



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"VARIACION GENETICA EN EL COMPLEJO DEL BOLSERO
CASTAÑO (*Icterus spurius*): EVIDENCIA DE UNA
RECIENTE DIVERGENCIA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
ESTEBAN LOPEZ MEDRANO



DIRECTOR DE TESIS: DR. KEVIN ERLING OMLAND

CODIRECTOR DE TESIS: DR. ADOLFO GERARDO M. VARGAS GONZALEZ

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (Méjico).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Variación Genética en el Complejo del Bolsero Castaño (*Icterus spurius*): Evidencia de una Reciente Divergencia"

realizado por Esteban López Medrano con número de cuenta 9421779-5

quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dr. Kevin Erling Omland

Propietario Dr. Adolfo Gerardo Navarro Sigüenza

Propietario Dr. Juan Jose Morrone Lupi

Suplente Dra. Blanca Estela Hernández Baños

Suplente M. en C. Pilar Gabriela Ibañez Hernández

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



A mi abuelita Martha †

y

A mis sobrinos Priscila, Adrian y Axel

El presente trabajo se elaboró en el Laboratorio del Dr. Kevin E. Omland de la University of Maryland, Baltimore County (UMBC). Asimismo, parte del presente trabajo y los contactos necesarios para llevarlo a cabo, se generaron en el Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" de la Facultad de Ciencias, UNAM, como parte de las actividades del Taller de "Faunística, Sistemática y Biogeografía de Vertebrados Terrestres e Insectos de México" impartido por los profesores: Dr. Jorge Llorente Bousquets, Dr. Adolfo Navarro Siguënza, Dr. Juan José Morrone Lupi, Dr. Oscar Flores Villela, Dr. Adrián Nieto Montes de Oca, Dr. Luis Medrano González, M. en C. Armando Luis Martínez, M. en C. Livia León Paniagua, Biól. Alejandro Gordillo Martínez y Biól. Luis Canseco Márquez.

Asimismo, el trabajo de laboratorio y la estancia inherente a este trabajo en la UMBC, fue financiado por el Art and Science Department de la University of Maryland, Baltimore County y por la National Science Foundation (NSF) Started Grant (DEB-0004400). Mientras que el apoyo financiero en México para las actividades relacionadas con la carrera y el presente trabajo fue gracias a los proyectos CONABIO E-018, CONACYT R-27961, DEGAPA-PAPIIT IN214200 e IN233002.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo excepcional.

NOMBRE: ESTEBAN LOPEZ MEDRANO

FECHA: 22 - ENERO - 2004

FIRMA: [Signature]

AGRADECIMIENTOS

A Ernes y Arce por el amor, la confianza y el apoyo que siempre me han dado y que en conjunto me han servido para ser la persona que soy y para poder llegar hasta donde he llegado y también, por el buen ejemplo que siempre me han inculcado. A Caro y Cris por su gran cariño y por darme tantas alegrías.

A ti Adriana por darme la oportunidad de amarte, así como por la gran confianza que me tienes y el apoyo que me brindas a cada momento. También, por la forma y sinceridad con la que vives este amor y por despertar en mi tantos y tantos sueños. Asimismo, por todos tus comentarios que me ayudan a esforzarme cada día más.

Al Dr. Adolfo Navarro por brindarme la oportunidad para desarrollarme tanto personal como profesionalmente y por la confianza y el apoyo incondicional.

Al Dr. Kevin Omland por brindarme la oportunidad de demostrar mi potencial y por la confianza y apoyo incondicional.

A mi estimado amigo Javier Salgado por todos los conocimientos que me proporcionó y por todas las buenas ambiciones que despertó en mí.

A Octavio, Ale Gordillo, Luis Antonio y Samuel por ser mis guías y mentores en el mundo de las aves y de la sistemática.

A Jason Baker, Chris Feldman, Jeff Petters, Beatriz Kondo, Jeff Laeps y Joe Smith por toda la ayuda y amistad que me brindaron durante mi estancia en el laboratorio y en general, en E. U. Así como a los Miller's por todo el cariño y apoyo incondicional.

A David (Kruger) por darle significado a la palabra hermano y por la confianza y apoyo incondicional, así como por tener una hermosa familia que me ha dado tanto.

A Dafné, Abril y Diana por su gran amistad que me ha dado tanto.

A Isadora, Lupita Castillo, Aldo y Alonso por su cariño, ayuda y apoyo.

A mis amigos del Museo: Magali, Nanda, Gaby, Itzel, Chente, Hernan, Yosh, Cesar, Erick y toda la demás gente que hizo de mí estancia el Museo una de mis mejores experiencias.

A mis sinodales el Dr. Juan Jose Morrone, la Dra. Blanca Hernández y la M. en C. Gabriela Ibáñez por su tiempo y por sus comentarios.

Y a toda la gente que durante toda mi vida me brindo su amistad y que me ayudaron a esforzarme cada día más.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	4
Morfología.....	4
Distribución.....	6
Hábitat.....	6
OBJETIVOS.....	9
MÉTODOS.....	10
Muestras.....	10
Marcadores moleculares.....	10
Procedimientos de Laboratorio.....	11
Análisis Filogenéticos.....	11
Análisis de Genética Poblacional.....	12
RESULTADOS.....	13
Secuencias.....	13
Análisis Filogenéticos.....	14
Análisis de Genética Poblacional.....	15
DISCUSIÓN.....	21
Reciente Divergencia.....	21
Tiempo de Divergencia.....	21
Límites de Especie.....	22
CONCLUSIONES.....	24
LITERATURA CITADA.....	25
APÉNDICE 1. Información de cada muestra.....	30
APÉNDICE 2. Secuencias de la Región Control.....	32
APÉNDICE 3. Secuencias del gen Citocromo- <i>b</i>	36

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

CUADRO 1. Criterios para definir a las especies con base en su nivel de divergencia.....	2
CUADRO 2. Intervalos de medidas del ala, cola y el culmen expuesto para las dos subespecies del complejo <i>Icterus spurius</i>	6
CUADRO 3. Distancias genéticas dentro y entre subespecies que componen el complejo <i>Icterus spurius</i> , usando secuencias de DNA mitocondrial de la Región Control y el gen Citocromo <i>b</i>	13
CUADRO 4. Resultados de la AMOVA (Excoffier <i>et al.</i> , 1992). Índices de fijación (F_{ST}) para <i>I. s. spurius</i> e <i>I. s. fuertesi</i> basados en las secuencias correspondientes a la Región Control.....	16
CUADRO 5. Valores de F_{ST} para el “Grupo Estadounidense” y el “Grupo Mexicano” basados en las secuencias correspondientes a la Región Control.....	16
FIGURA 1. Ejemplificación del proceso de especiación.....	3
FIGURA 2. Complejo <i>Icterus spurius</i>	5
FIGURA 3. Mapa de distribución correspondiente al complejo <i>Icterus spurius</i>	7
FIGURA 4. Sitios de colecta.....	10
FIGURA 5. Red de relaciones filogenéticas sin raíz para la secuencias correspondientes a la Región Control (RC), obtenido del análisis en PAUP* usando Máxima Parsimonia.....	17
FIGURA 6. Árbol Filogenético correspondiente a las secuencias de Citocromo <i>b</i> (Cit- <i>b</i>), obtenido del análisis en PAUP* usando Máxima Parsimonia.....	18
FIGURA 7. Árbol Filogenético correspondiente a la combinación de las secuencias de RC y Cit- <i>b</i> , obtenido del análisis en PAUP* usando Máxima Verosimilitud.....	19
FIGURA 8. Árbol Filogenético correspondiente a la combinación de las secuencias de RC y Cit- <i>b</i> , obtenido del análisis en PAUP* usando Consenso Estricto.....	20

INTRODUCCIÓN

El proceso de especiación ha sido y es tema central de muchas de las discusiones que aún prevalecen entre los biólogos y filósofos modernos. El término especiación fue empleado por primera vez en 1906 por el entomólogo Orator F. Cook y describía el proceso en el cual hubo un origen o multiplicación de especies por subdivisión, frecuentemente, si no siempre, como resultado de incidentes ambientales (Cook, 1906). Pese a esto, y de acuerdo con Berlocher (1998), fue hasta 1940 que el término fue aceptado después de haber aparecido en el título de un simposio (Cole, 1940) y después de 34 años de haber sido usado constantemente.

Actualmente, la especiación se define como el proceso mediante el cual aparecen nuevas especies (Harrison, 1998) o el proceso mediante el cual nuevas especies comienzan a existir (de Queiroz, 1998). No obstante, la gran polémica que ha despertado este proceso desde sus inicios es en sí sobre el establecimiento de cuál es el evento que induce dicha divergencia, ya que hasta nuestros días se han descrito varios tipos de especiación que resaltan distintos eventos como los responsables de esta divergencia (Ruiz, 1999; Morrone, 2003). En ornitología, el tipo de especiación con mayor aceptación es la especiación alópatrida (Mayr, 1963), la cual está basada en el mismo incidente ambiental al que Cook (1906) hizo referencia y que postula la formación de nuevas especies como consecuencia del aislamiento geográfico. Asimismo, este evento al cual hace hincapié este tipo de especiación podría considerarse como uno de los eventos que comprende el proceso de especiación (de Queiroz, 1998) y que para la mayoría de los casos, éste podría ser considerado como el iniciador de la divergencia en las poblaciones (Mayr, 1963; de Queiroz, 1998).

Esta polémica se vuelve más compleja al involucrar los conceptos y definiciones de especie, debido a que, como en los tipos de especiación, cada concepto y/o definición de especie tiene su propio énfasis (de Queiroz, 1998; Harrison, 1998). Pese a esto, y de acuerdo con de Queiroz (1998), los varios eventos o fenómenos que éstos y éstas enfatizan son todos los aspectos o propiedades de un solo concepto llamado Concepto de Linaje General de Especie (CLGE). El cual, considera a los eventos o fenómenos como los criterios que se deben considerar a la hora de definir a las especies (Cuadro 1). No obstante y así como en los demás conceptos y definiciones, el CLGE parece tener un “pero”, el cual podría radicar en que no todos los eventos ocurren al mismo tiempo y, por lo tanto, no todos los criterios se pueden aplicar conjuntamente. Sin embargo, este “pero” no cabe dentro del CLGE, ya que debido a que el proceso de especiación es un “proceso

temporalmente extendido" (Figura 1) puede o no existir en él un desfase en los eventos encargados de la divergencia y por lo tanto, los criterios que se aplican para definir a las poblaciones o a las especies dependen de la relación que pueda existir entre ellos y del "nivel de divergencia" en el que las poblaciones se encuentren y no, del número de criterios que éstas hayan acumulado (de Queiroz, 1998).

