

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Filogeografía de la Estrella Ecuatoriana (*Oreotrochilus chimborazo*)

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias
Biológicas

CARLOS ANTONIO RODRÍGUEZ S.

Quito, 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Carlos Antonio Rodríguez Saltos ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Tjitte de Vries

Director de la disertación

Quito, 12 de mayo de 2011

DEDICATORIA

A mi madre, la primera persona que me enseñó a poner todo en perspectiva y entenderlo bajo su propio contexto, un paso inicial muy importante para mi carrera científica.

A Freddy y Holger, los niños que llevan a pastar llamas junto a la montaña de los dragones en Apagua.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio contó con la ayuda de varios investigadores de distintas instituciones, y estudiantes de biología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la PUCE. En el trabajo de campo, agradezco especialmente a Daniela Bahamonde, Héctor Cadena, Jorge Antonio Castillo y Mayra Ninazunta, quienes participaron en la mayoría de salidas y cuyo interés por el tema de estudio se reflejó en un excelente desempeño, a pesar de las condiciones adversas que varias veces nos presentó el páramo. También tuve la colaboración imprescindible de Diego Alarcón, Elisa Bonaccorso, Diego Francisco Castro, Ana Lucía Charpentier, Gabriela Galarza, Mary Juiña, Paola García-Meneses, Andrea León, Belén Proaño, Camila Rodríguez, Martín Santacruz, Yamara Serrano, Janneken Sindram, Nicolás Tinoco, Mauricio Vargas, Almudena Vélez-Márquez y Santiago Yerovi. Hubo una ayuda significativa por parte de personas locales en cada sitio de estudio, colaborando en aspectos logísticos y proveyendo información útil sobre el acceso a los sitios de muestreo. Dos salidas de campo se hicieron dentro del plan de colecta para el proyecto “Caracterización Morfológica y Genética de Aves, Reptiles y Anfibios de los Andes de Ecuador”, ejecutado por el museo QCAZ y gestionado con fondos del Senacyt (Actualmente Senescyt), proyecto PI-C08-0000470. Agradezco al personal de campo del mencionado proyecto con quienes compartí esas salidas por su asistencia técnica y logística

En el laboratorio tuve la guía especial de María Eugenia Ordóñez, quien pacientemente ayudó a encontrar la solución a cualquier problema con el manejo de las muestras. También agradezco al personal del Laboratorio de Sistemática Molecular del

QCAZ y mis compañeros, también estudiantes de tesis, Diana Flores, Diego Páez, Marcel Caminer, Andrea Manzano y Gabriela Nicholls. Los primers para las reacciones de PCR fueron conseguidos gracias a Christopher Witt, investigador de la Universidad de Columbia, quien también se dedica al estudio de los colibríes altoandinos.

La información de sensores remotos fue accesible gracias a Pablo Menéndez, quien también dio importantes opiniones sobre la metodología, en lo referente a biogeografía. Varios investigadores fueron consultados respecto a distintos temas, agradezco a Niels Krabbe, Jody Hey, Robert Ridgely y a Santiago Ron por sus respuestas pertinentes. Los miembros de la Sociedad Quinto Pilar, en especial Daniel Romero y Roberto Vallejo, participaron en innumerables discusiones de biología y evolución que fueron invaluable para la comprensión de los conceptos involucrados en la presente investigación. Susana León-Yáñez, Alejandra Moscoso y Paola García-Meneses compartieron información muy útil sobre fitogeografía y ecología de páramos.

La constante comunicación con Diana Arzusa, administradora de las colecciones ornitológicas del QCAZ, fue muy importante para que los especímenes recibieran un trato adecuado y poder tener acceso en repetidas ocasiones. El personal del museo QCAZ supo crear el ambiente adecuado de trabajo para cualquier investigación, y valoro mucho la cooperación que hubo entre sus miembros, ya sea para esta u otras investigaciones.

Juan Manuel Guayasamín aportó considerablemente en el diseño de la investigación, y gracias a él pude contar con acceso a variadas fuentes de literatura sobre filogenética y biogeografía; Juan Manuel siempre demostró su entusiasmo por el proyecto opinando en diversas ocasiones sobre las posibles explicaciones de los resultados obtenidos o los análisis que podrían complementarlos. Juan Fernando Freile sugirió la

especie a ser estudiada para esta tesis, y además aportó con el acceso a varias fuentes importantes de información bibliográfica.

Finalmente, agradezco de manera muy especial a Elisa Bonaccorso, reconocida experta en el tema de filogenética de aves neotropicales. Elisa fue la directora de esta tesis hasta ya bien avanzada la investigación, y por lo tanto fue muy importante en todos los aspectos de la misma. Elisa siempre fue diligente en su función y conté con apoyo excepcional de su parte. No solo ha demostrado ser una excelente profesional, sino que también supo crear un ambiente ideal de cordialidad y apertura a discusión de ideas en el plano de lo académico y del desempeño de la investigación.

La presente investigación fue posible gracias las autorizaciones de investigación científica N° 008-09 IC-FAU-DNB/MA y N° 001-10 IC-FAU-DNB/MA emitidas por el Ministerio del Ambiente de Ecuador.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 ANTECEDENTES	5
3.1.1 LA FILOGEOGRAFÍA Y SUS VENTAJAS FRENTE A MÉTODOS TRADICIONALES DE GENÉTICA DE POBLACIONES	5
3.1.2 FILOGEOGRAFÍA EN LOS ANDES TROPICALES	7
3.2 JUSTIFICACIÓN	10
3.3 OBJETIVOS GENERALES	11
3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y MUESTRAS GENÉTICAS	13
4.2 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN	14
4.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	15
4.3.1 MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD	15
4.3.2 ESTIMACIÓN BAYESIANA	16

4.3.3	RED DE HAPLOTIPOS	18
4.4	GENÉTICA DE POBLACIONES	19
4.4.1	ANÁLISIS DE AISLAMIENTO Y MIGRACIÓN CON TEORÍA DE LA COALESCENCIA	19
4.5	MODELAMIENTO DE NICHOS Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	20
4.5.1	MODELAMIENTO AL PRESENTE, <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO</i>	21
4.5.2	MODELAMIENTO DE NICHOS AL PRESENTE, <i>CHUQUIRAGA JUSSIEUI</i>	22
4.5.3	PROYECCIÓN DEL MODELO DE <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO</i> AL ÚLTIMO MÁXIMO GLACIAL	23
5.	RESULTADOS	24
5.1	ESTADO DE LAS SECUENCIAS Y POLIMORFISMO GENÉTICO	24
5.2	ANÁLISIS FILOGENÉTICOS	25
5.2.1	GENES MITOCONDRIALES	25
5.2.2	EVIDENCIA TOTAL	26
5.3	REDES DE HAPLOTIPOS	27

5.4 TEORÍA DE LA COALESCENCIA, MODELO DE AISLAMIENTO Y MIGRACIÓN	28
5.5 MODELAMIENTO ECOLÓGICO DE NICHOS EN <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO</i>	29
5.5.1 MODELO CON VARIABLES PRESELECCIONADAS EN ENFA VS. MODELO SIN VARIABLES PRESELECCIONADAS	29
5.5.2 MODELAMIENTO DE NICHOS AL PRESENTE	29
5.5.3 PROYECCIÓN DEL MODELO EN LOS ANDES TROPICALES	31
5.5.4 ZONA DE CONTACTO ENTRE <i>O. C. CHIMBORAZO</i> Y <i>O. C. JAMESONII</i>	31
5.5.5 PROYECCIÓN DEL MODELO AL ÚLTIMO MÁXIMO GLACIAL	32
5.6 MODELAMIENTO DE NICHOS ECOLÓGICOS EN <i>CHUQUIRAGA JUSSIEUI</i>	32
5.6.1 MODELAMIENTO CON LOCALIDADES DE TROPICOS®	32
5.6.2 MODELAMIENTO CON LOCALIDADES REPORTADAS EN ESTE ESTUDIO	33
5.6.3 COMPARACIÓN DE LOS MODELOS DE <i>CHUQUIRAGA JUSSIEUI</i> Y <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO</i>	34

6. DISCUSIÓN	35
6.1 FILOGENIA DE <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO</i>, Y ALGUNAS CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS EN EL GÉNERO	35
6.2 ESTRUCTURA GEOGRÁFICA DE LOS LINAJES GENÉTICOS	38
6.3 RELACIÓN BIOGEOGRÁFICA ENTRE <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO</i> Y <i>CHUQUIRAGA JUSSIEUI</i>	41
6.4 DIVERGENCIA ENTRE <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO JAMESONII</i> Y <i>OREOTROCHILUS CHIMBORAZO CHIMBORAZO</i>	43
6.4.1 TIEMPO DE DIVERGENCIA Y TASA DE MIGRACIÓN	43
6.4.2 RANGOS DE DISTRIBUCIÓN DE AMBAS SUBESPECIES EN EL PASADO	45
6.4.3 HIBRIDIZACIÓN: EL ORIGEN DE <i>O. C. SOEDERSTROMI</i> ?	48
7. CONCLUSIONES	50
8. RECOMENDACIONES	53
9. BIBLIOGRAFÍA	56

10. FIGURAS	68
11. TABLAS	91
12. ANEXOS	99

LISTA DE FIGURAS

- 1.- Colibríes *Oreotrochilus chimborazo* y *Oreotrochilus estella stolzmanni*.
- 2.- Localidades visitadas durante el estudio.
- 3.- Filograma basado en el árbol bayesiano de los genes mitocondriales.
- 4.- Filograma basado en el árbol bayesiano de la evidencia total.
- 5.- Red de haplotipos de *Oreotrochilus chimborazo*, *O. estella stolzmanni* y *O. melanogaster* con la evidencia total.
- 6.- Redes de haplotipos de *Oreotrochilus chimborazo* y *O. estella stolzmanni* con los genes mitocondriales y con MUSK.
- 7.- Resultados del Análisis de Aislamiento y Migración para cuatro corridas. Tasa de migración.
- 8.- Resultados del Análisis de Aislamiento y Migración para cuatro corridas. Tiempo de separación.
- 9.- Resultados del Análisis de Aislamiento y Migración para cuatro corridas. Coalescente.
- 10.- Mapa predictivo de distribución geográfica de *Oreotrochilus chimborazo* en base a modelamiento en MaxEnt con reducción previa de variables en base a ENFA.
- 11.- Mapa predictivo de distribución geográfica de *Oreotrochilus chimborazo* en base a modelamiento en MaxEnt con las 19 variables bioclimáticas de WorldClim.
- 12.- Mapa predictivo de la distribución geográfica de *Oreotrochilus chimborazo* al presente, en base a sensores remotos y datos bioclimáticos.

- 13.- Mapa predictivo de la distribución geográfica de *Oreotrochilus chimborazo* en los Andes Tropicales.
- 14.- Evidencia de posible zona de contacto entre *O. c. jamesonii* y *O. c. chimborazo*.
- 15.- Proyección del modelo de *Oreotrochilus chimborazo* al LGM (Último Máximo Glacial).
- 16.- Mapa predictivo de distribución geográfica en base a modelamiento de nicho de *Chuquiraga jussieui* con datos bioclimáticos y localidades de la base de datos Tropicos®.
- 17.- Mapa predictivo de la distribución de *Chuquiraga jussieui* en base a localidades reportadas para este estudio y capas bioclimáticas.
- 18.- Mapa predictivo de la distribución de *Chuquiraga jussieui* en base a localidades reportadas para este estudio, capas bioclimáticas y capas de sensores remotos.
- 19.- Contribución de cada capa bioclimática o de sensores remotos a los dos primeros componentes del ACP de los valores ambientales de los puntos aleatorios de las distribuciones potenciales de *Oreotrochilus chimborazo* y *Chuquiraga jussieui*.
- 20.- Distribución de los puntos aleatorios del rango geográfico potencial de *O. chimborazo* y *C. jussieui* en los dos primeros componentes del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las capas bioclimáticas y de sensores remotos a la largo de zonas potencialmente habitadas por al menos una de las especies.
- 21.- Comparación de los mapas predictivos de las distribuciones de *Oreotrochilus chimborazo* y *Chuquiraga jussieui*.
- 22.- Posible polimorfismo en colibríes de El Cajas.

LISTA DE TABLAS

- 1.- Localidades visitadas durante el estudio.
- 2.- Especímenes de *Oreotrochilus chimborazo* y *Oreotrochilus estella* recolectados durante el presente estudio.
- 3.- Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π), y sus respectivas desviaciones estándar, para cada gen mitocondrial estudiado y la combinación de ambos en cada subespecie de *Oreotrochilus chimborazo*, y para la especie en general.
- 4.- Resultados de tres pruebas de detección de desviación de neutralidad en la evolución de las secuencias: D de Tajima, D^* de Fu y Li y F^* de Fu y Li
- 5.- Valores del modelo de sustitución según el árbol de Máxima Verosimilitud.

1. RESUMEN

La Estrella Ecuatoriana, *Oreotrochilus chimborazo*, se cree que está conformada por un complejo de poblaciones con distintas tendencias evolutivas, debido al carácter fragmentado del páramo que habita, y a la presencia de tres subespecies distinguibles en pequeño rango de distribución. Esta suposición fue puesta a prueba reconstruyendo la filogeografía de la especie utilizando métodos de máxima verosimilitud, análisis bayesiano, redes de haplotipos de máxima parsimonia y un análisis de aislamiento y migración (IMa) entre las subespecies *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii*. Se secuenciaron tres genes, los mitocondriales ND2 y ND4, y el intrón nuclear MUSK. Se muestrearon individuos en 11 localidades, dispersas en la mayor parte del rango de distribución. Se generó un modelo de nicho ecológico, en MaxEnt, a partir de datos bioclimáticos y de sensores remotos; los resultados se compararon con un modelo de *Chuquiraga jussieui*, que posiblemente es una fuente necesaria de néctar.

No se encontró evidencia de un patrón geográfico–genético en *Oreotrochilus chimborazo*, y los árboles filogenéticos no se resolvieron para la mayor parte de poblaciones; sin embargo, se encontraron señales de una posible divergencia para las poblaciones de El Ángel y El Cajas. Las relaciones filogenéticas dentro del género no fueron consistentes con la taxonomía; *O. estella stolzmanni* es más cercano a *O. melanogaster* que a *O. e. estella*, y por ello se propone separar ambas subespecies de *O. estella*. Las secuencias tampoco fueron informativas para IMa, resultando en un rango amplio de posibles valores para los parámetros estimados. Durante los trabajos de campo, se descubrió una posible zona de contacto para ambas subespecies, y al no haberse encontrado evidencia de la presencia de *O. c. soederstromi*, sugiero que ésta se trata de un híbrido. Se sugiere un tiempo muy reciente de divergencia entre ambas subespecies,

probablemente a causa de eventos climáticos del pasado, a pesar de que ya podrían estar bajo refuerzo de aislamiento reproductivo.

Palabras clave: Especiación, Estrella Ecuatoriana, Filogeografía, Modelamiento de Nicho Ecológico, *Oreotrochilus chimborazo*, Páramo andino, Sistemática, Teoría de la Coalescencia.

2. ABSTRACT

The Ecuadorian Hillstar, *Oreotrochilus chimborazo*, is a species believed to be composed of a complex of populations with different evolutionary trends, due to the “ecological island–complex” nature of the paramo it inhabits, and the presence of three distinct subspecies, despite its small range. This assumption was put into test by reconstructing the phylogeography of the species using Maximum Likelihood and Bayesian methods, Maximum Parsimony haplotype networks, and an Isolation and Migration Analysis (IMa) between two of the subspecies, namely *O. c. chimborazo* and *O. c. jamesonii*. Three genes were sequenced, the mitochondrial codifying genes ND2 and ND4, and the nuclear intron MUSK. Individuals were sampled from 11 localities, encompassing most of the species range. An Ecological Niche Modeling (ENM), based on maximum entropy analyses, was generated from bioclimatic and remote sensing variables; results were contrasted with the ENM for *Chuquiraga jussieui*, believed to be a necessary source of nectar.

No evidence was found to support geographical–genetic structure in *O. chimborazo*, and phylogenetic trees were unresolved for most populations; however, signs of a possible divergence were found for populations at El Ángel and El Cajas. Phylogenetic relationships within the genus were not consistent with taxonomy; *O. estella stolzmanni* was closer to *O. melanogaster* than to *O. e. estella*, and thus I propose that both species of *O. estella* should be split. Sequences were also uninformative for the IMa analysis, yielding a wide range of possible values for the estimated parameters. Interestingly, during field surveys, a possible contact zone was discovered for both subspecies, and since no evidence was found for the presence of *O. c. soederstromi*, I suggest that this subspecies could be the result of hybridization. A very recent split is

suggested for both subspecies, possibly linked to past climatic events, even though they could already be under reproductive isolation reinforcement.

Keywords: Andean paramo, Ecuadorian Hillstar, Ecological Niche Modelling, *Oreotrochilus chimborazo*, Systematics, Coalescence Theory, Speciation.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ANTECEDENTES

3.1.1 LA FILOGEOGRAFÍA, Y SUS VENTAJAS FRENTE A MÉTODOS TRADICIONALES DE GENÉTICA DE POBLACIONES

El paisaje geográfico tiene un papel fundamental en la generación de nuevos linajes evolutivos y en la formación de especies (Coyne y Orr, 2004). En el caso de las aves, la separación geográfica posiblemente está involucrada en el 99% de casos de especiación (Price, 2008). Por lo general, una barrera recién formada impide el intercambio de individuos que pertenecían a una misma población, resultando en poblaciones con distintas tendencias evolutivas. Aunque estas distintas tendencias evolutivas llegan a manifestarse en diferencias en la morfología o ecología de las poblaciones, generalmente es más fácil detectar rasgos de la divergencia a nivel de genotipo que de fenotipo (Coyne y Orr, 2004; Hamilton, 2009). Utilizando herramientas y sectores del genoma adecuados se puede reconstruir la historia de los linajes evolutivos y localizar en un plano temporal y espacial el evento de divergencia, con lo cual se puede evaluar el efecto de las barreras de dispersión.

La sistemática filogenética provee las herramientas necesarias para inferir la secuencia de divergencia en los linajes evolutivos y ha probado ser muy exitosa en el estudio de procesos macroevolutivos (Vandamme, 2009). Su implementación en genética de poblaciones tuvo un retraso significativo por la falta de métodos para sortear el problema de la recombinación genética, la cual junta aleatoriamente sectores del genoma con distinta historia evolutiva y borra importantes huellas del pasado de una población (Avice, 2000; Hamilton, 2009). Tradicionalmente, los estudios de genética de poblaciones sólo podían basarse en el análisis de frecuencias alélicas (e.g. aloenzimas, RFLP's), que por sí mismas no son útiles en la reconstrucción filogenética (Avice, 2000). En este tipo de

análisis la divergencia entre poblaciones se prueba en base a modelos matemáticos que explican el cambio en las frecuencias alélicas como respuesta a determinados eventos de la historia demográfica. Sin embargo, para que estos modelos puedan ser exitosos es necesario que las poblaciones cumplan con una serie de suposiciones difíciles de comprobar o no aplicables en la realidad (Avise, 2000; Hamilton, 2009). Por ejemplo, una suposición establece que haya un equilibrio entre las tasas de migración y de deriva génica, lo cual no se cumple en poblaciones con reciente tiempo de divergencia (Avise, 2000).

En la década de los setenta se descubrió la herencia materna, no recombinante, del ADN mitocondrial. Con la posibilidad real de la inferencia filogenética a nivel poblacional nació una nueva ciencia, la filogeografía (Avise, 2000). Actualmente, la filogeografía es un campo que recibe mucho interés en biogeografía, por las facilidades que brinda para conocer la historia de los linajes evolutivos en el espacio y el tiempo y poder evaluar los efectos de barreras geográficas o de eventos geológicos del pasado (Avise, 2000; Hickerson *et al.*, 2010). Ahora es mucho más fácil obtener información del ADN mitocondrial gracias a la difusión de la técnica de secuenciación automática (Hickerson *et al.*, 2010); además, gracias a los rápidos avances en biología molecular ya es posible contar otros sectores no recombinantes del genoma que permitan construir filogenias de más de un locus (todos los genes del ADN mitocondrial están ligados entre sí, actuando como un solo locus) que representen más acertadamente la auténtica historia de una población (Avise, 2000; Price, 2008; Vandamme, 2009; Hickerson *et al.*, 2010).

En base a la teoría de coalescencia es posible utilizar los árboles filogenéticos para inferir parámetros demográficos indicativos de cambios pasados en el tamaño efectivo de la población, asociados a eventos de pérdida o ganancia de diversidad genética (Kuhner, 2008; Hamilton, 2009; Rodrigo, 2009). En un árbol filogenético, cada nodo representa el instante en que distintos alelos coalescen en el pasado. El tiempo transcurrido entre el

evento de coalescencia y el presente es una función dependiente del tamaño eficiente de la población (Kingman, 1982; Hamilton, 2009; Rodrigo, 2009). Asumiendo una tasa de mutación en forma de reloj (fijo o relajado) la duración del intervalo entre determinados eventos de coalescencia puede ser calculada a partir de la longitud de las ramas del árbol (Drummond y Rambaut, 2009; Hamilton, 2009; Rodrigo, 2009). Sin embargo, cambios en la longitud de las ramas también pueden indicar selección natural, recombinación o migración (Rodrigo, 2009). Ante esta posibilidad, también se han desarrollado extensiones de la teoría de coalescencia que permiten estimar el efecto de estos factores dentro de un contexto estadístico, aunque con cierta dificultad en el caso de selección natural (Kuhner, 2008; Drummond y Rambaut, 2009; Rodrigo, 2009). La posibilidad de estimar la tasa de migración y el tiempo de divergencia ha posicionado a la teoría de coalescencia como una buena opción para evaluar estadísticamente el grado de divergencia entre poblaciones, de acuerdo a un modelo que no necesita de tantos requisitos como los métodos frecuentistas (Avice, 2000; Bloomquist *et al.*, 2010; Hickerson *et al.*, 2010).

3.1.2 FILOGEOGRAFÍA EN LOS ANDES TROPICALES

Los Andes tropicales son un escenario ideal para la práctica de la filogeografía. Forman parte de una cordillera joven en la que los dos tercios superiores de su elevación promedio, y sus correspondientes ecosistemas, fueron adquiridos dentro de los últimos 5 millones de años (van der Hammen, 1974; van der Hammen y Cleef, 1986; Gregory-Wodzicki, 2000), lo cual facilita rastrear la historia de los linajes genéticos. Pocos grupos se han estudiado en el continente con tanta atención como el de las aves (Fjeldså y Krabbe, 1990; Price, 2008), y la mayor parte de especies del continente se encuentran distribuidas en la región andina; de hecho, los Andes nororientales de Ecuador tienen la mayor cantidad de especies por unidad de área en el mundo (Fjeldså, 1994).

Se piensa que la elevada diversidad de los Andes está relacionada con su complejidad topográfica. La cordillera tiene numerosos valles que pueden actuar como barreras de dispersión, lo cual ha sido sugerido como un factor determinante en la diversificación de aves de bosques húmedos (Krabbe, 2008). El efecto de estas barreras podría incrementarse en zonas de mayor elevación, donde el área tiende a reducirse y los hábitats son más vulnerables a la fragmentación; por ejemplo, en colibríes del género *Metallura* se encontró que la diferenciación génica entre poblaciones que viven a la misma elevación aumenta a mayor elevación (García-Moreno *et al.*, 1999). La mayoría de linajes andinos son de origen reciente (Vuilleumier, 1986; Fjeldså, 1994), y muchos surgieron apenas en los últimos 2 millones de años (Price, 2008). Linajes tan jóvenes pueden ser el resultado de la fragmentación de las poblaciones debida a los fuertes procesos orográficos y geomorfológicos recientes y los ciclos de glaciación e interglaciación del Pleistoceno (Price, 2008; Graham, 2009); justamente, la filogeografía puede proveer el enfoque adecuado para corroborar muchas de estas posibilidades.

Hasta ahora, los estudios filogeográficos en la región andina se han concentrado en los bosques húmedos (Cadena *et al.*, 2007; Chaves *et al.*, 2007; Bonaccorso, 2009); sin embargo, existen otros ecosistemas que a pesar de no ser tan diversos pueden proveer interesantes perspectivas sobre la interacción de los organismos con su entorno geográfico. Un ejemplo de ello lo constituyen los páramos, que se distribuyen a lo largo de una estrecha franja longitudinal interrumpida por numerosas depresiones topográficas, formando “islas ecológicas”, con sus respectivos grupos endémicos de animales y plantas (Moret, 2005; Hughes y Eastwood, 2006).

Ecuador tiene una vasta superficie de páramos repartida en 9 unidades fisiográficas o conjuntos de islas ecológicas cercanas que comparten comunidades bióticas similares (Beltrán *et al.*, 2009). La Estrella Ecuatoriana (*Oreotrochilus chimborazo*) es un colibrí

que habita 8 de ellas, desde El Ángel y el volcán Chiles en el norte, hasta El Cajas en el sur (Ortiz-Crespo y Bleiweiss, 1982; Fjeldså y Krabbe, 1990; Ridgely y Greenfield, 2001). Debido a que el colibrí también habita el lado colombiano del volcán Chiles no se considera como endémico político (Salaman y Mazariegos, 1998). Se encuentra en páramos de pajonal, almohadillas y arenales sobre los 3500 m, donde su presencia está asociada a grupos de arbustos de *Chuquiraga jussieui*, a la que acude como fuente de néctar y que muy probablemente poliniza. Aunque en la literatura se menciona repetidas veces que prefiere páramos áridos o secos (Ortiz-Crespo y Bleiweiss, 1982; Fjeldså y Krabbe, 1990; Ridgely y Greenfield, 2001), hasta ahora no existen datos cuantitativos que sustenten esta afirmación.

La Estrella Ecuatoriana puede ser una especie modelo en filogeografía de páramos; en su pequeño rango de distribución se han descrito 3 subespecies, cuya existencia podría deberse a la influencia de la fragmentación natural de su hábitat (Ridgely y Greenfield, 2001). El renombrado biogeógrafo Alfred Russel Wallace, comentó la diferenciación en las poblaciones de esta especie como “uno de los más maravillosos casos de rangos restringidos”, recalcando el hecho de que los volcanes Chimborazo y Pichincha cuentan cada uno con una subespecie distinta (Wallace, 1895). Las subespecies y sus respectivos rangos de distribución son: *Oreotrochilus chimborazo chimborazo*, en los páramos aledaños al volcán Chimborazo; *O. c. soederstromi*, en el Volcán Quilotoa y *O. c. jamesonii*, en los otros páramos (Fjeldså y Krabbe, 1990; Ridgely y Greenfield, 2001). No se conoce ninguna localidad de simpatría entre subespecies, aunque es posible que *soederstromi* sea un híbrido (Fjeldså y Krabbe, 1990). Sólo existe un carácter que varía entre las tres subespecies y permite diagnosticarlas, el color de las plumas de la garganta. En *O. c. jamesonii*, éstas son azul-violeta iridiscentes (al igual que el resto de plumas en la cabeza y cuello, formando un conjunto uniforme), en *O. c. chimborazo*, verde iridiscentes

(Figura 1) y en *O. c. soederstromi*, descrito a partir de un solo individuo, tiene siete plumas de color verde iridiscente inmiscuidas en el azul-violeta (Chapman, 1926; Fjeldså y Krabbe, 1990; Ridgely y Greenfield, 2001).

3.2 JUSTIFICACIÓN

Un análisis filogeográfico puede evaluar las hipótesis del efecto de las barreras geográficas en esta especie. También puede analizar la contribución de otros eventos, como las glaciaciones (Milá *et al.*, 2000), que se sabe que tuvieron un efecto importante para modelar las comunidades en el Pleistoceno (van der Hammen y Cleef, 1986; Hooghiemstra *et al.*, 2006). Si los valles están provocando diversificación en esta especie, cabe cuestionarse si la subespecie de más amplia distribución, *O. c. jamesonii*, representa un conjunto de distintos linajes crípticos definidos por estos límites geográficos.

La taxonomía del colibrí y su relación con otras especies del mismo género también ha sido objeto de debate, por lo que es importante contribuir con información que permita determinar la monofilia de la especie. *Oreotrochilus chimborazo* fue anteriormente considerada como conspecífica a *O. estella*, de Perú y Bolivia, en función de un gradiente clinal de variación en el plumaje (Ridgely y Greenfield, 2001). Las hembras de ambas especies son indistinguibles; el macho de *O. estella* tiene la cabeza de color verde oliva, con iridiscencia únicamente en las plumas de la garganta, que son verdes (Fjeldså y Krabbe, 1990; Ridgely y Greenfield, 2001). Excluyendo a la población de El Cajas, la descripción morfológica parecería ser coherente con el gradiente: en un extremo se tendrían a machos de cabeza azul (desde Carchi hasta los Illinizas), y en el otro a machos de cabeza verde (*O. estella*, en Perú), con la población del volcán Chimborazo presentando un plumaje intermedio. Sin embargo, en la década de los ochenta se descubrió una población grande de *O. c. jamesonii* en El Cajas, al sur del Chimborazo, lo cual

contradecía la existencia de este gradiente (Ridgely y Greenfield, 2001). De todas formas, la presencia de al menos una subespecie que comparte un caracter con una especie considerada como hermana (el verde de la garganta entre *O. chimborazo chimborazo* y *O. estella*) levanta sospechas acerca de las relaciones filogenéticas entre los taxones involucrados; no sería sorprendente que un estudio genético cuestione la monofilia de una especie (Cadena *et al.*, 2007; Sanín *et al.*, 2009). Además, contar con un buen conocimiento sobre la historia evolutiva es el primer paso antes de progresar en análisis más complejos.

