



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS

LIMITES DE ESPECIES DENTRO DEL COMPLEJO  
*Icterus pustulatus* WAGLER (AVES:ICTERIDAE)

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**( S I S T E M Á T I C A )**

**P R E S E N T A :**

**MARÍA NANDADEVI CORTES RODRÍGUEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. BLANCA ESTELA HERNÁNDEZ BAÑOS

MÉXICO, D. F.

ENERO 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

La realización del trabajo fue posible gracias a las becas de Posgrado de Excelencia otorgadas por **CONACyT** y **DGEP**. Así como la información utilizada gracias a los proyectos **FONDO SECTORIAL SEMARNAT-CONACyT (C01-0265)**.

Al comité tutorial y directora de tesis que participaron con valiosos comentarios y correcciones al trabajo, **Dra. Virginia León Regagnon, Dr. Oscar Flores Villela y Dra. Blanca Hernández** (directora de tesis).

Un agradecimiento muy especial a las colecciones y colectores de las siguientes instituciones que prestaron tejidos de *Icterus pustulatus* para la elaboración de este proyecto.

University of Kansas Natural History Museum; Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM; Burke Museum, University of Washington; Peabody Museum, Yale University; Marjorie Barrick Museum of Natural History, UNLV; Omland tissue collection, UMBC.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo quisiera dedicarlo muy especialmente a mis papas Olga Margarita y Antonio Ramón por todo el amor y cariño que me han brindado, por ayudarme en las buenas y en las malas y por enseñarme que todo es posible en la vida con un poco de esfuerzo y que nunca hay que darse por vencido para llegar a la cumbre y defender los sueños e ideales. Gracias por ser mi gran apoyo. Los quiero mucho.

A mi hermanita Edel (Lobita) por traer tanta alegría a mi vida (y también algunas campales jaja), por apoyarme y aguantarme en las buenas y en las malas pero sobre todo por ser mi gran amiga. Te quiero mucho.

A mis lindas mascotas: Odory, chispa, los pericos y en especial a mi linda Cookie a quien quiero mucho. Por ayudarme a aumentar mi paciencia y por los divertidos paseos en el parque, pero sobre todo por mantenerme despierta.

A toda mi familia en especial a mis tías Martha. A mis abuelitas que aunque ya no estén aquí han sido un gran ejemplo para mí: Pachis, Mary, mi abuelito Ramón. Y a mi abuelita Monis donde quiera que este la recuerdo con mucho cariño.

A Blanca, por su confianza, amistad y todo el apoyo y paciencia que me ha tenido en estos últimos años.

A Adolfo por haberme aceptado en el Museo de Zoología e introducirme al maravilloso mundo de las aves.

A Kevin Omalnd, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y no solo por aprender nuevas técnicas, también por recibirme tan bien en su casa junto con Sonja y por los buenos ratos en el ski y en la canoa.

A César por su ayuda en los momentos difíciles pero sobre todo por ser alguien muy importante en mi vida.

A mis grandes amigos Vania y Harry por todos los cafés que nos hemos tomado juntos y por apoyarme en las buenas y en las malas (aunque casi no nos veamos) los quiero mucho y quiero que sepan que significan mucho para mí.

A mi gran amiga Paulina, por estar siempre ahí en los grandes eventos de mi vida y por que sigamos compartiendo muchas cosas. Con todo mi cariño, gracias por tu amistad.

A las moleculitas: Gaby y Magui por hacerme pasar ratos muy agradables en el laboratorio y en la pajarera, pero sobre todo por su amistad.

A mi amiguito Hernan por los buenos ratos en la UBMC (jaja!) especialmente en nuestras escapadas a los museos, al cine y a las tiendas en Arundel Mills.

A mis amiguitos del museo: Erick, al Loquito, la Perlis, Susette, Roberto (Mampo), Luis (Howell), Chente, Gordillo, Samuel, Itzel, Manuel (Champu), Beto, Uri, y también a Marilú (aunque no trabaje ahí)

A los miembros del laboratorio Omland: Liz, Beatrice, Chris, Jeff y los undergraduados por su paciencia y cariño.

A mis maestros Blanca Hernández, Oscar Flores, Gabriela Ibáñez, Ella Vázquez, Virginia León, Susana Castañeda, Georgina Santos, Oswaldo Téllez por enseñarme cada día algo nuevo.

A mi comité tutorial Dra. Virginia León y Dr. Oscar Flores, así como a los miembros del jurado Dra. Ella Vázquez y Dr. Alejandro Espinosa de los Monteros y a mi directora de tesis Dra. Blanca Hernández por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo

Muy especialmente a los colectores del museo y también de otras instituciones quisiera darles un agradecimiento infinito.

A los miembros y curadores de los siguientes museos: University of Kansas Natural History Museum; Museo de Zoología, Facultad de Ciencias, UNAM; Burke Museum, University of Washington; Peabody Museum, Yale University; Marjorie Barrick Museum of Natural History, UNLV; Omland tissue collection, UMBC.

A las becas de posgrado de CONACyT y DGEP,

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo del proyecto del Dr. Kevin Omland: National Science Foundation grant to K. Omland (DEB-0347083).

A todas aquellas personas que me apoyaron de una forma u otra y que he olvidado mencionar.

## ÍNDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	3
El complejo <i>Icterus pustulatus</i> .....	4
Hábitat .....	6
Descripción.....	6
Conducta y reproducción.....	7
Situación Taxonómica.....	7
Manuscrito	
Introduction.....	11
Methods.....	16
Results.....	18
1. Sequence data.....	18
2. Networks and trees.....	20
3. Population Genetic Analysis.....	25
Discusión.....	27
1. Genetic variation and species limits.....	27
2. Population history.....	28
3. Island Population.....	29
4. Geographic pattern.....	30
References.....	32
Appendix 1. Number of specimens sequenced in this project, locality and country of origin.	36
Conclusiones.....	39
Literatura Citada.....	40
Apéndice 2. Secuencias de los 15 haplotipos observados dentro del complejo <i>Icterus pustulatus</i> .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I. Filogenia del género <i>Icterus</i> .....	4
Figura II. Distribución conocida del complejo <i>Icterus pustulatus</i> propuesta por Howell y Webb (1995).....	5
Figure 1. Localities sampled.....	15
Figure 2. Haplotypic median joining network.....	21
Figure 3. Map showing the distribution of the three major groups of haplotypes found.....	22
Figure 4. Maximum-likelihood phylogram of <i>Icterus pustulatus</i> .....	24
Figure 5. Mismatch distribution histogram for the whole species complex.....	26

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Subespecies del complejo <i>Icterus pustulatus</i> que se han reconocido hasta la fecha.....	8
Tabla II. Aportaciones de varios autores al conocimiento del complejo <i>Icterus pustulatus</i> ...	9
Table 1. History of taxonomical proposals for the <i>Icterus pustulatus</i> complex.....	14
Table 2. mtDNA haplotypes and sampling sites.....	19
Table 3. Haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ).....	19
Table 4. Population Average Pairwise differences.....	23
Table 5. AMOVA results.....	26

## RESUMEN

Muchas especies de aves de zonas templadas muestran niveles bajos de diferenciación genética en comparación con especies de las zonas tropicales. Sin embargo, hay algunas excepciones interesantes. Asimismo, especies cuyos rangos de distribución se encuentran a través del límite tropical/templado podrían tener características de cualquiera o ambas zonas. La calandria de fuego (*Icterus pustulatus*), es una especie cuya distribución va de Sonora en el noroeste de México, al sur, a lo largo de la costa del pacífico hasta Costa Rica. Además, existe una población en las islas de Tres Marías. Las poblaciones norteñas son migratorias y dicromáticas (sexos diferentes), mientras que las poblaciones sureñas no son migratorias y monocromáticas (sexos iguales). Secuenciamos un total de 102 individuos para el primer dominio de la Región Control (DNA mitocondrial), obteniendo un total de 344 pares de base con solo 13 sitios variables, valores parecidos a los encontrados en otras especies del género *Icterus*. Los análisis de parsimonia y de máxima verosimilitud no apoyaron la existencia de más de una especie al interior del complejo *Icterus pustulatus*, sin embargo, las poblaciones de las islas de Tres Marías pudieran haber estado aisladas por un período bastante largo para acumular diferencias fijadas entre las islas y el continente. El complejo presenta un patrón filogeográfico muy raro, con árboles que presentan baja resolución y una estructura geográfica débil, sugiriendo que la especie ha experimentado una reciente expansión poblacional. Recomendamos que las poblaciones insulares se consideren como una especie separada; *Icterus graysonii*, dadas las diferencias fijadas utilizando criterios múltiples incluyendo patrones del mtDNA y del plumaje.