Cuadro 1. Criterios para definir a las especies con base en su nivel de divergencia, tomado de de Queiroz (1998).

Sepación inicial
Cohesión
Entrecruzamiento (aislamiento reproductivo)
Entrecruzamiento activo (aislamiento intrínseco o extrínseco)
Entrecruzamiento potencial (capacidad de cruzamiento / aislamiento intrínseco)
Reconocimiento (aislamiento precigótico)
Viabilidad
} Aislamiento poscigótico
Fertilidad
Zona adaptativa (hábitat)
Monofilia
Apomorfía
Coalescencia de árboles genéticos
Capacidad distintiva
Diagnosticabilidad (Fijación de diferencias)
Agrupación fenética
Agrupación genética

Avise (1987 y 1994) destaca el uso de marcadores moleculares y más específicamente del DNA mitocondrial (mtDNA), para inferir la historia evolutiva de las especies o de las poblaciones. Esto, a partir del registro de los cambios evolutivos que este tipo de marcador puede ser capaz de albergar gracias a su muy particular tipo de herencia y al conjunto de otras características que hacen que el mtDNA sea uno de los genomas más usados actualmente para entender y, en algunos casos, para aclarar las relaciones inter- e intraespecíficas.

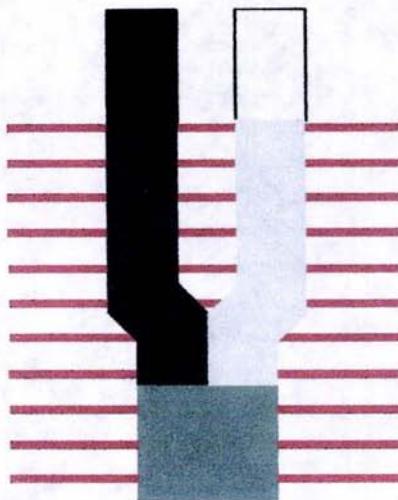


Figura 1. Ejemplificación del proceso de especiación y criterios para definir a las especies. En sí, el proceso de especiación puede esquematizarse como una línea o tronco que se divide en dos y los eventos encargados de esta divergencia que a su vez evocan a los criterios, se pueden representar como líneas perpendiculares. Asimismo, las diferencias de color en el tronco caracterizan a la diferenciación genética. Tomado de Queiroz, 1998.

Asimismo, y con base en los marcadores moleculares, la teoría de coalescencia establece que durante el proceso de especiación hay un reordenamiento de los alelos, o mejor dicho, de las secuencias haplotipo y/o de los sitios de restricción y que todos los haplotipos persistentes pertenecen a una sola matrilinea (Avise, 2001). Este reordenamiento está dado por una distribución azarosa de los haplotipos en el linaje, que a su vez permite presenciar patrones filogenéticos de polifilia y parasfilia en estadios tempranos de la divergencia, mientras que al completarse dicha distribución se espera que las poblaciones involucradas manifiesten reciproca monofilia (Neigel y Avise, 1986; Hudson, 1990). De aquí que el estudiar la distribución de los alelos o de los haplotipos para obtener una filogenia con base en la distribución de las frecuencias de éstos, sirva para generar inferencias sobre la estructural poblacional (Harrison, 1998) y para cuantificar la divergencia genética entre las poblaciones (Powell, 1994).

Por último, cabe mencionar que tanto el CLGE como la distribución azarosa de los haplotipos a la que la teoría de coalescencia hace referencia, evocan conjuntamente todos los eventos por los cuales se forman las especies, o mejor dicho, los eventos que caracterizan al proceso de especiación.

ANTECEDENTES

Actualmente, el complejo *Icterus spurius* está constituido por dos subespecies, el bolsero castaño (*Icterus spurius spurius* Linnaeus 1766) y el bolsero canelo (*Icterus spurius fuertesi* Chapman 1911), las cuales fueron descritas originalmente como especies distintas (Miller, 1957), hasta que Blake *et al.* (1968) y la A. O. U. (1983) consideraron que ambas subespecies conformaban la misma especie. Lawrence (1852), posteriormente apoyado por Amadon y Phillips (1947) y Gruber y Gruber (1954), denominó una tercera subespecie (*I. s. affinis*) para Texas, basándose en diferencias en la longitud del ala y el color del plumaje. No obstante, esta subespecie no fue registrada por Miller *et al.* (1957), Blake *et al.* (1968) y la A.O.U. (1983). Posteriormente, Dickerman y Warner (1962) describieron una cuarta subespecie (*I. s. phillipsi*) basados en un promedio mayor en las medidas del ala y cola, pero Monroe (1968) encontró que esta subespecie es indistinguible de *I. s. spurius*.

Morfología

El plumaje de los machos para ambas subespecies es claramente distinto (Figura 2). Mientras que en *I. s. spurius* los flancos, el pecho, el vientre, la rabadilla, las cobertoras inferiores y superiores de la cola y las escapulares son de color marrón, en *I. s. fuertesi* todas estas partes son de color canela o naranja medio (Howell y Webb, 1995; Jaramillo y Burke, 1999). Las hembras son similares en la coloración del plumaje, pero las hembras de *I. s. fuertesi* son menores en talla que las hembras de *I. s. spurius* (Chapman, 1911).

Respecto a la comparación de los especímenes con base en medidas del ala, la cola y el culmen expuesto se ha observado que *I. s. fuertesi* tiene intervalos de medidas menores que *I. s. spurius* (Cuadro 2), los cuales podrían sustentar la diferenciación en la talla entre estas dos subespecies.



a



b

Figura 2. Complejo *Icterus spurius*. a) macho correspondiente a *Icterus spurius spurius* y b) macho correspondiente a *Icterus spurius fuscatus*. Tomado de Jaramillo y Burke, 1999.

Cuadro 2. Intervalos de medidas del ala, cola y culmen expuesto para las dos subespecies del complejo *Icterus spurius* (Chapman, 1911; Graber y Graber, 1954; Jaramillo y Burke, 1999).

Subespecies	Sexo	Rangos		
		Ala (mm)	Cola (mm)	Culmen expuesto (mm)
<i>I. s. fuertesi</i>	♂ Ad.	(68.5-78)	(63.5-73)	(13-17)
<i>I. s. spurius</i>	♂ Ad.	(73-82)	(65-75)	(15-17.5)
<i>I. s. fuertesi</i>	♀ Ad.	(68-73)	(63.5-70)	(14.5)
<i>I. s. spurius</i>	♀ Ad.	(69-81)	(63-74)	(15.2-17.3)

Distribución

Ambas subespecies también difieren en su distribución correspondiente a la temporada reproductiva y de invierno, pues *I. s. spurius* (Figura 3a) anida y se reproduce en el sureste de Canadá, el este y centro de los Estados Unidos de América y en la planicie central de México (Sharf y Kren, 1996), mientras que durante el invierno su distribución es a lo largo de la costa del pacífico mexicano, desde el sur de Sinaloa hasta Chiapas, en el Istmo de Tehuantepec y en la Península de Yucatán, en las Islas del Caribe y en Centro América hasta el norte de Colombia y el noroeste de Venezuela (A.O.U., 1983; Sharf y Kren, 1996; A.O.U., 1998).

En contraste, *I. s. fuertesi* (Figura 3b) anida y se reproduce a lo largo de la costa del Golfo de México, desde el sur de Tamaulipas hasta la parte central de Veracruz, México (A.O.U., 1983; Howell y Webb, 1995; Sharf y Kren, 1996; A.O.U., 1998). Se piensa que *I. s. fuertesi* puede tener migración de distancia corta y que su distribución durante el invierno es a lo largo de la costa del Pacífico desde Guerrero hasta Chiapas (Jaramillo y Burke, 1999).

Hábitat

Los tipos de hábitat que *I. s. spurius* ocupa durante la temporada reproductiva y/o durante el verano abarcan bosques abiertos, sabanas, áreas arbustivas, mezquítales, áreas de cultivo y áreas de vegetación secundaria (A.O.U., 1998, Jaramillo y Burke, 1999). Durante la migración se puede encontrar en cualquier tipo de hábitat, no obstante, *I. s. spurius* parece evitar bosques con doseles muy cerrados y bosques de coníferas (Jaramillo y Burke, 1999). En las zonas de invierno prefiere bosques muy iluminados, bosques secos, matorrales, áreas arbustivas, áreas suburbanas y en los bordes de bosques tropicales (Jaramillo y Burke, 1999).

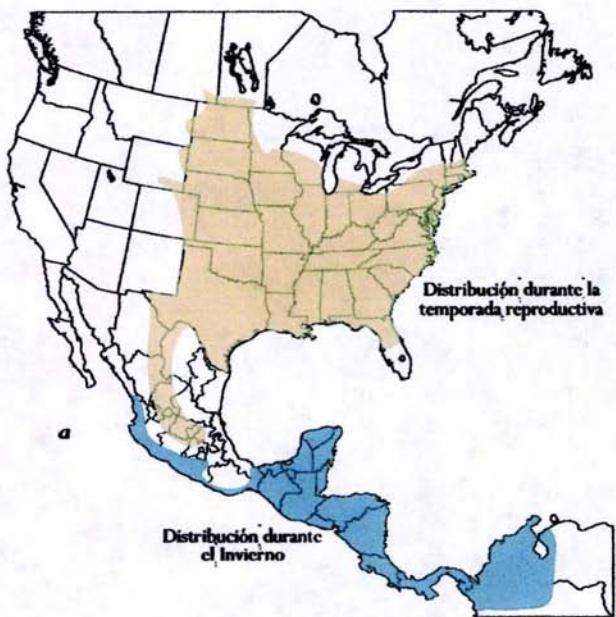


Figura 3. Mapa de distribución correspondiente al complejo *Icterus spurius* (Sharf y Kren, 1996; Jaramillo y Burke, 1999).
a) distribución de *Icterus spurius spurius* y b) distribución de *Icterus spurius fuertesi*.