A futuro, se pueden ejecutar proyectos similares para otras especies, sean o no aves, y hacer análisis comparativos, junto con los ya realizados, para encontrar patrones de diversificación en los altos Andes y los páramos. Un estudio de este tipo sería prioritario para conocer cómo se origina y mantiene la diversidad en una región tan importante a nivel mundial. Las implicaciones de estos estudios rebasan los límites del alcance de la biogeografía, e incluso influenciar programas en biología de la conservación, por ejemplo, mediante la propuesta de sitios prioritarios para la conservación que destaquen por su endemismo de linajes genéticos.

3.3 OBJETIVOS GENERALES

a) Reconstruir la historia evolutiva de los linajes de *Oreotrochilus chimborazo* en el espacio y el tiempo.

b) Evaluar el rol de factores ecológicos, geológicos, geográficos y climatológicos en la distribución geográfica actual de la especie.

3.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Elaborar una filogenia de *Oreotrochilus chimborazo* a nivel de poblaciones, utilizando como unidades taxonómicas operativas a individuos que representen la variabilidad genética de la especie en todo su rango de distribución. Identificar grupos monofiléticos y evaluar el status taxonómico de las subespecies.

2) Evaluar la situación taxonómica de *Oreotrochilus chimborazo* frente a otras especies del mismo género con base en la filogenia.

3) Analizar la distribución de los linajes en el espacio geográfico para hallar posibles efectos de barreras geográficas, como los valles que cruzan los páramos.

4) Si se reconocieran poblaciones aisladas en los análisis filogenéticos o de distribución geográfica, obtener una medida estadística de divergencia entre las mismas utilizando procedimientos derivados de la teoría de la coalescencia; en especial, estimar los parámetros de tiempo de divergencia y tasa de migración.

5) Analizar los límites ecológicos y geográficos en la distribución de *Oreotrochilus chimborazo*, y la contribución de factores abióticos (i.e. precipitación) y bióticos (i.e. asociación con *Chuquiraga jussieu*).

6) Proyectar la distribución de *Oreotrochilus chimborazo* al pasado, durante el último máximo glacial (LGM, por sus siglas en inglés), y analizar la contribución de esta distribución pasada en la actual distribución de linajes evolutivos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 RECOLECCIÓN DE ESPECÍMENES Y MUESTRAS GENÉTICAS

Se recolectaron especímenes de *Oreotrochilus chimborazo* en 11 localidades del país, incluyendo una localidad en la zona donde se encuentra *O. c. chimborazo*. No se encontró ningún individuo de *O. c. soederstromi* y no se pudo contar con esta subespecie en el análisis; en su lugar se encontraron sólo individuos de *O. c. jamesonii* cerca al Quilotoa, y tres especímenes de estos fueron usados en el estudio. Adicionalmente, se recolectaron especímenes de *O. estella* (grupo externo) en una localidad al sur del Ecuador. Se visitó al menos una localidad por unidad fisiográfica de páramo (Figura 2, Tabla 1), según el mapa de Beltran *et al.* (2009), en un promedio de 4 días por sitio.

Para capturar los colibríes se instalaron redes de neblina alrededor de arbustos de *Chuquiraga jussieui*; en promedio se usaron ocho redes por sitio, con dimensiones de 12 × 3 m cada una. Los colibríes fueron sacrificados por medio de compresión torácica; inmediatamente después, se los pesó y examinó para registrar datos de características difíciles de conservar en especímenes de museo (e.g. color de iris, patas, pico) de acuerdo a un procedimiento estandarizado en el Museo de Zoología de Vertebrados (QCAZ) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Para los estudios genéticos se cortó una muestra delgada de ~2 cm de largo del músculo pectoral mayor, que fue depositada en un tubo de 1,5 ml con etanol al 95%. Los cuerpos, guardados dentro de fundas individuales con sellado hermético, y los tubos fueron transportados al museo dentro de cajas frías con hielo. Todos los especímenes fueron depositados en QCAZ y registrados en su base de datos (Tabla 2).

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN, PCR Y SECUENCIACIÓN

El ADN fue extraído siguiendo un protocolo basado en lisis por tiocianato de guanidina y precipitación con lavados de etanol, isopropanol (M. Fujita, no publicado) y acetato de sodio. La concentración de ADN se midió con un espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 v. 3.7 (Thermo Scientific), y su calidad se evaluó mediante electroforesis y tinción con SYBR® Safe (Invitrogen) en gel de agarosa al 1%. A partir de las soluciones madre se prepararon alícuotas de 15 ng/ul para ser usadas en las reacciones de PCR.

Se amplificaron 3 genes por cada muestra, 2 mitocondriales codificantes, ND2 y ND4 (NADH deshidrogenasa, subunidades dos y cuatro; ND4 incluye secuencias de tRNA flanqueante), y un intrón nuclear, MUSK (quinasa músculo específica, intrón 3). Se utilizaron distintos protocolos de PCR para cada gen (Anexo 1). El éxito de la reacción fue probado con una electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con SYBR® Safe, buscando bandas con el tamaño previsto para el amplificado, según secuencias amplificadas con los mismos primers en especies relacionadas y publicadas en GenBank (ND2: 1041 pb; ND4: 912 pb; MUSK: 662 pb). Para descartar cualquier problema de contaminación, se utilizó un control negativo (coctel de reacción sin ADN) en todas las reacciones.

Los productos de las reacciones de PCR fueron purificados con ExoSap-IT (GE Healthcare) y enviados a los laboratorios Macrogen en Corea del Sur para su secuenciación. Macrogen prepara las muestras utilizando los reactivos en la mezcla BigDye™ Terminator (Applied Biosystems), bajo condiciones de ciclado estandarizadas; luego las purifica por precipitación con etanol y las corre en un ABI 3730XL (Applied Biosystems). Los cromatogramas y las secuencias fueron entregados en archivos de varios formatos a través de una cuenta institucional en Internet a nombre del museo QCAZ.

Mediante el programa Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation, 2007) se editaron las secuencias para examinar discrepancias entre las dos cadenas de nucleótidos o corregir errores en la interpretación automática del cromatograma. El alineamiento se realizó de forma automática en Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Para resumir la variabilidad genética en *O. chimborazo* se estimaron índices de diversidad nucleotídica y haplotípica por cada gen y subespecie.

4.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

4.3.1 MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD

El método de máxima verosimilitud (MV) estima el árbol filogenético que mejor se ajusta a los datos dado un modelo evolutivo (Holder y Lewis, 2003). El modelo se compone por parámetros que describen distintas facetas del proceso evolutivo, como la probabilidad de sustitución de un nucleótido por otro o la probabilidad de sustitución de un nucleótido según la posición en la secuencia (Schmidt y von Haeseler, 2009).

La búsqueda del árbol de máxima verosimilitud y la estimación de los parámetros del modelo se realizaron con el programa GARLI 1.0 (Zwickl, 2006). Los parámetros a estimarse se seleccionaron previamente con JModelTest (Guindon y Gascuel, 2003; Posada, 2008) en base al criterio de información de Akaike (Posada y Buckley, 2004). Para evaluar el soporte estadístico de cada clado se utilizó la función de *bootstrap* o remuestreo, incluida en GARLI. La prueba consiste en generar 100 pseudo-réplicas de la matriz de datos (alineamiento de secuencias, cada una con una extracción al azar y reemplazo en una secuencia) someter cada una de las matrices al mismo proceso de estimación que la original, obteniéndose un árbol por cada pseudo-réplica. En Mesquite (Maddison y Maddison, 2010), se obtuvo un árbol consenso (50% Majority-Rule Consensus) de los 100 árboles filogenéticos. Se consideraron con buen soporte aquellos clados representados en

un 70% de los árboles (Hillis y Bull, 1993). No se realizaron particiones en los datos para evitar errores de sobreparametrización (Steel, 2005) con los pocos datos disponibles.

4.3.2 ESTIMACIÓN BAYESIANA

Los resultados de máxima verosimilitud son puntajes que no pueden ser integrados para obtener la probabilidad de cada uno de los parámetros del modelo por separado; el problema radica en que el resultado de MV no es la probabilidad de que el modelo sea cierto (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Holder y Lewis, 2003; Schmidt y von Haeseler, 2009). En un modelo evolutivo hay pocos parámetros de interés en filogenética (e.g. topología del árbol y longitud de sus ramas), el resto son parámetros *nuisance* (e.g. parámetros del modelo de sustitución de las bases), que a pesar de todo son necesarios en los cálculos de verosimilitud (Holder y Lewis, 2003). A través de estimación bayesiana, y el proceso de marginalización de parámetros, es posible hallar los valores de probabilidad de sólo los parámetros de interés y averiguar su tasa de cambio cuando hay pequeñas variaciones en los valores de los parámetros *nuisance*. La estimación bayesiana puede lograr esto gracias a que encuentra la probabilidad posterior del modelo en base a la verosimilitud y la probabilidad *a priori* del mismo (Huelsenbeck *et al.*, 2001; Ronquist *et al.*, 2009). Con la marginalización es posible encontrar otros sectores de alta probabilidad en el paisaje de parámetros ocupados por un modelo en particular, a pesar de que éste nunca llegue a ocupar el punto máximo; metafóricamente se puede decir que con inferencia bayesiana se escoge a un árbol en base al volumen que ocupa en el paisaje de parámetros, más que a su altura como sucede en MV (Holder y Lewis, 2003).

Aparte de la ventaja de poder estimar los valores de probabilidad de cada parámetro por separado, la estimación bayesiana ha ganado fama por el algoritmo que generalmente emplea, las Cadenas Markov Monte–Carlo con criterio de optimalidad Metropolis–Hasting

(MHMCMC, por sus siglas en inglés). El algoritmo se comporta como una cadena que se extiende a través del paisaje de parámetros, buscando las regiones de mayor probabilidad. Este espacio virtual puede ser comparado con un paisaje montañoso, en el que las coordenadas geográficas se ven representadas por los posibles valores que pueden ocupar los parámetros del modelo y la elevación por la probabilidad de cada posible estado del modelo de acuerdo a los datos (Ronquist *et al.*, 2009). Cada vez que la cadena visita un nuevo sector del paisaje lo compara con el anterior y decide si avanzar o no en base a su probabilidad, avanzando siempre que sea más alta que la del anterior; si la probabilidad es menor, la cadena podría o no aceptar el nuevo estado, de acuerdo con el criterio de optimalidad (Ronquist *et al.*, 2009). Entre menor sea la diferencia de probabilidad con el estado anterior, más probable es que acepte el nuevo estado. Esta característica, que desliga a la cadena de ser una “escaladora estricta”, es muy valiosa cuando los datos no son muy informativos o cuando hay sobreparametrización; en tales casos el paisaje de parámetros tiende a estar lleno de picos menores que pudieran confundir la búsqueda del pico superior (Holder y Lewis, 2003). El criterio de optimalidad está construido de tal forma que si la cadena se encontrara en el sector de mayor probabilidad, ésta dejaría de avanzar hacia otras regiones. Si la cadena exhibiese este comportamiento, habrá llegado a su fase estacionaria. El tiempo que la cadena acepte a un modelo dentro la fase estacionaria es directamente proporcional a la probabilidad posterior del modelo (Ronquist *et al.*, 2009).

Para el presente estudio, se hizo una estimación bayesiana de la filogenia de *Oreotrochilus chimborazo* en el programa MrBayes (Huelsenbeck *et al.*, 2001). Los criterios *a priori* escogidos fueron los menos informativos y más uniformes posibles, para evitar subjetividad en el análisis. La corrida se alargó durante 1'000.000 de generaciones, con *burn-in* de 5.000 árboles, y los modelos fueron registrados cada 20.000 generaciones. Paralelamente, se realizó otra corrida con distinto punto de inicio para buscar convergencia

en las cadenas. La convergencia entre ambas corridas se evaluó mediante la desviación estándar de la frecuencia de divisiones entre ambas muestras de árboles, que debía ser menor a 0,01 para ser válida (Ronquist *et al.*, 2009). Finalmente, MrBayes generó un árbol consenso entre todos los árboles de la muestra de la fase estacionaria. Los clados que se consideraron con buen soporte fueron aquellos con una probabilidad posterior superior a 0.95.

4.3.3 RED DE HAPLOTIPOS

Las redes de haplotipos constituyen una alternativa práctica de estimación filogenética cuando se prevé que las relaciones entre las poblaciones no son dicotómicas y comparten haplotipos debido a un tiempo corto de divergencia o a migraciones (Avice, 2000; Bloomquist *et al.*, 2010). La red puede interpretarse como un diagrama que muestra las relaciones filogenéticas entre haplotipos, pero, al contrario de un árbol filogenético, los haplotipos ocupan el lugar de los nodos; por ello, para que el diagrama sea real, los haplotipos no deben sobrepasar un determinado límite de distancia genética. La mayor utilidad de una red es su facilidad para ser sobrepuesta a un mapa de distribución geográfica, y así tener una visualización clara sobre la conexión genética entre poblaciones (Bloomquist *et al.*, 2010).

En términos biológicos, la forma correcta de interpretar los resultados de una red de haplotipos es un tema debatido (Templeton, 2004; Beaumont y Panchal, 2008; Bloomquist *et al.*, 2010). En la actualidad existen métodos estadísticamente más poderosos que las redes de haplotipos para analizar divergencia poblacional (e.g. Análisis de Migración y Aislamiento, IM), y que además incorporan teoría de la coalescencia en sus procedimientos (Avice, 2000; Kuhner, 2008; Hickerson *et al.*, 2010). Sin embargo, la red de haplotipos puede ser útil como un paso inicial para definir poblaciones *a priori* para estudios de

coalescencia.

La red se construyó utilizando TCS 2.1 (Clement *et al.*, 2000) bajo el criterio de máxima parsimonia. El límite de conectividad genética se fijó en un 95%, siguiendo recomendaciones de los autores. Se utilizaron todas las secuencias de *Oreotrochilus chimborazo* y *O. estella*, además de secuencias de *O. melanogaster*, obtenidas de GenBank (números de acceso GU166866 y GU166854; Kirchman *et al.*, 2010).

4.4. GENÉTICA DE POBLACIONES

4.4.1. ANÁLISIS DE AISLAMIENTO Y MIGRACIÓN CON TEORÍA DE LA COALESCENCIA

Se utilizó el programa IMA (Hey y Nielsen, 2004; Geraldès *et al.*, 2006; Hey y Nielsen, 2007) para inferir el tiempo de divergencia y la tasa de migración entre *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii*. El uso de este programa es recomendado en poblaciones con tiempo reciente de divergencia, para las que una prueba de F_{st} no convendría debido a la escasa probabilidad de que hayan llegado a una situación de equilibrio en su deriva génica y migración (Avice, 2000; Kuhner, 2008). IMA emplea Cadenas de Markov Monte Carlo, e incorpora en el modelo evolutivo los parámetros coalescente θ (Rodrigo, 1999), tasa de migración de la población 1 a la 2, tasa de migración de la población 2 a la 1 y tiempo de divergencia (Hey y Nielsen, 2004; 2007).

En una fase de prueba, se construyeron varias cadenas de Markov con bajo número de generaciones para explorar los valores de ESS (Tamaño de la Muestra Efectiva, por sus siglas en inglés), que indican el ingreso en la fase estacionaria cuando $ESS > 150$, y las gráficas de probabilidades marginales de cada parámetro; con ello fue posible determinar el número mínimo adecuado de generaciones de la cadena y los valores *a priori* máximos para los parámetros. Finalmente, se trabajó con un número de 2,8 millones de generaciones

para la cadena, *burn-in* de 100 mil generaciones, muestreo cada 10 mil generaciones y los siguientes valores máximos para los parámetros: Tiempo de separación, 15 años \times (pb / año); coalescente *O. c. jamesonii*, 90 individuos \times (pb / año); coalescente *O. c. chimborazo*, 10 individuos \times (pb / año); tasa de migración *O. c. jamesonii* a *O. c. chimborazo*, 2000 individuos \times (pb / año); tasa de migración *O. c. chimborazo* a *O. c. jamesonii*, 500 individuos \times (pb / año). Se hicieron tres repeticiones del análisis para evaluar la convergencia de las cadenas.

4.5. MODELAMIENTO ECOLÓGICO DE NICHO Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

4.5.1. MODELAMIENTO DE NICHO AL PRESENTE, *OREOTROCHILUS*

CHIMBORAZO

Se empleó el programa MaxEnt (Phillips *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2006) para el modelamiento de nicho. Las capas ambientales usadas correspondieron a 19 variables de temperatura y precipitación (Anexo 2) de la base de datos WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005), con un ancho de pixel equivalente a 30 arcsecs (~1 km). Las capas fueron cortadas para trabajar a nivel de Ecuador. Se ingresaron 15 localidades en el análisis, las visitadas y una reportada en la literatura, en las Lagunas de Antojos (Benítez *et al.*, 2000); para evitar autocorrelación espacial, se escogió el mayor número de localidades disponibles que no se solapaban en un radio de 5 km. Todas las coordenadas estuvieron especificadas bajo el datum World Geodetic System 1984 (WGS84).

En vista de un posible problema de sobreparametrización (19 variables de las capas vs. 16 localidades) se hizo una reducción de variables por medio de ENFA en Biomapper (Hirzel *et al.*, 2009). ENFA construye un árbol UPGMA que agrupa las variables según la similitud en la distribución de sus valores a lo largo de un espacio geográfico determinado.

En el árbol se escogió un umbral de similitud sobre el cual las variables se considerarían como correlacionadas de tal forma que se pudiera obtener el mayor número posible de variables independientes sin llegar a rebasar el número de localidades. MaxEnt también tiene una función que puede disminuir los efectos de la sobreparametrización de forma automática (Elith *et al.*, 2011); por esta razón, también se corrió un análisis utilizando las 19 variables para comparar el modelo resultante con aquel generado tras la reducción de variables y así escoger la estrategia más eficaz para ejecutar el resto de análisis.

Los páramos han sido sujetos a un largo historial de deforestación y sobrepastoreo (Lægaard, 1992; Podwojewski *et al.*, 2002); además, la edafología también tiene un papel importante en definir el tipo de hábitat (Lauer *et al.*, 2001). En consideración de estos factores se generó otro modelo incorporando información acerca del estado de la vegetación en los páramos por medio de capas ambientales basadas en lecturas de sensores remotos. Las capas satelitales fueron LAI I, II y III (Myneni *et al.*, 2002); TREE (Hansen *et al.*, 2002); QSCAT, promedio y desviación estándar (Long *et al.*, 2001); NDVI; y SRTM, todas del año 2002. Las capas LAI y TREE son productos derivados de la información recolectada por el satélite MODIS que representan el área de superficie terrestre ocupada por hojas verdes y la cobertura de árboles (Buermann *et al.*, 2008). QSCAT recoge información de escaterometría satelital de microondas, que funciona bajo el mismo principio de un radar; diferencias en la señal detectada por QSCAT están relacionadas con distintos niveles de rugosidad o humedad en el suelo (Long *et al.*, 2001; Buermann *et al.*, 2008). El SRTM es una capa de topografía que muestra la elevación media de cada pixel (Buermann *et al.*, 2008). La resolución de todas las capas fue de 1 km por pixel. Se corrió un análisis con sensores remotos únicamente y otro junto con información de sensores remotos, aparte del análisis con capas bioclimáticas. Para evaluar el soporte estadístico que los datos dan al modelo, se hizo una prueba de validación

cruzada para modelos con menos de 25 localidades (Pearson *et al.*, 2006). Finalmente, para contrastar la contribución de la ecología y la historia biogeográfica en la distribución de *O. chimborazo* se corrió un modelo usando capas con las mismas variables climáticas para un área mayor de Sudamérica, que incluía los Andes desde Venezuela hasta Bolivia.

4.5.2. MODELAMIENTO DE NICHOS AL PRESENTE, *CHUQUIRAGA JUSSIEUI*

Para evaluar la posible relación entre la distribución de *Oreotrochilus chimborazo* y la de *Chuquiraga jussieui*, se ejecutó un modelo predictivo y luego se compararon ambos modelos por medio de una prueba binomial exacta entre las áreas geográficas predichas por ambos modelos (Martínez-Meyer y Peterson, 2006); de esta manera, se pone a prueba si el modelo de *Oreotrochilus chimborazo* puede predecir los puntos de *Chuquiraga jussieui* mejor que al azar, y viceversa. Además, se realizó un ACP (Análisis de Componentes Principales) con enfoque en el espacio ambiental que ocupan las zonas predichas, el cual se realizó en R (R Development Core Team, 2011) con puntos al azar extraídos de los mapas potenciales de distribución de cada especie en base a una rejilla de puntos con 5 km de distancia entre cada uno. El modelo de *C. jussieui* fue construido en base a 20 localidades visitadas durante este estudio, y una reportada en la literatura (Laguna de Antojos), donde se había registrado tanto a *Oreotrochilus chimborazo* como a *Chuquiraga jussieui* (Benítez *et al.*, 2000).

Se ejecutó un modelo con 56 localidades de *Chuquiraga jussieui* de la base de datos Tropicos[®] (<http://www.tropicos.org>); algunos registros de esta base correspondían a plantas conseguidas en mercados de ciudades cercanas a los páramos, mas no en ellos, y por lo tanto fueron descartadas en el análisis. Aun así, la distribución geográfica predicha por este modelo incorpora áreas no apropiadas para la especie, como ciertos valles interandinos (véase Resultados); por ello se sospecha que hubo otras localidades con

coordenadas geográficas incorrectas y se decidió trabajar únicamente con las localidades visitadas dentro de este estudio donde se registró a *Chuquiraga*. No se considera que haya un problema respecto a la identificación de la especie porque en los registros de Tropicos[®] se reportan esas mismas localidades, visitadas por otros investigadores. Se utilizaron las mismas capas ambientales que para *Oreotrochilus chimborazo*, y se construyeron dos modelos, uno solo con las capas bioclimáticas y otro con inclusión de capas derivadas de sensores remotos. La validación cruzada se realizó con la misma prueba de Pearson *et al.* (2006).

4.5.3 PROYECCIÓN DEL MODELO DE *OREOTROCHILUS CHIMBORAZO* AL ÚLTIMO MÁXIMO GLACIAL

Para conocer la distribución de *O. chimborazo* en el pasado, lo cual pudo haber tenido una influencia significativa en la distribución actual de los linajes genéticos, se hizo una proyección del modelo de MaxEnt de *Oreotrochilus chimborazo* en capas que describen el clima del Último Máximo Glacial del Pleistoceno (LGM, por sus siglas en inglés; 21000 años atrás) con respecto a las 19 variables de WorldClim. Se hicieron 2 proyecciones: una con el modelo CCSM (Collins *et al.*, 2004) y la otra con Miroc (Hasumi y Emori, 2004). La resolución empleada para la proyección fue de 2,5 km de ancho de pixel.

5. RESULTADOS

5.1 ESTADO DE LAS SECUENCIAS Y POLIMORFISMO GENÉTICO

Los datos de los genes secuenciados para cada espécimen, y sus correspondientes haplotipos, se resumen en la Tabla 2. En casi todos los casos se pudo secuenciar la totalidad del gen, salvo en algunos casos donde fue difícil recuperar el primer nucleótido de ND2. La diversidad de *Oreotrochilus chimborazo* en estos genes fue baja. Los genes mitocondriales fueron los que presentaron la mayor cantidad de posiciones variables, cinco en ND2 (todas filogenéticamente informativas) y cuatro en ND4 (tres filogenéticamente informativas). En MUSK se reportaron sólo 2 posiciones variables, ambas filogenéticamente informativas. Así mismo, si se consideran los haplotipos de ambos loci por separado, la cantidad de haplotipos mitocondriales es mayor, con un total de siete versus los tres alelos de MUSK. Solamente hubo dos cambios de aminoácidos, ambos en los genes mitocondriales, uno por cada gen.

En los genes mitocondriales, la diversidad haplotípica y nucleotídica se pudo calcular con confiabilidad, mientras que en MUSK, las ambigüedades (dos o más nucleótidos en la misma posición) y el bajo polimorfismo, complicaron el cálculo. Los valores obtenidos para estos indicadores de polimorfismo fueron bajos (Tabla 3; comparar con Milá *et al.*, 2000), y similares en ambas subespecies, a pesar de que el rango de distribución de *O. c. chimborazo* es bastante más restringido que el de *O. c. jamesonii*. En vista de esta notable contradicción, se sospechó que *O. c. jamesonii* podría haber sufrido recientemente un rápido aumento en el tamaño de la población; sin embargo, en tres pruebas estadísticas que se hicieron en cada población para detectar una posible desviación de un modelo neutral de evolución (D de Tajima; D^* de Fu y Li; F^* de Fu y Li) no hubo diferencias significativas respecto a la hipótesis de neutralidad (Tabla 4). Considerando sólo a los genes mitocondriales, se registraron dos haplotipos únicos a *O. c. chimborazo*,

cuatro a *O. c. jamesonii* y cuatro compartidos entre ambas subespecies, en MUSK los tres alelos fueron compartidos entre las dos subespecies; dentro de los haplotipos mitocondriales compartidos estuvo incluido aquel con mayor frecuencia en la especie (presente en 21 de 51 individuos).

Las secuencias de las dos muestras de *O. estella stolzmanni* fueron completas para los tres genes. Ambos individuos compartían un mismo haplotipo mitocondrial, pero el alelo de MUSK era distinto. Ningún haplotipo fue compartido entre ambas especies de *Oreotrochilus*. El haplotipo de *O. melanogaster* también fue único y ninguna otra especie lo compartía.

5.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

5.2.1 GENES MITOCONDRIALES

Incluyendo los grupos externos, hubo 596 posiciones variables en el alineamiento de secuencias de los dos genes, de las cuales 384 fueron filogenéticamente informativas. El modelo de evolución escogido bajo el criterio AIC fue TIM3 + I (Posada, 2003). Los valores del modelo de sustitución estimados por máxima verosimilitud se resumen en la Tabla 5.

La topología bajo ambos métodos, Maxima Verosimilitud y análisis Bayesiano, fue bastante similar; de hecho, el árbol Bayesiano muestra todos los clados recuperados en el árbol de máxima verosimilitud, además de otros no representados en aquel. Por ello, se resumen los resultados de ambos análisis en el árbol Bayesiano (Figura 3). En ambos árboles, *Oreotrochilus chimborazo* aparece como monofilético (probabilidad posterior, 1,00 / “bootstrap” MV, 88%); así mismo, en ambos la mayor parte de las muestras dentro del clado de *O. chimborazo* forman una politomía que involucra a ambas subespecies. Entre los clados representados en el árbol Bayesiano, y no en el de máxima verosimilitud,

se encuentra uno que agrupa a los individuos del páramo de El Ángel y otro a los del Cajas; particularmente, el clado que representa a los individuos de El Ángel tiene un alto soporte de probabilidad posterior (PP = 0,96). Esos fueron los únicos clados que apuntaron a algún tipo de patrón geográfico dentro de la especie.

En ambos árboles, el clado hermano a *Oreotrochilus chimborazo* estuvo formado por especímenes de *O. estella stolzmanni* y de *O. melanogaster*. *Oreotrochilus estella estella* es el taxón hermano de ((*O.e. stolzmanni* + *O. melanogaster*) + *O. chimborazo*), indicando que, de acuerdo a la evidencia disponible, *O. estella* es polifilético con respecto a *O. melanogaster* y *O. c. chimborazo*.

5.2.2. EVIDENCIA TOTAL

El gen MUSK mostró un polimorfismo tan bajo, que en un análisis con máxima verosimilitud, se obtuvo un árbol sin resolución para *O. chimborazo* (árbol no mostrado). Sin embargo, al usar los tres genes al mismo tiempo, se generaron resultados de mayor interés (Figura 4). Para este caso se trabajó únicamente con *Colibri coruscans*, *Oreotrochilus estella stolzmanni*, *O. e. estella* y *O. melanogaster* como grupos externos. El alineamiento de secuencias tuvo 350 posiciones variables, de las cuales 47 fueron filogenéticamente informativas. El modelo evolutivo más adecuado fue TrN + G (Tamura y Nei, 1993); los valores del modelo de sustitución estimados por máxima verosimilitud, tanto del árbol con los genes combinados, como del árbol generado con MUSK, se resume en la Tablas 5.

