	Tejido	Venezuela	Táchira	P.N Páramos El Batallón y La Negra	8,2098	-71,9712	2575	12-mar-05	
<i>Diglossa Carbonaria</i>	LSUMZ B	106752	<i>D.carbonaria1</i>	Tejido	Bolivia	Cochabamba	Quebrado Major	- 16,5830	-66,3000	2236		
<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	MUUA	1007	<i>D.b.vuilleumieri-Cen1</i>	Tejido	Colombia	Antioquia	Mun. Bello, San Felix Serranía de las Baldías	6,3325	-75,6485	3163	15-ago-15	
<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	GEEV	Ba12	<i>D.b.vuilleumieri-Cen2</i>	Sangre	Colombia	Antioquia	Mun. Bello, San Felix Serranía de las Baldías	6,3320	-75,6484	3164	16-ago-15	
<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	GEEV	Ur4	<i>D.b.vuilleumieri-Occ1</i>	Sangre	Colombia	Antioquia	Mun. Urrao, Páramo del Sol	6,4265	-76,0785	3120	10-oct-15	
<i>Diglossa brunneiventris vuilleumieri</i>	GEEV	Ur8	<i>D.b.vuilleumieri-Occ2</i>	Sangre	Colombia	Antioquia	Mun. Urrao, Páramo del Sol	6,4265	-76,0785	3113	10-oct-15	
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	LSUMZ B	72390	<i>D.b.brunneiventris 1</i>	Tejido	Perú	Huanuco	Mayobamba alta	-9,7529	-76,1049	2891		
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	LSUMZ B	72539	<i>D.b.brunneiventris 2</i>	Tejido	Perú	La libertad	Prov. Sanchez Carrion	-7,7700	-77,7500	3200		
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	LSUMZ B	72550	<i>D.b.brunneiventris 3</i>	Tejido	Perú	Amazonas	Prov. Chachapoya, Duraznopampa	-6,5624	-77,8244	2501		
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	FMNH	430118	<i>D.b.brunneiventris 4</i>	Tejido	Peru	Cuzco	Paucartambo, Pillahuata	- 13,1617	-71,5942			Cyt b (EU647895) ND2 (EU647928)
<i>Diglossa brunneiventris brunneiventris</i>	AMNH	DOT 2892	<i>D.b.brunneiventris 5</i>	Tejido	Bolivia	La Paz	Prov. Franz Tamayo Parque Nacional Apolobamba	- 14,9936	-68,8186			Cyt b (EU647896) ND2 (EU647929)
<i>Diglossa humeralis aterrima</i>	IAvH	12730	<i>D.h.aterrima-Nariño</i>	Tejido	Colombia	Nariño	Páramo de Paja Blanca	1,0125	-77,6075	2950		
<i>Diglossa humeralis aterrima</i>			<i>D.h.aterrima-Ec2</i>	Sangre	Ecuador		Alto Perú	0,1792	-78,4678			Cyt b (AF310050)
<i>Diglossa humeralis aterrima</i>	USNM	B-03015	<i>D.h.aterrima-Ec1</i>		Ecuador			0,1792	-78,4678	3520		ND2 (EU647933)

<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST56	<i>D.h.humeralis-ST1</i>	Sangre	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán	7,2856	-72,9183	3520	14-mar-18	
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST59	<i>D.h.humeralis-ST2</i>	Sangre	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán	7,2856	-72,9183	3520	15-mar-18	
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST64	<i>D.h.humeralis-ST3</i>	Sangre	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán	7,2856	-72,9183	3520	15-mar-18	
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	GEEV	ST121	<i>D.h.humeralis-ST4</i>	Sangre	Colombia	Santander	Vetas, Páramo de Santurbán	7,2811	-72,9175	3530	20-mar-18	
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	Uniandes	T1613	<i>D.h.humeralis-ST5</i>	Tejido	Colombia	Santander	California, Angostura, Los Laches, Páramo de Santurbán	7,3167	-72,8686	3450	03-jun-09	
<i>Diglossa humeralis humeralis</i>	Uniandes	T345	<i>D.h.humeralis-Bog</i>	Tejido	Colombia	Cundinamarca	Universidad de los Andes	4,6006	-74,0633	2650	22-nov-07	
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	SN22	<i>D.h.nocticolor-SNSM1</i>	Sangre	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo Sierra Nevada de Santa Marta	11,1022	-74,0627	2379		
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	DhSN 2019	<i>D.h.nocticolor-SNSM2</i>	Sangre	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo Sierra Nevada de Santa Marta	11,1022	-74,0627	2379	02-abr-19	
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	SN9	<i>D.h.nocticolor-SNSM3</i>	Sangre	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo Sierra Nevada de Santa Marta	11,1027	-74,0618	2398		
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	GEEV	SN58	<i>D.h.nocticolor-SNSM4</i>	Sangre	Colombia	Magdalena	Cuchilla de San Lorenzo Sierra Nevada de Santa Marta	11,1022	-74,0627	2379	02-abr-19	
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	IAvH	11363	<i>D.h.nocticolor-Perijá1</i>	Tejido	Colombia	Cesar	Mun. Manaure, Vereda El Cinco El Cinco, Serranía de Perijá	10,3334	-72,9167	2525	11-jul-08	
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	IAvH	11382	<i>D.h.nocticolor-Perijá2</i>	Tejido	Colombia	Cesar	Mun. Manaure, Vereda Sabana Rubia, Serranía de Perijá	10,3781	-72,9300	3025	07-jul-08	
<i>Diglossa humeralis nocticolor</i>	Uniandes	T729	<i>D.h.nocticolor-Perijá3</i>	Tejido	Colombia	Cesar	Mun. Manaure	10,3561	-72,9331	2600	13-jul-08	

GEEV: Grupo de Ecología y Evolución de Vertebrados, IAvH: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, IZET-COP: Instituto de zoología y ecología tropical (IZET) y colección ornitológica Phelps (COP), LSUMZ B: Louisiana State University Museum of Zoology, MUUA; Museo de la Universidad de Antioquia, Uniandes: Universidad de los Andes.