En cambio, el hábitat que *I. s. fuertesi* ocupa durante la temporada reproductiva es típicamente en áreas con alta densidad de matorrales y arbustos característicos de dunas costeras, no obstante, también puede ser encontrado en las cercanías de áreas de agricultura, áreas urbanas y particularmente en los matorrales de potreros. Durante la migración y durante el invierno, *I. s. fuertesi* ocupa éstos tipos de hábitat pero en las zonas de la costa este de México desde el sur de Tamaulipas hasta el sur de Veracruz y en la costa del Pacífico desde Guerrero hasta Chiapas (Graber y Graber, 1954; Jaramillo y Burke, 1999).

OBJETIVOS

General

Establecer la relación filogenética actual entre *Icterus spurius spurius* e *Icterus spurius fuertesi*, ambas correspondientes al complejo *Icterus spurius*, con base en fragmentos específicos de DNA mitocondrial propios del dominio I de la Región Control y el gen Citocromo *b*.

Particulares

- Identificar el patrón filogenético que presenta el complejo.
- Generar una nueva hipótesis sobre la situación taxonómica actual del complejo.
- Discutir la hipótesis resultante de este trabajo con la información referente a la diferenciación del plumaje de los machos, en tallas, en las áreas de distribución y en el hábitat.

MÉTODOS

Muestras

Se obtuvieron muestras de tejido muscular y epitelial de individuos que representan las dos subespecies mencionadas por la A.O.U. (1998). De las 30 muestras obtenidas, 23 corresponden a la distribución de *I. s. spurius* durante su temporada reproductiva (Figura 4), mientras que las 7 muestras restantes corresponden a los dos extremos, norte y sur, de la distribución que tiene *I. s. fuertesi* durante la temporada reproductiva (Figura 4). Todas estas muestras representan la variación que tiene el complejo *Icterus spurius* (ver Apéndice 1).

Con base en el trabajo de Omland *et al.* (1999) sobre la filogenia molecular del género *Icterus*, se eligieron los grupos externos, los cuales fueron las subespecies *Icterus dominicensis dominicensis* e *Icterus dominicensis prosthemelas*, que según ese trabajo son los taxones más cercanamente relacionados con el complejo *Icterus spurius*.

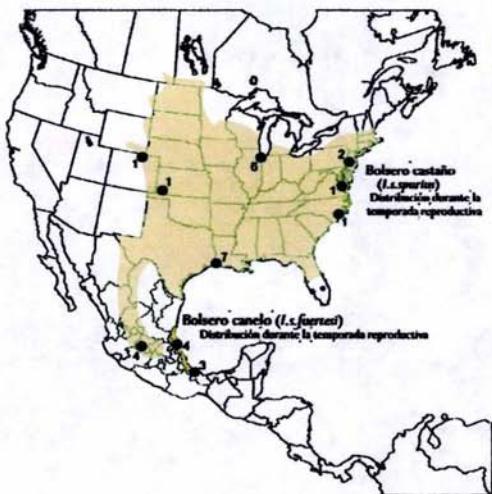


Figura 4. Sitios a los que corresponden las muestra de DNA y número de muestras correspondiente a cada sitio.

Marcadores moleculares

El fragmento correspondiente al dominio I de la Región Control (RC) fue elegido debido a que frecuentemente muestra grandes evidencias en la sustitución de nucleótidos y un alto nivel de

polimorfismo intraespecífico (McMillan y Palumbi, 1997; Lunt *et al.*, 1998). Por otra parte, se eligió el fragmento de Citocromo *b* (Cit-*b*) debido a que es eficaz en trabajos de filogenia y su uso fue comprobado en otros grupos de aves (Moore y DeFilippis, 1997; Omland *et al.*, 1999).

Procedimientos de laboratorio

La extracción del DNA de tejido muscular y de piel se realizó con los Qiaamp Tissue Extraction Kits (Qiagen). Fragmentos específicos de 344 pares de bases (pb) de la RC y 925 pb del gen Cit-*b* correspondientes al genoma mitocondrial fueron amplificados mediante el proceso de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y usando los siguientes seis oligos (*primers*): el LGL2 y el H417 (Tarr, 1995) para los fragmentos de la RC y el L14990/LB1 (Kocher *et al.*, 1989), el H15424/HSH (Hackett, 1996), el L15350/LCBA (Klicka, com. pers.), y el H15916/HB4 (Lanyon, 1994) para los fragmentos del gen Cit-*b*. Dicha amplificación constó de un ciclo inicial de 4 min a 95°C, 1 min a 50°C y de 45 s a 72°C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 50°C y de 45 s a 72°C y de una extensión final de 10 min a 72°C. Los productos obtenidos del proceso de amplificación fueron purificados usando los QIAquick Kits (Qiagen). Posteriormente, se realizó una secuenciación de los segmentos de la RC y de Cit-*b* en ambas direcciones usando los oligos arriba mencionados y el Big Dye Chemistry [versión 2, Applied Biosystems, Inc. (ABI)], esto siguiendo los protocolos de ABI correspondientes para el ciclo de secuenciación. Los productos obtenidos del ciclo de secuenciación fueron purificados usando el protocolo recomendado por ABI de precipitación con base en etanol. Por último, estos productos fueron secuenciados en el Secuenciador Automático ABI 3100 (ABI) y los cromatogramas obtenidos mediante dicho aparato fueron alineados y confirmados usando SEQUENCHER (Sequencher Sequence Analysis Sofware versión 4.1; Gene Codes Corp., Inc.).

Análisis filogenéticos

El agrupamiento de todas las secuencias fue importado al programa PAUP* (beta-test versión 4.0b8; Swofford, 1999) para realizar los análisis filogenéticos. En este programa se calcularon los valores de las distancias genéticas para ambos fragmentos de DNA, para lo cual, cada conjunto de secuencias correspondientes a la RC y al gen Cit-*b* se analizaron de forma separada usando el análisis de máxima parsimonia (MP). Los análisis de MP se realizaron usando el algoritmo heurístico de búsqueda con 1000 adiciones al azar. Posteriormente, y con base en la prueba de partición homogénea en PAUP*, se determinó si el conjunto de secuencias de la RC y de Cit-*b* era

significativamente incongruente. Esto con el propósito de combinar ambos conjuntos de secuencias y realizar un nuevo análisis de MP y de máxima verosimilitud (MV). Asimismo, no hubo inserciones o delecciones en los conjuntos de secuencias, lo cual no se presentó y todos los caracteres tuvieron el mismo peso. Simultáneamente, se realizó una prueba de proporción de probabilidad jerárquica en el ModelTests (versión 3.04; Posada y Crandall, 1998) para establecer cuál era el mejor modelo de substituciones en el DNA. De aquí que el modelo que se determinó como el mejor al cual se ajustaba la combinación de secuencias fue el HKY85 + Γ (Hasegawa *et al.*, 1985; Yang, 1994). No obstante, también se usó el algoritmo heurístico de búsqueda con 1000 adiciones al azar para construir el árbol filogenético de MV y para estimar, sucesivamente, los parámetros del árbol filogenético antes de que cualquier topología estable fuese encontrada.

Además, esta combinación de secuencias fue sometida a una prueba de consenso estricto con la finalidad de obtener para las agrupaciones que se formaron, los porcentajes que se consideran como índices de soporte para dichas agrupaciones (Felsenstein, 1985; Li y Zharkikh, 1994). Esta prueba se realizó en el programa de PAUP* utilizando 100 y 1000 repeticiones.

Análisis de genética poblacional

Usando análisis jerárquicos de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), se analizaron los haplotipos de la RC para probar lo significativo de la estructura poblacional. Además, se calculó por parejas y empleando ARLEQUIN (versión 2.0; Schneider *et al.*, 2000), el índice de fijación (F_{ST}) para poblaciones en distintos niveles jerárquicos. Los valores de F_{ST} indican cuanta variación molecular es asignada entre los niveles jerárquicos y provee un límite superior en los niveles relativos al flujo génico que ocurre entre individuos en cada nivel. Para el propósito de este análisis, las dos subespecies del complejo *Icterus spurius* se subdividieron en dos grupos cada una. La subespecie correspondiente a *I. s. spurius*, se dividió en: el "Grupo Estadounidense" que abarcaba poblaciones del este {Pensilvania (PA), Virginia (VA) y Carolina del Norte (NC)}, del centro {Illinois (IL)}, del sur {Louisiana (LA)} y del oeste {Colorado (CO) y Kansas (KS)} y el "Grupo Mexicano" que a su vez, abarcaba la distribución reproductiva de *I. s. phillipsi* en Guanajuato (Gua). Mientras que, la subespecie correspondiente a *I. s. fuertesi*, se dividió en el "Grupo del Norte" (NVer) y el "Grupo del Sur" (SVer), ambas haciendo referencia a los dos extremos de la distribución reproductiva en Veracruz.

RESULTADOS

Secuencias

De las secuencias correspondientes a la RC de 344 pb, 9 sitios equivalentes al 2.62 % fueron variables y 3 equivalentes al 0.87 % fueron parsimoniosamente informativos. Por otra parte, de las secuencias correspondientes a Cit-*b* de 925 pb, 10 sitios equivalentes al 1.08 % fueron variables y 3 equivalentes al 0.32 % fueron parsimoniosamente informativos. Las distancias genéticas mínima y máxima y el porcentaje que se encontraron dentro y entre *I. s. spurius* e *I. s. fuertesi* se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Distancias genéticas dentro y entre subespecies que componen el complejo *Icterus spurius*, usando secuencias de DNA mitocondrial de la Región Control y el gen Citocromo *b*.

	Región			Citocromo		
	Control			<i>b</i>		
	Mínimo (%)	Máximo (%)	Promedio (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)	Promedio (%)
Dentro de <i>I. s. spurius</i>	0.00	0.87	0.30	0.00	0.43	0.19
Dentro de <i>I. s. fuertesi</i>	0.00	0.87	0.27	0.00	0.22	0.12
Entre subespecies	0.00	1.16	0.77	0.00	0.43	0.20

Los aspectos que son importantes resaltar de los resultados representados en el Cuadro 3, es que se puede observar perfectamente una "mínima" diferenciación genética para el caso del gen Cit-*b* y una "evidente" diferenciación genética para el caso de la RC. Curiosamente, esta variación no solo resalta una diferenciación genética, sino que apoya la idea inicial de una diferenciación poblacional o entre subespecies.