La topología de los árboles consenso de máxima verosimilitud y análisis Bayesiano fue muy parecida a la de los árboles basados sólo en genes mitocondriales. Sin embargo, en el árbol Bayesiano el clado de los especímenes de El Ángel apareció como hermano al resto de los individuos de *O. chimborazo*. Aunque los clados dentro de *O. chimborazo*

fueron los mismos que los recuperados sólo con los genes mitocondriales, éstos tuvieron mayor soporte una vez incluido MUSK. Los clados de El Ángel y de El Cajas tuvieron una probabilidad posterior igual a 1,00; el clado de El Ángel estuvo bien representado en el árbol de máxima verosimilitud, con alto soporte de “bootstrap” (77%), mientras que el clado de El Cajas, nuevamente, no fue recuperado en el árbol de máxima verosimilitud. Así mismo, *O. estella* apareció como polifilético, en la misma forma que en los árboles de los genes mitocondriales.

5.3 REDES DE HAPLOTIPOS

Los resultados de las redes de haplotipos estuvieron dentro de lo esperado conforme a las reconstrucciones filogenéticas. En la red construida con todos los genes (Figura 5), los haplotipos de *O. chimborazo* estuvieron conectados muy próximos entre sí, un resultado consistente con la monofilia de la especie. Las únicas poblaciones geográficamente bien definidas con distintos haplotipos fueron las de El Cajas y El Ángel; ni siquiera la población del Chimborazo estuvo claramente separada a nivel genético. En cuanto al grupo externo propuesto, TCS aceptó únicamente a *O. melanogaster* y a *O. e. stolzmanni* en la red; *O. e. estela* sobrepasó el límite de conectividad. *O. melanogaster* fue el taxón más cercano a *O. chimborazo*, separado por 21 pasos del haplotipo más cercano; sin embargo, la distancia entre *O. melanogaster* y *O. e. stolzmanni* fue mucho menor (cuatro pasos).

Las red construida únicamente con genes mitocondriales (Figura 6a) conserva las características mencionadas, aunque aparecen menos haplotipos y la mayoría están conectados al haplotipo más común, como asemejando una figura de estrella. La red construida únicamente con MUSK (Figura 6b) sólo muestra tres haplotipos dentro de *O. chimborazo*, y cinco en total; no se aprecia ningún patrón geográfico.

5.4 TEORÍA DE LA COALESCENCIA, MODELO DE AISLAMIENTO Y MIGRACIÓN

El bajo nivel informativo de las secuencias generó incertidumbre en el análisis de Migración y Aislamiento, con rangos muy amplios para los valores bajo el 95% del área de las curvas marginales de probabilidad de cada parámetro de interés. Estos rangos son similares entre las distintas corridas (Figuras 7, 8, 9), al igual que los valores medios de los parámetros, lo que indica que las distintas cadenas MCMC sí llegaron a su convergencia. Sin embargo, hubo discrepancias importantes en cuanto a los valores que llevan la mayor probabilidad en casi todos los parámetros estimados. De todas formas, en casi todos los casos, los puntos más probables de la distribución se encontraron cerca del extremo inferior del rango de valores que ocupaban el 95% del área de la curva.

Los valores más probables para el tiempo de separación fueron muy bajos, de hecho el valor más probable (0,0075 en las cuatro corridas) es muy cercano a cero. Entre los demás parámetros destaca que el coalescente de *O. c. jamesonii* y la tasa de migración de esta población a la de *O. c. chimborazo* podría ser mucho más alta que los mismos parámetros en relación a *O. c. chimborazo*. A pesar de que los rangos de valores más probables de estos parámetros se sobrelapan en ambas subespecies, en *O. c. jamesonii* llegan a valores más altos. Es interesante también que la población ancestral (Figura 9) probablemente tuvo un valor de coalescente dentro del rango de probabilidades de *O. c. chimborazo*, o del extremo inferior de ese rango en *O. c. jamesonii*, pero nunca como los valores probables más altos de *O. c. jamesonii*.

5.5 MODELAMIENTO ECOLÓGICO DE NICHOS EN *OREOTROCHILUS CHIMBORAZO*

5.5.1 MODELO CON VARIABLES PRESELECCIONADAS EN ENFA VS. MODELO SIN VARIABLES PRESELECCIONADAS

Los mapas predictivos de distribución del modelo con reducción de variables basada en ENFA y del modelo sin reducción previa fueron bastante similares; en ambos casos hubo discontinuidades geográficas en la distribución potencial de *Oreotrochilus chimborazo* que coincidían con los principales valles que atraviesan el páramo (Figuras 10 y 11). En ambos casos, el límite altitudinal inferior en la distribución potencial parecería coincidir con la cota de 3600 m, con mayor acentuación en el modelo de las 19 variables iniciales, porque éste logra excluir algunas áreas un poco más bajas en el norte de la distribución. Una diferencia notable entre ambos modelos fue la capacidad de predicción del límite de distribución altitudinal superior; en este aspecto el modelo sin reducción de variables fue más acertado, cortando el área de presencia a aproximadamente 4800 m de elevación. Por el contrario, el otro modelo consideró a las zonas sobre este límite como las más probables para la presencia de *O. chimborazo*, un resultado incoherente porque esos territorios son ocupados por suelos rocosos carentes de vegetación o por glaciares (obs. pers.). Por lo tanto, debido a la capacidad intrínseca de MaxEnt de evitar sobreparametrización (Elith *et al.*, 2011) y las diferencias de desempeño de los modelos, se decidió trabajar sin ejecutar análisis previos en ENFA.

5.5.2 MODELAMIENTO DE NICHOS AL PRESENTE

El modelo de variables bioclimáticas logró captar adecuadamente el rango altitudinal de *Oreotrochilus chimborazo* reportado en la literatura (Ridgely y Greenfield, 2001), y por lo tanto la fragmentación de su rango geográfico (Figura 11). Las variables

que contribuyeron mayoritariamente a la predicción fueron aquellas asociadas a la temperatura, y su contribución conjunta fue de 94,7%.

Una aparente contradicción con lo reportado en la literatura (Ridgely y Greenfield, 2001), es que en el modelo basado únicamente en capas bioclimáticas no se aprecia ninguna diferencia de preferencia por zonas con distinta humedad dentro del páramo; por otra parte, la predicción de presencia mínima abarca toda la franja altitudinal entre los 2600 y 3800 m de elevación, dentro de la cual se encuentran ecosistemas donde es probable que no habite *O. chimborazo*, como los bosques de *Polylepis*. Se pensó que la aclaración al problema podría radicar en la necesidad de usar los datos de sensores remotos.

Al utilizar únicamente datos de sensores remotos la predicción es poco precisa, pues también se resaltan áreas localizadas al nivel del mar; el problema se corrigió añadiendo la capa SRTM de topografía, pero en tal caso esta capa contribuyó en un 98% al modelo (Anexo 3). Juntando la información de sensores remotos y capas bioclimáticas en un sólo análisis, MaxEnt prefirió dar mayor peso a la información bioclimática, y los sensores remotos contribuyeron en tan sólo 4,1%. Nuevamente fueron las variables de temperatura las dominantes, con un 90,8% de contribución al modelo. Por lo tanto, los mapas de predicción de ambos modelos (con y sin sensores remotos) son bastante similares, aunque el mapa basado en datos de sensores remotos (Figura 12) es más restrictivo en el rango de distribución, sobretodo en la zona del Parque Nacional Sangay. La prueba estadística de validación cruzada de Pearson dio un valor muy alto de D para el modelo de sensores remotos y variables bioclimáticas ($D = 0,866667$; $p \approx 0,00$), por lo que fue este modelo el que se aplicó en análisis posteriores.

5.5.3 PROYECCIÓN DEL MODELO EN LOS ANDES TROPICALES

Adicionalmente, utilizando sólo las capas de WorldClim, se realizó un modelo que incluyó los Andes desde Venezuela hasta Bolivia. En la proyección de este modelo (Figura 13) las regiones de mínima presencia se situaron únicamente en Ecuador y en pocas zonas lejanas hacia el norte, en Colombia, donde no se ha reportado ningún *Oreotrochilus*, a pesar de ser zonas bien conocidas ornitológicamente (Fjeldså y Krabbe, 1990; Salaman y Mazariegos, 1998). Interesantemente, no se predice ningún área al sur del Páramo de El Cajas, y por lo tanto el nicho modelado no es similar al que ocuparían otras especies de *Oreotrochilus* hacia el sur, sugiriendo que en esta especie podría haber ocurrido evolución de nicho.

5.5.4 ZONA DE CONTACTO ENTRE *O. C. CHIMBORAZO* Y *O. C. JAMESONII*

El modelo de MaxEnt no mostró separación entre las distribuciones de *O. c. jamesonii* y *O. c. chimborazo*, prediciendo una distribución continua entre el Quilotoa y Chimborazo (Figura 14a). En mapas de vegetación de los Andes (Beltrán *et al.*, 2009) también se muestra al páramo como continuo entre esos sectores. Tanto para comprobar esta predicción del modelo de MaxEnt, como para conocer el límite en la distribución de ambas subespecies, se realizó una salida de campo para visitar 3 localidades en la zona intermedia, las cuales fueron la Represa Mulá Corral (S 01°11'35,9", O 78°49'42,3"; 4148 m), páramos aledaños a Simiatug (S 01°18'37,9", O 78°55'15,7"; 4215 m) y páramos aledaños a Salinas de Guaranda (S 01°22'37,3", O 79°00'04,4"; 4127 m), ordenados aquí de norte a sur. En la primera localidad se observaron tres machos, todos de la subespecie *O. c. jamesonii*; sin embargo, en las otras dos localidades todos los machos observados fueron de la subespecie *O. c. chimborazo*. La primera localidad estuvo separada de la segunda por apenas 17 km. A pesar de que no se cuenta con especímenes de esa zona que

faciliten el diagnóstico, sí se obtuvo clara evidencia fotográfica (Figuras 14b y 14c). Al no haber una barrera geográfica ni ecológica que separe claramente a ambas subespecies, se sospecha de la existencia de una zona de contacto.

5.5.5 PROYECCIÓN DEL MODELO AL ÚLTIMO MÁXIMO GLACIAL

El área de distribución geográfica predicha con los modelos CCSM y Miroc para el LGM no fue muy distinta que la del modelo del presente (Figura 15). De hecho, el límite inferior en elevación fue el mismo (3600 m). En una exploración de las capas se observó que bajo ambos modelos no hay variación de temperatura en las capas del Pleistoceno respecto a las del presente para los Andes. Este resultado está en contradicción con la evidencia geológica y palinológica (van der Hammen, 1974; Clapperton y Vera, 1986; van der Hammen y Cleef, 1986; Clapperton *et al.*, 1997; Winckell *et al.*, 1997), según la cual el límite inferior de los glaciares y del páramo descendieron en un promedio de 1500 m. Por esta razón, los resultados del modelamiento al último máximo glacial no fueron tomados en cuenta en discusiones posteriores sobre la biogeografía histórica de *Oreotrochilus chimborazo*.

5.6 MODELAMIENTO DE NICHOS ECOLÓGICOS EN *CHUQUIRAGA JUSSIEUI*

5.6.1 MODELAMIENTO CON LOCALIDADES DE TROPICOS®

El mapa resultante fue muy general en su predicción, mostrando un rango de distribución continuo extendido considerablemente por debajo de los 3600 m de elevación (Figura 16), lo cual no concuerda con la distribución altitudinal reportada por Ulloa y Jørgensen (1995). Este resultado se obtuvo tanto para el modelo con capas bioclimáticas únicamente como para el de sensores remotos.

5.6.2 MODELAMIENTO CON LOCALIDADES REPORTADAS EN ESTE ESTUDIO

Para este análisis se usaron las mismas localidades del modelo de *O. chimborazo*, más otras cuatro donde se registró a *Chuquiraga jussieui* en ausencia del colibrí. Dos de esas localidades pertenecían a una unidad fisiográfica (páramos de Azuay–Morona Santiago–Zamora Chinchipe) donde no se ha reportado a *Oreotrochilus chimborazo* (Ridgely y Greenfield, 2001), una fue aquella donde se registró a *Oreotrochilus estela* en el sur del país y otra fue e las Lagunas de El Voladero, páramo de El Ángel, pese que sí se registró a *O. chimborazo* en la misma unidad fisiográfica.

En el mapa predictivo, la distribución se mostró fragmentada y consistente con el sistema de unidades fisiográficas; la relación fue aún más evidente con el modelo que incorporó información de sensores remotos (Figura 17). Por ejemplo, el modelo que sólo incorporó capas bioclimáticas mostró un puente continuo entre el Ángel y los páramos de la provincia de Napo; sin embargo, en la realidad, la vegetación no es tan continua en esa zona (Beltrán *et al.*, 2009), lo que fue captado de mejor manera en el modelo con sensores remotos. El modelo que incorporaba sensores remotos mostró una distribución más restringida, descartando zonas de menor altitud en el centro y norte de la distribución, pero logró incluir los páramos de Morona–Santiago, Zamora–Chinchipe y el este de Azuay, que se encuentran a una elevación considerablemente menor (e.g. Páramos del Río Shincata, 3000 m). Por lo demás, las curvas de omisión y ROC fueron aceptables en ambos casos.

A comparación de lo ocurrido con *O. chimborazo*, las capas de sensores remotos tuvieron una mayor contribución en este caso (10,0%), aunque de todas formas también fueron las capas de temperatura las más importantes (87,8%). La prueba de validación cruzada de Pearson tuvo un valor alto ($D = 0,904762$; $p \approx 0,00$).

5.6.3 COMPARACIÓN DE LOS MODELOS DE *CHUQUIRAGA JUSSIEUI* Y *OREOTROCHILUS CHIMBORAZO*

Según la prueba binomial, ambos modelos logran predecir las localidades de ocurrencia de la otra especie ($p < 0,05$). Para el ACP se obtuvieron 324 puntos de la distribución compartida entre *O. chimborazo* y *C. jussieui*, 564 exclusivos a *C. jussieui* y sólo uno exclusivo a *O. chimborazo*. Por medio del ACP las variables ambientales fueron reducidas a tan sólo dos componentes que explicaban el 94,45% de la varianza. El primer componente (87,34% de la varianza) dependió significativamente de la variable NDVI7 (que mide la presencia de vegetación verde), mientras que el segundo principalmente de Topografía (SRTM), seguido por varias otras como Bio12 (precipitación anual) y la media del sensor H de QSCAT (relacionada a humedad y rugosidad del suelo; Figura 18).

C. jussieui ocupó un área mayor en el espacio de ambos componentes (Figura 19), mientras que el área de *O. chimborazo* se hallaba incluida casi por completo dentro del área de *C. jussieui*. Las diferencias fueron más notorias en el segundo componente, donde los puntos de *C. jussieui* estuvieron más ampliamente distribuidos, con tendencia hacia valores más positivos, que para *O. chimborazo*.

6. DISCUSIÓN

6.1 FILOGENIA DE *OREOTROCHILUS CHIMBORAZO*, Y ALGUNAS CONSIDERACIONES TAXONÓMICAS EN EL GÉNERO

La descripción de tres subespecies en un rango geográfico tan pequeño y fragmentado ha hecho de *Oreotrochilus chimborazo* una especie sobre la que mucho se ha especulado en cuanto a evolución y diversidad de linajes genéticos. Desde la época de Alfred R. Wallace hasta la actualidad, ha permanecido planteada la hipótesis de que cada complejo montañoso tendría su propia población en vías de especiación. Sin embargo, esto no es evidente con los genes estudiados, que han sido ampliamente utilizados en filogenética de aves y estudios de límites de especie.

El nivel de diferenciación genética entre las especies del género *Oreotrochilus* podría ser muy bajo; como se observa en los árboles de las Figuras 3 y 4, la distancia genética entre *O. melanogaster* y *O. estella stolzmanni* es incluso menor que aquella entre los haplotipos más distantes de *O. chimborazo*. Sin embargo, no ha habido problemas taxonómicos respecto al status de *O. melanogaster*, ya que el macho es fácil de distinguir de las otras especies por su vientre distintivamente negro, e incluso la hembra es distinta por la presencia de negro en sus rectrices (Schulenberg *et al.*, 2007). Llama la atención que especies morfológicamente tan diferentes tengan pocas diferencias a nivel genético; no obstante, casos similares han sido reportados en aves (Kirchman y Franklin, 2007), y se ha invocado diversas hipótesis para explicar el fenómeno (Cadena *et al.*, 2011).

Por una parte, la tasa de sustitución molecular en sí misma podría ser baja. Hay evidencia que indica que, ante determinados factores, la tasa de evolución molecular puede cambiar (Graur y Martin, 2004; Gillooly *et al.*, 2005; Weir y Schluter, 2008), afectando significativamente cualquier estimación que se pueda hacer con relojes moleculares.

Bleiweiss (1998), en base a estudios de hibridación de ADN, encontró una relación inversa en la tasa de evolución molecular de los colibríes andinos y la elevación promedio de su hábitat. Bleiweiss sugirió que el torpor en el que entran los colibríes para conservar su energía en zonas de baja temperatura ambiental es un factor importante para explicar el fenómeno; en el caso de *Oreotrochilus* el torpor es tan extremo que la temperatura corporal disminuye hasta a 5°C (Wolf y Gill, 1986). Debido a que el metabolismo del oxígeno disminuye drásticamente, también disminuye la liberación de productos secundarios con efectos mutagénicos (Bleiweiss, 1998). Por otra parte, menores tasas de sustitución también podrían estar asociadas a un incremento en la presión selectiva en la mitocondria en respuesta a un ambiente pobre en oxígeno.

Aunque la hipótesis de una menor tasa de sustitución en colibríes de altura es plausible, no se deben descartar otras posibilidades. La profundidad de los nodos situados entre ramas que conducen a distintas especies en el árbol de *O. chimborazo* no es muy distinta de aquella presente en la filogenia de otro género de aves de páramo, *Cinclodes* (Sanín *et al.*, 2009); en ambos casos esta profundidad es menor que en aves de bosques andinos (eg. Bonaccorso, 2009). *Cinclodes* son aves que no presentan torpor, y por lo tanto no se ajustarían a la explicación de Bleiweiss. Por otra parte, la avifauna del páramo tiene una ecología e historia evolutiva distinta a la de las aves de los bosques andinos. Los páramos en sí mismos son ecosistemas bastante jóvenes, que se asentaron en los Andes después de que otros ecosistemas montanos lo hicieran (Hooghiemstra *et al.*, 2006; Graham, 2009), a finales del Plioceno. Por lo tanto, no sería sorprendente encontrar linajes tan recientes y cercanos en distintas especies de páramos.

En el caso de los colibríes, el origen de formas tan diversas en plumaje podría estar vinculado con la selección sexual. Mientras en otras especies las diferencias entre individuos de poblaciones separadas por una barrera geográfica no han llegado a niveles

tan altos como para que los taxónomos los consideren especies distintas (e.g. *Cinclodes fuscus*), en los colibríes la selección sexual pudo haber acelerado el proceso de especiación, como se ha sugerido en otros casos (Mitra *et al.*, 1996). De hecho, las características más notorias que separan a las especies de *Oreotrochilus* podrían estar sujetas a selección sexual, porque intervienen en patrones de iridiscencia y contraste de plumajes en machos. Las hembras no son muy distintas, y en algunos casos son imposibles de distinguir en el campo; cuando hay diferencias entre ellas, probablemente se debe a un reflejo del plumaje del macho (e.g. negro en las rectrices de *O. melanogaster*, tinte azulado general en *O. chimborazo*). La selección sexual podría ser el mecanismo por el cual *O. melanogaster* ha llegado a ser tan distinto de *O. e. stolzmanni*, a pesar de ser evolutivamente cercanos, a un nivel que en otras aves suele asociarse únicamente con el de subespecies distintas; de la misma manera, la selección sexual podría estar implicada en la rápida diferenciación morfológica entre *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii*.

La filogenia es consistente con un patrón que se ha sospechado desde hace varios años para aves altoandinas y ha sido comprobado por otros trabajos similares; se trata de un patrón de dispersión sur–norte en la colonización de los Andes (Chapman, 1926; Fjeldså y Krabbe, 1990; Sanín *et al.*, 2009). Las aves de los páramos, en especial, habrían utilizado esta vía de colonización por tener su centro de diversidad en la Patagonia (Chapman, 1926) o en los Andes Centrales (Sanín *et al.*, 2009); así mismo, el caso de *O. melanogaster* como especie que interviene en el rango de distribución de subespecies o especies similares, patrón conocido como “leap–frog”, no es único, y en los casos pertinentes se ha sugerido que es consecuencia de rápida evolución morfológica en la especie interventora y que ésta suele estar cercanamente relacionada a una de las dos separadas (Fjeldså y Krabbe, 1990; Cadena *et al.*, 2011). Las consecuencias de la dispersión sur–norte podrían manifestarse también en *Oreotrochilus chimborazo*, ya que

como se observa en la Figura 13, hay áreas en Colombia óptimas para la especie, pero no hay registros en ese país más allá del Volcán Chiles (Salaman y Mazariegos, 1998).

6.2 ESTRUCTURA GEOGRÁFICA DE LOS LINAJES GENÉTICOS

A pesar de que para la mayoría de unidades fisiográficas no se pudieron identificar linajes genéticos únicos, hubo dos unidades donde sí podría presentarse este caso: El Ángel y El Cajas. Los individuos recolectados en estas localidades presentan haplotipos únicos en la especie. Lamentablemente no se puede llegar a mayores conclusiones, ni determinar el estado de divergencia de las poblaciones, puesto que la distancia genética es muy pequeña (un nucleótido de diferencia frente al haplotipo más cercano) y la muestra también es pequeña (3 individuos de El Ángel y 2 de El Cajas). Sin embargo, hay otras razones para sugerir que aquellas poblaciones podrían ser genéticamente distintas. El Cajas y El Ángel han sido reconocidos como importantes centros de endemismo para plantas e insectos (Jørgensen y León-Yáñez, 1999; Moret, 2005). El páramo de El Ángel, por ejemplo, es uno de los dos únicos sitios donde hay frailejones en Ecuador (hay otra localidad en los páramos de los Llanganates, a unos 180 kilómetros al sur, Jørgensen y León-Yáñez, 1999). La distancia entre El Ángel y los páramos más cercanos en Ecuador es de al menos 20 km, lo cual se debe a la amplitud del valle del Río Chota. Este mismo río ha sido propuesto como una importante barrera de dispersión para aves de bosques húmedos en la cordillera occidental (Krabbe, 2008; Vélez-Márquez, 2010).

El caso con el Páramo de El Cajas no es tan claro porque no hay una distancia tan grande que lo aisle de otros páramos. Sin embargo, se han descrito especies endémicas a El Cajas, o incluso aves de bosque que encuentran límites en su distribución al norte de El Cajas, como por ejemplo en *Metallura baroni*, colibrí endémico, o en *Aglaeactis*

cupripennis, donde la subespecie *A. c. cupripennis* del norte es reemplazada por *A. c. parvulus* (Ridgely y Greenfield, 2001).

En otros organismos se ha sugerido que la ausencia de volcanismo reciente en el austro ecuatoriano pudo haber influenciado en la generación de un patrón distinto de biodiversidad (Moret, 2005). De hecho, el austro se considera volcánicamente inactivo; en contraste, las poblaciones en zonas con volcanismo activo podrían tener menor diversidad genética por el efecto devastador de los volcanes. La reducción en variabilidad genética asociada a actividad volcánica ha sido sugerida para tortugas en las islas Galápagos (Beheregaray *et al.*, 2003). En El Cajas se pudo haber conservado de mejor manera cualquier linaje genético único.

Los individuos de *Oreotrochilus chimborazo* de El Cajas también podrían tener una diferencia notable a nivel de plumaje en *Oreotrochilus chimborazo*. Ambos machos capturados muestran una banda tenue de color negro entre el blanco de las rectrices que no está presente en especímenes de otras localidades (Figura 22). Al parecer no todos en el Cajas la muestran, pues especímenes recolectados en otro estudio en la misma zona, y depositados en la Academia de Ciencias Naturales en Filadelfia (ANSP), no la tienen; sin embargo, la banda podría estar presente como un polimorfismo.

En lo concerniente al resto de unidades fisiográficas, hay un haplotipo único a Culebrillas y otro al Chimborazo; el caso de Chimborazo se discutirá más abajo. En el caso de Culebrillas hubo una buena muestra como para suponer que no hay mayor divergencia en los genes estudiados frente a otras poblaciones, ya que el resto de haplotipos son compartidos con otras unidades fisiográficas. De todas formas, existen razones para pensar que tal vez la especie en sí misma no tenga una estructura poblacional tan bien definida como la que se encontraría para otros grupos de organismos de páramo, e incluso para aves

de bosques altoandinos. Fjeldså e Irestedt (2009) encontraron que el endemismo de aves tiende a aumentar en bosques a mayor elevación, pero disminuye en el páramo. Las aves de los páramos probablemente necesitan ser más oportunistas que las de los bosques, y ello podría implicar que tengan una mejor capacidad de dispersión. *O. chimborazo* podría valerse de esta capacidad de dispersión para moverse entre parches dispersos de *Chuquiraga*. Valles como los que separan los Illinizas del Quilotoa tal vez no sean barreras efectivas para el colibrí al presente, y eso tendería a homogeneizar los haplotipos que pudieron haberse generado en momentos de mayor aislamiento. Además, hay una peculiaridad geográfica en el páramo que puede contribuir a la conexión entre poblaciones, especialmente entre las cordilleras occidental y oriental; en el mapa de la Figura 12, se puede observar un nudo transversal que conecta el área de los Illinizas con los páramos de Cotopaxi y Napo, sirviendo como un puente en medio de una importante barrera geográfica, el valle interandino. Además, la evidencia palinológica y geológica indica que los páramos pudieron haber estado interconectados durante los períodos de máximo avance de los glaciares (van der Hammen, 1974; Hooghiemstra *et al.*, 2006); aquello podría haber atenuado o cancelado los efectos de posibles eventos de divergencia en anteriores períodos interglaciares. Por lo tanto, si los valles interandinos están actuando como barreras de dispersión para la especie, es más seguro que las diferencias genéticas correspondientes se manifiesten en marcadores de evolución más rápida que los utilizados en este estudio.

Por otra parte, el largo historial volcánico pleistocénico de gran parte del área de distribución del colibrí, posiblemente ha afectado sus poblaciones. Como se reporta en la literatura (Barbieri *et al.*, 1988; Coltorti y Ollier, 2000), ha habido varios eventos devastadores en el páramo, a causa de erupciones volcánicas, algunos muy recientes. Si una población es totalmente exterminada, se esperaría que esta zona sea repoblada con individuos de bloques cercanos de páramo; el efecto que esto tiene a largo plazo es la

reducción en variabilidad genética de las poblaciones. Irónicamente, cierto tipo de actividad volcánica también podría incentivar el aumento en diversidad biológica, destruyendo una enorme extensión de hábitat, y provocando barreras de aislamiento geográfico.

6.3 RELACIÓN BIOGEOGRÁFICA ENTRE *OREOTROCHILUS CHIMBORAZO* Y *CHUQUIRAGA JUSSIEUI*

No en todos los sitios donde está presente *Chuquiraga jussieui* se encuentra a *O. chimborazo*, tal es el caso de los páramos presentes en un ramal de los Andes en los límites de las provincias de Azuay, Morona–Santiago y Zamora–Chinchipec, cerca a los pueblos de Gima y Nabón. Es bien conocido que en el austro ecuatoriano hay vegetación paramuna creciendo a baja elevación (Jørgensen y León-Yáñez, 1999; Richter y Moreira-Muñoz, 2005; Beltrán *et al.*, 2009), y estos páramos constituyen un excelente ejemplo por estar situadas a 3000 m de elevación. En las capas bioclimáticas no se registran diferencias de temperatura distintas a las de otros sitios a la misma elevación, lo cual complica cualquier intento de explicar por qué hay páramo en esta zona. Particularmente, llama la atención que estos páramos hayan sido predichos adecuadamente en el mapa del modelo de nicho de *Chuquiraga jussieui*, sin sobre-predicir en sitios al norte con la inclusión de capas de sensores remotos. Según la prueba binomial, ambos modelos logran predicir las localidades de ocurrencia de la otra especie mejor que al azar; sin embargo, en el análisis de ACP el nicho de *C. jussieui* aparece como más general que el de *O. chimborazo*, y la mayoría de puntos que salen de la distribución del segundo son aquellos correspondientes a los páramos cercanos a Nabón. En este caso, el uso de la prueba binomial puede ser engañoso. Indudablemente, el nicho de ambas especies debe ser similar, porque ambas se

encuentran en el mismo hábitat; sin embargo, hay una cordillera donde una de las dos especies no ha sido registrada, y si bien puede ser que ésta no represente una buena proporción en el área geográfica de la predicción, la situación en cuanto a espacio ambiental puede ser distinta, algo que se captó mejor con el APC. Por lo tanto, es probable que *C. jussieui* no dependa exclusivamente de *O. chimborazo* para estar presente en un área en particular. Sin embargo, no se puede discernir si la distribución de *O. chimborazo* en los páramos depende exclusivamente de la de *C. jussieui*, porque ambas especies ocupan nichos muy generales.