---

## ABSTRACT

Many species of birds from the temperate zone show low levels of genetic differentiation when compared with species from the tropics. However, there are some interesting exceptions. Furthermore, species whose ranges occur across the temperate tropical boundary could have characteristics of either or both zones. The Streak-backed Oriole (*Icterus pustulatus*), is a species, whose distribution goes from Sonora in NW Mexico, South along the Pacific coast to Costa Rica. In addition there is a population on the Tres Marias Islands. Northern populations are migratory and dichromatic (sexes different), whereas southern populations are non migratory and monochromatic (sexes alike). We sequenced 102 individuals of this species for the control region's domain I (mtDNA). We obtained 344 bp with only 13 variable sites, similar values were found in other species of the genus *Icterus*. MP and ML analysis did not support the existence of multiple species within *Icterus pustulatus* based on mtDNA. However, populations from Tres Marias Islands seem to have been isolated for a period long enough to have fixed differences between the islands and the mainland. The species complex shows a very rare phylogeographic pattern, with shallow haplotype trees and weak geographic structure, suggesting it has undergone a recent population expansion. We recommend that the insular populations should be considered a separate species, *Icterus graysonii* given the fixed differences in multiple criteria including mtDNA and plumage patterns.



## INTRODUCCIÓN

Desde hace más de 50 años, Ernest Mayr estableció que del total de la diversidad de aves en el mundo, solamente quedaban por describirse 100 especies aproximadamente. Esta profecía, que pondría fin a la descripción de nuevas especies no resultó cierta, pues se han descrito al menos 163 especies válidas entre 1947 y 1997. Cabe señalar que más allá de la simple descripción de nuevas taxa, mucho del trabajo pendiente dentro de la sistemática ornitológica se centra en esclarecer los límites de especies entre las especies ya descritas (Peterson 1998). Por lo anterior, actualmente, muchos estudios de sistemática tienen como objetivo la delimitación de especies y la reconstrucción de sus historias; sin embargo, el establecimiento de los límites de las especies, no es una tarea sencilla, ya que primero debe de quedar claro qué es una especie y ese debate aún continúa. Este problema implica no sólo cuestiones biológicas, sino también filosóficas, confrontando al realismo (quienes llaman especies a entidades reales con funcionalidad propia), con el nominalismo (para quienes las especies son entidades abstractas y sin correlación real en la naturaleza), derivándose de estas posiciones una gran cantidad de conceptos de especie sin llegar a un acuerdo acerca de cuál de éstos es el que mejor describe la diversidad biológica (Crisci 1994 ).

El debate principal se ha centrado entre el concepto biológico de especie (BSC) y el concepto filogenético (PSC). El concepto biológico, propuesto por Ernest Mayr (1942), describe a una especie como un grupo de poblaciones naturales interreproductivas aisladas reproductivamente de otros grupos y reconoce la existencia de una gran cantidad de unidades subespecíficas dentro de una especie que incluyen variantes geográficas bien marcadas. El concepto filogenético de especie se ha utilizado para al menos tres clases distintas de definiciones de especie asociados con la ideología taxonómica conocida como sistemática filogenética o cladística (Por ejemplo Hennig 1966, Por ejemplo Eldredge y Cracraft 1980, Nelson y Platnick 1981). A continuación se revisarán estas tres clases de definiciones del concepto filogenético de especie:

1. Conocido también como el concepto de **especie cladístico o Hennigiano**. Grupo de organismos entre dos sucesos de especiación, o entre un suceso de especiación y uno de extinción, o que son descendientes de un evento de especiación (Ridley 1989, Panchen 1992).

2. Conocido también como el concepto de especie **basado en monofilia**. Un grupo de organismos reconocido como linaje con una base morfológica, por la posesión de caracteres derivados compartidos (sinapomorfías) y jerarquizados como especies por factores causales que mantienen al linaje como el grupo monofilético mas pequeño e importante reconocido en la clasificación (Mishler y Donohue 1992).
3. Conocido también como la aproximación diagnóstica en donde una especie es la unidad evolutiva más pequeña diagnosticable e individuos de un organismo dentro de la cual existe un patrón de ancestría-descendencia (Eldredgey Cracraft 1979, Cracraft 1983).

Actualmente, los estudios de variación geográfica o límites de especies han proporcionado información importante para el esclarecimiento de las relaciones entre diversos taxones, tal es el ejemplo de los estudios realizados en los complejos *Toxostoma curvirostre* (Rojas-Soto 1998) *Momotus momota* (Ibáñez-Hernández 2000), *Chlorospingus ophthalmicus* (Sánchez-González 2002), *Cyananthus latirostris* (García-Deras 2003); en éstos, los resultados mostraron la existencia de más de una unidad taxonómica al interior de cada uno de estos complejos (García-Trejo, en prep). Entendiendo por "complejo" a un grupo de taxones relacionados entre sí, cuyos límites geográficos no están bien delimitados y son de especial interés, ya que representan el extremo en los patrones espaciales (Rojas-Soto 1998, Kirchman *et al.* 2000).

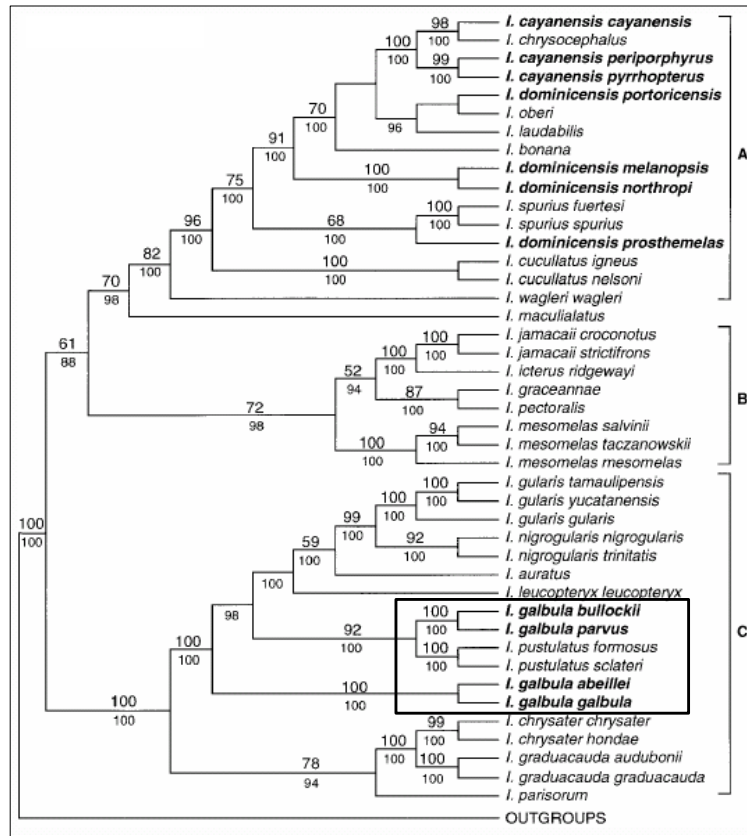
El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido la integración de datos bioquímicos al análisis filogenético (Espinosa de los Monteros y Cracraft 1997). A diferencia de los primeros análisis de filogenia molecular realizados con aloenzimas, en los cuales se reveló poca o ninguna diferenciación genética interespecífica (Zink y Dittman 1991, Avise 2000) el DNA mitocondrial proporcionó los primeros datos accesibles en genealogías de genes a nivel intraespecífico, por lo que se ha establecido un puente empírico y conceptual entre la genética de poblaciones (microevolución) y la filogenética tradicional (macroevolución;(Avise 1994). En las genealogías de genes el DNA mitocondrial presentó un 95% de probabilidad de igualar al árbol de la especie, a diferencia del DNA nuclear que presentó un 65%; con base en estos datos, serían necesarios muchos árboles de genes nucleares para generar una hipótesis de historia evolutiva de los organismos, mientras que en el caso del DNA mitocondrial se requeriría de un solo árbol (Moore 1995, 1997).