Asimismo, estos resultados también evidencian la diferenciación que puede haber entre los marcadores moleculares que se estén usando, ya que como es bien sabido, cada gen o parte del genoma mitocondrial (y del genoma nuclear) tiene su propia tasa de mutación y/o sus propias características que a su vez pueden proporcionar distinta información (Avise, 1994; McMillan y Palumbi, 1997; Lunt *et al.*, 1998). No obstante, la utilización de más de un gen o de una región del genoma permite tener una visión más amplia del estado de las relaciones filogenéticas.

Análisis filogenéticos

De la búsqueda con ponderación indistinta usando el análisis de MP para el conjunto de secuencias correspondientes a la RC, se obtuvo una sola topología que se prefirió presentarla en la modalidad de red de relaciones filogenéticas sin raíz (Figura 5). Esto, debido a que se aprecian mejor las agrupaciones que forman los haplotipos y la mezcla que existe entre ellos y también, por que se puede resaltar la “polarización” de los dos grandes grupos que se formaron sin desmeritar la mezcla de haplotipos. También, se obtuvo de forma separada un árbol filogenético para cada uno de los conjuntos de secuencias de la RC y del gen Cit-*b* (Figura 6), realizando nuevamente una búsqueda con ponderación indistinta usando el análisis de MP. Al mismo tiempo, no se detectó incongruencia significativa entre los dos conjuntos de secuencias ($P = 0.092$), después de haber aplicado la prueba de partición homogénea en PAUP*.

Es evidente que en la red de relaciones filogenéticas para la RC (Figura 5) y en el árbol filogenético de MP para el gen Cit-*b* (Figura 6), hay ciertos haplotipos que caracterizan a cada una de las subespecies. Sin embargo, hay otros haplotipos de ciertos individuos que corresponden a una de las subespecies [esto con base en caracteres morfológicos (Howell y Webb, 1995) y su ubicación en el momento de colecta, ver Apéndice 1], que se agrupan con los haplotipos que conforman el “yacimiento” de variación genética de la subespecie opuesta.

Del análisis de búsqueda con ponderación indistinta usando MP a los que fue sometida la combinación de secuencias (RC y Cit-*b*), se obtuvieron cuatro árboles filogenéticos que mostraban a ambos taxones como grupos polifiléticos y que resultaron ser los árboles filogenéticos más parsimoniosos con 92 pasos de largo. No obstante, se forzó una búsqueda con ponderación indistinta usando MP para generar árboles filogenéticos que mostraran a *I. s. spurius* o a *I. s. fuertesi* como grupos monofiléticos y el resultado fueron ocho árboles filogenéticos de 93 pasos de largo. Una comparación de ambas hipótesis (polifilia versus monofilia) usando la prueba de “Wilcoxon signed-ranks” (Templenton, 1983) de dos colas en PAUP*, no pudo excluir la monofilia para cualquiera de los dos taxones ($P > 0.5$) y mostrar a un taxón parafilético con respecto al otro, pero lo que sí fue posible fue excluir la monofilia para ambos ($P < 0.0001$).

La búsqueda para la combinación de secuencias usando MV encontró un único árbol filogenético (-lnl = 2119.52) con los siguientes parámetros: proporción de transiciones/tranversiones (ti/tv) = 7.2539; forma de la distribución gama (α) = 0.1574 y frecuencia empírica de bases (Figura 7). No obstante, éste árbol filogenético es similar a los árboles

filogenéticos generados de los análisis de búsqueda con ponderación indistinta usando MP que se les aplicó a cada uno de los conjuntos de secuencias y representa que los haplotipos están intermezclados, aunque una de las cosas que vale la pena resaltar, es que en este árbol filogenético hay una mejor visión de la “tendencia” que la evolución está llevando a cabo para estas dos subespecies.

Del doble análisis estadístico de consenso estricto hecho en PAUP* para la combinación de ambos conjuntos de secuencias, se obtuvo el mismo árbol filogenético (Figura 8) que muestra el mayor índice de soporte estadístico para una de las agrupaciones correspondiente a *I. s. fuertesi*, la cual ha sido constante en todas las representaciones gráficas. No obstante, el haplotipo NVer-2 correspondiente también a *I. s. fuertesi* se mantuvo agrupado en todas las representaciones gráficas con los haplotipos correspondientes a *I. s. spurius*, lo cual evidencia una incompleta distribución de los haplotipos en el linaje.

Análisis de genética poblacional

Los análisis sobre la estructura geográfica usando ARLEQUIN revelan una significativa diferenciación genética entre *I. s. spurius* e *I. s. fuertesi* ($F_{ST} = 0.608$, $P < 0.00001$) (Cuadro 4). Asimismo, no se encontró evidencia de una diferenciación genética dentro de las poblaciones para ambas subespecies ($P > 0.75$), incluyendo la comparación entre el Grupo Estadounidense y el Grupo Mexicano ($P > 0.5$) que sugiere que *I. s. spurius* es una sola población (Cuadros 4 y 5).

Dentro de este tipo de estudios y muy particularmente en este estudio que presenta una mezcla poblacional de haplotipos (Figuras 3, 4, 5 y 6), uno de los aspectos más preocupantes era probar la estructura genética poblacional con el fin de evidenciar el grado de flujo génico entre las poblaciones. Esto se infirió a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) y los resultados obtenidos (Cuadro 4) sugieren fuertemente que hay una pequeña probabilidad o nula de intercambio génico entre las poblaciones de ambas subespecies con un estimado de 0.3 migrantes por generación.

Por otra parte, los resultados obtenidos (Cuadro 5) sugieren que las poblaciones correspondientes a *I. s. spurius* no presentan una diferenciación genética y que dentro de todo el rango de distribución hay un intenso intercambio de genes. Esto es compatible con lo hallado por Monroe (1968) que descarta a *I. s. phillipsi* como una tercera subespecie para el complejo y que establece que *I. s. spurius* es una sola población.

Cuadro 4. Resultados de la AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992). Índices de fijación (F_{ST}) para *I. s. spurius* e *I. s. fuentesi* basados en las secuencias correspondientes a la Región Control.

Fuente de variación	Componentes de discrepancia	Porcentaje de variación	F_{ST}	<i>P</i>
Entre subespecies	0.78589	60.75	0.608	< 0.000001
Entre poblaciones / Dentro de las subespecies	-0.02338	-1.81	-0.046	0.75269
Entre individuos / Dentro de las poblaciones	0.53054	41.03	0.590	0.00196

Cuadro 5. Valores de F_{ST} para el “Grupo Estadounidense” y el “Grupo Mexicano” basados en las secuencias correspondientes a la Región Control.

Fuente de variación	Componentes de discrepancia	Porcentaje de variación	F_{ST}	<i>P</i>
Entre grupos	0.01238	2.40	0.024	0.22581
Entre poblaciones / Dentro de los grupos	-0.01204	-0.024	-0.024	0.46432
Entre individuos / Dentro de los grupos	0.51587	99.93	0.00066	0.56403

Red de Relaciones Filogenéticas para Región Control
(Máxima Parsimonia)

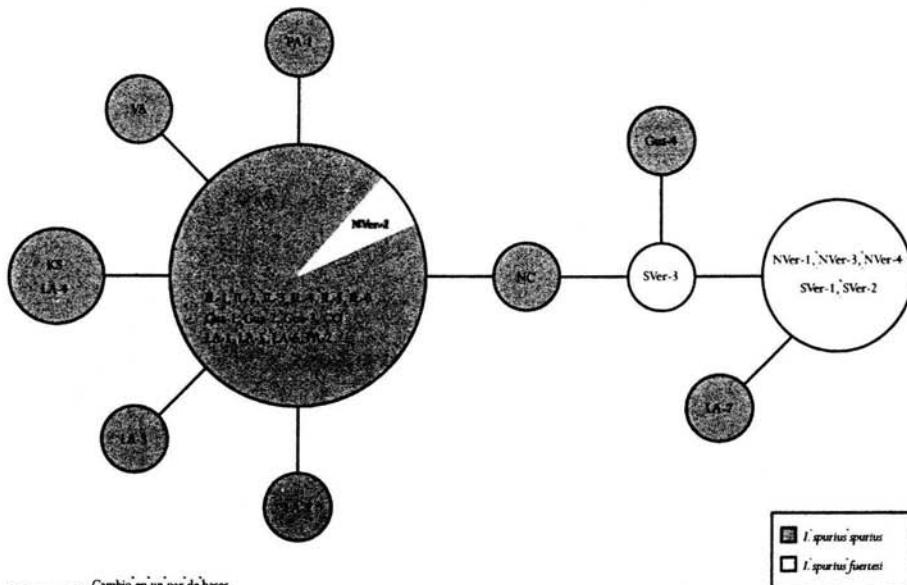


Figura 5. Red de relaciones filogenéticas sin raíz para la secuencias correspondientes a la Región Control (RC), obtenido del análisis en PAUP* usando Máxima Parsimonia. El largo de las ramas corresponde a un cambio en un par de bases y las frecuencias de los haplotipos esta indicada por el área de los círculos.