Hay reportes de *O. chimborazo* libando de otras especies aparte de *C. jussieui*, entre ellas, algunas malváceas, *Puya* y flores que crecen muy cerca del suelo (Fjeldså y Krabbe, 1990). En la zona de Simiátug, en este estudio, se vieron colibríes libando frecuentemente de *Gentianella cernua*, a pesar de que había *Chuquiraga* en los alrededores. Sin embargo, no hay un sólo reporte de una localidad donde *O. chimborazo* esté en ausencia de *C. jussieui*. Incluso en la localidad del artículo de Woods *et al.* (1998), cerca del Volcán Chiles, donde se menciona la posibilidad de que *O. chimborazo* dependa en la zona sólo de *Puya hamata*, el colibrí visita a *C. jussieui*, y posiblemente en mayor frecuencia que a *P. hamata* (obs. pers.). *Chuquiraga jussieui* puede constituir una excelente fuente de néctar para *O. chimborazo*, si bien, no la única. Probablemente es más abundante que el néctar de otras especies, pues una sola planta puede tener varios capítulos productores de néctar a la vez, y están disponible todo el año (*P. hamata* tiene florecimiento estacional, García–Meneses, 2011). Por lo tanto, es probable que *O. chimborazo* sí dependa de *C. jussieui*, aunque también pueda visitar otras flores con menos frecuencia.

La distribución de *C. jussieui* y *O. chimborazo* es tan general dentro de los páramos que las áreas de mínima presencia no dependen de la precipitación, y este factor no estaría relacionado a la preferencia por hábitats áridos que se ha reportado en la literatura (Fjeldså

y Krabbe, 1990; Ridgely y Greenfield, 2001). Estudios de ecología de páramos (Sklenář *et al.*, 2008) han demostrado que más importante que la precipitación es la frecuencia de nubes y humedad relativa para definir comunidades vegetales; sin embargo, la disponibilidad de las correspondientes capas ambientales estuvo más limitada. De todas maneras, debe existir una mayor tolerancia por sitios húmedos que lo que se reporta en la literatura, por el hecho de registros en los Llanganates (Benítez *et al.*, 2000), en Cayambe e incluso Culebrillas (este estudio), lugares que supuestamente son demasiado húmedos para la especie (Ortiz-Crespo y Bleiweiss, 1982; Ridgely, comm. pers.). Por otra parte, durante los trabajos de campo hubo la impresión de que *C. jussieui* era más abundante en arenales volcánicos, y así mismo *O. chimborazo*; de hecho, el arenal del Chimborazo fue el lugar con mayor abundancia de individuos estandarizada por el esfuerzo de muestreo. Además, *C. jussieui* pertenece a un género de plantas xerofíticas, y muchas de ellas habitan desiertos y arenales (Ezcurra, 2002). Por lo tanto, sí parece existir una preferencia por zonas áridas, pero más que debido a un fenómeno climático esto puede deberse a la porosidad del suelo arenoso, típicos cerca de los mayores picos volcánicos. Lamentablemente, con el modelo obtenido, no es posible determinar zonas de mayor idoneidad ambiental en ninguno de los dos organismos porque el muestreo no estuvo diseñado con ese fin.

6.4 DIVERGENCIA ENTRE *OREOTROCHILUS CHIMBORAZO JAMESONII* Y *OREOTROCHILUS CHIMBORAZO CHIMBORAZO*

6.4.1 TIEMPO DE DIVERGENCIA Y TASA DE MIGRACIÓN

La presencia de haplotipos únicos a *O. c. chimborazo* o a *O. c. jamesonii* parecería indicar que existe algún grado de diferenciación genética entre ambas poblaciones. El mayor problema para distinguir esta separación son los haplotipos compartidos.

Lamentablemente, las secuencias no fueron suficientemente informativas como para hacer estimaciones certeras con el análisis de Aislamiento y Migración. En todos los parámetros estimados, el rango de valores altamente probables (i.e. dentro del 95% del área bajo la curva marginal de probabilidad) fue muy amplio e incorporó valores cercanos a cero. Los resultados del modelo parecerían indicar que con el nivel de información disponible, un escenario con alta tasa de migración y poco tiempo de divergencia, es tan compatible como un escenario con tiempo de divergencia significativo. Por ejemplo, el tamaño del rango de valores altamente probables para tiempo de divergencia es de 618.905,60 años. El extremo más reciente de este rango es muy cercano al presente; para comprender cuán reciente es, se puede utilizar como referencia la tasa de 2% de divergencia en las secuencias por millón de años propuesta para el gen mitocondrial citocromo *b* en aves (Weir y Schluter, 2008), una suposición que ha recibido notorias críticas (Graur y Martin, 2004; Gillooly *et al.*, 2005), para una secuencia de 1928 pares de bases (i.e. ND2 + ND4), la tasa de mutación sería de $1,928 \times 10^{-5}$ cambios por año. La tasa de sustitución molecular para otros genes mitocondriales es muy similar a la de citocromo *b* (Pskert *et al.*, 2007), así que para propósitos de referencia también puede ser aplicada para ND2 y ND4. Más complicado resulta integrar la tasa de sustitución de MUSK en el cálculo, porque no está reportada en la literatura; sin embargo, considerando un rango de valores posibles para esta tasa entre 0,1 y 2 % de divergencia por millón de años, ambos valores muy poco probables por lo que se observa en los datos, el menor valor probable de tiempo de divergencia oscilaría entre los 6253 y 593 años. Con base en la información disponible, la separación entre ambas poblaciones pudo haber ocurrido en cualquier momento en la última cuarta parte del Pleistoceno.

Los valores más probables de tiempo de divergencia en el análisis se sitúan cerca del extremo inferior del rango, y por lo tanto, muy cerca al presente. Este resultado podría

implicar que ni siquiera existan señales de divergencia en estos genes, y que por tanto los haplotipos únicos a ambas especies resulten de la naturaleza estocástica del proceso de coalescencia, lo cual tiende a afectar más a estudios donde se emplean pocos loci, como el presente. Aún así, esto no significaría que las poblaciones de ambas subespecies no sean divergentes (o estén en proceso de divergencia), en especial si se considera que tienen un rangos de distribución distintos y que hay al menos un carácter morfológico que permite diagnosticarlas (sensu Mayr y Ashlock, 1991; Winker, 2010), que además podría estar sujeto a selección sexual y actuar como barrera de aislamiento precigótico (Price, 2008), todo esto a pesar de haber poblaciones vecinas.

6.4.2 RANGOS DE DISTRIBUCIÓN DE AMBAS SUBESPECIES EN EL PASADO

Una posibilidad interesante que se plantea con el modelo de Aislamiento y Migración es que el coalescente de *O. c. jamesonii*, que es directamente proporcional al tamaño efectivo de la población, podría ser mayor al de *O. c. chimborazo* e inclusive a la población ancestral. Si *O. c. jamesonii* tuviese un mayor tamaño de población que el ancestro de ambas subespecies, ello podría ser un indicador de que en el pasado sus rangos de distribución eran más restringidos (Kuhner, 2008), siendo posible una diferenciación en estado alopátrico. El contacto que pudieran tener en la actualidad, sobre todo en la zona entre el Quilotoa y el Chimborazo, podría ser un contacto secundario producto de una expansión de rango de *O. c. jamesonii*. De todas formas, ninguna de estas posibilidades puede ser tomada en forma conclusiva, por el alto grado de incertidumbre en los resultados.

La distribución de *O. chimborazo* pudo haber sido más pequeña en un pasado reciente. Existe evidencia palinológica que indica que a continuación del retroceso de los glaciares en el holoceno hubo un período de mayor temperatura que la actual, en la cual los bosques pudieron haber subido unos 400 m en elevación (Lauer *et al.*, 2001). Este período, conocido como el óptimo climático o el hipsotermal, ocurrió hace 8000–3000 años. Ello significaría que los páramos abiertos de pajonal tenían su límite altitudinal inferior en 4200 m. A pesar de esta reducción severa en el área de los páramos, es poco plausible que *O. chimborazo* hubiera ocupado bosques andinos. No se ha registrado a *O. chimborazo* dentro de bosques de *Polylepis*, y existen buenas razones para pensar que no podrían habitarlos. *Chuquiraga jussieui* es una planta que no crece al interior de los bosques (Ulloa y Jørgensen, 1995; Ezcurra, 2002). Además, podría existir competencia excluyente cerca con otras especies de colibríes que visitan *C. jussieui* en zonas cercanas al bosque; durante el trabajo de campo se observaron enfrentamientos agonísticos entre *O. chimborazo* y *Aglaeactis cupripennis*, y en esos sitios la primera especie solía capturarse en las redes con más frecuencia que la otra.

Si bien existen estas razones para pensar que *Oreotrochilus chimborazo* evita bosques de *Polylepis*, en los análisis de modelamiento de nicho, las capas de sensores remotos (relacionadas a los tipos de vegetación) no parecen haber aportado mucha información en predecir la distribución de *O. chimborazo*. Esto no quiere decir que *O. chimborazo* se encuentre en cualquier tipo de vegetación sobre los 3600 m (límite altitudinal que coincide con el umbral de mínima presencia en el modelamiento de nicho), el problema podría radicar en la misma reducción histórica de los bosques altoandinos. Los bosques de *Polylepis* ocupan menos del 5% de la zona altitudinal donde se encuentra *O. chimborazo* (Beltrán *et al.*, 2009). Por lo tanto, las regiones correspondientes al bosque no

ocupaban un área que pudiera ser considerada significativa dentro del mapa predictivo de distribución, el cual estuvo mejor explicado por otras variables.

Retomando los posibles efectos de los cambios ocurridos durante el periodo hipsotermal e hipotetizando que *O. chimborazo* no pudo habitar áreas ocupadas por bosques andinos, la especie pudo haber tenido un área de distribución con un tamaño cercano a los 2480 km², más de tres veces menor que la actual (8045 km²). En tal caso, el efecto de barreras geográficas pudo haber sido mucho mayor, y el aislamiento entre *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii*, más efectivo. La divergencia entre ambas subespecies pudo haber ocurrido en este período de tiempo, cercano al presente.

Si bien, *C. jussieui* puede verse afectada por el uso intenso del páramo con fines de ganadería y agricultura (Podwojewski *et al.*, 2002), y por ello suele ser escasa cerca de zonas con largo historial de asentamientos humanos en el páramo, también es cierto que esta planta puede resistir ciertos regímenes de devastación de hábitat natural, entre ellos la quema del páramo (Lægaard, 1992). La explotación moderada del páramo, junto a la disminución de temperatura posterior al periodo hipsotermal, pudieron haber ampliado el rango de distribución de la planta, y por tanto también el de *O. chimborazo*. Así, la distribución actual que tiene el colibrí podría ser causada en parte por el modelamiento antropogénico del paisaje altoandino. Cerca de la posible zona de contacto entre ambas subespecies existen parches de bosque de *Polylepis* que llegan a 4000 m (obs. pers.); esta zona se encuentra en una región con un largo historial de explotación del páramo (Podwojewski *et al.*, 2002), que incluso podría remontarse a tiempos prehispánicos. Bajo este escenario, es posible que la región haya tenido una cobertura continua de bosque que separaba a las dos subespecies. Así, la zona de contacto actual, sería una zona de contacto secundario, es decir, luego de que ambas poblaciones se hubieran diferenciado morfológicamente.

No existen indicios que permitan inferir que *O. chimborazo* tuviera una distribución fragmentada inmediatamente antes del periodo hipsotermal. De hecho, durante el LGM los páramos pudieron haber estado conectados (van der Hammen, 1974; Hooghiemstra *et al.*, 2006), pese a que esta situación no estuvo reflejada en los modelos climáticos Miroc y CCSM. Al no existir estudios publicados de predicciones al pasado en los Andes con estos modelos, no se cuenta con una evaluación sobre su desempeño en esta región, pero por los resultados aquí expuestos no parecen ser eficaces en los Andes. Una posible explicación del mal desempeño es que las capas se basan en valores climáticos del presente y una extrapolación de los mismos al LGM de acuerdo a un modelo climático, cuya implementación en las capas podría no contar con una resolución adecuada en la región andina.

Si bien, durante las glaciaciones es probable que las poblaciones no hayan estado fragmentadas, tal vez sí lo estuvieron en anteriores épocas interglaciares. En el caso de *O. c. jamesonii* y *O. c. chimborazo*, eso implicaría que durante la época de glaciación siguiente a la de divergencia hubo un refuerzo en el aislamiento reproductivo que permitió la conservación de la identidad morfológica en ambas subespecies. Pero si ese fuese el caso, la tasa de migración genética debió haber sido baja entre ambas poblaciones, lo que implicaría que tiempos de divergencia mayores respecto al presente sean menos probables para explicar el alto grado de similitud genética.

6.4.3 HIBRIDIZACIÓN: EL ORIGEN DE *O. C. SOEDERSTROMI*?

La duda persiste acerca de los mecanismos de reconocimiento entre ambas subespecies y la tasa de migración genética, que una vez conocida podría aclarar a su vez el tiempo de divergencia. Es notable que las dos subespecies vivan tan cerca, que

probablemente tengan una zona de contacto y que sin embargo logren mantener su identidad. Ello podría sugerir que efectivamente existe el refuerzo para mantener a ambas subespecies separadas genéticamente (a pesar de los resultados obtenidos con los genes estudiados).

En las visitas que se realizaron a la región del Quilotoa, no se registró ningún individuo con las características descritas para la subespecie “intermedia”, *O. c. soederstromi*. Alrededor de la caldera no se encontró ningún *O. chimborazo*, y sólo *Lesbia victoriae* visitaba *Chuquiraga*. El sitio estaba en una elevación baja (3600 m), con varios asentamientos humanos, lo cual pudo haber tenido un efecto importante en la ausencia del colibrí. En una localidad a mayor elevación (4000 m), en Apagua, a 12 km al sur, se encontraron varios colibríes frecuentando un parche de *Chuquiraga*. Todos los machos observados (al menos cinco) fueron de la subespecie *O. c. jamesonii*, como lo atestiguan dos especímenes capturados. Este constituyó el primer registro de la subespecie en la región.

El plumaje mixto de *O. c. soederstromi*, sugiere que puede tratarse de un híbrido. La suposición de una tercera subespecie, endémica al Quilotoa, se planteó cuando todavía no se conocía bien la distribución de *Oreotrochilus chimborazo*, y se pensaba que era más restringida de lo que es en realidad, supuestamente limitada sólo a los picos volcánicos mayores. De todas formas, el mapa predictivo no muestra una separación grande entre el Quilotoa y otras áreas al norte, la barrera geográfica correspondiente es el valle del Río Toachi, y ésta separa el páramo en un tramo de apenas 6 km. Fjeldså y Krabbe (1990) también mencionan la posibilidad de que *O. c. soederstromi* se trate de un híbrido.

7. CONCLUSIONES

1) Los genes empleados para el presente estudio (ND2, ND4 Y MUSK) no tienen buena resolución filogenética dentro de *Oreotrochilus chimborazo*. No se pudo establecer una relación claramente definida entre los linajes genéticos y la distribución geográfica de la especie para la mayoría de unidades fisiográficas. No se puede distinguir tampoco a *O. c. chimborazo* ni a *O. c. jamesonii* como linajes evolutivos independientes. Sin embargo, queda claro que *O. chimborazo* es una especie monofilética.

2) La variación genética entre especies de *Oreotrochilus* también es baja, a pesar de que sí se pueden reconocer taxa a nivel de especie en la filogenia. Este caso ya se ha visto en la menos otra especie de ave de páramo y puede deberse a una radiación reciente debido a la joven edad de los páramos en relación a otros ecosistemas altoandinos. Explicaciones alternativas se basan en un posible retardo en la tasa de sustitución nuclear, asociado a factores fisiológicos adaptativos para un ambiente con bajos niveles de oxígeno y baja temperatura.

3) *O. estella stolzmanni* y *O. melanogaster* forman un clado hermano a *O. chimborazo*. El clado conformado por los tres taxa es a la vez hermano de *O. e. estella*. La filogenia es consistente con un modelo evolutivo de dispersión sur-norte en los páramos andinos, lo cual se ha reportado para otras especies de aves andinas. La rápida divergencia morfológica de *O. melanogaster* respecto a *O. e. stolzmanni*, pese a su cercanía genética, podría deberse en parte a la selección sexual. La notable divergencia morfológica entre *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii* también puede haber estado influenciada por la selección sexual.

4) Dos unidades fisiográficas podrían tener sus propios linajes evolutivos, El Cajas y El Ángel. El endemismo en otros grupos de organismos en estas unidades es notable. El

Ángel está bien separado geográficamente de otros páramos ecuatorianos; sin embargo, una separación especial frente a otros páramos no es evidente en El Cajas. Factores históricos todavía no bien comprendidos podrían haberse encargado de fomentar el endemismo en El Cajas. La muestra de individuos en cada sitio es muy baja como para hacer determinaciones de divergencia poblacional

5) La falta de estructura poblacional acorde con las barreras geográficas en otras partes del país podría deberse a que el colibrí tiene una elevada capacidad de dispersión, al volcanismo intenso de gran parte su rango, que puede provocar disminución en la diversidad genética, la presencia de nudos que conectan unidades fisiográficas y una mayor conectividad de los páramos en el pasado. De todas formas, no se descarta que exista una estructura poblacional más allá del nivel observado en este estudio y que sea evidente con genes de evolución más rápida.

6) Tanto *O. chimborazo* como *C. jussieui* ocupan un amplio nicho dentro del páramo, y pueden estar presentes en cualquier sitio con páramo abierto, independientemente de la precipitación. Posiblemente son más abundantes en arenales y sitios con suelos áridos. Ambas especies pueden haberse beneficiado de una intervención moderada en los páramos.

7) *O. chimborazo* no ha sido registrado al interior de bosques altoandinos, y podría evitar acercarse. En zonas cercanas a los bosques otras especies de colibríes también visitan *C. jussieui* y por tanto podría haber competencia excluyente.

8) *C. jussieui* vive en zonas con ausencia de *O. chimborazo* en el sur del país. Esto indica que la planta no necesitaría exclusivamente de esta especie de colibrí para subsistir. *O. chimborazo* puede consumir néctar de otras especies de plantas, pero probablemente *C.*

jussieui sea su mejor opción y no le sea óptimo vivir en sitios donde esta planta esté ausente.

9) Las poblaciones de *O. c. jamesonii* y *O. c. chimborazo* no tienen una separación geográfica claramente definida, y podrían estar en contacto. Por lo tanto, la subespecie *O. c. soederstromi* se trata con buena probabilidad de un híbrido entre las otras subespecies.

10) Los genes empleados para el estudio no permiten establecer con certeza si *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii* tienen un tiempo corto de divergencia y baja tasa de migración, alta tasa de migración y mayor tiempo de divergencia, o si las diferencias genéticas entre ambas subespecies son resultados de la naturaleza estocástica del proceso de coalescencia. Esto no quiere decir que las poblaciones de ambas subespecies no sean divergentes, en especial si se considera que hay al menos un carácter morfológico que permite diagnosticarlas a pesar de tener poblaciones vecinas. Por otra parte, entre mayor haya sido el tiempo de divergencia, tuvo que haber habido cierto aislamiento reproductivo entre ambas subespecies, y por lo tanto una tasa menor de migración, para poder mantener la identidad de cada subespecie durante las épocas de posible contacto extenso en las glaciaciones. Ello favorecería modelos que expliquen la separación de ambas subespecies en el menor tiempo de divergencia posible.

11) Existe la posibilidad de que *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii* hayan divergido a inicios del Holoceno, durante un período conocido como Hipsotermal. El límite de los bosques subió en unos 400 m, restringiendo a los páramos y aumentando la efectividad de las barreras. La deforestación de los bosques altoandinos y la posterior disminución en temperatura pudieron haber provocado un contacto secundario entre *O. c. chimborazo* y *O. c. jamesonii*.

8. RECOMENDACIONES

Para profundizar en la búsqueda de estructura geográfica en las poblaciones se recomienda utilizar genes de evolución más rápida, como la Región Control de la mitocondria, o incluso microsátélites. Se recomienda que el enfoque del estudio siga siendo el de la filogeografía, ya que permite reconstruir genealogías manejando información a nivel de genética de poblaciones. En los próximos años, el acceso a varios genes nucleares será más fácil, y será un gran avance para estudios multi-locus en filogeografía.

Las zonas de El Ángel y El Cajas merecen especial atención. Puede realizarse un muestreo más extenso de *Oreotrochilus chimborazo* en estos lugares, o, más recomendable aún, un estudio de filogeografía comparada con otras especies de páramo para desentrañar el rol de los valles que separan a estos páramos como barreras de aislamiento geográfico.

En base a los resultados filogenéticos, se recomiendan los siguientes arreglos taxonómicos, que posteriormente serán propuestos al SACC (*South American Classification Committee*), comité encargado de revisar la nomenclatura taxonómica de aves en Sudamérica:

1. Elevar *Oreotrochilus estella stolzmanni* al estatus de especie, como *Oreotrochilus stolzmanni*. Las relaciones evolutivas más cercanas a *O. melanogaster* y *O. chimborazo* así lo ameritan. El cambio también reflejaría la probable historia biogeográfica del género en los Andes, implicando una ocupación en sentido sur-norte. Chapman (1927) propuso la idea de que las aves de los páramos descenden de especies patagónicas y se dispersaron desde el sur para ocupar la cordillera. El cambio implicaría un regreso a la taxonomía de Peters (1945) y Schuchmann (1999).

2. Invalidar la subespecie *Oreotrochilus chimborazo soederstromi*. La evidencia presentada en este estudio indicaría que con mucha probabilidad se trata de un híbrido, una posibilidad ya mencionada por Fjeldså y Krabbe (1990).

3. Mantener *Oreotrochilus chimborazo chimborazo* y *Oreotrochilus chimborazo jamesonii* como subespecies, hasta probar la existencia de refuerzo de aislamiento reproductivo en la zona de contacto. Con los genes estudiados no se distinguen linajes independientes, y la distinción entre ambas subespecies se basa en tan solo un caracter; por lo tanto, no existe todavía evidencia suficiente para considerarlas como especies distintas. Por otra parte, la presencia de una posible zona de contacto y el hecho de que las subespecies mantienen su rasgo distintivo y no comparten la misma área de distribución, sugeriría que hay algún mecanismo de refuerzo. Si no existiera una proporción considerable de híbridos éste sería un buen argumento para elevar ambas taxa al nivel de especie (Grant y Grant, 2007).

La posible zona de contacto entre *O. c. jamesonii* y *O. c. chimborazo* merece la pena ser estudiada. Una búsqueda de híbridos, tanto por medio de rasgos morfológicos como utilizando marcadores moleculares, podría proveer información valiosa sobre el refuerzo en el aislamiento reproductivo de ambas subespecies. Si se estudian marcadores moleculares adecuados podría realizarse nuevamente un Análisis de Migración y Aislamiento para tener una mejor certeza de la tasa de migración y tiempo de divergencia.

Si bien no existen pruebas suficientes para dividir a *Oreotrochilus chimborazo* en otras especies, hay que considerar que aún así el rango de distribución de la especie es muy pequeño y restringido. En el DataZone de Birdlife International (Birdlife International, 2011) se provee un estimado para el rango de distribución de 32.000 km², sin embargo, el área mínima de presencia según el modelo de nicho establece una cifra de 8.045 km².

Además, de existir una preferencia por sitios áridos en los páramos, el rango de ocupación podría estar más limitado aún; una buena forma de comprobar esta hipótesis sería repitiendo el análisis de MaxEnt utilizando información sobre frecuencia de nubes y humedad relativa, como la provista por NOAA-AVHRR (Bendix *et al.*, 2004). A pesar de que la especie es frecuente en varias localidades, se debe estar pendiente de su estado de la población, especialmente si está estrechamente asociada a un sólo recurso que en zonas densamente pobladas tiende a ser escaso probablemente por la misma presión antropogénica (Woods *et al.*, 1998). Si su población, o la de *C. jussieui*, llegaran a disminuir, la especie calificaría como Vulnerable de extinción (IUCN, 2001); *O. c. chimborazo* sería más susceptible aún, al ocupar un rango alrededor de 3000 km²; y aunque no fuese una especie válida, es importante considerar que se trata de una variedad distinta de la cual todavía no se conoce bien su historia natural, ni en cuánto difiere de la de *O. c. jamesonii*.

El tema de la biodiversidad de aves en los páramos ha recibido escasa atención, a pesar de las oportunidades únicas que ofrecen para su estudio. El presente estudio es uno de los primeros trabajos de filogeografía en aves de páramo, y se espera que sea de enorme utilidad para encaminar futuros proyectos en este campo. Además, los páramos son escenarios importantes donde ejercer la práctica de la conservación ambiental, debido al notable endemismo dentro de sus comunidades bióticas, los importantes servicios ambientales que prestan y la fragilidad de su ecosistema. Se espera que el presente trabajo, y aquellos que continúen en la misma línea, aporten a la conservación de la biodiversidad en los páramos por medio de la identificación de especies, hábitats y linajes genéticos que necesiten medidas de protección prioritarias.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*, Harvard University Press, Cambridge, U.S.A.
- Barbieri, F., Coltelli, M., Ferrara, G., Innocenti, F., Navarro, J. M., y Santacroce, R. 1988. Plio-Quaternary volcanism in Ecuador. *Geological Magazine* 125 (1): 1–14.
- Beaumont, M. A., y Panchal, M. 2008. Comment — On the validity of nested clade phylogeographical analysis. *Molecular Ecology* 17: 2563–2565.
- Beheregaray, L. B., Ciofi, C., Geist, D., Gibbs, J. P., Caccone, A., y Powell, J. R. 2003. Genes record a prehistoric volcano eruption in the Galápagos. *Science* 302: 75.
- Beltrán, K., Salgado, S., Cuesta, F., León-Yáñez, S., Romoleroux, K., Ortiz, E., Cárdenas, A., y Velástegui, A. 2009. Distribución espacial, sistemas ecológicos y caracterización florística de los páramos en el Ecuador, *Ecociencia*, Proyecto Páramo Andino, Herbario QCA, Quito, Ecuador.
- Bendix, J., Rollenbeck, R., y Palacios, W. E. 2004. Cloud detections in the Tropics—a suitable tool for climate-ecological studies in the high mountains of Ecuador. *International Journal of Remote Sensing* 25 (21): 4521–4540.
- Benítez, V., Sánchez, D., y Larrea, M. 2000. Evaluación ecológica rápida de la avifauna en el Parque Nacional Llanganates. En: *Biodiversidad en el Parque Nacional Llanganates: un reporte de las evaluaciones ecológicas y socioeconómicas rápidas* (M. A. Vásquez, M. Larrea y L. Suárez, eds) pp. 67–108. *Ecociencia*, Ministerio del Ambiente, Herbario Nacional del Ecuador, Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales e Instituto Internacional de Reconstrucción Rural, Quito, Ecuador.
- Birdlife International. 2011. Species factsheet: *Oreotrochilus chimborazo* [En línea]. <http://www.birdlife.org>.

- Bleiweiss, R. 1998. Slow rate of molecular evolution in high-elevation hummingbirds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 612–616.
- Bloomquist, E. W., Lemey, P., y Suchard, M. A. 2010. Three roads diverged? Routes to phylogeographic inference. *Trends in Ecology and Evolution* 25 (11): 626–632.
- Bonaccorso, E. 2009. Historical biogeography and speciation in the Neotropical highlands: Molecular phylogenetics of the jay genus *Cyanolyca*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 618–632.
- Buermann, W., Saatchi, S., Smith, T. B., Zutta, B. R., Chaves, J. A., Milá, B., y Graham, C. H. 2008. Predicting species distributions across the Amazonian and Andean regions using remote sensing data. *Journal of Biogeography* 35: 1160–1176.
- Cadena, C. D., Cheviron, Z. A., y Funk, W. C. 2011. Testing the molecular and evolutionary causes of a 'leapfrog' pattern of geographical variation in coloration. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 402–414.
- Cadena, C. D., Klicka, J., y Ricklefs, R. E. 2007. Evolutionary differentiation in the Neotropical montane region: Molecular phylogenetics and phylogeography of *Buarremon* brush-finches (Aves, Emberizidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 993–1016.
- Clapperton, C. M., Hall, M., Mothes, P., Hole, M. J., Still, J. W., Helmens, K. F., Kuhry, P., y Gemmell, A. M. D. 1997. A younger dryas icecap in the equatorial Andes. *Quaternary Research* 47: 13–28.
- Clapperton, C. M., y Vera, R. 1986. The Quaternary glacial sequence in Ecuador: a reinterpretation of the work of Walter Sauer. *Journal of Quaternary Science* 1 (1): 45–56.
- Clement, M., Posada, D., y Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1660.