## ANTECEDENTES

La familia Icteridae (comúnmente conocidas como calandrias), es una familia diversa que incluye paserinos de mediano a gran tamaño, cuyos miembros comparten características morfológicas, vocales y conductuales que revelan sus relaciones taxonómicas, se distribuyen exclusivamente en América, desde Alaska hasta Argentina, incluyendo el Caribe (Jaramillo y Burke 1999). Aún cuando constituyen una familia cien por ciento americana, presentan similitudes con familias del viejo mundo como la familia Oriolidae (orioles del viejo mundo), Sturnidae (estorninos) y Ploceidae (tejedores), por la elaboración de nidos colgantes y la formación de colonias (Jaramillo y Burke 1999). Originalmente considerada como subfamilia (Icterinae) de la familia Emberizidae, la familia Icteridae parece estar más emparentada con la familia Parulidae que con las familias Emberizidae, Thraupidae y Cardinalidae (Bledsoe 1988, Curson *et al.* 1994). Los ictéridos han recibido gran atención en cuando a investigación con respecto a su ecología y conducta, poca atención se ha dado al esclarecimiento de las relaciones taxonómicas dentro del grupo (Jaramillo y Burke 1999).

La familia Icteridae, incluye especies cercanamente relacionadas y con una gran cantidad de “subespecies” que ofrecen oportunidades excelentes para el estudio de eventos recientes de especiación, se han utilizado como modelos para el estudio de genética evolutiva, evolución molecular así como eventos recientes de especiación (Omland y Lanyon 2000, Baker *et al.* 2003) se encuentran entre las aves más estudiadas del continente americano, además de que el género *Icterus* es uno de los más diversos, ya que cuenta con 25 especies reconocidas actualmente (Sibley y Ahlquist 1990), 14 de las cuales se reproducen en México (Howell y Webb 1995). La familia exhibe un amplio rango de caracteres morfológicos, conductuales y ecológicos que son interesantes para el estudio de evolución del plumaje, ya que muestran variaciones en los patrones de coloración y esquemas de maduración del plumaje, presentando tanto especies monomórficas como dimórficas (Omland *et al.* 1999). A pesar de que es grupo interesante para estudios ecológicos y conductuales, las relaciones filogenéticas al interior del género no son claras y se remontan formalmente a los años cincuenta, cuando Beecher (1950) realizó estudios con características de esqueletos y forma de nidos, encontrando dos linajes evolutivos de orioles y estableciendo que el género no es monofilético. Desafortunadamente, no fue sino hasta los años noventa, en que Freeman y Zink (1995)

realizaron estudios taxonómicos para este género utilizando enzimas de restricción, pero, aún cuando sus resultados no resolvieron las relaciones entre las especies, sugieren la posibilidad de que este género no sea monofilético. Estudios recientes (Omland *et al.* 1999), en los que se analizaron secuencias de DNA mitocondrial, utilizando el gen Citocromo *b*, establecen que el género si es monofilético (Figura 1).



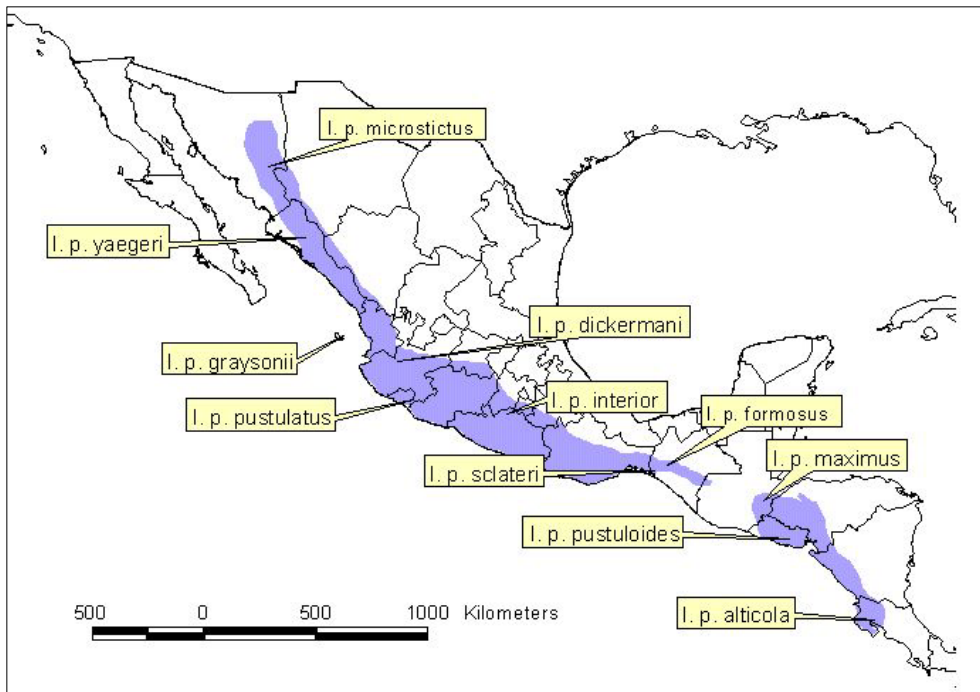
**Figura 1.** Filogenia del género *Icterus* utilizando los genes ND2 y Citocromo *b* (de acuerdo con Omland y Lanyon 1999). Se observa que este género es monofilético; así también, se muestran las especies relacionadas con mayor cercanía a *Icterus pustulatus*.

### **El complejo *Icterus pustulatus***

La calandria de fuego, *Icterus pustulatus* (Wagler 1829), es una especie polimórfica con once subespecies reconocidas (Figura 2). Se distribuye en la zona tropical este y sur de la República Mexicana desde los estados de Sonora, Chihuahua, Nayarit

(con una población en las islas Tres Marías), Veracruz hasta Oaxaca y Chiapas; y en el sur de Centroamérica hasta Nicaragua y el Norte de Costa Rica. Recientemente se le ha visto en el sureste de Oregon, Arizona, California y Nevada (Friedman *et al.* 1950, Jaramillo y Burke 1999).

Como se observa, el complejo *Icterus pustulatus* tiene una distribución en su mayoría continua y aún así, las distintas poblaciones presentan diferencias en el patrón de coloración y variaciones morfológicas. Las subespecies norteñas son migratorias (en invierno) y sexualmente dicromáticas; los machos son naranja, negro y blanco brillante, mientras que las hembras son amarillas, olivo y blanco crípticas, contrastando con las poblaciones sureñas que no son migratorias y son monocromáticas (carecen de cabeza rojo-anaranjado y presentan coloración negra que domina la espalda), siendo difícil de distinguir a machos y hembras (Jaramillo y Burke 1999).



**Figura II.** Distribución conocida del complejo *Icterus pustulatus* propuesta por Howell y Webb (1995); se muestran las once subespecies descritas hasta el momento.

## **Hábitat**

Habita principalmente en bosques tropicales deciduos, bosques de galería y bosques secundarios (0-1900m; en zonas tropicales y subtropicales), así como en corredores riparios y en desiertos, al menos en el norte de su distribución. Muestra preferencia por áreas abiertas, especialmente aquellas con arbustos espinosos como *Mimosa*. También se le encuentra en áreas de cultivo y secas, hasta en bosques de pino-encino en las tierras altas de México. Forrajea en pares o grupos y se alimenta de frutos, semillas e insectos que encuentra en el follaje o muertos.

## **Descripción**

*Icterus putulatus* es una calandria de tamaño mediano a grande, con pico moderadamente profundo con culmen recto y gonis un poco curvado, la cola es graduada débilmente, las plumas exteriores son 10mm más cortas que las internas (Howell y Webb 1995, Jaramillo y Burke 1999).

**Macho adulto no migratorio (*microstictus*):** Pico negro con un tercio a un medio de la parte basal de la mandíbula azul-gris. Muestra lores negros, auriculares anteriores, barba, garganta y la parte superior del pecho crean una máscara negra. La frente, la corona y el cuello son rojizo-naranja con olivo. La espalda es notablemente rayada, con pequeñas manchas negras. Las plumas negras tienen blanco en las puntas.