Árbol Filogenético para
el gen Citocromo *b*
(Máxima Parsimonia)

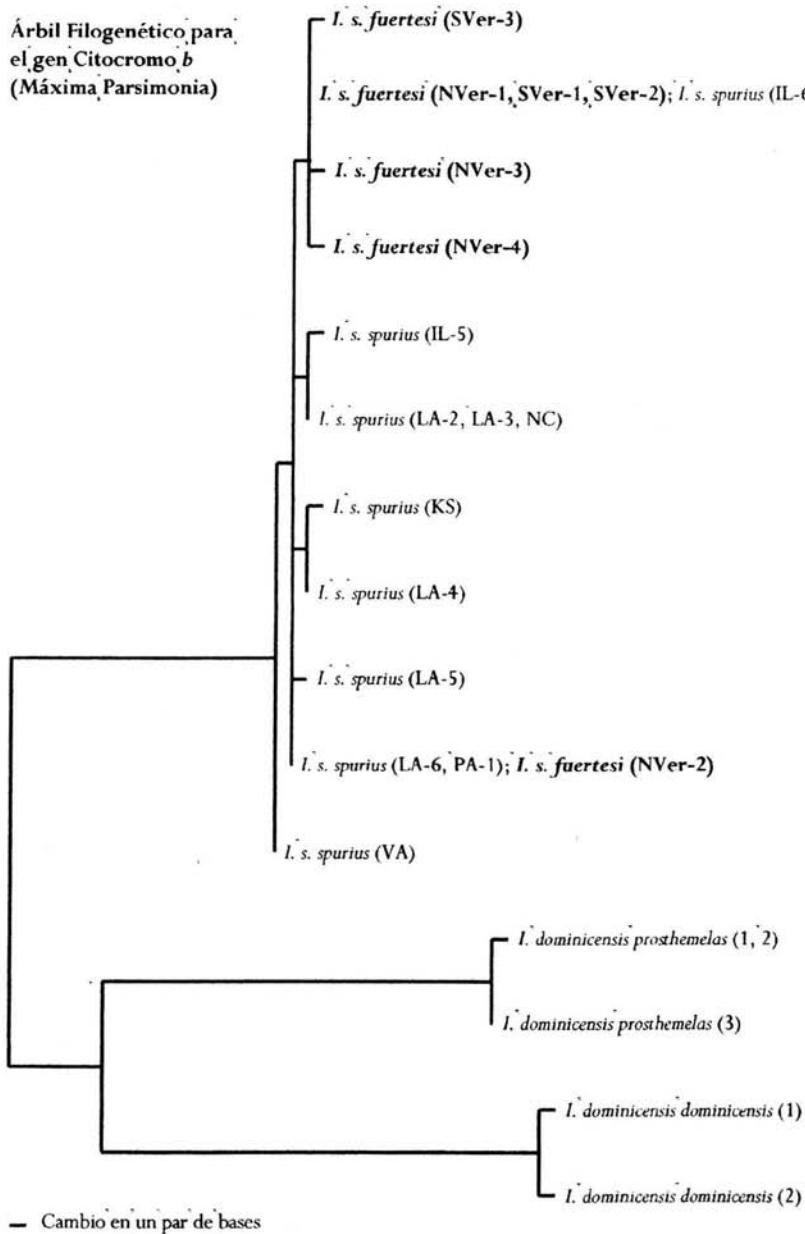


Figura 6. Árbol filogenético correspondiente a las secuencias de Citocromo *b* (Cit-*b*), obtenido del análisis en PAUP* usando Máxima Parsimonia.

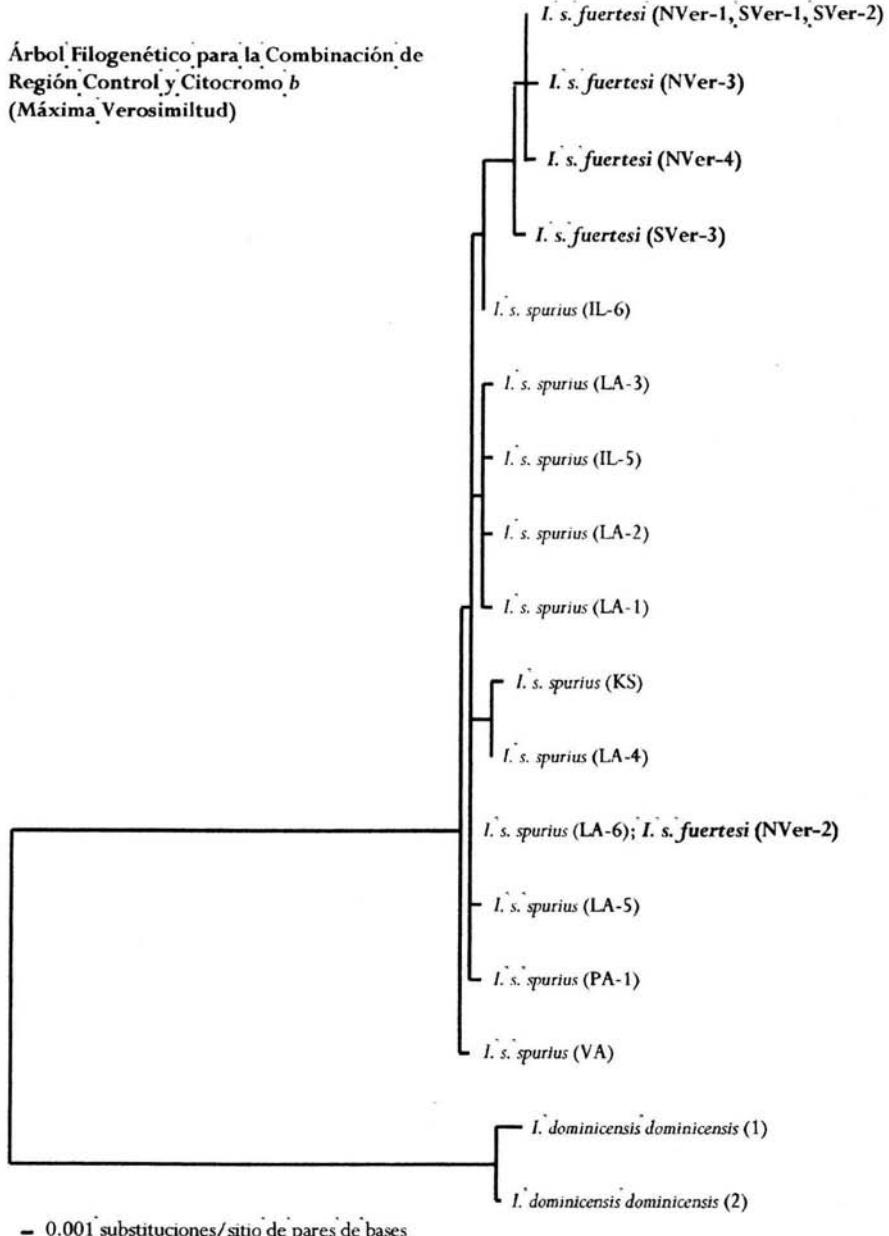


Figura 7. Árbol filogenético correspondiente a la combinación de las secuencias de RC y Cit-*b*, obtenido del análisis en PAUP* usando Máxima Verosimilitud.

Máxima Parsimonia para la
Combinación de Datos
(Consenso Estricto)

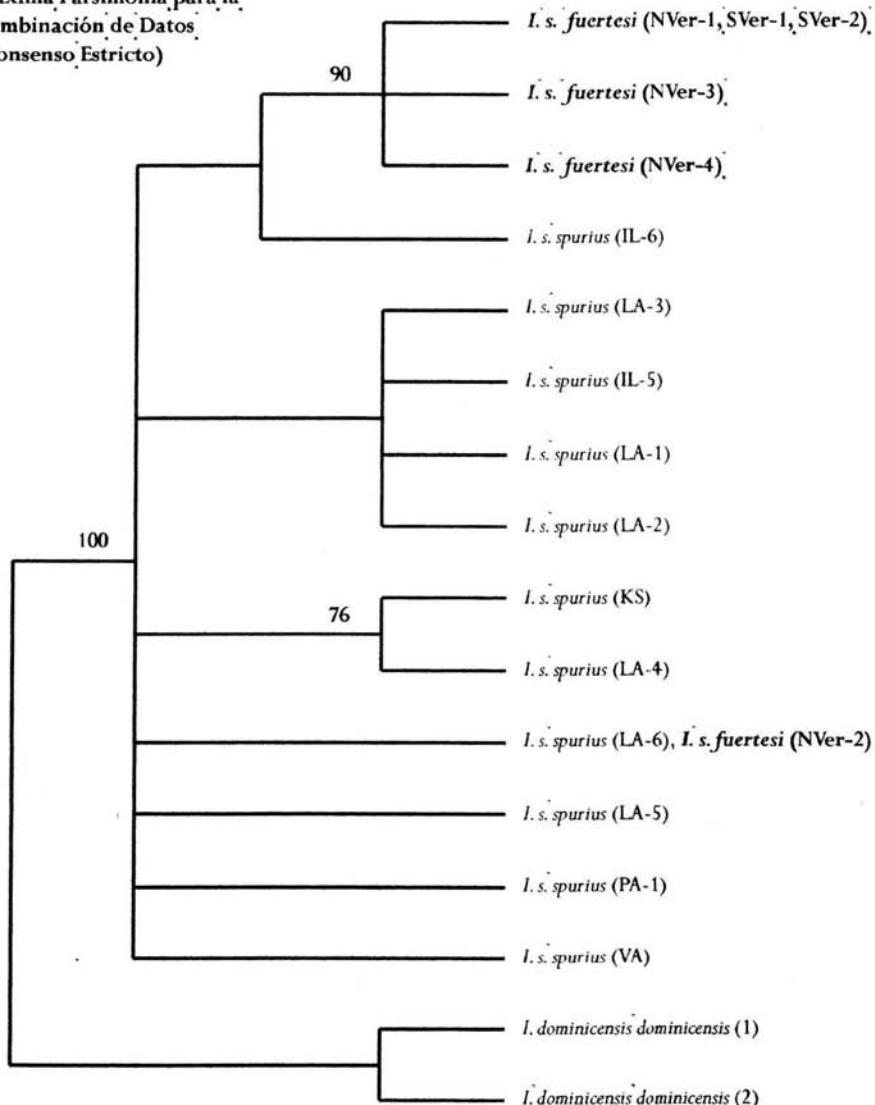


Figura 8. Árbol filogenético correspondiente a la combinación de las secuencias de RC y Cit-b, obtenido del análisis en PAUP* usando Consenso Estricto.

DISCUSIÓN

Reciente divergencia

Con base en los resultados obtenidos, el patrón filogenético que presentan y que actualmente predomina entre las dos grandes poblaciones de este complejo, es un patrón de polifilia (Figuras 5, 6 y 7). Dicho patrón es pronosticado para estadios tempranos de divergencia por parte de la teoría de coalescencia (Neigel y Avise, 1986; Hudson, 1990). No obstante, existen propuestas muy respetadas que argumentan que el único patrón filogenético que representa una “verdadera divergencia”, es el de monofilia (Rosen, 1979; Mishler y Brandon, 1987; Nixon y Wheeler, 1990; Smith, 1994; Baum y Shaw, 1995). Sin embargo, el 17 % de todas las aves y el 23 % de todas las especies de animales no presentan patrones de monofilia para el mtDNA (Funk y Omland, 2003).