- Coltorti, M., y Ollier, C. D. 2000. Geomorphic and tectonic evolution of the Ecuadorian Andes. *Geomorphology* 32: 1–19.
- Collins, W. D., Blackmon, M., Bitz, C., Bonan, G., y Bretherton, C. S. 2004. The Community Climate System Model (CCSM3). *Journal of Climate* 19: 2122–2143.
- Coyne, J. A., y Orr, H. A. 2004. *Speciation*, Sinauer, Sunderland, MA, U.S.A.
- Chapman, F. M. 1926. The distribution of bird-life in Ecuador. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 55: 1–784.
- Chaves, J. A., Pollinger, J. P., Smith, T. B., y LeBuhn, G. 2007. The role of geography and ecology in shaping the phylogeography of the Speckled Hummingbird (*Adelomyia melanogenys*) in Ecuador. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 795–807.
- Drummond, A. J., y Rambaut, A. 2009. Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. En: *The Phylogenetic Handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing* (P. Lemey, M. Salemi y A.-M. Vandamme, eds). Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.
- Elith, J., Phillips, S. J., Hastie, T., Dudík, M., Chee, Y. E., y Yates, C. J. 2011. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. *Diversity and Distributions* 17: 43–57.
- Ezcurra, C. 2002. Phylogeny, morphology, and biogeography of *Chuquiraga*, an Andean-Patagonian genus of Asteraceae-Barnadesioideae. *The Botanical Review* 68 (1): 153–170.
- Fjeldså, J. 1994. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodiversity and Conservation* 3: 207–226.
- Fjeldså, J., y Krabbe, N. 1990. *Birds of the High Andes*, Zoological Museum of the University of Copenhagen, Copenhagen, Dinamarca.

- García-Moreno, J., Arctander, P., y Fjeldså, J. 1999. Strong diversification at the treeline among *Metallura* hummingbirds. *The Auk* 116 (3): 702–711.
- Gene Codes Corporation 2007. Sequencher. Versión 4.8. Ann Arbor, Michigan, U.S.A., Gene Codes Corporation.
- Geraldes, A., Ferrand, N., y Nachman, M. W. 2006. Contrasting patterns of introgression at X-linked loci across the hybrid zone between subspecies of the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Genetics* (173): 919–933.
- Gillooly, J. F., Allen, A. P., West, G. B., y Brown, J. H. 2005. The rate of DNA evolution: Effects of body size and temperature on the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (1): 140–145.
- Graham, A. 2009. The Andes: A geological overview from a biological perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96 (3): 371–385.
- Grant, P. R., y Grant, B. R. 2007. How and why species multiply: the radiation of Darwin's Finches, Princeton University Press, Princeton, Estados Unidos.
- Graur, D., y Martin, W. 2004. Reading the entrails of chickens: molecular timescales of evolution and the illusion of precision. *Trends in Genetics* 20 (2): 80–86.
- Gregory-Wodzicki, K. M. 2000. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin* 112 (7): 1091–1105.
- Guindon, S., y Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.
- Hamilton, M. B. 2009. Population genetics, Blackwell Publishing, West Sussex, Reino Unido.
- Hansen, M. C., DeFries, R. S., Townshend, J. R. G., Sohlberg, R. A., Dimiceli, C., y Carroll, M. 2002. Towards an operational MODIS continuous field of percent tree

- cover algorithm: Examples using AVHRR and MODIS data. *Remote Sensing of the Environment* 83: 303–319.
- Hasegawa, M., Kishino, K., y Yano, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160–174.
- Hasumi, H., y Emori, S. 2004. K-1 coupled GCM (MIROC) description, Center for Climate System Research, University of Tokyo, Tokyo, Japón.
- Hey, J., y Nielsen, R. 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167: 747–760.
- Hey, J., y Nielsen, R. 2007. Integration with the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (8): 2785–2790.
- Hickerson, M. J., Carstens, B. C., Cavender-Bares, J., Crandall, K. A., Graham, C. H., Johnson, J. B., Rissler, L., Victoriano, P. F., y Yoder, A. D. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 291–301.
- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G., y Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Hillis, D. M., y Bull, J. J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42 (2): 182–192.
- Hirzel, A. H., Hausser, J., y Perrin, N. 2009. Biomapper 4.0. Lab. for Conservation Biology, University of Lausanne, Laussane, Suiza, <http://www.unil.ch/biomapper>.

- Holder, M., y Lewis, P. O. 2003. Phylogeny estimation: Traditional and bayesian approaches. *Nature Reviews Genetics* 4: 275–284.
- Hooghiemstra, H., Wijninga, V. M., y Cleef, A. M. 2006. The paleobotanical record of Colombia: implications for biogeography and biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 93: 297–324.
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., y Bollback, J. P. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294: 2310–2314.
- Hughes, C., y Eastwood, R. 2006. Island radiation on a continental scale: Exceptional scales of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 10334–10339.
- IUCN 2001. 2001 IUCN Red List Categories and Criteria version 3.1, IUCN, Gland, Suiza.
- Jørgensen, P. M., y León-Yáñez, S. 1999. Catalogue of the vascular plants of Ecuador, Missouri Botanical Garden, San Luis, Estados Unidos.
- Kingman, J. F. C. 1982. The coalescent. *Stoch. Process. Appl.* 13: 235–248.
- Kirchman, J. J., y Franklin, J. D. 2007. Comparative phylogeography and genetic structure of Vanuatu birds: Control region variation in a rail, a dove, and a passerine. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 14–23.
- Krabbe, N. 2008. Arid valleys as dispersal barriers to high-andean forest birds in Ecuador. *Cotinga* 29: 28–30.
- Kuhner, M. K. 2008. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (2): 86–92.
- Lægaard, S. 1992. Influence of fire in the grass páramo vegetation of Ecuador. En: *Paramo, and andean ecosystem under human influence* (H. Baslev y J. L. Luteyn, eds) pp. 151–170. Academic Press Limited, Londres, Inglaterra.

- Lauer, W., Rafiqpoor, M. D., y Theisen, I. 2001. *Physiographie, Vegetation un Syntaxonomie der Flora des Paramo de Papallacta (Ostkordillere Ecuador)*, Franz Steiner Verlag Wiesbaden GMBH, Stuttgart, Alemania
- Long, D. G., Drinkwater, M. R., Holt, B., Saatchi, S., y Bertoia, C. 2001. Global ice and land climate studies using scatterometer image data. *EOS Transactions AGU* 82: 503.
- Maddison, W. P., y Maddison, D. R. 2010. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Versión 2.73. <http://mesquiteproject.org>
- Martinez-Meyer, E., y Peterson, A. T. 2006. Conservatism of ecological niche characteristics in North American plant species over the Pleistocene-to-Recent transition. *Journal of Biogeography* 33: 1779–1789.
- Mayr, E., y Ashlock, P. D. 1991. *Principles of Systematic Zoology*, McGraw-Hill, New York, Estados Unidos.
- Milá, B., Girman, D. J., Kimura, M., y Smith, T. B. 2000. Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 1033–1040.
- Mitra, S., Landel, H., y Pruett-Jones, S. 1996. Species richness covaries with mating systems in birds. *The Auk* 113: 544–551.
- Moret, P. 2005. *Los coleópteros carabidae del páramo en los Andes del Ecuador — Sistemática, ecología y biogeografía*, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Myneni, R. B., Hoffman, S., Knyazikhin, Y., Privette, J. L., Glassy, J., Tian, Y., Wang, Y., Song, X., Zhang, Y., Smith, G. R., Lotsch, A., Friedl, M., Morisette, J. T., Votava, P., Nemani, R. R., y Running, S. W. 2002. Global products of vegetation leaf areas

- and fraction absorbed PAR from year one of MODIS data. *Remote Sensing of the Environment* 83: 214–231.
- Ortiz-Crespo, F., y Bleiweiss, R. 1982. The northern limit of the hummingbird genus *Oreotrochilus* in South America. *The Auk* 99: 376–378.
- Pearson, R. G., Raxworthy, C. J., Nakamura, M., y Peterson, A. T. 2006. Predicting species' distributions from small numbers of occurrence records: A test case using cryptic geckos in Madagascar. *Journal of Biogeography* 34: 102–117.
- Peters, J. L. 1945. Check-list of the birds of the World, Harvard University Press, Cambridge, MA, U.S.A.
- Phillips, S., Dudík, M., y Schapire, R. E. 2004. A maximum entropy approach to species distribution modeling. *Proceedings of the twenty-first international conference on machine learning*: 655–662.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P., y Shapire, R. E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Podwojewski, P., Poulenard, J., Zambrana, T., y Hofstede, R. 2002. Overgrazing effects on vegetation cover and properties of volcanic ash soil in the paramo of Llangahua and La Esperanza (Tungurahua, Ecuador). *Soil Use and Management* (18): 45–55.
- Posada, D. 2003. Using Modeltest and Paup* to select a model of nucleotide substitution. En: *Current Protocols in Bioinformatics* (A. D. Baxevanis, D. B. Davison, R. D. M. Page, G. A. Petsko, L. D. Stein y G. D. Stormo, eds). John Wiley & Sons, Inc.
- Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Posada, D., y Buckley, T. R. 2004. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike Information Criterion and bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Systematic Biology* 53 (5): 793–808.

- Price, T. 2008. *Speciation in Birds*, Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, U.S.A.
- R Development Core Team. 2011. R: A language and environment for statistical computing [En línea]. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>.
- Richter, M., y Moreira-Muñoz, A. 2005. Heterogeneidad climática y diversidad vegetacional en el sur de Ecuador: un método de fitoindicación. *Revista Peruana de Biología* 12: 217–238.
- Ridgely, R. S., y Greenfield, P. J. 2001. *The Birds of Ecuador*, Cornell University Press, Ithaca, U.S.A.
- Rodrigo, A. 2009. The coalescent: population genetic inference using genealogies. En: *The Phylogenetic Handbook* (P. Lemey, M. Salemi y A.-M. Vandamme, eds) pp. 551–563. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Ronquist, F., van der Mark, P., y Huelsenbeck, J. P. 2009. Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes. En: *The Phylogenetic Handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing* (P. Lemey, M. Salemi y A.-M. Vandamme, eds) pp. 210–266. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Salaman, P., y Mazariegos, L. A. 1998. The hummingbirds of Nariño, Colombia. *Cotinga* 10: 30–36.
- Sanín, C., Cadena, C. D., Maley, J. M., Lijtmaer, D. A., Tubaro, P. L., y Chesser, R. T. 2009. Paraphyly of *Cinclodes fuscus* (Aves: Passeriformes: Furnariidae): Implications for taxonomy and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 547–555.
- Schmidt, H. A., y von Haeseler, A. 2009. Phylogenetic inference using maximum likelihood methods. En: *The Phylogenetic Handbook: a practical approach to*

- phylogenetic analysis and hypothesis testing (P. Lemey, M. Salemi y A.-M. Vandamme, eds) pp. 181–209. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Schuchmann, K.-L. 1999. Family Trochilidae (hummingbirds). En: Handbook of the Birds of the World, Vol. 5 (J. del Hoyo, A. Elliot y J. Sargatal, eds) pp. 468-680. Lynx Edicions, Barcelona, España.
- Schulenberg, T. S., Stotz, D. F., Lane, D. F., O'Neill, J. P., y III, T. A. P. 2007. Birds of Peru, Princeton University Press, New Jersey, U.S.A.
- Sklenář P, Bendix J, & Balslev H. 2008. Cloud frequency correlates to plant species composition in the high Andes of Ecuador. *Basic and Applied Ecology* 9:504-513.
- Steel, M. 2005. Should phylogenetic models be trying to "fit an elephant"? *Trends in Genetics* 21: 307-309.
- Tamura, K., y Nei, M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial-DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.
- Templeton, A. R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789–809.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* 25 (24): 4876–4882.
- Ulloa, C., y Jørgensen, P. M. 1995. Árboles y arbustos de los Andes del Ecuador, Editorial Abya-Yala, Quito, Ecuador.
- van der Hammen, T. 1974. The Pleistocene changes of vegetation and climate in tropical South America. *Journal of Biogeography* 1: 3–26.

- van der Hammen, T., y Cleef, A. 1986. Development of the high Andean paramo flora and vegetation. En: High Altitude Tropical Biogeography (F. Vuilleumier y M. Monasterio, eds) pp. 153–201. Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Vandamme, A.-M. 2009. Basic concepts of molecular evolution. En: The Phylogenetic Handbook (P. Lemey, M. Salemi y A. -M. Vandamme, eds) pp. 3–29. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Vélez-Márquez, A. 2010. La filogeografía de *Phrygilus unicolor* en Ecuador y su futuro inmediato: qué les espera a las especies de páramo. Tesis de Universidad Internacional Menéndez-Pelayo, España.
- Vuilleumier, F. 1986. Origins of the tropical avifaunas of the high Andes. En: High Altitude Tropical Biogeography (M. Monasterio y F. Vuilleumier, eds). Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Wallace, A. R. 1895. Island Life, or the phenomena and causes of insular faunas and floras including a revision and attempted solution of the problem of Geological Climates, Macmillan and Co., Londres, Inglaterra.
- Weir, J. T., y Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17: 2321–2328.
- Winckell, A., Zebrowski, C., y Sourdat, M. 1997. Las regiones y paisajes del Ecuador, Geografía Básica del Ecuador, TomoIV: Geografía física, volumen 2, CEDIG, Quito, Ecuador.
- Winker, K. 2010. Subspecies represent geographically partitioned variation, a gold mine of evolutionary biology, and a challenge for conservation. *Ornithological Monographs* 67: 6-23.
- Wolf, L. L., y Gill, F. B. 1986. Physiological and Ecological Adaptations of High Montane Sunbirds and Hummingbirds. En: High Altitude Tropical Biogeography (F.

- Vuilleumier y M. Monasterio, eds) pp. 103–119. Oxford University Press, New York, Estados Unidos.
- Woods, S., Ortiz-Crespo, F., y Ramsay, P. M. 1998. Presence of Giant Hummingbird *Patagona gigas* and Ecuadorian Hillstar *Oreotrochilus chimborazo jamesoni* at the Ecuador-Colombia border. *Cotinga* 10: 37–40.
- Zwickl, D. J. 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Tesis de Ph. D., The University of Texas at Austin, Austin, U.S.A.

10. FIGURAS

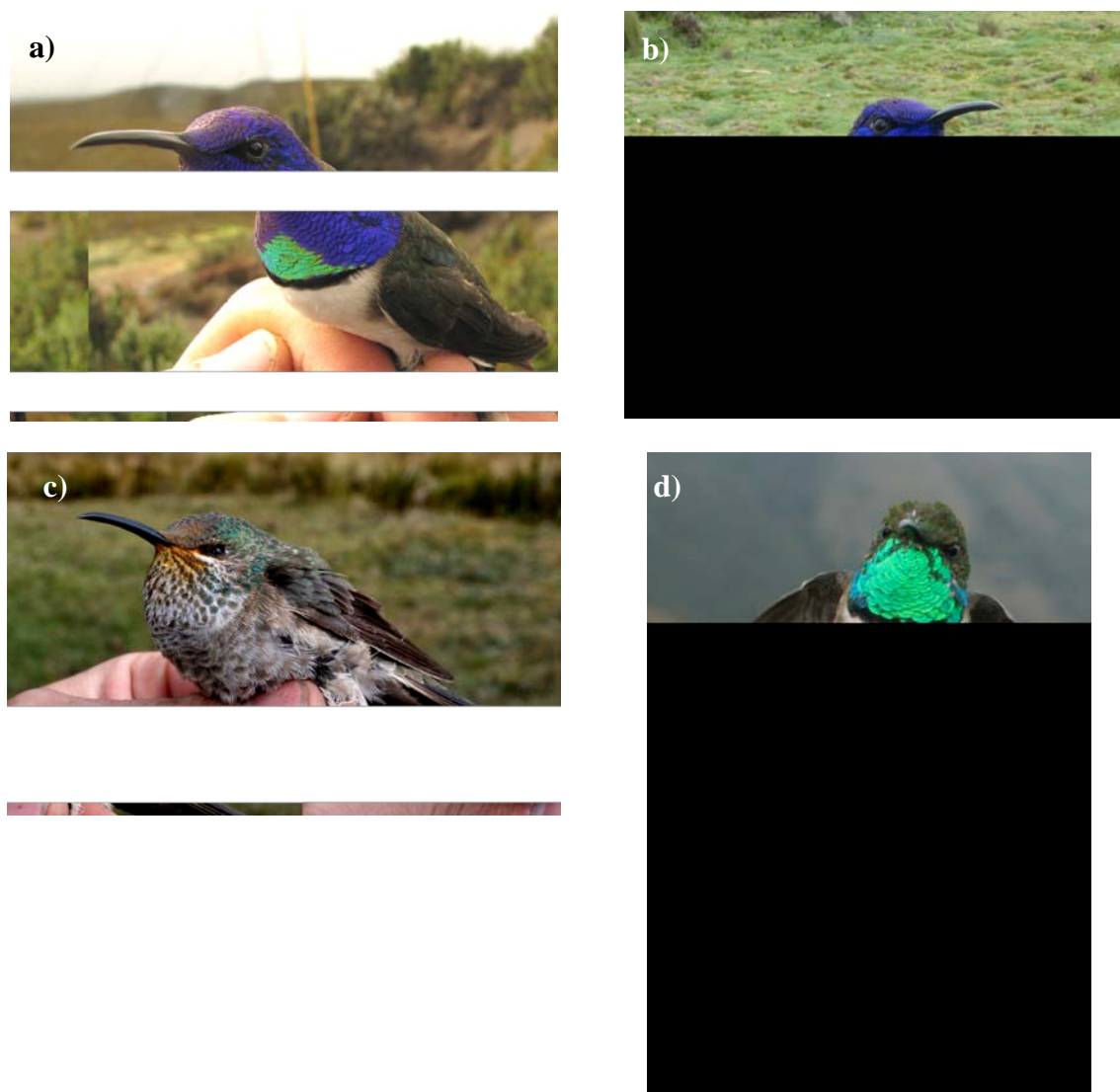


Figura 1.- Colibríes *Oreotrochilus chimborazo* y *Oreotrochilus estella stolzmanni*. a) Macho adulto, *O. c. chimborazo*; QCAZ 3784; b) macho adulto, *O. c. jamesonii*, Cayambe, QCAZ 4183; c) Hembra, *O. c. jamesonii*, Laguna Culebrillas, QCAZ 4148, la mancha anaranjada cerca del pico es de polen de *Chuquiraga jussieui*; las hembras en ambas subespecies son indistinguibles, y similares a la de *O. e. stolzmanni*, la cual se distingue por un tinte bronceo en las plumas. d) macho adulto de *O. e. stolzmanni*, Páramos de Jimbura, QCAZ 4192, individuo que fue recolectado después de realizado el análisis filogeográfico. Fotos: a y b, Héctor Cadena; c y d, Carlos Antonio Rodríguez.

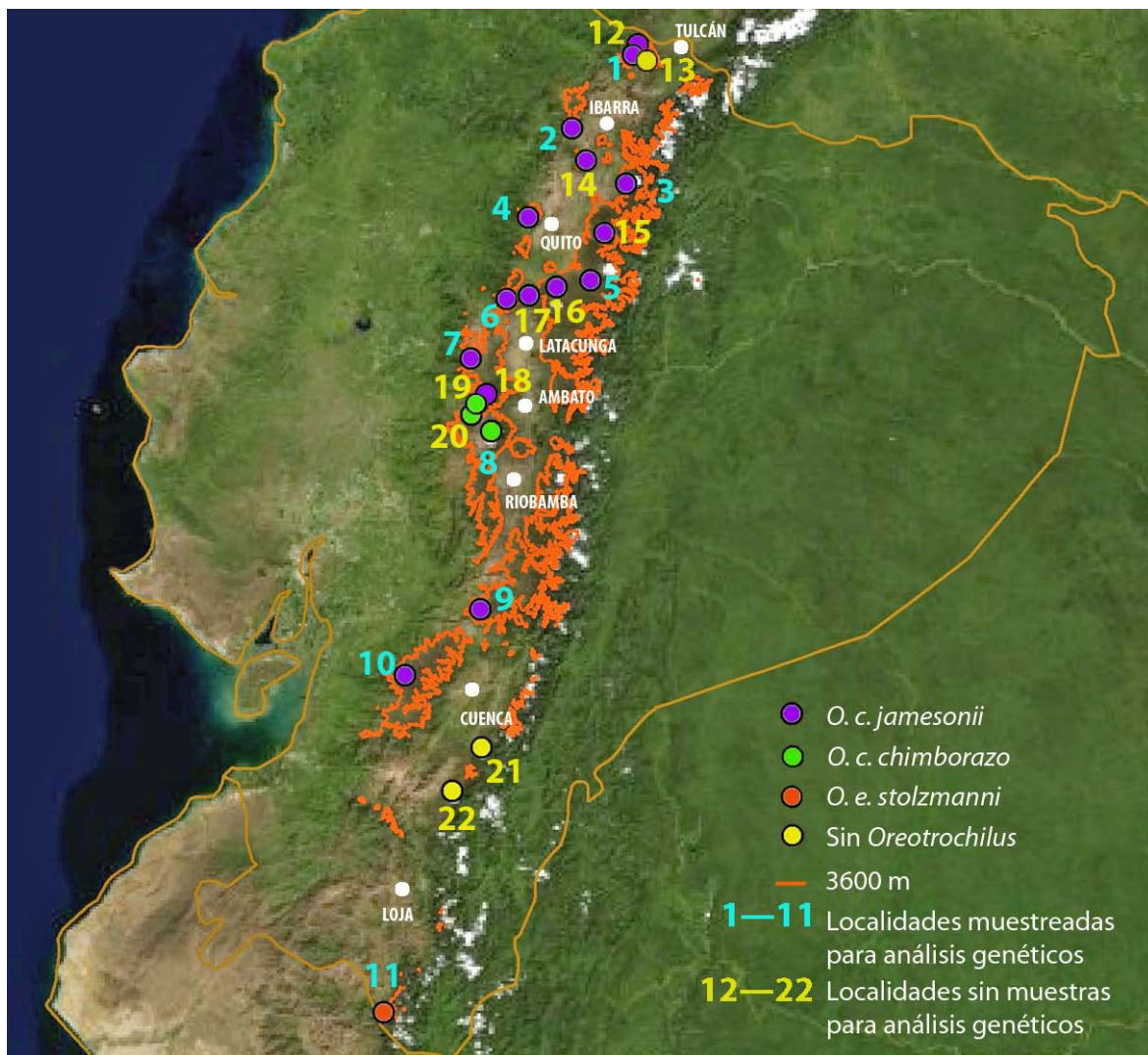


Figura 2.- Localidades visitadas durante el estudio. Se distingue entre aquellas donde se recolectaron especímenes para el análisis genético. 1) Represa Geovanny Calle, 2) Páramos de Cotacachi, 3) Cayambe, 4) Páramos de Pichincha, 5) Páramos de Antisana, 6) Refugio de los Illinizas, 7) Cordillera Apagua, 8) Cunungyacu (Chimborazo), 9) Laguna Culebrillas, 10) Migüir (El Cajas), 11) Páramos de Jimbura (Cordillera Lagunillas), 12) Volcán Chiles, 13) El Voladero, 14) Lagunas de Mojanda, 15) Páramos de Papallacta, 16) Volcán Cotopaxi, 17) Loma Santa Cruz, 18) Represa Mulá Corral, 19) Páramos de Simátug, 20) Páramos de Salinas, 21) Cordillera Moriré, y 22) Río Shincata. Imagen de fondo cortesía de NASA/WorldWinds.

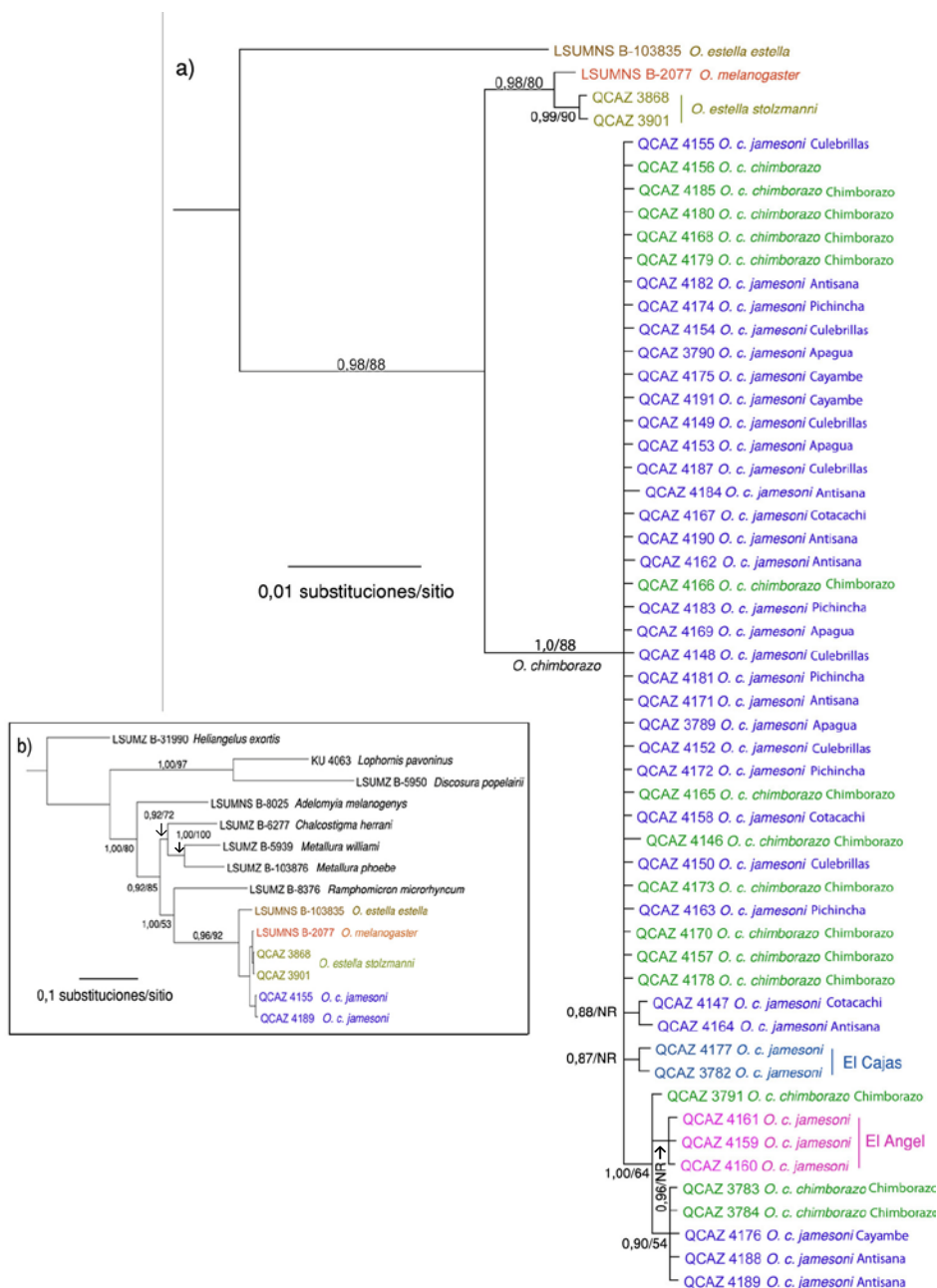


Figura 3.- Filograma basado en el árbol bayesiano (“50% Majority-Rule Consensus”) de los genes mitocondriales (ND2 y ND4; 1928 pb). a) Detalle, con enfoque en *Oretrochilus chimborazo*. b) Filogenia con todos los grupos externos incluidos; para facilitar la visualización, *Oretrochilus chimborazo* aparece representado por sólo dos especímenes. En las ramas se muestran los valores de soporte, probabilidades posteriores bayesianas/“bootstraps” de máxima verosimilitud. NR = Clado no representado en el árbol consenso correspondiente (bayesiano/máxima verosimilitud).