**Hembra adulta no migratoria (*microstictus*):** Similar al macho adulto en el patrón del plumaje, pero mucho más opaca. La espalda y la corona son verde-olivo y las partes inferiores son naranja-amarillo pálido, pero más brillante en la cara.

**Juvenil no migratorio (*microstictus*):** Similar a la hembra adulta, pero la espalda es solo un poco rayada. Las partes inferiores son blancas en el vientre y las alas tienen poco blanco en la punta con barras no prominentes.

**Macho adulto insular (*graysonii*):** Similar a *microstictus* en el patrón, pero carece de la mayoría de las rayas negras en la espalda. El plumaje es más naranja-amarillo.

**Hembra insular (*graysonii*):** Similar al macho adulto, pero la espalda es verdosa y las partes inferiores son naranja-amarillo pálido.

**Macho adulto migratorio (*sclateri*):** Similar a *microstictus*, pero las rayas de la espalda son más grandes, haciendo parecer a la espalda negro con naranja. La coloración naranja del cuerpo no es tan rojiza como la de *microstictus*. Ambos sexos son similares.

**Macho adulto migratorio (*alticola*):** Similar a *sclateri*, pero la espalda es casi totalmente negra debido a que las rayas son mucho más gruesas. Sexos similares, al igual que en *sclateri*.

### **Conducta y reproducción**

Forrajea en pares o en grupos familiares, generalmente insectívoro. Se alimenta de insectos en el follaje o muertos, aunque también se alimenta de frutos y semillas. Se ha visto a *Icterus pustulatus* confrontándose con *Icterus bullockii* en árboles de *Pseudobombax ellipticum* (Morelos) al cual puede llegar a derrotar en varias ocasiones (Eguiarte *et al.* 1987). Tiende a ser monogámico, sin embargo se tienen registros de poliginia; la temporada de anidamiento comienza a principios de Junio y continúa hasta Agosto, poniendo de 3 a 4 huevos (azul pálido con manchas negras igualmente distribuidas), la incubación dura entre 12 y 14 días y tardan aproximadamente dos semanas en levantar el vuelo. Ambos padres se alternan para alimentar a los polluelos, que ocasionalmente son parasitados por *Molothrus aeneus* (Howell y Webb 1995, Jaramillo y Burke 1999).

### **Situación Taxonómica**

Debido a la variación geográfica y a las características morfológicas que presenta, se han propuesto en total once formas o subespecies desde su descripción en 1829 (Tabla I). Estas variaciones tanto en morfología como en plumaje, han sido la causa de que muchos autores sugieran que el complejo *Icterus pustulatus* está formado por varias especies (Tabla II). Se ha reconocido la existencia de tres grupos dentro del complejo: *pustulatus*, *sclateri* y *graysonii* (este último de las Islas Tres Marías, México) que han sido nominados para ser considerados como especies (AOU 1998, Jaramillo y Burke 1999, Navarro-Sigüenza y Peterson 2004). Cabe mencionar que, aunque estas propuestas coinciden en la probable existencia de tres especies, los límites de distribución entre ellas no están claramente definidos.

**Tabla I.** Subespecies del complejo *Icterus pustulatus* que se han reconocido hasta la fecha:

<b><i>Icterus pustulatus pustulatus</i> (Wagler) 1829</b>	Zonas tropicales en Colima (integrada con <i>microstictus</i> ), Michoacán, Guerrero, Norte de Oaxaca, Guanajuato, Morelos, Puebla, Veracruz.
<b><i>Icterus pustulatus pustuloides</i> Wagler 1829</b>	Volcán de San Miguel (El Salvador)
<b><i>Icterus pustulatus graysonii</i> Cassin 1867</b>	Islas Tres Mariás (María Madre, María Magdalena, María Cleofás), Nayarit, México
<b><i>Icterus pustulatus sclateri</i> Cassin 1867</b>	Costa del Pacífico (principalmente) de El Salvador, Honduras y Nicaragua, sur hasta la Península de Nicoya, noroeste de Costa Rica.
<b><i>Icterus pustulatus formosus</i> Lawrence 1872</b>	Zona tropical árida del sur de México (Oaxaca, Chiapas) y extremo noroeste de Guatemala
<b><i>Icterus pustulatus alticola</i> Miller y Griscom 1925</b>	Zona tropical árida de Guatemala, excepto el extremo noroeste y la costa Atlántica (bajo los 1520 metros) de Honduras.
<b><i>Icterus pustulatus maximus</i> Griscom 1930</b>	Parte Central en el Norte de Guatemala
<b><i>Icterus pustulatus microstictus</i> Griscom 1934</b>	Zona tropical del oeste de México desde Sonora (norte de Hermosillo y Moctezuma) y Chihuahua sur hasta Jalisco y no se reproduce en Guerrero
<b><i>Icterus pustulatus yaegeri</i> Phillips 1995</b>	Residente en las zonas bajas costeñas desde la parte más sureña de Sinaloa y hasta el sur de Nayarit. Tierra adentro en Tepic y el valle sur de Compostela.
<b><i>Icterus pustulatus dickermani</i> Phillips 1995</b>	Residente en las tierras bajas del Pacífico desde el suroeste de Jalisco y costa de Colima, al Este, hasta el Sur de Guerrero desde donde va al Norte al área de Tierra Colorada.
<b><i>Icterus pustulatus interior</i> Phillips 1995</b>	Residente en el Sur y Centro de México, lejos de la costa; desde el centro de Colima y el Sur de Michoacán (valle del Río Balsas norte hasta las montañas de la costa) en el Este probablemente al oeste de Oaxaca y al Norte, al menos hasta Morelos.



**Tabla II.** Aportaciones de varios autores al conocimiento del complejo *Icterus pustulatus*.

<b>Autor y Año</b>	<b>Aportaciones</b>
<b>Wagler (1829)</b>	Hace la descripción de <i>Icterus pustulatus</i>
<b>Cassin (1867)</b>	Describe a <i>Icterus sclateri</i> e <i>Icterus graysonii</i> (Islas Marías)
<b>Lawrence (1872)</b>	Describe a <i>Icterus formosus</i>
<b>Ridgway (1911)</b>	Reconoce varias especies de <i>Icterus</i> , en particular destacan <i>Icterus pustulatus</i> , <i>Icterus sclateri</i> e <i>Icterus graysonii</i> Propone también que los individuos de Nicaragua, al ser mas pequeños que los demás, sean tratados como <i>I. s. formosus</i> .
<b>Van Rossem (1927)</b>	Propone a <i>I. sclateri</i> y a <i>I. pustulatus</i> como conespecíficas
<b>Peters (1945)</b>	Para <i>Icterus pustulatus</i> reconoce a <i>I. p. microstictus</i> desde Sonora y Chihuahua, hasta Jalisco y Guerrero <i>I. p. graysonii</i> de las Islas Tres Marías (México) <i>I. p. pustulatus</i> desde Colima hasta Guatemala <i>I. p. formosus</i> del sureste de México hasta el noreste de Guatemala <i>I. p. alticola</i> en la costa Atlántica de Guatemala <i>I. p. sclateri</i> desde Guatemala hasta Nicaragua
<b>Friedman et al (1950)</b>	Reconoce a <i>I. p. microstictus</i> , <i>I. p. graysonii</i> , <i>I. p. pustulatus</i> e <i>I. p. formosus</i> (en el sur de México y noroeste de Guatemala)
<b>Howell y Webb (1995)</b>	Reconoce cuatro grupos: <i>microstictus</i> (reproductivo desde Sonora a Jalisco) <i>graysonii</i> (Islas Tres Marías) <i>pustulatus</i> (reproductivo de Jalisco a Honduras e incluye a <i>formosus</i> ) <i>alticola</i> (reproductivo en el valle de C. A.)
<b>Phillips (1995)</b>	Propone tres nuevas formas dentro de <i>Icterus pustulatus</i> : <i>I. p. yaegeri</i> (sur de Sinaloa hasta el sur de Nayarit), <i>I. p. dickermani</i> (suroeste de Jalisco al sur de Guerrero) e <i>I. p. interior</i> (centro-sur de México)
<b>AOU (1998)</b>	Reconoce tres grupos dentro de la especie: <i>I. pustulatus</i> , <i>I. graysonii</i> e <i>I. sclateri</i>
<b>Jaramillo y Burke (1999)</b>	Proponen el establecimiento de tres grupos: <i>pustulatus</i> , <i>sclateri</i> (incluye dos nuevas formas <i>I. p. pustuloides</i> (del Volcán San Miguel en El Salvador) e <i>I. p. maximus</i> (restringida a la región del Río Negro en Guatemala).
<b>Navarro y Peterson (2004)</b>	Proponen la separación de <i>I. sclateri</i> y de <i>I. graysonii</i> estableciéndolas como especies: <i>I. sclateri</i> (Incluye a <i>Icterus sclateri formosus</i> ) se distribuye desde Chiapas hasta Honduras <i>I. graysonii</i> se distribuye en las Islas Tres Marías (México) <i>I. pustulatus</i> (incluye a <i>I. p. microstictus</i> ) cuya distribución va desde el Oeste de México y Sonora hasta Chiapas.