Esta disputa por querer establecer un solo patrón filogenético que funcione para definir a las especies oculta la verdadera disputa, la cual debe ser centrada en la idea de que las poblaciones pasan por distintos patrones filogenéticos durante el proceso de divergencia (Neigel y Avise, 1986; Hudson, 1990). Sin embargo, hay que tener cuidado debido a que dependiendo de la “agresividad” que puedan manifestar los eventos encargados de la divergencia, se pueden o no presentar todos los patrones filogenéticos en las poblaciones involucradas.

Asimismo, cada especie tiene su propia historia evolutiva, la cual es determinada por la manifestación de los eventos encargados de la especiación, dando como resultado especies con distinto grado de divergencia (Avise et al., 1987; Avise 2001). Esto, puede ejemplificarse mejor si recordamos la Figura 1, en la cual las especies o en este caso las poblaciones, pueden con base en los eventos encargados de la divergencia acomodarse en distintos niveles de la “Y”. Por lo que, en este caso, las dos grandes poblaciones del complejo de *Icterus spurius*, se acomodan en la base de la bifurcación. Esto, con base en el patrón de polifilia resultante de todos los análisis a los que fueron sometidos los fragmentos específicos de mtDNA (Figuras 5, 6 y 7).

Tiempo de divergencia

Klicka et al. (2001) sugieren que una interpretación temporal de la filogenia con base en marcadores moleculares requiere de una “brusca” y constante tasa de sustituciones de bases entre los taxones. Asumiendo la tasa de divergencia de un millón de años por cada 1.6 % de divergencia entre las secuencias (Fleischer et al., 1998), se estimó con base en la máxima distancia génica de 0.43 %

en las secuencias de *Cit-b*, que *I. s. spurius* e *I. s. fuertesi* comenzaron su proceso de divergencia a partir de un ancestro común hace 200,000 años atrás. Esta estimación coincide con la última glaciaciación del Pleistoceno que al parecer fue una de las principales protagonistas que propició la radiación de los vertebrados en Norte América (Avise y Walter, 1998; Avise *et al.*, 1998; Milá *et al.*, 2000) y muy en especial, la de los Passeriformes (Klicka y Zink, 1997 y 1999).

Cabe mencionar que los factores que pueden incrementar el grado de divergencia entre las poblaciones dependen de grandes períodos de tiempo en la interrupción del flujo génico y con un tamaño pequeño de la población efectiva (Hudson, 1990).

Límites de especies

Lo complicado que puede ser establecer los límites de especies, radica en la controversial indecisión que genera el no estar seguro cuál concepto y/o definición de especie escoger que se ajuste mejor o que sirva más para establecer y explicar estos límites. No obstante, la posible solución para este conflicto y que además tiene un gran sustento teórico, es la propuesta que considera que todos los eventos o fenómenos en los que estos conceptos y definiciones están fundamentados, hacen referencia a un solo concepto, el CLGE (de Queiroz, 1998). Y es justamente este trabajo, el que proporciona un excelente ejemplo para aplicar esta propuesta, ya que con base en los resultados obtenidos y con la previa información, se pueden resaltar los criterios que ambas poblaciones cumplen para establecer los límites de especie y que a su vez, evidencian la divergencia que ha ocurrido entre ellas.

El criterio que necesita ser aplicado a primera vista es el de capacidad distintiva, ya que es evidente que cada una de las dos poblaciones presenta una fijación de caracteres en lo que corresponde a la coloración de los machos adultos (Howell y Webb, 1995; Jaramillo y Burke, 1999). Este carácter proporciona distinguibilidad a cada una de las poblaciones (Cracraft, 1983), manifestando al mismo tiempo una agrupación fenética (Sokal y Crovello, 1970). De igual modo, trabajos anteriores resaltan una posible agrupación fenética para cada población con base en caracteres merísticos (Chapman, 1911; Graber y Graber, 1954; Jaramillo y Burke, 1999).

El segundo criterio que puede ser aplicado con base en información muy general es el de cohesión, ya que tanto los hábitos migratorios y la distribución de las poblaciones durante la temporada reproductiva (Jaramillo y Burke, 1999), permiten un posible aislamiento reproductivo, que a su vez permite que haya un entrecruzamiento activo entre los individuos de cada población y

no entre los individuos de poblaciones distintas. Asimismo y con base en los resultados del análisis de genética poblacional, existe una mínima o nula posibilidad de que pueda haber actividad de intercambio génico entre las dos poblaciones. No obstante, se ha comprobado que pueden existir poblaciones o especies diferenciadas genéticamente y/o morfológicamente que mantienen un limitado flujo génico como evidencia de una cercana relación filogenética y que dicha habilidad no debería ser tomada en cuenta a la hora de establecer los criterios para definir a las especies (Zink y McKittrick, 1995; Burns, 1998). Incluso, hay especies reconocidas con extensas zonas de hibridación, en las cuales las especies involucradas no están cercanamente relacionadas (Zink, 1994; Freeman y Zink, 1995). Otro aspecto importante que está relacionado con el criterio de cohesión, es el relacionado con la zona adaptativa (Van Valen, 1976), ya que los tipos de hábitat resultan ser contrastantes para ambas poblaciones (Graber y Gruber, 1954; A.O.U., 1998, Jaramillo y Burke, 1999), al igual que el tamaño del área que cada población ocupa y la abundancia de cada una de éstas.

El siguiente criterio que cumple este complejo y que evidencia la diferenciación genética presente entre sus dos poblaciones es el de coalescencia, no obstante, de Queiroz (1998) sugiere que este criterio es exclusivo para poblaciones que manifiesten patrones de monofilia y por lo tanto, así debería llamarse. Sin embargo, con base en la teoría de coalescencia (Neigel y Avise, 1986, Hudson, 1990) las poblaciones pueden presentar patrones filogenéticos de polifilia o parafilia en estadios tempranos de la divergencia y que el alcanzar patrones que manifiesten una recíproca monofilia esta completamente relacionado con los otros criterios y con el tiempo (Neigel y Avise, 1986, Avise, 2001), por lo que, se recomienda cambiar el criterio de monofilia por el criterio de coalescencia debido a que este si hace referencia a la transición de los haplotipos por los distintos patrones filogenéticos al igual que a la coalescencia de árboles genéticos.

Por último, parece ser que tanto los cambios en la coloración del plumaje como hábitos migratorios se desarrollan dentro de períodos de tiempo relativamente cortos. Para el caso de *I. s. spurius*, se sabe que la coloración del plumaje es importante en la búsqueda de pareja, por lo que la selección sexual podría estar jugando un papel trascendental en la fijación de nuevos caracteres de coloración en el plumaje (Enstrom, 1993), asimismo, como una rápida adaptación a un hábitat determinado (Van Valen, 1976). No obstante, también se requiere de más trabajo de campo que ayude a encontrar nuevas evidencias que sirvan para reforzar las ya contempladas.

CONCLUSIONES

- Los patrones de polifilia que presentaron todos los análisis de este trabajo evidencian una distribución incompleta de los haplotipos en el linaje.
- La monofilia no es el único patrón filogenético que pueden presentar las poblaciones durante su proceso de divergencia.
- El flujo génico debe de ser considerado como un indicador del grado de la divergencia y no como requisito para que la divergencia ocurra.
- La combinación de más de un conjunto de secuencias correspondientes a genes distintos, permite tener una visión más amplia de la filogenia de las especies.
- La conjunción de la variación genética resultante de es trabajo con los datos ya existentes sobre morfología, ecología y hábitos migratorios, permiten reconocer a *Icterus spurius* e *Icterus fuertesi* como especies distintas que presentan un reciente proceso de divergencia.

LITERATURA CITADA

- American Ornithologists' Union. 1983. Check-list of North American Birds, Sexta Edición. Allen Press/American Ornithologists' Union, Lawrence.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. Intraespecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall, Nueva York.
- Avise, J. C. y D. Walker. 1998. Pleistocene Phylogeographic Effects on Avian Populations and the Speciation Process. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 265: 457-463.
- Avise, J. C., D. Walker y G. C. Johns. 1998. Speciation Durations and Pleistocene Effects on Vertebrates Phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 265: 1707-1712.
- Avise, J. C. 2001. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Baum, D. A. y K. L. Shaw. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. Pp. 289-303. En: *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, No. 53. (P. C. Hoch y A. G. Stephenson; Editores). Missouri Botanical Garden, San Luis.
- Berlocher, S.H. 1998. Origins. A brief history of the research of the speciation. Pp. 3-15. En: *Endless Forms: Species and Speciation* (D.J. Howard y S.H. Berlocher; Editores). Oxford University Press, Oxford.
- Blake, E. R., J. C. Greenway, T. R. Howell, G. H. Lowery, E. Mayr, B. L. Monroe, R. A. Paynter, A. L. Rand y M. A. Taylor. 1968. *Check-List of Birds of the World. A continuation of the Work of James L. Peters. Volumen XIV.* (R. A. Paynter; Editor). The Haffernan Press, Inc. Worcester, Massachusetts.
- Burns, K. J. 1998. Molecular Phylogenetics of the Genus *Piranga*: Implications for Biogeography and the Evolution of Morphology and Behavior. *The Auk* 115 (3): 621-634.
- Chapman, F. M. 1911. Description of a new oriole (*Icterus fuertesi*) from Mexico. *Auk* 28:1-4.
- Cole, L.J. 1940. The relation of the genetics to geographic distribution and speciation; speciation I. Introducción. *American Naturalist* 74:193-197.