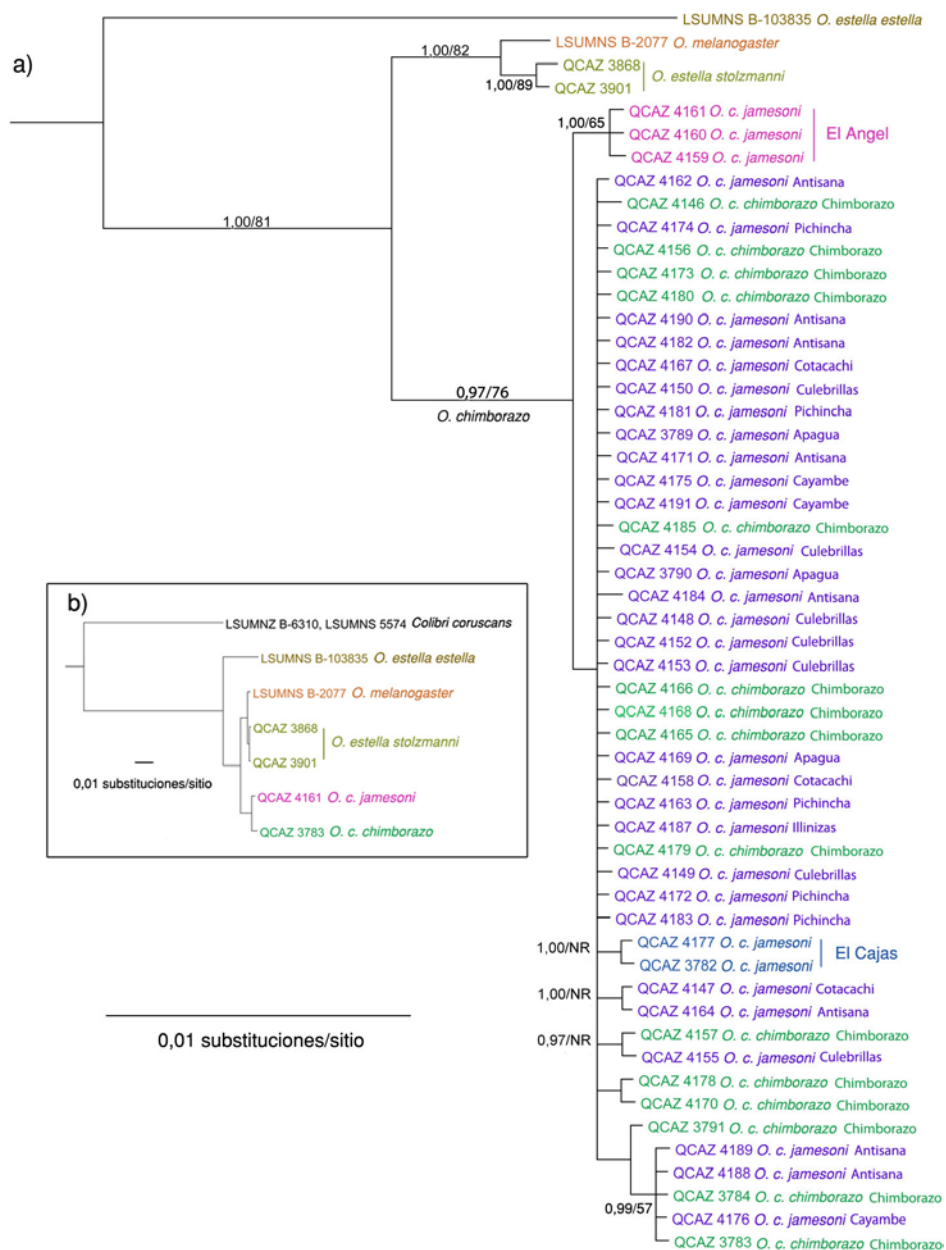


Figura 4.- Filograma basado en el árbol bayesiano (“50% Majority-Rule Consensus”) de la evidencia total (ND2, ND4 y MUSK; 2527 pb). a) Detalle, con enfoque en *Oreotrochilus chimborazo*. b) Filogenia con todos los grupos externos incluidos; para facilitar la visualización, *Oreotrochilus chimborazo* aparece representado por sólo dos especímenes. En las ramas se muestran los valores de soporte, probabilidades posteriores bayesianas/“bootstraps” de máxima verosimilitud. NR = Clado no representado en el árbol consenso correspondiente (bayesiano/máxima verosimilitud).

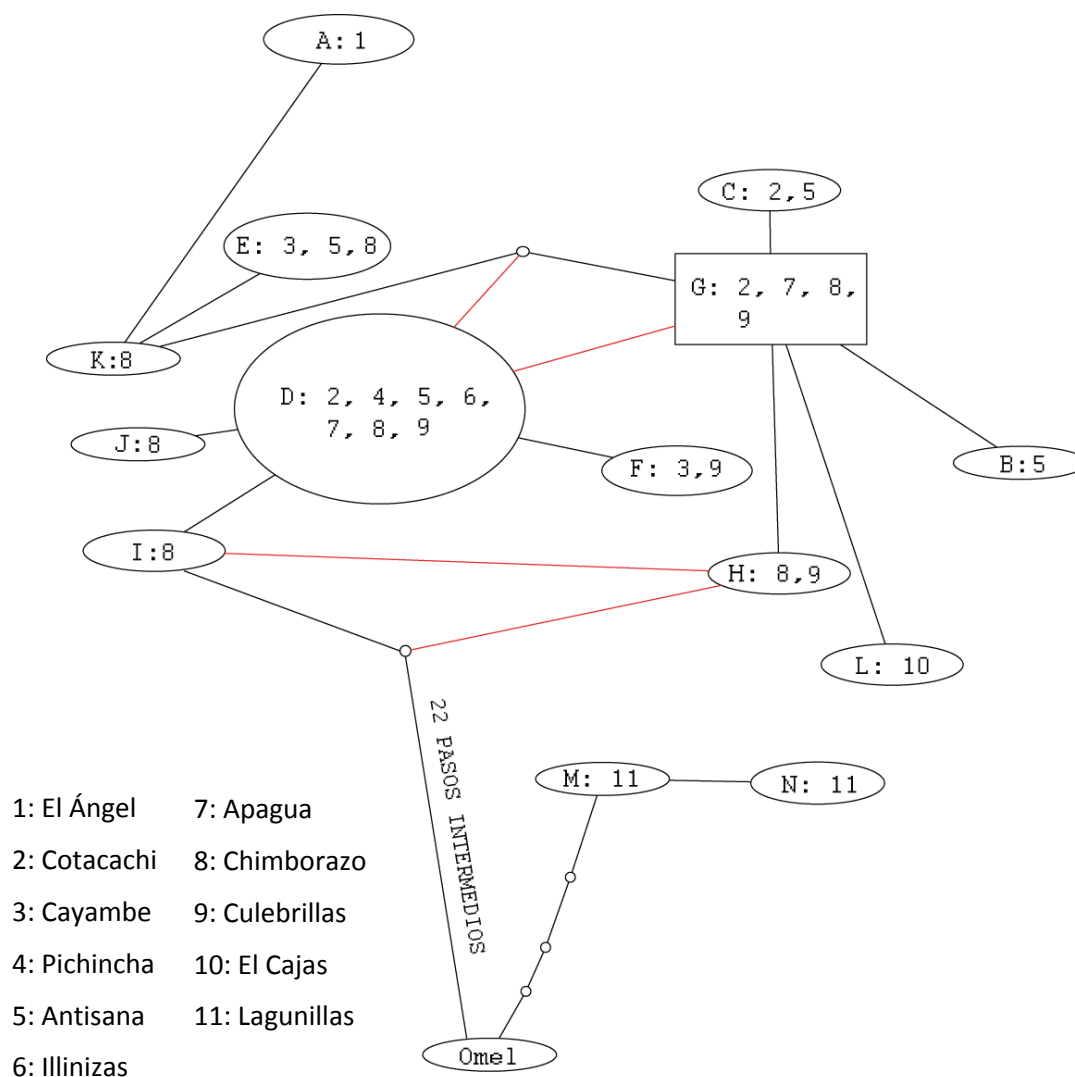


Figura 5.- Red de haplotipos de *Oreotrochilus chimborazo*, *O. estella stolzmanni* y *O. melanogaster* con la evidencia total (ND2, ND4 y MUSK; 2527 pb). Dentro de las cajas se muestra la identificación del haplotipo, en letras mayúsculas, seguido por dos puntos y una lista de localidades. En líneas rojas se muestra el mismo cambio representado cuatro veces en la red; todos los haplotipos seguirían vinculados si sólo se dibujara una de esas cuatro líneas. A — L: *O. chimborazo*; M — N: *O. estella stolzmanni*, y Omel: *O. melanogaster*.

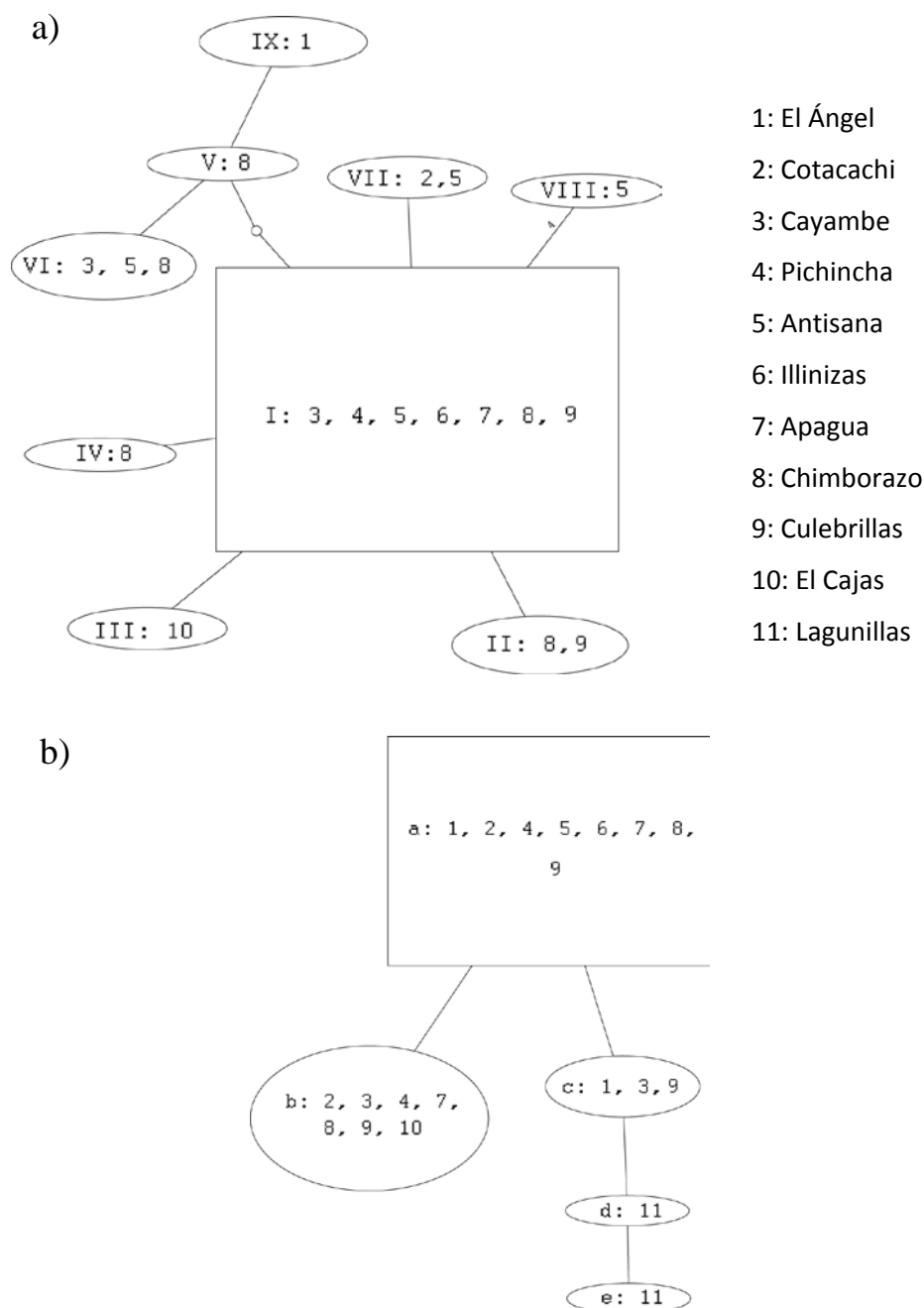


Figura 6.- Redes de haplotipos de *Oreotrochilus chimborazo* y *O. estella stolzmanni*, a) con los genes mitocondriales (1928 pb), y b) MUSK, únicamente (599 pb). Dentro de las cajas se muestra la identificación del haplotipo, en números romanos para a) y letras minúsculas para b), seguido por una lista de localidades, las mismas para ambas figuras. Todos los haplotipos en a), son de *O. chimborazo*, en b), d y e pertenecen a *O. estella stolzmanni*, y el resto a *O. chimborazo*. La nomenclatura se basa en los haplotipos mitocondriales y alelos de MUSK de la Tabla 2.

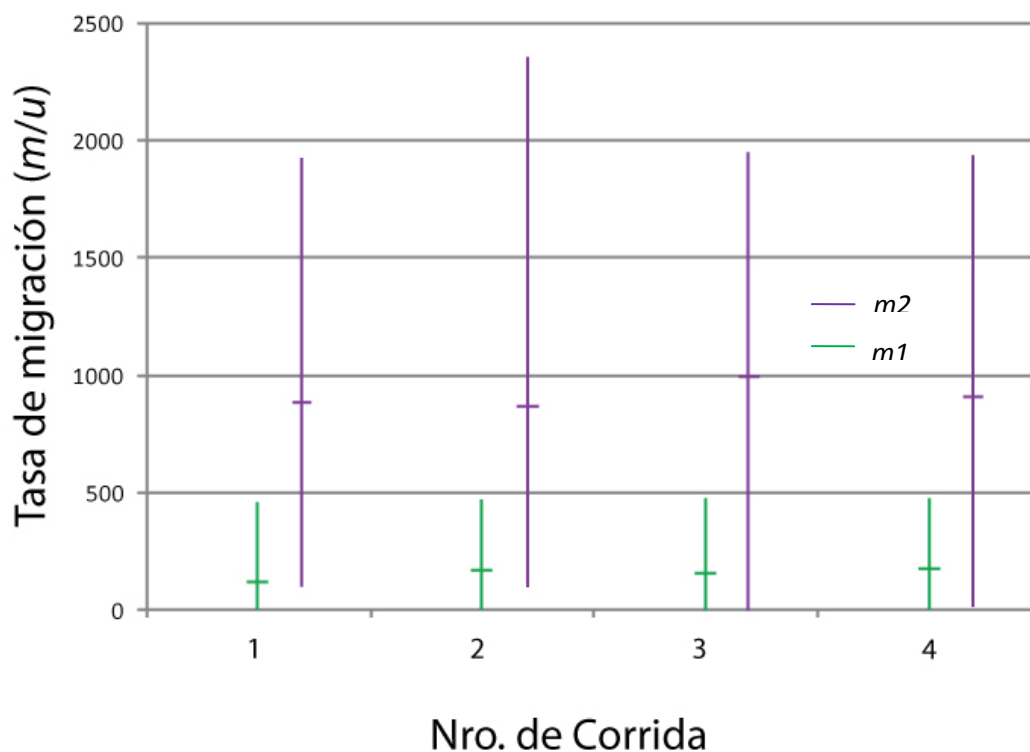


Figura 7.- Resultado del análisis de Aislamiento y Migración en base a Teoría de la Coalescencia para cuatro corridas. En esta gráfica se muestra la estimación del parámetro de la Tasa de migración, producto de la tasa de migración de una a otra población (m), expresada en número de individuos por generación, y la tasa de mutación (u), expresada en cambios de pares de bases por año. Las líneas verticales representan el rango de valores dentro del 95% del área bajo la curva marginal de probabilidad. $m_1 = O. c. chimborazo$ a $O. c. jamesonii$; $m_2 = O. c. jamesonii$ a $O. c. chimborazo$.

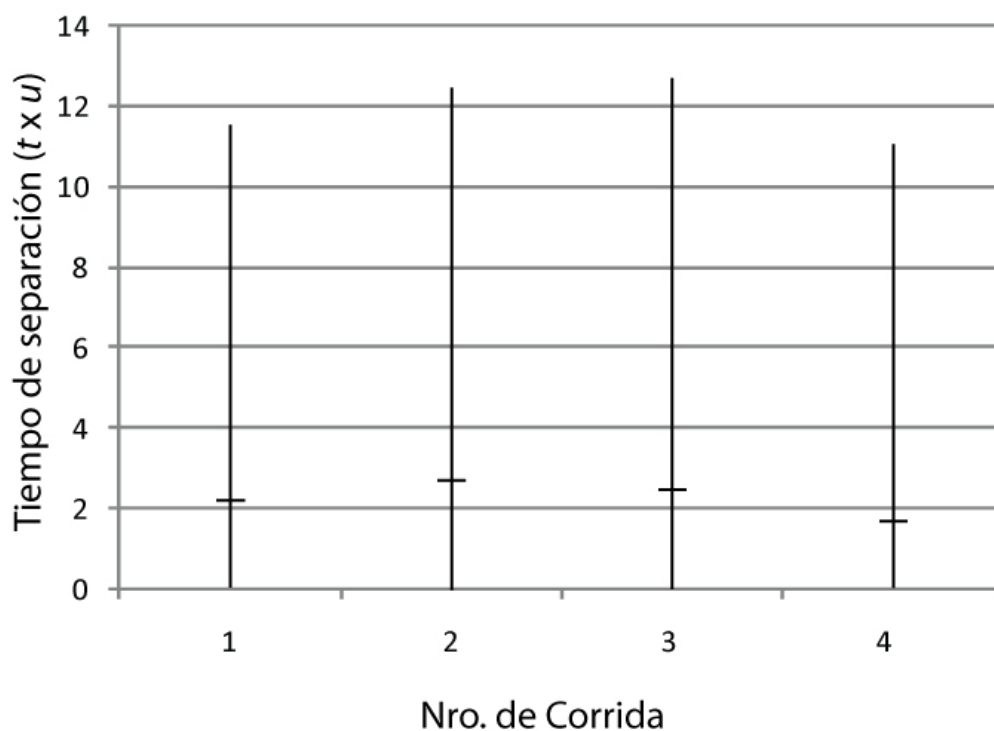


Figura 8.- Resultado del análisis de Aislamiento y Migración en base a Teoría de la Coalescencia para cuatro corridas. En este gráfico se muestran los valores estimados para el parámetro Tiempo de separación, producto del tiempo de divergencia de poblaciones, en años, y la tasa de mutación, en cambio de pares de bases por año. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza al 95%, en las cuales se marca el valor más probable.

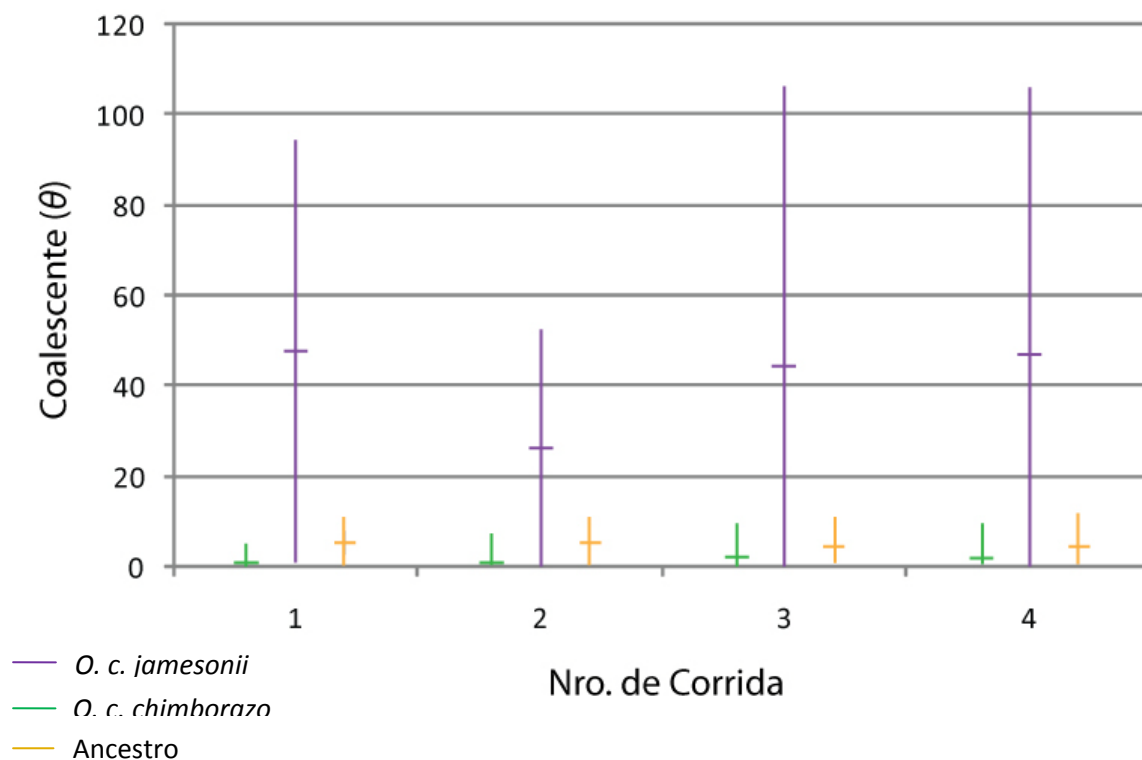


Figura 9.- Valores del coalescente (θ) para *O. c. chimborazo*, *O. c. jamesonii* y la población ancestral a ambas. Las líneas verticales representan el rango de valores que encajan dentro del 95% del área bajo la curva marginal de probabilidad. Cada línea tiene una marca que indica el valor medio del parámetro.

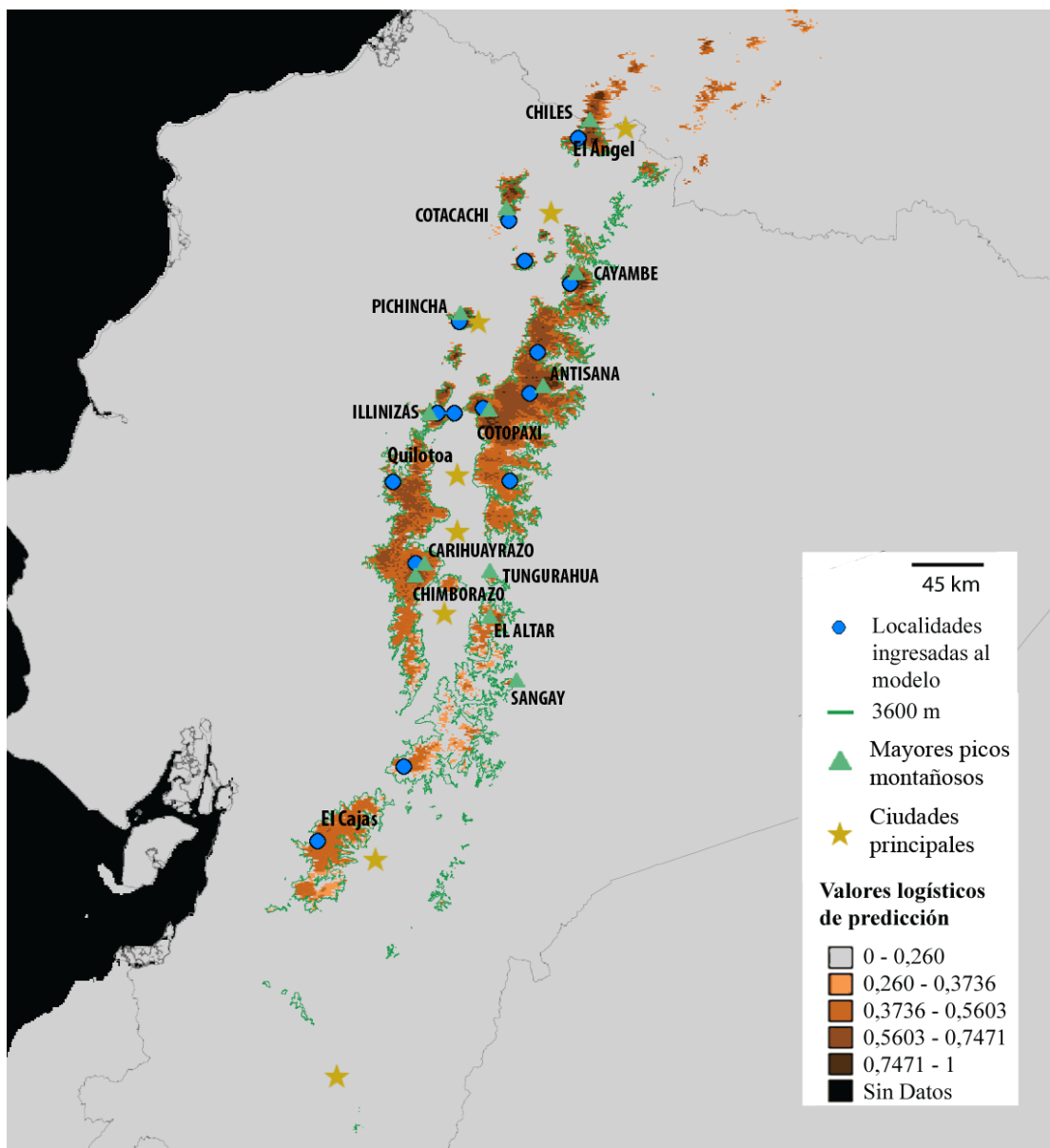


Figura 10.- Mapas predictivos de distribución geográfica para *Oreotrochilus chimborazo* en base a modelamiento de nicho con reducción previa de variables con base en ENFA. El modelamiento fue realizado en MaxEnt 3.3.2. Las ciudades corresponden a las mismas de la Figura 2. El valor logístico 0,260 representa el umbral de Mínima Presencia de las localidades de Entrenamiento.

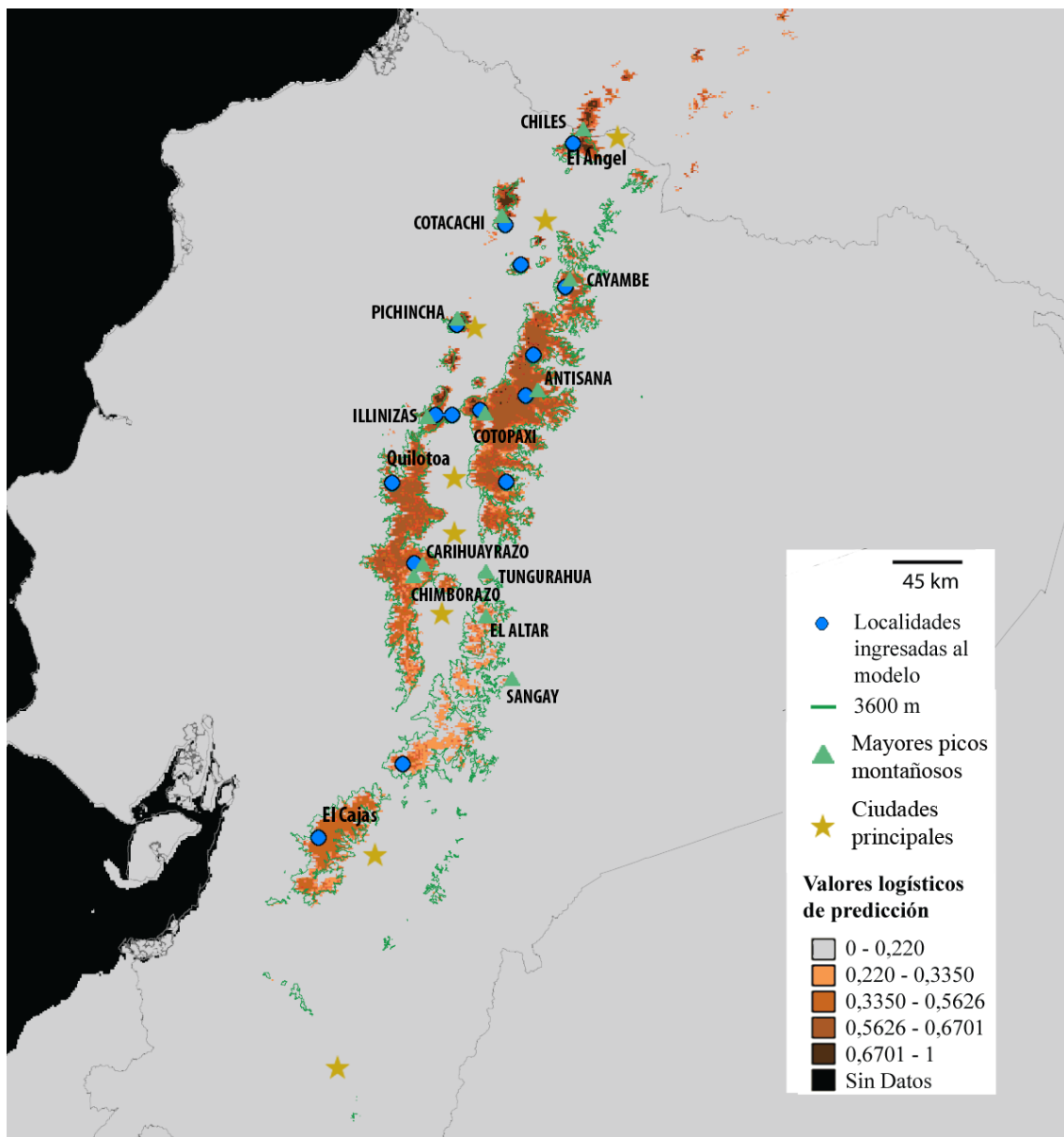


Figura 11.- Mapa predictivo de distribución geográfica para *Oreotrochilus chimborazo* en base a modelamiento de nicho con todas las 19 variables bioclimáticas de WorldClim. El modelamiento fue realizado en MaxEnt 3.3.2. Las ciudades corresponden a las mismas de la Figura 2. El valor logístico 0,220 representa el umbral de Mínima Presencia de las localidades de Entrenamiento.