Como se observa en las Tablas I y II, existe una clara incertidumbre en cuanto a los límites de las diferentes unidades de historia reconocidas por varios autores, y aún cuando se encuentra en elaboración el análisis de la variación geográfica y los patrones de coloración (Morales en prep.), no se han realizado estudios utilizando caracteres moleculares para *Icterus pustulatus*, lo que si se ha hecho con otras especies del mismo género: *Icterus spurius* e *Icterus fuertesii* (Baker *et al.* 2003) o *Icterus galbula* e *Icterus abeillei* (Kondo *et al.* 2004). Debido a lo anterior resalta la necesidad de investigar la existencia de más de un linaje evolutivo independiente dentro del complejo *Icterus pustulatus* mediante la utilización de las secuencias del dominio 1 de la Región Control del genoma mitocondrial. Adicionalmente, se tratará de determinar si la variación genética encontrada está relacionada con la distribución geográfica, y si esta variación es similar a la encontrada en la morfología.

Los resultados y discusión se presentarán en inglés, a manera de artículo, haciendo énfasis en los puntos más importantes obtenidos en este proyecto.

# **GEOGRAPHIC VARIATION AND GENETIC STRUCTURE IN THE STREAK-BACKED ORIOLE (*ICTERUS PUSTULATUS*): LOW MITOCHONDRIAL DNA DIFFERENTIATION REVEALS RECENT DIVERGENCE.**

Cortes-Rodríguez, M. Nandadevi  
Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera", Departamento de Biología Evolutiva,  
Facultad de Ciencias, UNAM  
Apartado Postal 70-399, México, D.F. 04510, México

## **INTRODUCTION**

Many recognized bird species show strong geographic variation in morphology, behavior, ecology or molecules (Zink and Dittman 1993a, Greenberg et al. 1998, Milá et al 2000, Baker et al 2003). High levels of morphological variation may be due to sexual selection (such as on coloration; Hoekstra and Price 2004), foraging preferences (such as bill size and shape; Burns et al 2002), or other ecological adaptation (James 1983). Studies of geographic variation of polytypic species have proposed the ecological and historical mechanisms behind these phenotypic patterns in many species of birds (Zink 1986, Kirchman 2000). The examination of geographic variation at the molecular level has provided valuable information on historical demographic events (Milá et al. 2000). Moreover, the examination of populations within polytypic species can reveal the processes of genetic structuring that may lead to speciation (Wright 1931).

Many studies of geographic variation in the temperate zone have shown low levels of genetic variation (Ball et al. 1988, Greenberg et al. 1998, Omland et al. 2000, Milá et al. 2000, Baker et al. 2003, Kondo et al. 2004). In contrast, many tropical species, show relatively high levels of variation in mitochondrial DNA (mtDNA; Peterson 1992, Edwards 1993, Hackett 1993, Bates et al. 1999, Garcia-Moreno et al. 1999, Garcia-Moreno et al. 2004). In many of the tropical examples mentioned above, molecular/genetic variation has coincided with phenotypic variation (e.g. Common-bush Tanager/*Chlorospingus ophthalmicus*, Garcia-Moreno et al. 2004). In contrast, there are cases such as the Orchard Oriole group (*Icterus spurius* vs. *Icterus fuertesi*, Baker et al. 2003), where morphology shows differences without fixed differences in mtDNA. In addition, there are species that do not show substantial morphological variation and yet show deep molecular splits (e.g.

Carolina Chickadee/*Poecile carolinensis*, Gill et al. 1999, Common Raven/*Corvus corax*, Omland et al. 2000).

Because mtDNA generally has a faster mutation rate and a more rapid sorting rate than nuclear genes, the probability that mitochondrial DNA reflects the evolutionary history of a species is generally higher (Avice 1987, Moore 1995, Avice 2000). Since mtDNA is maternally inherited, we can trace female gene flow, founder events, and population bottlenecks among other events (Moritz et al. 1987). Mitochondrial DNA sequences data are very useful for examining population history and species limits in birds. In particular, the control region of the mitochondrial genome is known for being the most variable portion, specifically for passerine birds (Baker and Marshall 1997, Marshall and Baker 1997).

A well known example of geographic variation among Mexican birds is the Streak-backed Oriole complex (*Icterus pustulatus*). This polytypic species has an extensive range from Sonora in northwest Mexico along the Pacific Coast, South to Costa Rica, as well as an insular population on the Tres Marias Islands (Friedman et al. 1950, Howell and Webb 1995, AOU 1998, Jaramillo and Burke 1999). Despite its generally continuous distribution, the populations show differences in plumage coloration patterns and in morphometric traits. Northern populations (race *microstictus*) are winter migrants and are sexually dichromatic. Males are bright orange with reddish-orange head, small black streaks on the back and black wings with white edges; females are similar to males in pattern, but much duller with back nape and olive-green crown (Jaramillo and Burke 1999). Southern populations (El Salvador to Costa Rica, race *sclateri*) are non migrants and monochromatic (sexes alike both sexes elaborate). In addition, in specimens from Guatemala to Honduras (race *alticola*) the streaks are so much wider that their backs are almost completely black (Miller and Griscom 1925). Finally, males from the Tres Marias Islands (race *graysonii*) tend to be yellow orange usually lacking the streaks on the back (or have a few streaks on the scapulars), while females are similar but with a more olive coloration (Howell and Webb 1995, Jaramillo and Burke 1999).

This plumage variation may be generally clinal, where specimens show blacker coloration on their backs and females become more male like as you go farther south in the range (Howell and Webb 1995). Some measures reported by Jaramillo and Burke