- Cook, O. F. 1906. Factors of the species-formation. *Science* 23:506-507.
- Cracraft, J. 1983. Species Concepts in Systematics and Speciation Analysis. *Current Ornithology* 1: 159-187.
- Dickerman, R. W., y D. W. Warner. 1962. A new Orchard Oriole from Mexico. *Condor* 64:311-314.
- De Queiroz, K. 1998. The General Linage Concept of Species, Species Criteria, and the Process of the Speciation: A conceptual Unification and Terminological Recommendations. Pp. 57-75. *En: Endless Forms: Species and Speciation* (D.J. Howard y S.H. Berlocher; Editores). Oxford University Press, Oxford.
- Enstrom, D. A. 1993. Female Choice for Age-Specific Plumage in the Orchard Oriole: Implications for Delayed Plumage Maturation. *Animal Behavior* 45: 435-442.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial restriction region. *Genetics* 131: 479-491.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Fleischer, R. C., C. E. McIntosh y C. L. Tarr. 1998. Evolution on a volcanic conveyor belt: Using phylogeographic reconstructions and K-Ar-bases ages of the Hawaiian Islands to estimate molecular evolutionary rates. *Molecular Ecology* 7: 533-545.
- Freeman, S. y R. M. Zink. 1995. A Phylogenetic Study of the Blackbirds Based on Variation in Mitochondrial DNA Restriction Sites. *Systematics Biology* 44: 409-420.
- Funk, D. J. y K. E. Omland. 2003. Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *The Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 397-423.
- Graber, R. R. y J. W. Gruber. 1954. Comparative Notes on Fuertes's and Orchard Orioles. *Condor* 56: 274-282.
- Hackett, S. J. 1996. Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5:368-382.
- Harrison, R. G. 1998. Linking Evolutionary Pattern and Process: The Relevance of Species Concepts for the Study of Speciation. Pp. 19-31. *En: Endless Forms: Species and Speciation* (D.J. Howard y S.H. Berlocher; Editores). Oxford University Press, Oxford.

- Hasegawa, M., K. Kishino y T. Yano. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 21: 160-174.
- Howell, S. N. G., y S. Webb. 1995. A Guide to the Birds of Mexico and Northern Central America. Oxford University Press, Oxford.
- Hudson, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. Pp. 1-44. En: *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, No. 7 (D. J. Futuyma y J. Antonovics; Editores). Oxford University Press, Nueva York.
- Jaramillo, A., y P. Burke. 1999. New World Blackbirds: The Icterids. Princeton University Press, Princeton.
- Klicka, J. y R. M. Zink. 1997. The importance of recent ice ages in speciation: A failed paradigm. *Science* 277: 1666-1669.
- Klicka, J. y R. M. Zink. 1999. Pleistocene effects on North American songbird evolution. *Proceedings of the Royal Society, London, Series B* 366: 695-700.
- Klicka, J., A. J. Fry, R. M. Zink y C. W. Thompson. 2001. A Cytochrome-*b* Perspectives on *Passerina* Bunting Relationships. *The Auk* 118 (3): 611-623.
- Kocher, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Paabo, F. X. Villablanca, and A. C. Wilson. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 86: 6196-6200.
- Lanyon, S. M. 1994. Polyphyly of the blackbird genus *Agelaius* and the importance of assumptions of monophyly in comparative studies. *Evolution* 48: 679-693.
- Laerence, G. H. 1852. Description of New Birds of the Genera *Conirostrum* D'Orb. et Lafr., *Enbernagra* Less., and *Xanthornus* Briss. *Ann. Lyc. Nat. Hist.* 5: 112-117.
- Li, W.-H. y A. Zharkikh. 1994. What is the bootstrap technique? *Systematic Zoology* 43: 424-430.
- Lunt, D. H., L. E. Whipple y B. C. Hyman. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): Utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology* 7: 1441-1455.
- Mayr, E. 1963. Animals species and evolution. Belknap Press. Cambridge.
- McMillan, W. O. y S. R. Palumbi. 1997. Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterfylfishes (Chaetodontidae). *Journal of Molecular Evolution* 45: 473-484.

- Miller, A. H., H. Friedmann, L. Griscon y R.T. Moore. 1957. Distributional Check-List of the Birds of Mexico. Parte 2. Pacific Coast Avifauna No. 33. Cooper Ornithological Society.
- Monroe, B. L. 1968. A Distributional Survey of the Birds of Honduras. Allen Press/American Ornithologists' Union, Lawrence.
- Mishler, B. D. y R. N. Brandon. 1987. Individuality pluralism and the phylogenetic species concept. *Biology and Philosophy* 2: 397-414.
- Morrone, J. J. 2003. El lenguaje de la cladística. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. México.
- Neigel, J. E. y J. C. Avise. 1986. Phylogenetic relationships of the mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. Pp. 515-534. En: *Evolutionary Processes and Theory* (S. Karlin y E. Nevo; Editores). Academic Press, San Diego.
- Nixon, K. C. y Q. D. Wheeler. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211-223.
- Omland, K. E., S. M. Lanyon y S. J. Fritz. 1999. A Molecular Phylogeny of the New World Orioles (*Icterus*): The Importance of Dense Taxon Sampling. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 224-239.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. ModelTest: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 818-818.
- Powell, J. R. 1994. Molecular techniques in population genetics: a brief history. Pp. 131-156. En: *Molecular ecology and evolution: approaches and applications* (B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner y R. Desalle; Editores). Birkhäuser Verlag, Basel.
- Rosen, D. E. 1979. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 162: 267-376.
- Ruiz, G.R. 1999. Especiación: teorías, modelos y polémicas. Pp. 203-229. En: *La Evolución Biológica* (J. Núñez-Farfán y L.E. Eguiarte; Compiladores). Facultad de Ciencias e Instituto de Ecología, U.N.A.M.
- Scharf, W. C., y J. Kren. 1996. Orchard Oriole (*Icterus spurius*). Pp. 1-24. En: *The Birds of North America*, no. 255 (F. Gill y A. Poole; Editores). Academy of Natural Sciences, Philadelphia, y American Ornithologists' Union, Washington.

- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin: A Software Package for Population Genetics. Versión 2.0. Universidad de Geneva, Geneva.
- Smith, A. B. 1994. Systematics and the Fossil Record. Documenting Evolutionary Patterns. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Sokal, R. R. y Crovello T. J. 1970. The biological species concept: A critical evaluation. American Naturalist 104: 127-153.
- Swofford, D. L. 1999. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Versión 4.0 b8. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts.
- Tarr, C. L. 1995. Primers for amplification and determination of mitochondrial control-region sequences in oscine passerines. Molecular Ecology 4:527-529.
- Templeton, A. R. 1983. Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. Evolution 37: 221-244.
- Van Valen, L. 1976. Ecological Species, multispecies and Oaks. Taxon 25: 233-239.
- Yang, Z. 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: Approximate methods. Journal of Molecular Evolution 39: 306-314.
- Zink, R. M. 1994. The Geography of the Mitochondrial DNA Variation, Population Structure, Hybridization and Species Limits in the Fox Sparrow (*Passerina iliaca*). Evolution 48: 96-111.
- Zink, R. M. y M. C. McKittrick. 1995. The Debate over Species Concepts and its Implications for Ornithology. The Auk 112 (3): 701-719.

APÉNDICE 1

Información básica de cada muestra.

Taxón	Museo*	Número de Catálogo	Región Control	Número de acceso***	Citocromo-b	Localidad
<i>I. s. fueresi</i> (NVer-1)	MZFC	15535	AY211221	AY211206	AY211206	Méjico, N de Veracruz, Tecolutla
<i>I. s. fueresi</i> (NVer-2)	MZFC	15534	AY211222	AY211207	AY211207	Méjico, N de Veracruz, Tecolutla
<i>I. s. fueresi</i> (NVer-3)	MZFC	15533	AY211223	AY211208	AY211208	Méjico, N de Veracruz, Tecolutla
<i>I. s. fueresi</i> (NVer-4)	MZFC	15532	AY211224	AY211209	AY211209	Méjico, N de Veracruz, Tecolutla
<i>I. s. fueresi</i> (SVer-1)	MZFC	13565	AY211218	AY211214	AY211214	Méjico, S de Veracruz, Tlacoalpan
<i>I. s. fueresi</i> (SVer-2)	BMNH	42538	AY211219	AY211215	AY211215	Méjico, S de Veracruz, Tlacoalpan
<i>I. s. fueresi</i> (SVer-3)	MZFC	13568	AY211220	AY2112245	AY2112245	Méjico, S de Veracruz, Tlacoalpan
<i>I. s. spurius</i> (C-O)	LSUMZ	B-3980	AY211229	E.U.A., Colorado, Weld Co.
<i>I. s. spurius</i> (L-L)	FNMNH	383513	E.U.A., Illinois, Cook Co.
<i>I. s. spurius</i> (L-L-2)	FNMNH	383514	AY211231	E.U.A., Illinois, Cook Co.
<i>I. s. spurius</i> (L-L-3)	FNMNH	389579	AY211232	E.U.A., Illinois, Cook Co.
<i>I. s. spurius</i> (L-L-4)	FNMNH	366464	AY211233	E.U.A., Illinois, Cook Co.
<i>I. s. spurius</i> (L-L-5)	FNMNH	390351	AY211235	AY211197	AY211197	E.U.A., Illinois, DuPage Co.
<i>I. s. spurius</i> (L-L-6)	FNMNH	381975	AY211234	AY211198	AY211198	E.U.A., Illinois, Cook Co.
<i>I. s. spurius</i> (LA-1)	LSUMZ	B-5329	AY211230	AY211199	AY211199	E.U.A., Louisiana, Cameron Co.
<i>I. s. spurius</i> (LA-2)	LSUMZ	B-6377	AY211236	E.U.A., Louisiana, Cameron Co.
<i>I. s. spurius</i> (LA-3)	LSUMZ	B-6378	AY211237	AY211200	AY211200	E.U.A., Louisiana, Cameron Co.
<i>I. s. spurius</i> (LA-4)	LSUMZ	B-6379	AY211238	AY211201	AY211201	E.U.A., Louisiana, Cameron Co.
<i>I. s. spurius</i> (LA-5)	LSUMZ	B-6380	AY211239	AY211202	AY211202	E.U.A., Louisiana, Cameron Co.
<i>I. s. spurius</i> (LA-6)	LSUMZ	B-6382	AY211240	AY211203	AY211203	E.U.A., Louisiana, Cameron Co.
<i>I. s. spurius</i> (LA-7)	LSUMZ	B-8464	AY211241	AY211204	AY211204	E.U.A., Louisiana, Cameron Co.
<i>I. s. spurius</i> (NC)	NCNM	15229	AY211242	E.U.A., North Carolina, Pender Co.
<i>I. s. spurius</i> (PA-1)	ANSP	10125	AY211243	AY211205	AY211205	E.U.A., Pennsylvania, Bucks Co.
<i>I. s. spurius</i> (PA-2)	ANSP	10147	AY211244	AY211210	AY211210	E.U.A., Pennsylvania, Bucks Co.
<i>I. s. spurius</i> (VA)	ANSP	10210	AY211245	AY211211	AY211211	E.U.A., Virginia, Accomack Co.
<i>I. s. spurius</i> (KS)	URMNH	91051	AY211246	E.U.A., Kansas, Seward Co.