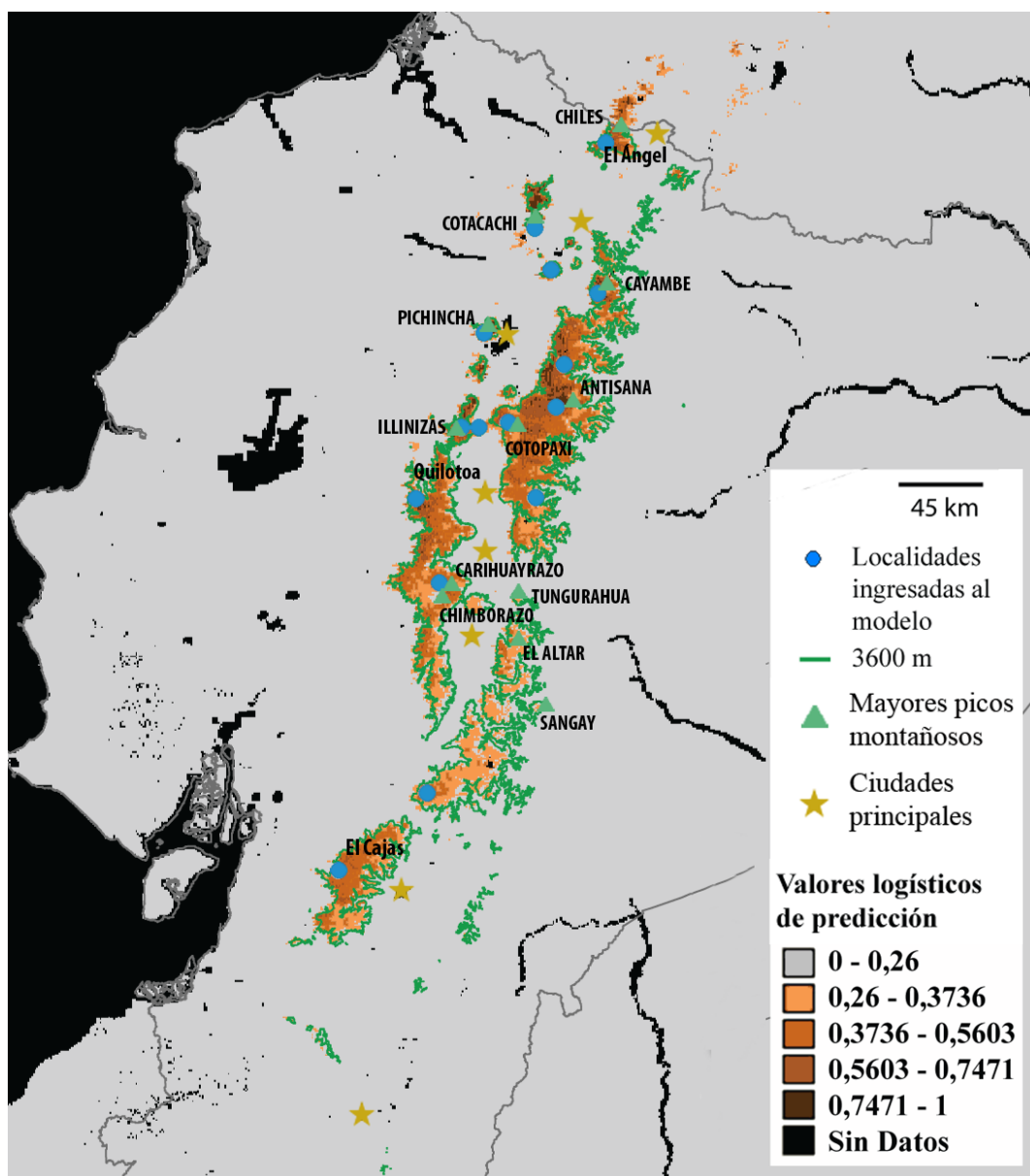


Figura 12.- Mapa predictivo de distribución geográfica en Ecuador al presente de *Oreotrochilus chimborazo*, en base a modelamiento de nicho en MaxEnt con capas bioclimáticas y de sensores remotos. Las ciudades corresponden a las mismas de la Figura 2. El valor logístico 0,26 representa el umbral de Mínima Presencia de las localidades de Entrenamiento.

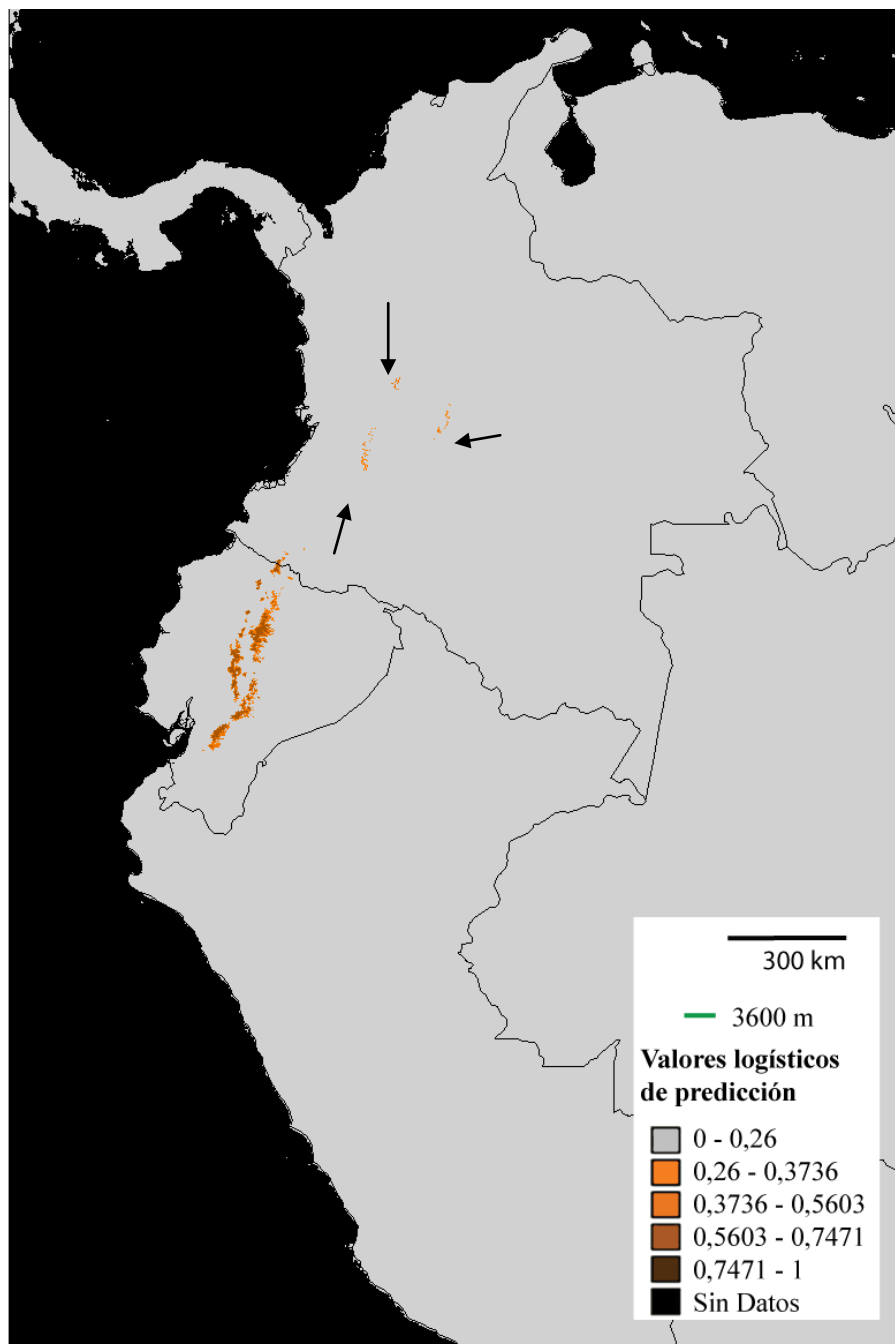


Figura 13.- Mapa predictivo de la distribución geográfica de *Oreotrochilus chimborazo* en los Andes Tropicales, en base a modelamiento con capas bioclimáticas (no se utilizaron capas de sensores remotos por falta de disponibilidad). Las flechas indican zonas predichas en Colombia, donde la especie está ausente. El valor logístico 0,26 representa el umbral de Mínima Presencia de las localidades de Entrenamiento.

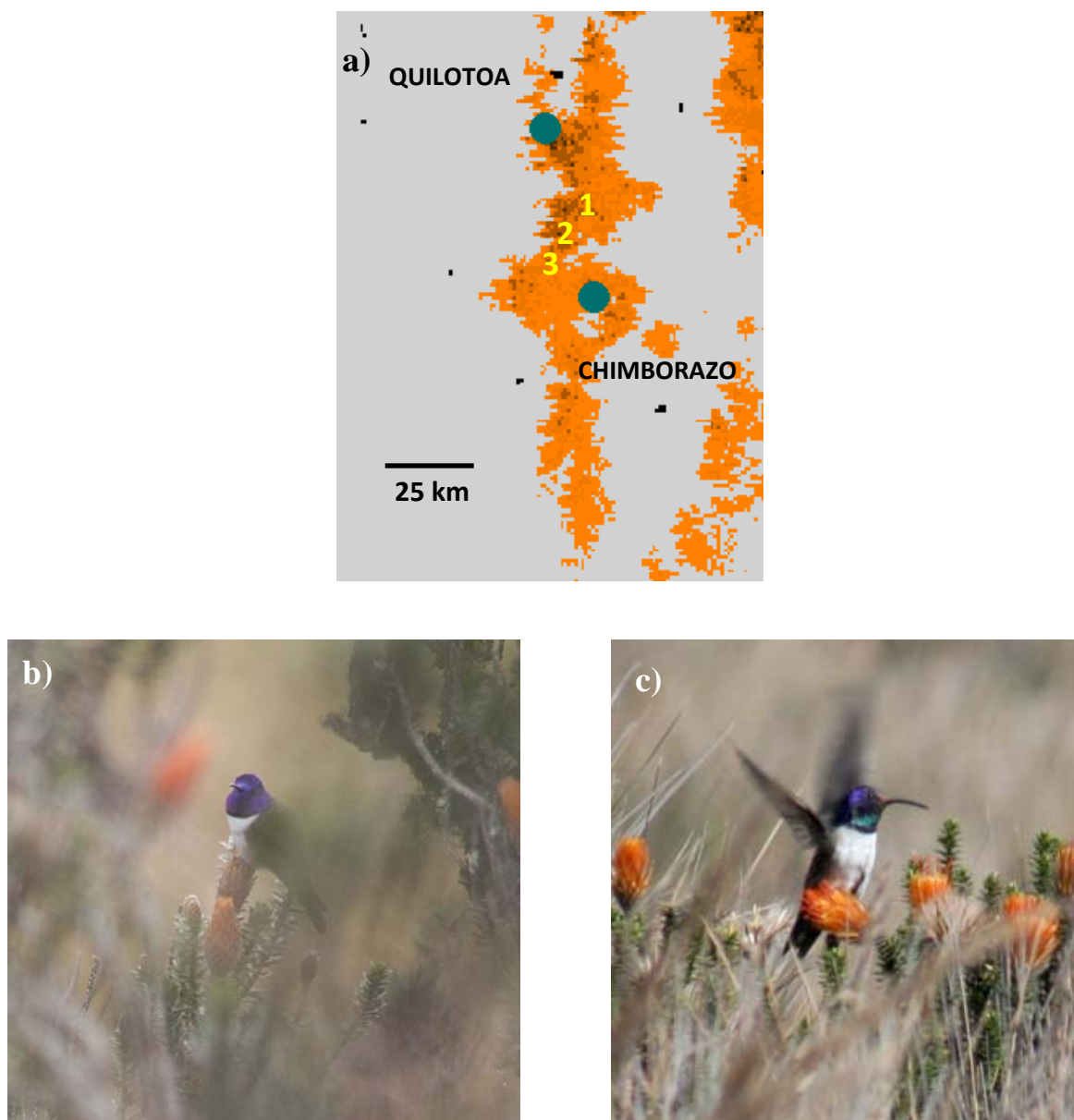


Figura 14.- Evidencia de posible zona de contacto entre *O. c. jamesonii* y *O. c. chimborazo*. a) Detalle de la región de Quilotoa y Chimborazo en el mapa de la figura 12; en turquesa se muestran las localidades utilizadas para el modelamiento. En números se muestran las localidades visitadas para comprobar esta predicción: 1, Represa Mulá Corral; 2, Simiátug; 3, Salinas. b) Individuo *O. c. jamesonii* fotografiado en Represa Mulá Corral. c) Individuo *O. c. chimborazo* fotografiado en los páramos de Salinas. En Simiátug los individuos observados fueron de *O. c. chimborazo*.

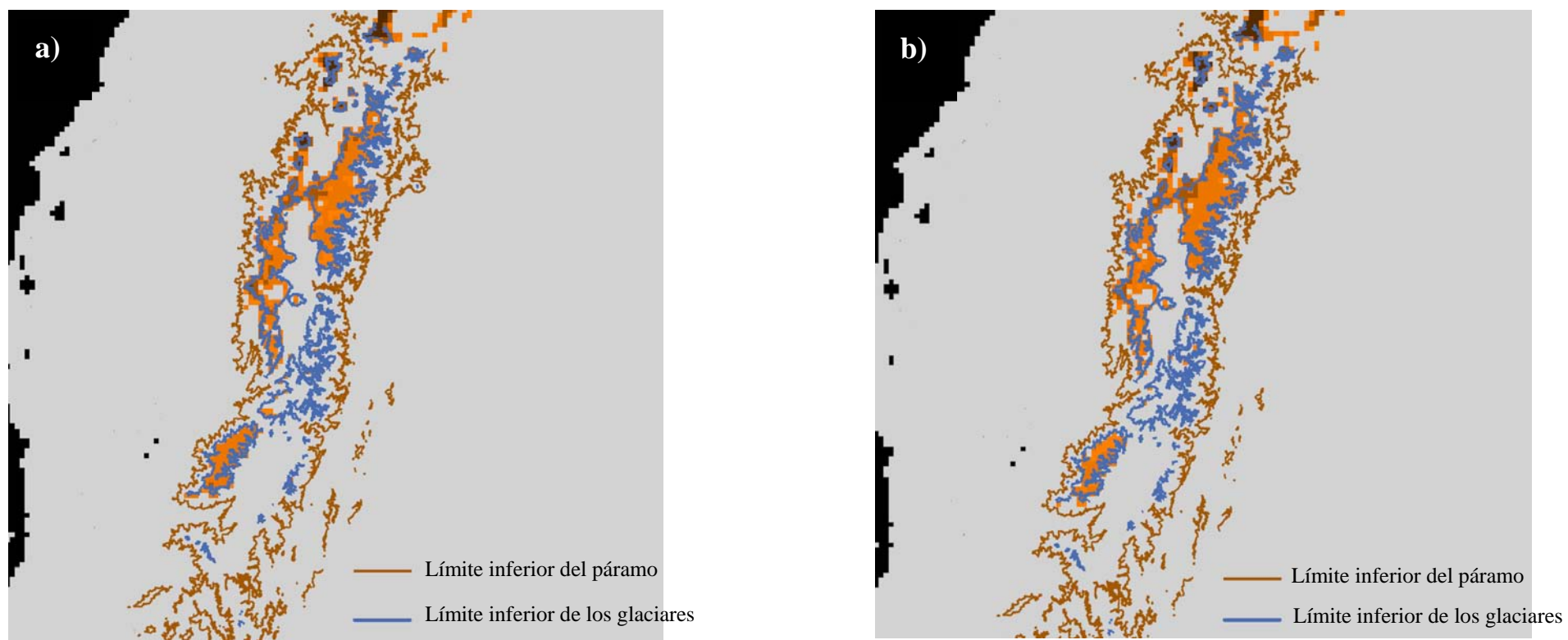


Figura 15.- Proyección del modelo al LGM (Último Máximo Glacial, 21000 años atrás). a) Modelo CCSM, b) Modelo Miroc. También se muestra la posible extensión del páramo y los glaciares según evidencia geológica y palinológica.

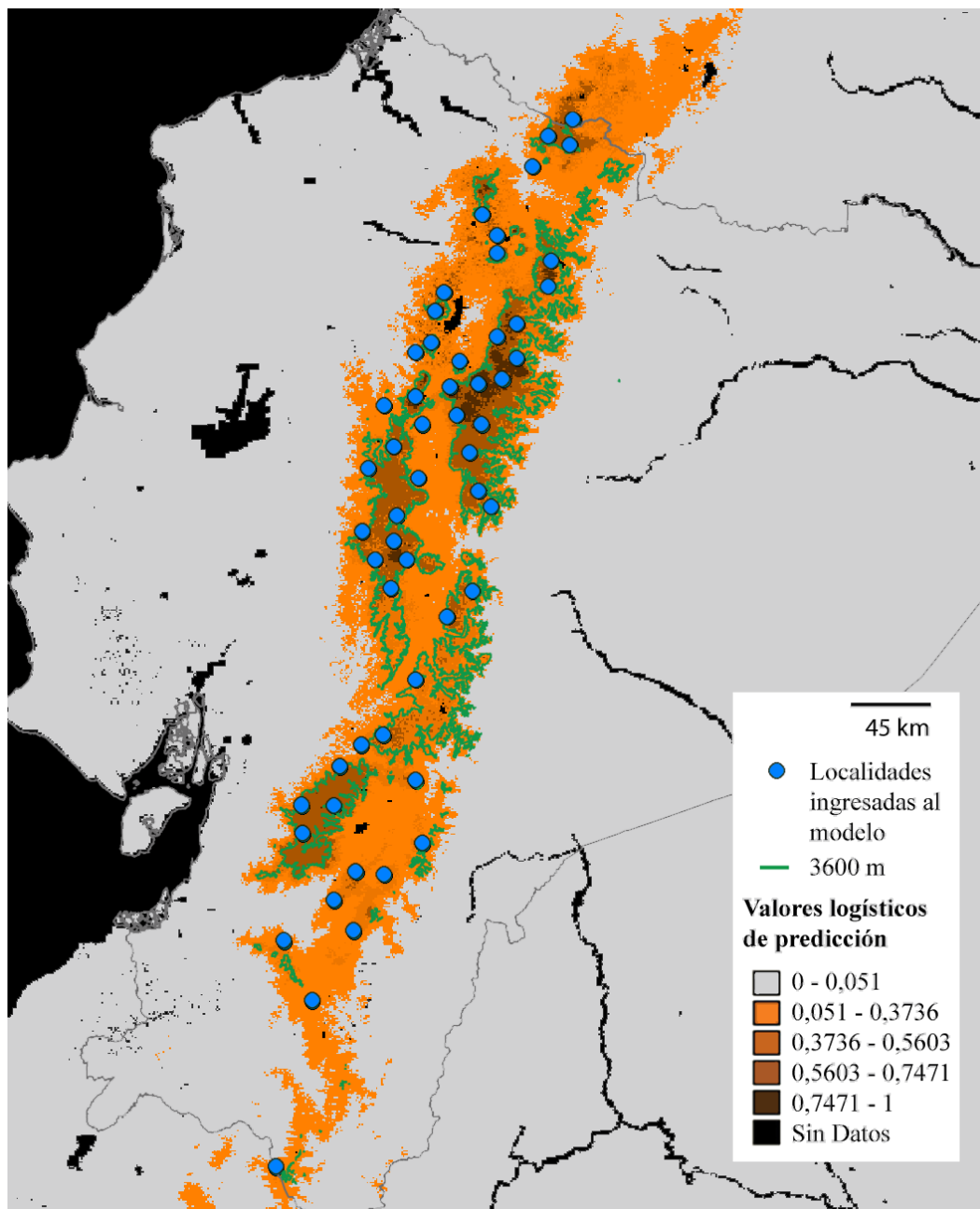


Figura 16.- Mapa predictivo de la distribución de *Chuquiraga jussieui*, en base a modelamiento de nicho en MaxEnt con capas bioclimáticas y de sensores remitos y localidades de la base de datos Tropicos®. El valor logístico 0,051 representa el umbral de Mínima Presencia de las localidades de Entrenamiento.

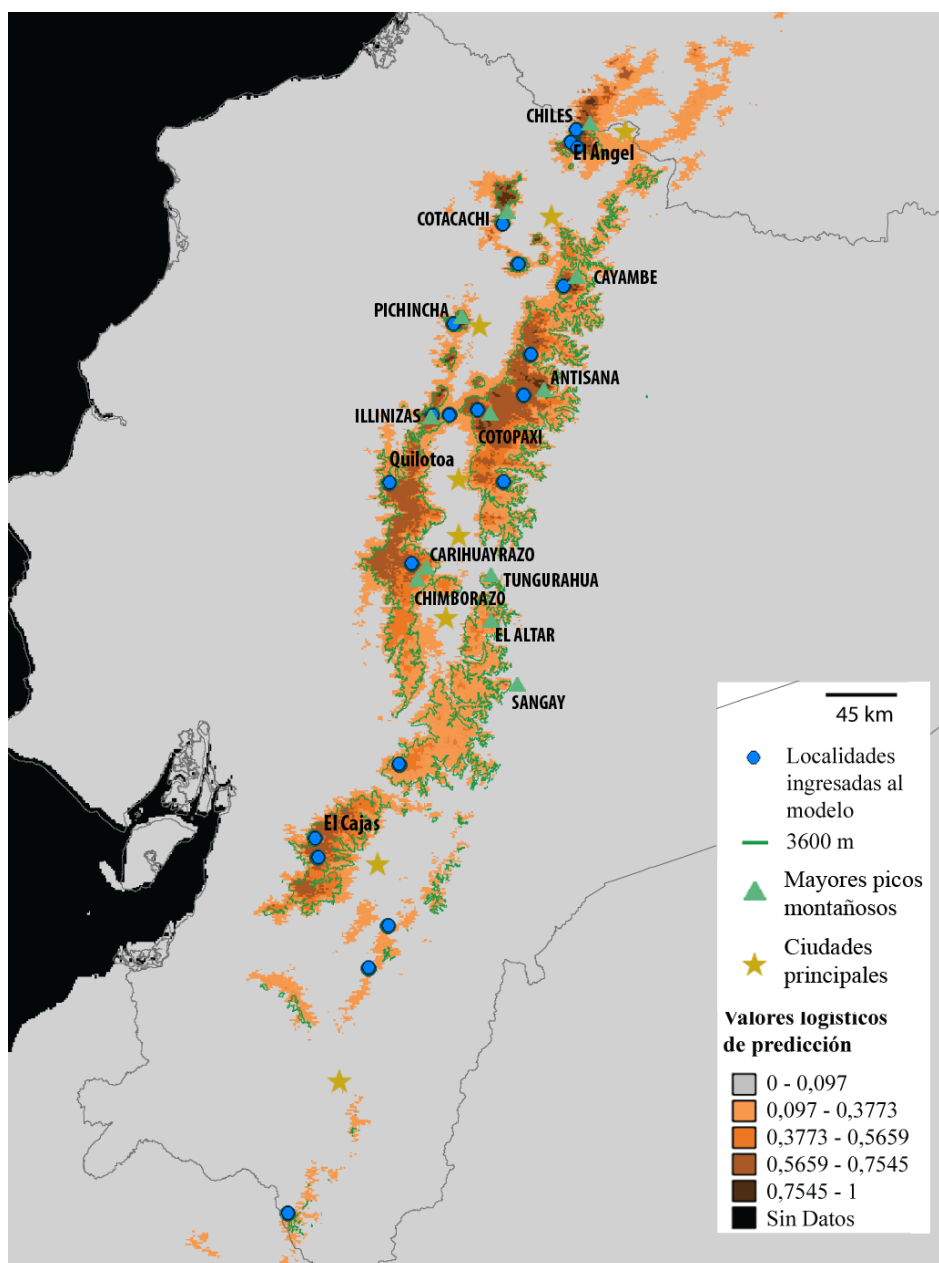


Figura 17.- Mapa predictivo de la distribución de *Chuquiraga jussieui*, en base a modelamiento de nicho en MaxEnt con capas bioclimáticas. Las localidades ingresadas al modelo fueron las registradas en este estudio. El valor logístico 0,097 representa el umbral de Mínima Presencia de las localidades de Entrenamiento.

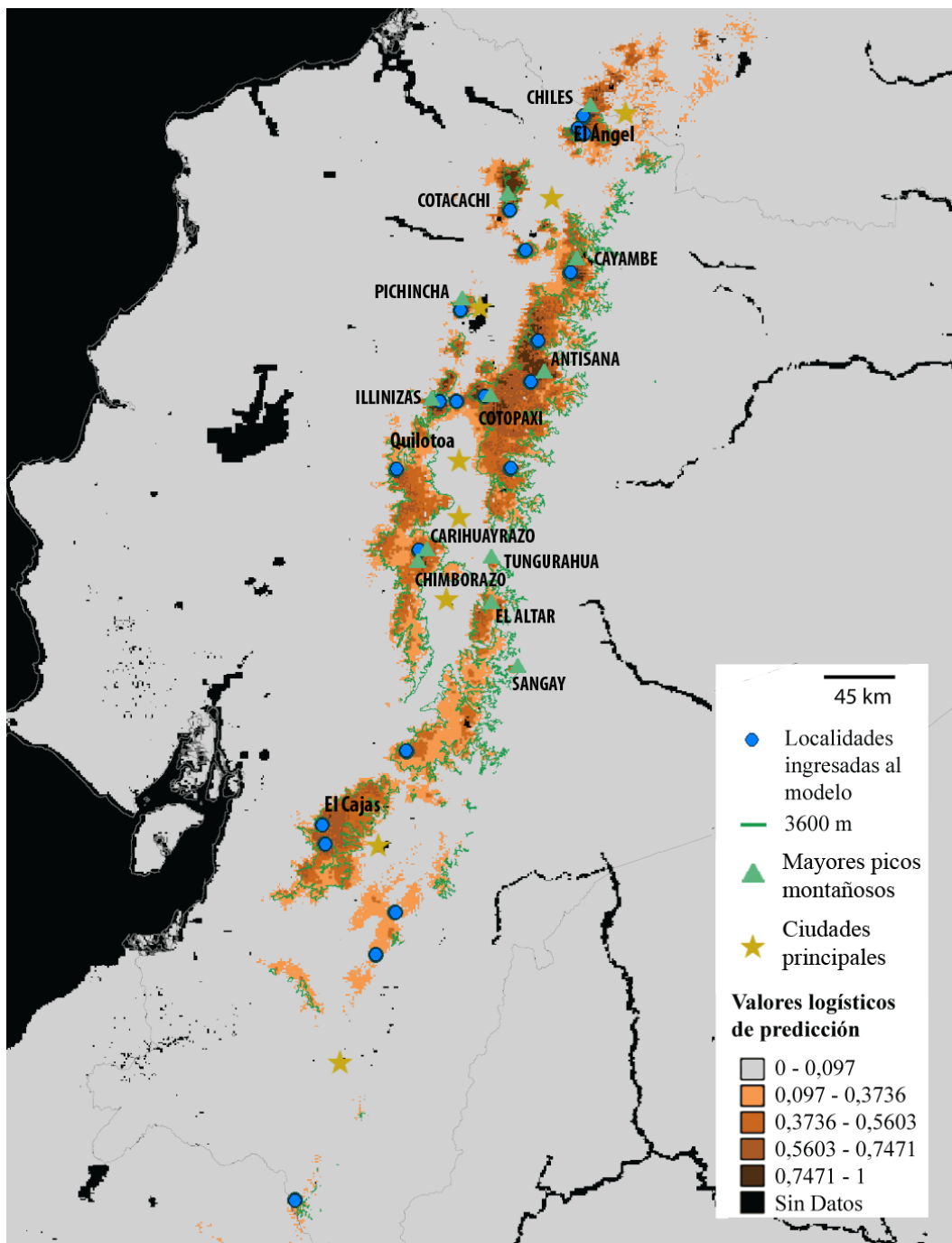


Figura 18.- Mapa predictivo de la distribución de *Chuquiraga jussieui*, en base a modelamiento de nicho en MaxEnt con capas bioclimáticas más capas de sensores remotos. Las localidades ingresadas al modelo fueron las registradas en este estudio. El valor logístico 0,097 representa el umbral de Mínima Presencia de las localidades de Entrenamiento.