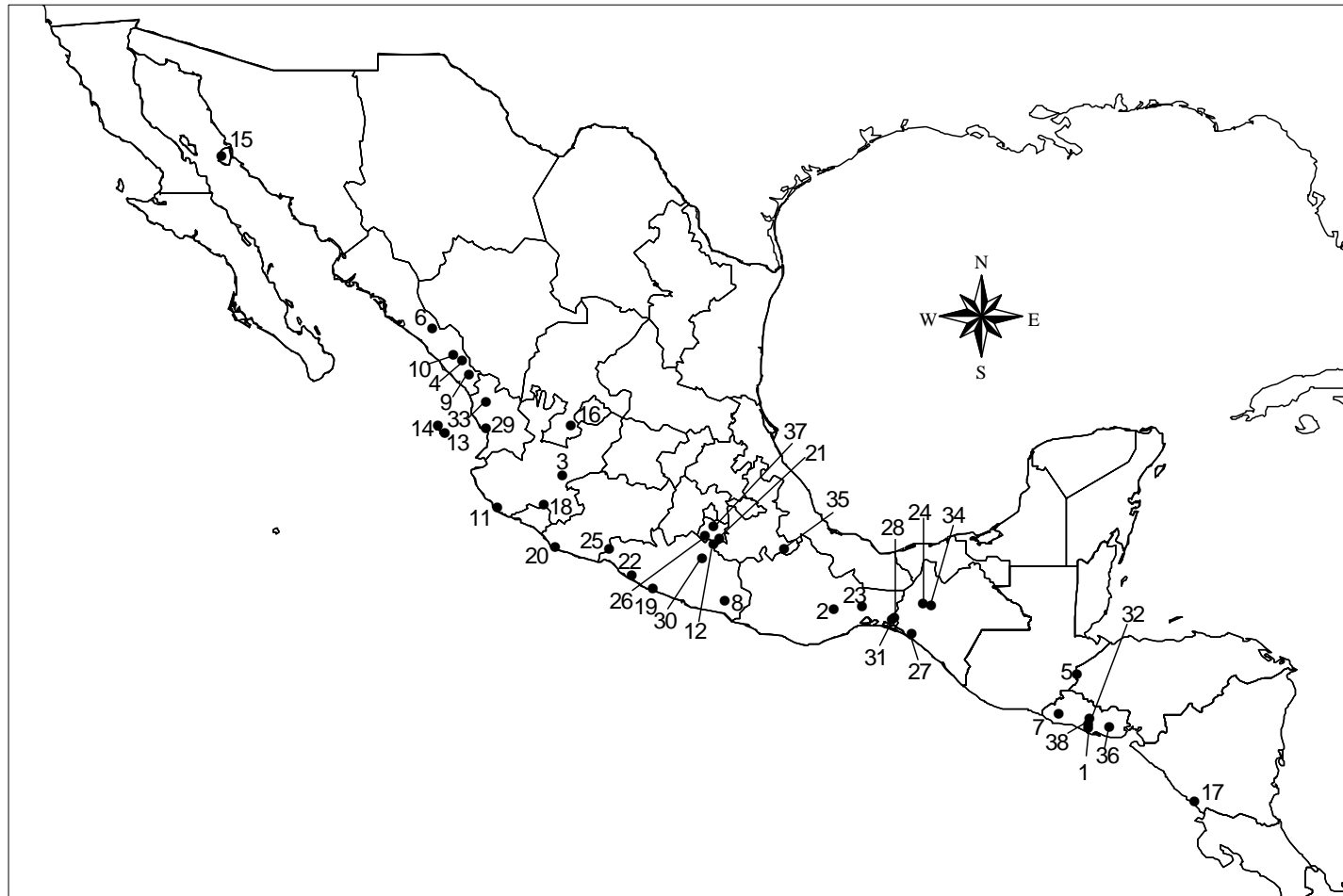
(1999) also suggest a clinal trend in size measurements: southernmost specimens (*sclateri* and *alticola*) show larger wing measures on average (although no rigorous morphometric analysis has been conducted). Specimens from the Tres Marias Islands are not substantially bigger; however these populations show the largest average culmen measure.

Given all this geographic variation many authors (Table 1) have proposed that the Streak-backed Oriole is a superspecies composed of several groups or distinct species. Howell and Webb (1995) proposed four groups: *microstictus* (breeds from Sonora to Jalisco in Mexico), *graysonii* (Tres Marias Islands), *pustulatus* (Jalisco in Mexico to Honduras, includes *formosus*) and *alticola* (interior valleys of Central America). Later, Jaramillo and Burke (1999) proposed three groups: *pustulatus* (from Sonora to N Oaxaca in Mexico), *graysonii* (Tres Marias Islands) and *sclateri* (S Oaxaca and Chiapas in Mexico to Costa Rica). Recently, Navarro and Peterson (2004) proposed full species status for same groups as Jaramillo and Burke (1999); however, the boundaries are different: *pustulatus* (Sonora to Chiapas in Mexico), *sclateri* (Chiapas in Mexico to Honduras) and *graysonii* (Tres Marias Islands). It is important to mention that also the AOU (1998) agrees on the recognition of the same three groups proposed by Jaramillo and Burke (1999); however, again the proposed boundaries between them are slightly different.

It is important to emphasize that even though these morphological proposals agree on the probable existence of more than one species within *Icterus pustulatus*, the boundaries between them are not clear. Also, no formal morphological nor molecular study has been conducted, hence, the importance of our research. In this study, we set out to accomplish several goals: 1) determine if the degree of genetic variation between the Streak-backed Oriole populations corresponds to the degree of morphological variation, 2) evaluate whether the recognition of multiple species would be supported by mtDNA, and 3) report the overall patterns of genetic variation within and among populations of the Streak-baked Oriole complex. These results will give important insights into the evolutionary history and taxonomic status of this interesting temperate/tropical bird.

**TABLE 1.** History of taxonomical proposals for the *Icterus pustulatus* complex  
 (\*) Three major proposals for species limits that we tested using mtDNA AMOVA.

<b>Author and Year</b>	<b>Main conclusions</b>
<b>Wagler (1829)</b>	Describes the Streak-backed Oriole ( <i>Icterus pustulatus</i> )
<b>Cassin (1867)</b>	Description of <i>I. sclateri</i> and <i>Icterus graysonii</i> (Tres Mariás Islands)
<b>Lawrence (1872)</b>	Describes <i>Icterus formosus</i>
<b>Ridgway (1911)</b>	Recognizes several species of <i>Icterus</i> particularly <i>Icterus pustulatus</i> , <i>Icterus sclateri</i> and <i>Icterus graysonii</i> . Proposes that the specimens from Nicaragua which are smaller than the other specimens should be treated as <i>I. s. formosus</i> .
<b>Van Rossem (1927)</b>	Proposes <i>I. sclateri</i> and <i>I. pustulatus</i> as conspecific
<b>Peters (1945)</b>	<i>I. p. microstictus</i> from Sonora and Chihuahua to Jalisco and Guerrero <i>I. p. graysonii</i> from Tres Mariás Islands (México) <i>I. p. pustulatus</i> from Colima to Guatemala <i>I. p. formosus</i> from southeast Mexico to northern Guatemala <i>I. p. alticola</i> on the Atlantic slope of Guatemala <i>I. p. sclateri</i> from Guatemala to Nicaragua
<b>Friedman et al (1950)</b>	Recognizes <i>I. p. microstictus</i> , <i>I. p. graysonii</i> , <i>I. p. pustulatus</i> and <i>I. p. formosus</i> (southern Mexico and northwestern Guatemala)
<b>* Howell and Webb (1995)</b>	Recognizes four groups: <i>microstictus</i> (breeds from Sonora to Jalisco) <i>graysonii</i> (Tres Mariás Islands) <i>pustulatus</i> (breeds from Jalisco to Honduras including <i>formosus</i> ) <i>alticola</i> (breeds in Costa Rica valley)
<b>Phillips (1995)</b>	Propose three new forms: <i>I. p. yaegeri</i> (southern Sinaloa to southern Nayarit) <i>I. p. dickermani</i> (southwestern Jalisco to southern Guerrero) and <i>I. p. interior</i> (central-south Mexico)
<b>AOU (1998)</b>	Recognizes three groups: <i>pustulatus</i> , <i>graysonii</i> and <i>sclateri</i>
<b>* Jaramillo and Burke (1999)</b>	Proposes three groups: <i>pustulatus</i> (From Sonora to north Oaxaca) <i>graysonii</i> (From Tres Marias Islands) <i>sclateri</i> (From north Oaxaca to Costa Rica)
<b>* Navarro and Peterson (2004)</b>	Recognizes three distinct species: <i>I. sclateri</i> (includes <i>Icterus sclateri formosus</i> ) from Chiapas to Honduras <i>I. pustulatus</i> (includes <i>I. p. microstictus</i> ) from Western Mexico from Sonora to Chiapas. <i>I. graysonii</i> in Tres Marias Islands (Mexico)



**Figure 1** Localities sampled throughout *Icterus pustulatus*'s distributional range, 1. Cantón Ánimas Abajo, El Salvador; 2. Cerro Piedra Larga, Oaxaca; 3. Chapala, Jalisco; 4. Copala, Sinaloa; 5. Copán, Honduras; 6. Cosalá, Sinaloa; 7. Cruz Grande, El Salvador; 8. El Carmen, Guerrero; 9. El Limón, Sinaloa; 10. El Magistral, Sinaloa; 11. Emiliano Zapata, Jalisco; 12. Huautla, Morelos; 13. I. Madre, Nayarit; 14. I. María Magdalena, Nayarit; 15. I. Tiburón, Sonora; 16. Jalpa, Zacatecas; 17. La Flor, Nicaragua; 18. Laguna la María, Colima; 19. Laguna Nuxco, Guerrero; 20. Las Haciendas, Michoacán; 21. Limón, Morelos; 22. Los Cirilos, Guerrero; 23. Nizanda, Oaxaca; 24. Ocozucuatla, Chiapas; 25. Presa Infiernillo, Michoacán; 26. Puente de Ixtla, Morelos; 27. Rancho Bellavista, Oaxaca; 28. Rancho las Minas, Oaxaca; 29. San Blas, Nayarit; 30. San Miguel Tecuicapan, Guerrero; 31. San Pedro Tapanatepec, Oaxaca; 32. San Vicente, El Salvador; 33. Tierra Generosa, Nayarit; 34. Tuxtla Gutierrez, Chiapas; 35. Venta Salada, Puebla; 36. Volcán San Miguel, El Salvador; 37. Yautepec, Morelos; 38. Zacatecoluca, El Salvador.