<i>I. s. spurius</i> (Gua-1)	MZFC	5439	AY211247	-----	Méjico, Guanajuato, Santiago
<i>I. s. spurius</i> (Gua-2)	MZFC	5440	AY211226	-----	Méjico, Guanajuato, Santiago
<i>I. s. spurius</i> (Gua-3)	MZFC	5474	AY211227	-----	Méjico, Guanajuato, San Pedro de los Naranjos
<i>I. s. spurius</i> (Gua-4)	MZFC	5454	AY211225	-----	Méjico, Guanajuato, Santiago Maravatí
<i>I. d. proboscidea</i> (1)	MZFC	13573	-----	AY211212	Méjico, Campeche, Xpujil
<i>I. d. proboscidea</i> (2)	BMNH	42543	-----	AFO99289	Méjico, Campeche, Xpujil
<i>I. d. proboscidea</i> (3)	BMNH	42542	-----	AY211213	Méjico, Yucatán, Chichenitza
<i>I. d. dominicensis</i> (1)	MVZ	178920	AY211216	AY211195	República Dominicana, Samana
<i>I. d. dominicensis</i> (2)	NKK**	1112	AY211217	AY211196	República Dominicana, Peravia

* Esta columna corresponde a las iniciales de los Museos a los que pertenece cada muestra: Academy of Natural Sciences, Philadelphia (ANSP); J.F. Bell Museum of Natural History, Universidad de Minnesota (BMNH); Field Museum of Natural History (FMNH); Louisiana State University Museum of Zoology (LSUHZ); Museum of Vertebrate Zoology (MVZ); Museo de Zoológia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (MZN-C); North Carolina State Museum (NCSM) y University of Kansas Natural History Museum (UKNHM).

** Esta muestra corresponde a las iniciales de Nedra K. Klein† quien la colectó el 8 de julio de 1998. Asimismo, esta muestra se encuentra bajo la custodia del Dr. Kevin E.

Omland de la University of Maryland, Baltimore County.
*** Números de acceso para el GenBank.

APÉNDICE 2

Secuencia de 344 pares de bases de la Región Control para cada muestra de *I. s. spurius* e *I. s. fuertesi*.

mzfc15532	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
mzfc13565	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
bmnh42538	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
mzfc13568	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb3980	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
fnnhb383513	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
fnnhb383514	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
fnnhb389579	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
fnnhb384644	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
fnnhb390351	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
fnnhb381975	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
uknhm91051	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb5929	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb6377	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb6378	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb6379	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb6380	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb6382	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
lsumzb8464	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
nesm15229	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
aspn10125	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
aspn10147	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
aspn10210	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
mzfc5439	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
mzfc5440	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
mzfc5474	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
mzfc5454	AACATTCCTTGTTCAGGTACCATAGAGGCCAGATCTTCCTAACCCAAAGGCAAGCGCCAAGCCCAAGGCAAGCGTCAACCTTATCACTA
mzfc15595	ACTTCCAACTTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
mzfc15534	ACCCCCAACCTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
mzfc15533	ACTTCCAACTTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
mzfc15532	ACTTCCAACTTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
mzfc13565	ACTTCCAACTTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
bmnh42538	ACTTCCAACTTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
mzfc13568	ACTTCCAACTTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
lsumzb3980	ACCCCCAACCTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG
fnnhb383513	ACCCCCAACCTAGAGAACGGGAATGTCCCTAGACTACAGGATTGCCAACCTTCTAGGTAAATTCAGCCAAGCCAAAG

fmnh389514	ACCCCCAACTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
fmnh3895179	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
fmnh389644	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
fmnh390351	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
fmnh381975	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
ukhmh91051	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
lsumzB5929	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
lsumzB6377	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
lsumzB6378	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
lsumzB6379	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
lsumzB6380	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
lsumzB6382	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
lsumzB8446	ACTCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
ncsn15229	ACCTCCAACCTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
ansp10125	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
ansp10147	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
ansp10210	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
mzfc5439	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
mzfc5440	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
mzfc5447	ACCCCCAACTTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
mzfc5454	ACCTCCAACCTAGAGAACGAGGAATGTCCCCAGACACCTTGTAAATTCCCTAGGTAAATTCAGGCCAACAG
mzfc15595	CCTTCAAGAACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
mzfc15534	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
mzfc15533	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
mzfc15532	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
mzfc13565	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
bmnh42538	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
mzfc13568	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
lsumzB3980	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
fmnh383513	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
fmnh383514	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
fmnh389579	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
fmnh384644	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
fmnh390351	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
fmnh381975	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT
ukhmh91051	CCTTCAAGAACCCCCAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATCGCGCTT

lsumzB5929	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
lsumzB6377	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
lsumzB6378	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
lsumzB6379	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
lsumzB6380	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
lsumzB6382	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
lsumzB8464	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
ncsm15729	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
ansp10125	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
ansp10147	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
ansp10210	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
mzf5439	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
mzf5440	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
mzf5474	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT
mzf5484	CCTTCAAGAACACCCAAAGCCAGAGAACACGGTTATTATGATTCGGCTT

APÉNDICE 3

Secuencia de 925 pares de bases del gen Cítronomo-*b* para algunas muestras de *I. s. spurius*, todas de *I. s. fueresi* y todas de los grupos externos.

mzfc15595	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc15534	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc15533	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc15532	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc13565	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
bmnh42338	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc13568	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
fnnh390351	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
fnnh381975	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
uknhm91051	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
lsumzB-6377	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
lsumzB-6378	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
lsumzB-6379	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
lsumzB-6380	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
lsumzB-6382	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
ncsn15229	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
ansp10125	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
ansp10147	CTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc13573	CTTCGGTAACCTACTGGGAATCTGCTTAATTACTCAAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
bmnh42342	CTTCGGTAACCTACTGGGAATCTGCTTAATTACTCAAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mvz178920	TTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACATCCAAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
nlkk112	TTTCGGGTCCCTACTGGGCATCTGCCATAATCGTTACATCCAAATCGTTACAGGTCCTCTGTAGCCATAACATCAATGAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc15595	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTCGGGTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc15534	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc15533	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc15532	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc13565	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
bmnh42338	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
mzfc13568	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
fnnh390351	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
fnnh381975	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC
uknhm91051	TCCGGTGGCTCACATCTGCCAGAACGTACAATTGGCTGACTCATTCGGCAACCTCCATGCAAATGGAGCACCAACCTAGCCTTTC

mzf15595	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mzf15534	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mzf15533	AGGTACGTACTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mzf15532	AGGTACGTACTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mzf13565	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
bmmh4-25338	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mzf13568	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mzf13569	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
fmnh390351	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
fmnh3819751	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
lsamB-91051	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
lsamB-63778	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
lsamB-63779	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
lsamB-6380	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
lsamB-6382	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
ncsn15229	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
ansp10125	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
ansp10147	AGGTACGTGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mzf13573	AGGATACTGGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
bmmh4-25452	AGGATACTGGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
mvv178920	AGGATACTGGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC
lif1111	AGGATACTGGCTACCATTGGCCAATAATCATTCATTCTGAGGGCTTACCGTCTACACAAACCTATTCAGCCATCCCATACTGGACAAACACTAGTC

ansp10147	GCCAAACCCCTTAAGTCACCCCCA CCTCATATCAAGCCTGAATGATACTTCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc13573	GCCAAACCCCTTAAGTCACCCCCA CCTCATATCAAGCCTGAATGATACTTCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
bmnh42342	GCCAAACCCCTTAAGTCACCCCCA CCTCATATCAAGCCTGAATGATACTTCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mvz178920	GCCAAACCCCTTAAGTCACCCCCA CCTCATATCAAGCCTGAATGATACTTCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
nkk112	GCCAAACCCCTTAAGTCACCCCCA CCTCATATCAAGCCTGAATGATACTTCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc15595	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc15534	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc15533	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc15532	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc13565	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
bmnh42338	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc13568	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
fmnh390351	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
fmnh381975	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc15531	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
ukhm91051	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
lsamzb-6377	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
lsamzb-6378	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
lsamzb-6379	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
lsamzb-6380	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
lsamzb-6382	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
ncsn15229	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
ansp10125	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
ansp10147	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc13573	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
bmnh42342	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mvz178920	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
nkk112	ATTAGCTTTAGCCGCCCTCAATCCTAGCTCTTATCCCAACTACTTCACACATCGAAACTACGATCAATAACTTCCGTCCCCATTATCGCAAATTC
mzfc15595	TGTTCTGAGGCCCTAGTCGCCCAATGTGCCCTTGCTCTAACCTGAGTAGGCAGC
mzfc15534	TGTTCTGAGGCCCTAGTCGCCCAATGTGCCCTTGCTCTAACCTGAGTAGGCAGC
mzfc15533	TGTTCTGAGGCCCTAGTCGCCCAATGTGCCCTTGCTCTAACCTGAGTAGGCAGC
mzfc15532	TGTTCTGAGGCCCTAGTCGCCCAATGTGCCCTTGCTCTAACCTGAGTAGGCAGC
mzfc13565	TGTTCTGAGGCCCTAGTCGCCCAATGTGCCCTTGCTCTAACCTGAGTAGGCAGC
bmnh42338	TGTTCTGAGGCCCTAGTCGCCCAATGTGCCCTTGCTCTAACCTGAGTAGGCAGC

mzfc13568	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
fmnh390351	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
fmnh381975	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
ukhn91051	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
lsumzB-6377	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
lsumzB-6378	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
lsumzB-6379	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
lsumzB-6380	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
lsumzB-6382	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
ncsn15229	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
ansp10125	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
ansp10147	TGTTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
mzfc13573	TATTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
bmnh42542	TATTCTGAGCCCTAATGCGCAATGTCCTGTCTAACCTGAGTAGGCAGC
mvz178920	TATTCTGGGCCCTAATGCGCTAAATGTCCTTATCCTAACCTGAGTAGGCAGC
nkk1112	TATTCTGGGCCCTAATGCGCTAAATGTCCTTATCCTAACCTGAGTAGGCAGC