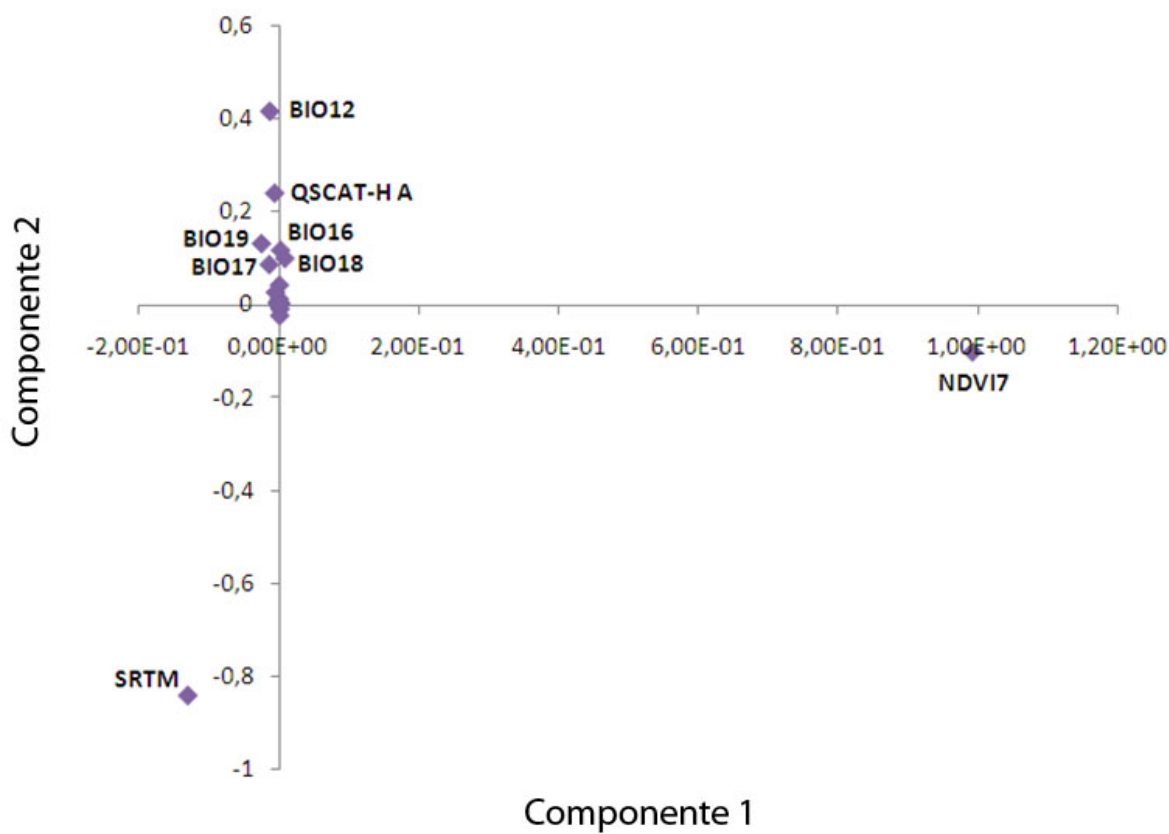
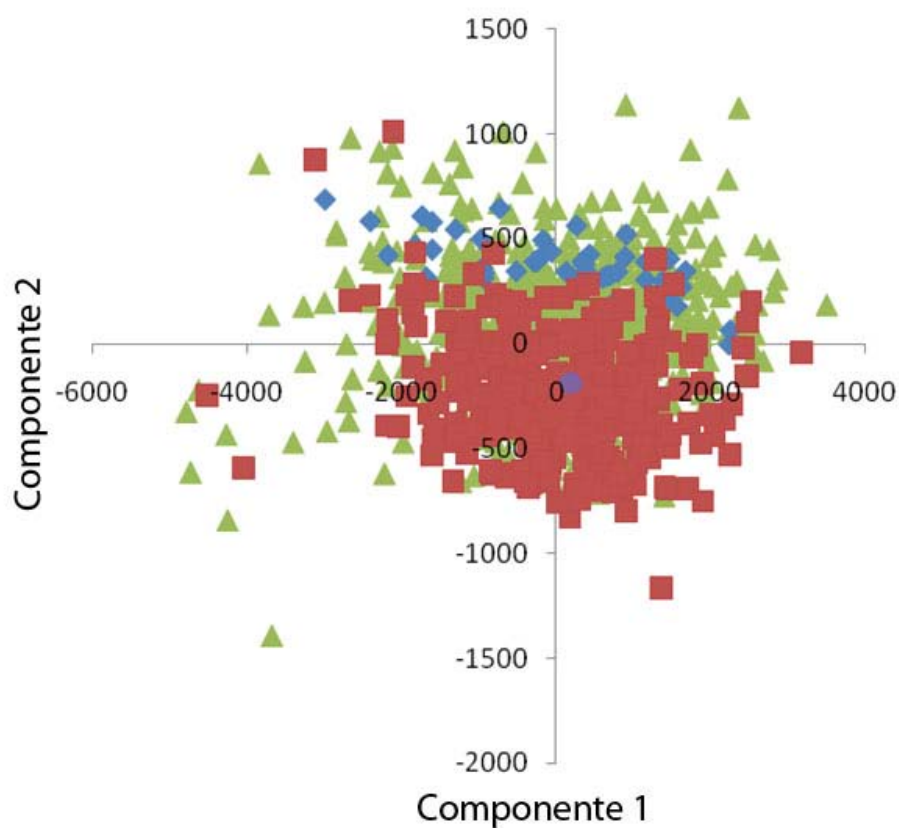


Figura 19.- Contribución de cada capa bioclimática o de sensores remotos a los dos primeros componentes del ACP de los valores ambientales de los puntos aleatorios de las distribuciones potenciales de *Oreotrochilus chimborazo* y *Chuquiraga jussieui*.



- ▲ *C. jussieui*
- ◆ *C. jussieui* Azuay-Morona Santiago-Zamora
Chinchipe
- *C. jussieui* + *C. chimborazo*
- *O. chimborazo*

Figura 20.- Distribución de los puntos aleatorios del rango geográfico potencial de *O. chimborazo* y *C. jussieui* en los dos primeros componentes del Análisis de Componentes Principales (ACP) de las capas bioclimáticas y de sensores remotos a la largo de zonas potencialmente habitadas por al menos una de las especies.

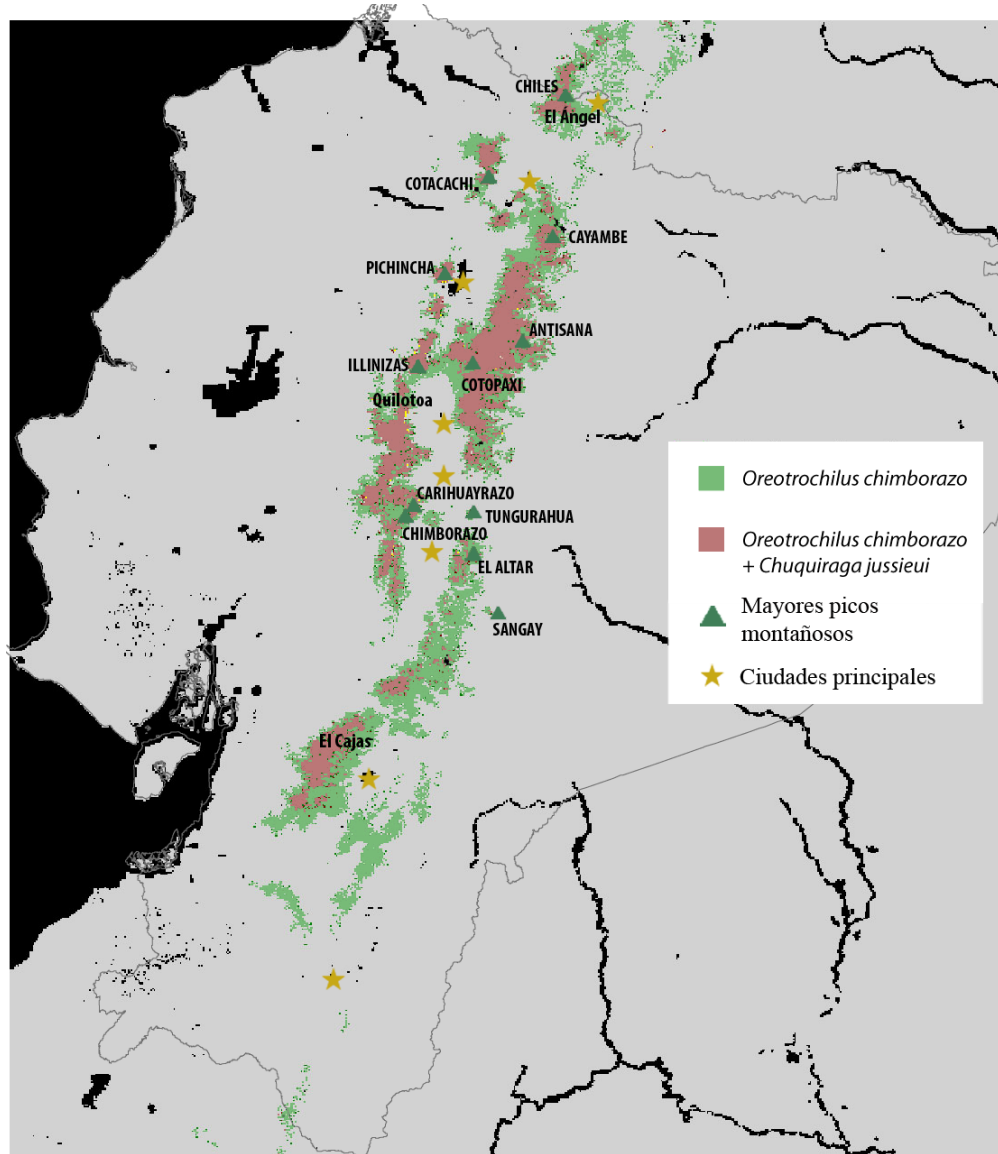


Figura 21.- Comparación de los mapas predictivos de *O. chimborazo* y *C. jussieui*, correspondientes a las figuras 2a y 6b, respectivamente. Se muestran las regiones ocupadas únicamente por *C. jussieui* y las compartidas entre ambas especies. Las zonas exclusivas a *O. chimborazo* son imperceptibles a esta escala. Para realizar el mapa se colapsaron los valores logísticos en datos de presencia/ausencia en base al mínimo umbral de presencia de puntos de entrenamiento. Las ciudades corresponden a las mismas de la Figura 2.



Figura 22.- Posible polimorfismo en El Cajas. Los individuos capturados en Migüir mostraron ambos una tenue banda oscura transversal en las rectrices que no ha sido encontrada en otras localidades. El individuo de la imagen superior corresponde a QCAZ 4177, y el de la inferior a QCAZ 3782.

11. TABLAS

Tabla 1.- Localidades visitadas durante el estudio. Las coordenadas corresponden al datum WGS84. No todas las localidades fueron visitadas para el muestreo genético, en aquellas donde sí se recolectaron especímenes se especifica el número. Tampoco se registró a *Oreotrochilus chimborazo* en todas, y aquellas donde estuvo ausente han sido debidamente marcadas. En Páramos de Jimbura, a pesar de que se recolectaron dos especímenes de *O. estella*, no se registró a *O. chimborazo*. En todas las localidades hubo *Chuquiraga jussieui*.

Localidad	Longitud	Latitud	Elevación	Nro. Individuos analizados
Volcán Chiles	O 77°58'12,9"	N 00°48'22,8"	3703 m	-
Geovanny Calle	O 77°59'58,5"	N 00°44'39,5"	3866 m	3
El Voladero†	O 77°58'00,0"	N 00°43'00,0"	3657 m	-
Páramos de Cotacachi	O 78°20'46,4"	N 00°19'40,5"	3830 m	3
Lagunas de Mojanda	O 78°16'00,5"	N 00°07'31,6"	3760 m	-
Páramos de Cayambe	O 78°02'13,4"	N 00°00'39,0"	4085 m	3
Volcán Pichincha	O 78°35'43,4"	S 00°10'56,3"	4123 m	3
Páramos de Papallacta	O 78°12'06,1"	S 00°20'15,6"	4042 m	-
Páramos de Antisana	O 78°14'25,0"	S 00°32'37,2"	4103 m	8
Volcán Cotopaxi	O 78°28'35,3"	S 00°37'06,9"	3870 m	-
Loma Santa Cruz	O 78°37'00,5"	S 00°38'42,4"	3897 m	-
Refugio de los Illinizas	O 78°42'14,1"	S 00°38'42,6"	4750 m	1
Cordillera Apagua	O 78°55'28,8"	S 00°59'21,8"	4080 m	3
Represa Mulá Corral*	O 78°49'42,3"	S 01°11'35,9"	4148 m	-
Páramos de Simátug*	O 78°55'15,7"	S 01°18'37,9"	4215 m	-
Páramos de Salinas *	O 79°00'04,4"	S 01°22'37,3"	4127 m	-
Cunungyacu	O 78°48'33,7"	S 01°24'12,5"	4348 m	15
Laguna Culebrillas	O 78°52'23,6"	S 02°25'29,8"	4080 m	8
Migüir	O 79°18'14,9"	S 02°48'08,5"	3718 m	2
Cordillera Moriré†	O 78°55'52,2"	S 03°15'00,1"	3303 m	-
Río Shincata†	O 79°01'54,0"	S 03°27'47,3"	3003 m	-
Páramos de Jimbura†	O 79°26'24,8"	S 04°42'42,7"	3360 m	2

† Localidades con ausencia de *Oreotrochilus chimborazo*.

* Localidades visitadas después de realizado el modelamiento de nicho (ver Resultados, 5.4.4).

Tabla 2.- Especímenes de *Oreotrochilus chimborazo* y *Oreotrochilus estella* recolectados durante el presente estudio. Se indica también las secuencias disponibles por cada fragmento empleado en el análisis filogenético, así como los correspondientes haplotipos mitocondriales y los alelos del intrón MUSK. La designación de los haplotipos y alelos fue arbitraria. ND = haplotipo o alelo no disponible; en los casos en los que se cuenta con sólo un gen mitocondrial, se especifica entre paréntesis el haplotipo más probable de acuerdo al gen disponible. Macho = M, Hembra = H.

Espécimen	Identificación	Sexo	Localidad	ND2	ND4	MUSK	Haplotipo mitocondrial	Alelo MUSK
QCAZ 4190	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Antisana	X	X	X	A	a
QCAZ 4184	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Antisana	X	X	X	H	b
QCAZ 4182	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Antisana	X	X	X	A	a
QCAZ 4164	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Antisana	X	X	X	G	a
QCAZ 4162	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Antisana	X	X	X	A	a
QCAZ 4171	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Antisana	X	X	X	A	a
QCAZ 4188	<i>O. c. jamesonii</i>	ND	Antisana	X	X	X	B	a
QCAZ 4189	<i>O. c. jamesonii</i>	ND	Antisana	X	X	X	B	a
QCAZ 4172	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Pichincha	X	X	X	A	a
QCAZ 4163	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Pichincha	X	X	X	A	a
QCAZ 4181	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Pichincha	X	X	X	A	a
QCAZ 4174	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Pichincha	X	X	X	A	a
QCAZ 4183	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Pichincha	X	X	X	A	a

QCAZ 4191	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Cayambe	X		X	ND (A)	c
QCAZ 4175	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Cayambe	X	X	X	A	c
QCAZ 4176	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Cayambe	X	X	X	B	b
QCAZ 3783	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X	X	B	b
QCAZ 3784	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X	X	B	a
QCAZ 4165	<i>O. c. chimborazo</i>	H	Cunungyacu	X	X	X	A	b
QCAZ 4168	<i>O. c. chimborazo</i>	H	Cunungyacu	X	X	X	A	b
QCAZ 4156	<i>O. c. chimborazo</i>	H	Cunungyacu	X	X	X	A	a
QCAZ 4157	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X	X	D	b
QCAZ 4173	<i>O. c. chimborazo</i>	H	Cunungyacu	X	X	X	A	a
QCAZ 4146	<i>O. c. chimborazo</i>	H	Cunungyacu	X	X	X	F	a
QCAZ 4178	<i>O. c. chimborazo</i>	H	Cunungyacu	X	X	X	D	a
QCAZ 4185	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X		A	ND
QCAZ 3791	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X	X	I	a
QCAZ 4180	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X	X	A	a
QCAZ 4166	<i>O. c. chimborazo</i>	H	Cunungyacu	X	X	X	A	b
QCAZ 4170	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X	X	D	a
QCAZ 4179	<i>O. c. chimborazo</i>	M	Cunungyacu	X	X	X	A	a
QCAZ 4167	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Cotacachi	X	X	X	A	a
QCAZ 4158	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Cotacachi	X	X	X	A	b
QCAZ 4147	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Cotacachi	X	X	X	G	B
QCAZ 4187	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Illinizas	X	X	X	A	A

QCAZ 4169	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Apagua	X	X	X	A	b
QCAZ 3789	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Apagua	X	X	X	A	a
QCAZ 3790	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Apagua	X	X	X	A	a
QCAZ 4177	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Migüir	X	X	X	E	b
QCAZ 3782	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Migüir	X	X	X	E	b
QCAZ 4160	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Geovanny Calle (El Ángel)	X	X	X	C	c
QCAZ 4161	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Geovanny Calle (El Ángel)	X	X	X	C	a
QCAZ 4159	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Geovanny Calle (El Ángel)	X	X	X	C	c
QCAZ 4153	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Culebrillas		X	X	ND (A)	b
QCAZ 4152	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Culebrillas	X	X	X	A	b
QCAZ 4155	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Culebrillas	X	X	X	D	b
QCAZ 4148	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Culebrillas		X	X	ND (A)	b
QCAZ 4149	<i>O. c. jamesonii</i>	M	Culebrillas	X	X	X	A	a
QCAZ 4150	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Culebrillas		X	X	ND (A)	c
QCAZ 4154	<i>O. c. jamesonii</i>	H	Culebrillas	X	X		A	ND
QCAZ 3868	<i>O. e. stolzmanni</i>	H	Jimbura	X	X	X	J	d
QCAZ 3901	<i>O. e. stolzmanni</i>	H	Jimbura	X	X	X	J	e

Tabla 3.- Diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π), y sus respectivas desviaciones estándar, para cada gen mitocondrial estudiado y la combinación de ambos en cada subespecie de *Oreotrochilus chimborazo*, y para la especie en general.

	h	$ds(h)$	π	$ds(\pi)$
ND2				
<i>O. chimborazo</i>	0,398	0,099	0,00083	0,00022
<i>O. c. jamesonii</i>	0,412	0,083	0,00088	0,00019
<i>O. c. chimborazo</i>	0,467	0,148	0,00103	0,00036
ND4				
<i>O. chimborazo</i>	0,358	0,100	0,00044	0,00013
<i>O. c. jamesonii</i>	0,355	0,084	0,00043	0,00011
<i>O. c. chimborazo</i>	0,343	0,128	0,00039	0,00014
ND2+ND4				
<i>O. chimborazo</i>	0,561	0,096	0,00065	0,00014
<i>O. c. jamesonii</i>	0,538	0,100	0,0006	0,00015
<i>O. c. chimborazo</i>	0,695	0,109	0,00073	0,00019

Tabla 4.- Resultados de tres pruebas de detección de desviación de neutralidad en la evolución de las secuencias: D de Tajima, D^* de Fu y Li y F^* de Fu y Li. Las pruebas fueron ejecutadas en DNAsp, programa que además entregó valores de significancia estadística. Cuando $p > 0,10$, el estadístico no es significativamente distinto de lo que se esperaría bajo el modelo neutral.

Población	D de Tajima	p	D^* de Fu y Li	p	F^* de Fu y Li	p
<i>O. chimborazo</i>	-1,00456	>0,10	0,03316	>0,10	-0,35889	>0,10
<i>O. c. jamesonii</i>	-1,05564	>0,10	-0,00018	>0,10	-0,38294	>0,10
<i>O. c. chimborazo</i>	-0,38901	>0,10	0,5052	>0,10	0,3082	>0,10

Tabla 5- Valores del modelo de sustitución según el árbol de Máxima Verosimilitud. En esta tabla se muestran las frecuencias de las bases, el parámetro alpha (α), proporción de sitios invariables (Pinv), el puntaje del árbol ($-\ln 1$) y las tasas de sustitución por cada tipo de cambio. Los modelos preseleccionados fueron: HKY + G (Hasegawa *et al.*, 1985), para MUSK; TIM3 + I (Posada, 2003), para los genes mitocondriales; y TrN + G (Tamura y Nei, 1993), para los tres genes combinados.

	Frecuencias de las bases				α	Pinv	$-\ln 1$	Tasas de sustitución					
	A	C	G	T				AC	AG	AT	CG	CT	GT
MUSK	0,30	0,19	0,21	0,30	1,68	0,635	-2094,3231	Tasa de transversión/transición = 1,5516					
Genes mitocondriales	0,33	0,38	0,10	0,19	—	0,647	-7252,9855	0,435	22,809	1,000	0,435	16,997	1,000
Evidencia total	0,32	0,29	0,14	0,25	0,06	—	-5242,8308	1,000	61,421	1,000	1,000	22,375	1,000

12. ANEXOS

Anexo 1.- Protocolos utilizados para las reacciones de PCR.

Gen: ND2

- 1) 94 °C; 10 min
- 2) 92 °C; 30 s
- 3) 55 °C; 30 s
- 4) 72 °C; 1,5 min
- 5) Repetir pasos 2–4, 25 veces
- 6) 72 °C, 10 min

Gen: ND4

- 1) 94 °C; 10 min
- 2) 92 °C; 30 s
- 3) 50 °C; 30 s
- 4) 72 °C; 1,5 min
- 5) Repetir pasos 2–4, 10 veces
- 6) 92 °C; 30 s
- 7) 48 °C; 30 s
- 8) 72 °C; 1,5 min
- 9) Repetir pasos 6–8, 10 veces
- 10) 92 °C; 30 s
- 11) 45 °C; 30 s
- 12) 72 °C; 1,5 min
- 13) Pasos 10–12, 10 veces

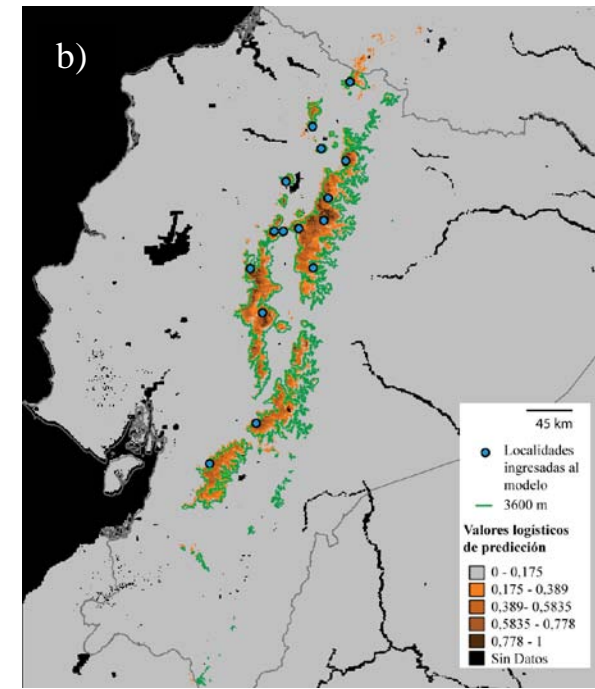
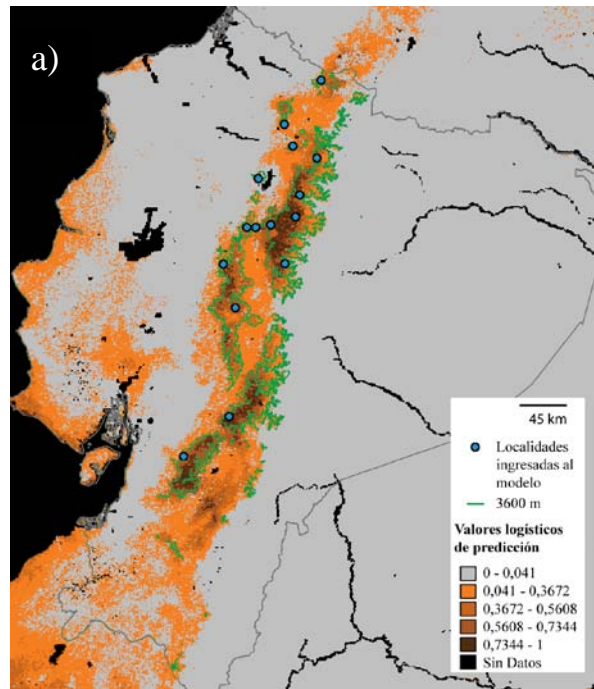
14) 72 °C; 7 min

Gen: MUSK

- 1) 95 °C; 3 min
- 2) 95 °C; 30 s
- 3) 62 °C; 45 s
- 4) 72 °C; 1 min
- 5) Repetir pasos 2–4, disminuyendo la temperatura del paso 3 en 1 °C por ciclo, 10 veces.
- 6) 95 °C; 30 s
- 7) 52 °C; 45 s
- 8) 72 °C; 1 min
- 9) Repetir pasos 6–8, 20 veces
- 10) 72 °C; 10 min

Anexo 2.- Variables bioclimáticas de WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005) usadas en este estudio, y el correspondiente parámetro climático del que se almacena información en cada una de ellas.

Variable	Parámetro climático
BIO1	Temperatura media anual
BIO2	Rango medio diario (Media de la diferencia entre la máxima y la mínima temperatura de cada mes)
BIO3	Isotermalidad ($100 \times \text{BIO2}/\text{BIO7}$)
BIO4	Estacionalidad térmica (Desviación estándar de la temperatura media anual $\times 100$)
BIO5	Temperatura máxima del mes más cálido
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío
BIO7	Rango anual de temperatura (BIO5 - BIO6)
BIO8	Temperatura media de la cuarta parte del año más húmeda
BIO9	Temperatura media de la cuarta parte del año más seca
BIO10	Temperatura media de la cuarta parte del año más cálida
BIO11	Temperatura media de la cuarta parte del año más fría
BIO12	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes más húmedo
BIO14	Precipitación del mes más seco
BIO15	Estacionalidad de la precipitación (Coeficiente de variación)
BIO16	Precipitación de la cuarta parte del año más húmeda
BIO17	Precipitación de la cuarta parte del año más seca
BIO18	Precipitación de la cuarta parte del año más cálida
BIO19	Precipitación de la cuarta parte del año más fría



Anexo 3.- Mapas predictivos, de acuerdo con el correspondiente modelo de MaxEnt, de la distribución geográfica al presente de *Oreotrochilus chimborazo*, basado solamente en la información de sensores remotos, sin la capa de SRTM (a) y con SRTM (b). Los porcentajes de contribución de las variables fueron los siguientes: a) media QSCAT-H, 75,8%; LAI1, 15,5%; LAI3, 3,1%; TREE, 2,4%; desviación estándar QSCAT-V, 0,6%; LAI4, 0,4%; NDVI7, 0,2%. b) SRTM, 91,6%; NDVI7, 4,3%; media QSCAT-H, 2,4%; LAI1, 0,8%; LAI3, 0,6%; desviación estándar QSCAT-H, 0,4%; TREE y LAI4, 0.

Anexo 4.- Glosario de siglas utilizadas en esta disertación, con su correspondiente traducción al español.

ACP.- Análisis de Componentes Principales.

AIC.- Akaike Information Criterion. Criterio de Información de Akaike.

CCSM.- Community Climate System Model. Modelo Sistemático Climático de la Comunidad.

ENFA.- Environmental Factor Analysis. Análisis de Factores Ambientales.

ESS.- Effective Sample Size. Tamaño de la Muestra Efectiva.

GARLI.- Generic Algorithm for Rapid Likelihood Inference. Algoritmo Genético para Inferencia Rápida de Verosimilitud.

HKY + G.- Hasegawa-Kishino-Yano substitution model, with a gamma distribution among variable sites. Modelo de substitución de Hasegawa-Kishino-Yano, con una distribución gamma entre sitios variables.

IMa.- Isolation and Migration Analysis. Análisis de Aislamiento y Migración.

LAI.- Leaf Area Index. Índice de Superficie Foliar.

LGM.- Last Glacial Maximum. Último Máximo Glacial.

MHMC.- Metropolis-Hasting Markov Chains Monte Carlo. Cadenas Markov Monte-Carlo con criterio de optimalidad Metropolis-Hasting.

MaxEnt.- Maximun Entropy. Máxima Entropía.

Miroc.- Model for Interdisciplinary Research on Climate. Modelo para Investigación Interdisciplinaria del Clima.

MODIS.- Moderate Resolution Imaging Spectroradiometer. Espectroradiómetro productor de Imágenes con Resolución Moderada.

MUSK.- Muscle Specific Kinase. Quinasa Músculo-específica.

MV.- Máxima Verosimilitud

ND2.- Nicotinamide Adenine Dinucleotide subunit 2. Segunda subunidad del Dinucleótido de Adenina-nicotinamida.

ND4.- Nicotinamide Adenine Dinucleotide subunit 4. Cuarta subunidad del Dinucleótido de Adenina-nicotinamida.

NDVI.- Normalized Difference Vegetation Index. Índice de Vegetación con Diferencia Normalizada.

NOAA-AVHRR.- National Oceanic and Atmospheric Administration Advanced Very High Resolution Radiometer. Radiómetro Avanzado de Muy Alta Resolución de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica.

PCR.- Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

QSCAT.- Quick Scatterometer. Escaterómetro Rápido.

ROC.- Receiver Operator Curve. Curva de Receptor y Operador.

SRTM.- Shuttle Radar Topographic Mission. Misión Topográfica con Radar de Transbordador.

TIM3 + I.- Transitional substitution model 3, with a proportion of invariable sites. Tercer modelo de substitución transicional, con una proporción de sitios invariables.

TREE.- Tree percentage coverture. Cobertura de porcentaje de árboles.

TrN + G.- Tamura-Nei variable base frequencies substitution model, with a gamma distribution among variable sites. Modelo de substitución con bases de distintas frecuencias de Tamura-Nei, con una distribución gamma entre sitios variables.

UPGMA.- Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean. Método de aparejamiento no ponderado en base a media aritmética