## METHODS

### *Laboratory Methods*

We obtained a total of 102 samples of tissue (muscle, heart, liver) from individuals of the Streak-backed Oriole complex collected from across the species' range (38 localities shown in Figure 1). We used *Icterus bullockii* and *Icterus galbula* as outgroups (Omland et al. 1999, Allen and Omland 2003). DNA was extracted from tissue samples using the DNeasy extraction Tissue Kit (Quiagen). We amplified mitochondrial control region (CR-Domain I) using two primers spanning 344 bp: LGI2 (CGCCACATCAGACAGTCCAT) and H417 (CTCACGAGAACCGAGCTACT; Tarr 1995). A typical control region amplification involved an initial cycle (4 min 95°C, 1 min 50°C, 45 seg 72°C) followed by 35 cycles (1 min 95°C, 1 min 50°C, 45 seg 72°C) and a final elongation step of 72°C. PCR was carried out on the Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) and products were verified on a 1% agarose gel additioned with ethidium bromide and cleaned using QIAquick kits (Qiagen). We sequenced these products using ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing on the Gene Amp PCR system 2400 (Applied Biosystems). Excess dye terminators were removed by the EDTA/ethanol precipitation protocol recommended by ABI, and sequences were run out on an ABI 3100 automated sequencer.

### *Phylogenetic analysis*

Once we obtained the sequences, we edited and aligned them using Sequencher 4.1 (Genecodes Corporation, Ann Arbor, Michigan). Maximum parsimony (MP) trees were constructed for the control region sequences using heuristic searches PAUP\* (version 4.0b8, Swofford 1999). We conducted 1000 bootstrap pseudoreplicates to determine support values for various nodes on the phylogenies. We tested for the nucleotide substitution model that best fitted our data using Modeltest 3.7 (Posada and Crandall 2005). We then performed maximum likelihood (ML) analysis in PAUP\* with a heuristic search of 1000 random additions. We also constructed a haplotype network using Network 4.1.1.2 (Bandelt et al., 1999; fluxus-engineering.com, MJ algorithm).



### *Population genetics analysis*

We performed an analysis of molecular variance (AMOVA) to test which of the three major taxonomic proposals fit best with mtDNA. These proposals highlighted on table 1 with an asterisk (Howell and Webb, Jaramillo and Burke, and Navarro and Peterson). Also we conducted an additional AMOVA separating the northern populations into two groups: individuals from the Tres Marias Islands (*graysonii* group) versus individuals from the mainland (*microstictus* and *pustulatus* groups). Significance values for these AMOVA took into account the number of mutations between haplotypes ( $\Phi$ -statistics) and were performed with 1000 permutations.

We used mismatch distributions to determine whether the Streak-backed Oriole complex is in mutational-drift equilibrium or under recent demographic expansion. We computed this analysis for the whole species complex and then for each population group that showed haplotypic variation. These analyses were performed in Arlequin v3.01 (Excoffier et al. 2006).

## RESULTS

### 1. Sequence data

We obtained 344 base pairs for the control region: only 13 of these sites were variable (3.77%) and 8 were parsimony informative (2.32%). We found a total of 16 haplotypes. The most common haplotype (A1) was found predominantly in the southern populations (15 populations from Guerrero, Morelos, Oaxaca, Chiapas, El Salvador and Honduras). The second most common haplotype (B1) was generally found in northern populations (Sonora, Sinaloa, Zacatecas, Nayarit, Jalisco, Michoacan, Colima, Puebla and Oaxaca). Haplotypes from the south did not share haplotypes with the north; however, a single B1 haplotype was found in Oaxaca (Rancho las Minas). Haplotype diversity was greatest in central Mexico, especially in the in states of Morelos, Puebla, Oaxaca, Guerrero, Michoacan and Jalisco. Haplotype C1 generally was restricted to central Mexico, except for a single individual from Nicaragua. Individuals from Tres Marias Islands all shared one unique haplotype (B4); there were no haplotypes shared between these islands and the mainland. Differences between haplotypes were low, with only one base change in genera (except for haplotype A2, from Guerrero, which was two base pairs different from its closest haplotype). Haplotype distribution can be observed in Figure 3.

Nucleotide diversity ( $\pi$ ) for the whole species was  $0.0041 \pm 0.0028$  while haplotype diversity ( $h$ ) was  $0.80 \pm 0.02$  with a pairwise differences average between sequences of  $1.43 \pm 0.88\%$ . This was also calculated for each population: however, only 12 showed variation among individuals as shown in Table 3.

Due to the low variation found between many of the localities, we grouped them into populations by state to have a better idea of their variation. The population average pairwise differences are shown in table 4 gives an idea that even though populations were grouped in states, there is still low variation between them. The highest average of pairwise difference value was 3.42 between populations from Tres Marias (MAR) and Morelos (MOR). On the other hand the average number of pairwise differences within populations was extremely low. Michoacan (MIC) showed the greatest number of haplotypes.

TABLE 2. mtDNA haplotypes and sampling sites.

<i>Haplotype</i>	<i>No. of individuals</i>	<i>Sampled locality, state, and number of samples</i>
A1	34	Rancho Bellavista (3), Tuxtla Gutierrez (2), Ocozocautla (2) CHIAPAS; El Carmen (3) GUERRERO; San Pedro Tepanatepec (3), Nizanda (3), Cerro Piedra Larga (3) OAXACA; Yautepec (1) MORELOS; Cantón Cruz Grande (2), San Vicente (2), Cantón Animas Abajo (2) Volcán de San Miguel (1), Zacatecoluca (2) EL SALVADOR; Copan (5) HONDURAS;
A2	1	Los Cirulos (1) GUERRERO
A3	1	Cerro Piedra Larga (1) OAXACA
B1	29	Isla Tiburón (1) SONORA; Laguna la María (2) COLIMA; Emiliano Zapata (2), Chapala (2) JALISCO; Presa Infiernillo (1), Las Haciendas (1) MICHOACAN; San Blas (4), Tierra Generosa (1) NAYARIT; Rancho Bellavista (1) CHIAPAS; Jalpa (1) ZACATECAS; Venta Salada (1) PUEBLA; Copala (4), EL Magistral (1), Cosala (3), El Limón (4) SINALOA
B2	1	Emiliano Zapata (1) JALISCO
B3	1	Presa Infiernillo (1) MICHOACAN
B4	15	Isla María Magdalena (6), Isla María Madre (2) NAYARIT
B5	2	San Blas (2) NAYARIT
B6	1	Cosala (1) SINALOA
B7	1	Cosala (1) SINALOA
B8	1	El Limon (1) SINALOA
C1	14	San Miguel Tecuiziapan (5) GUERRERO; Laguna Nuxco (1), Presa Infiernillo (2) MICHOACAN; Puente de Ixtla (1), Limon (1) MORELOS; La Flor (1) NICARAGUA; Cerro Piedra Larga (1) OAXACA; Venta Salada (2) PUEBLA
C2	3	San Miguel Tecuiziapan (1) GUERRERO; Huautla (1), Yautepec (1) MORELOS
C3	2	Los Cirulos (1) GUERRERO; Presa Infiernillo (1) MICHOACÁN
C4	2	Limon (2) MORELOS
C5	1	Cerro Piedra Larga (1) OAXACA

TABLE 3. Within population variation: haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) from those localities that showed variation in their haplotypes.

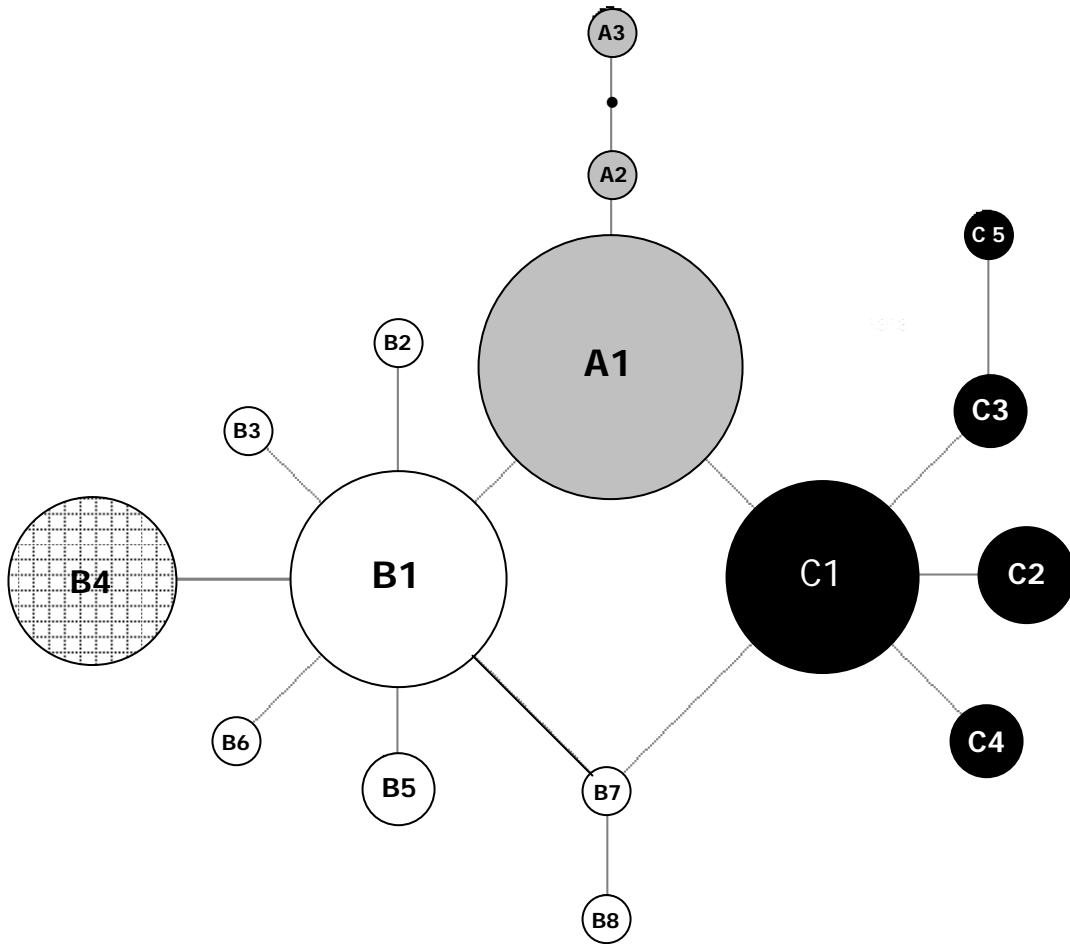
<b>Sampled locality</b>	<b>Haplotype diversity (<math>h</math>)</b>	<b>Nucleotide diversity (<math>\pi</math>)</b>
<b>Cerro Piedra Larga (Oaxaca)</b>	0.800 ± 0.17	0.00445 ± 0.00355
<b>Cosala (Sinaloa)</b>	0.700 ± 0.21	0.00232 ± 0.00231
<b>El Limón (Sinaloa)</b>	0.400 ± 0.23	0.00232 ± 0.00231
<b>Emiliano Zapata (Jalisco)</b>	0.666 ± 0.31	0.00193 ± 0.00241
<b>Infiernillo (Michoacán)</b>	0.900 ± 0.16	0.00639 ± 0.00492
<b>Limón (Morelos)</b>	0.667 ± 0.31	0.00193 ± 0.00241
<b>Los Cirilos (Guerrero)</b>	1.000 ± 0.50	0.00872 ± 0.1007
<b>San Blas (Nayarit)</b>	0.533 ± 0.17	0.00155 ± 0.00170
<b>San Miguel Tecuiziapan (Guerrero)</b>	0.333 ± 0.21	0.00969 ± 0.00127
<b>San Pedro Tapanatepec (Oaxaca)</b>	0.500 ± 0.26	0.00145 ± 0.00180
<b>Venta Salada (Puebla)</b>	0.666 ± 0.31	0.00387 ± 0.00398
<b>Yautepec (Morelos)</b>	1.000 ± 0.50	0.00581 ± 0.00712

## 2. Network and trees

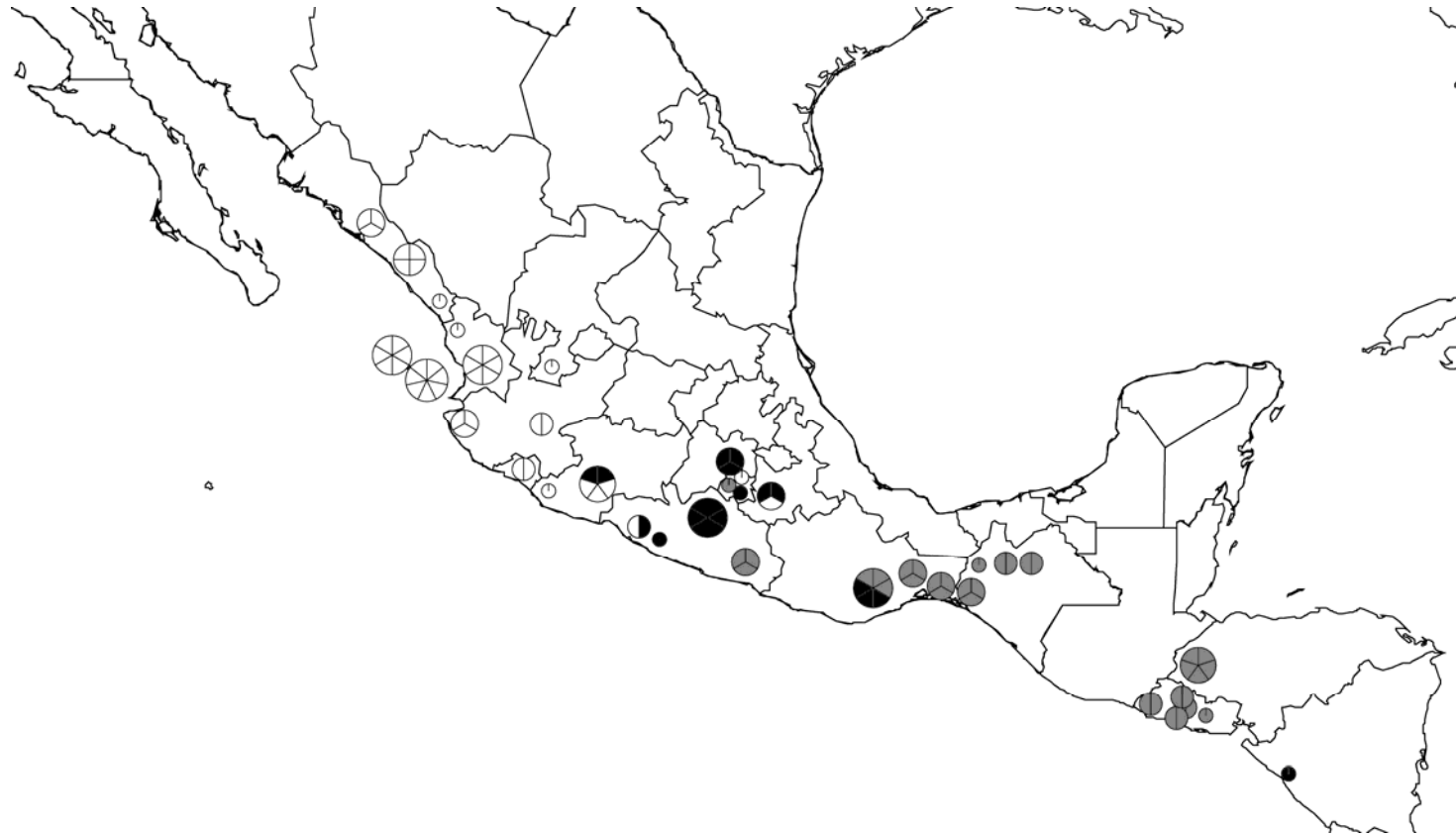
The median joining network computed using Network 4.1.1.1 is shown in Figure 2. Haplotype A1 appears as the most common and is also interconnected to the next most common haplotypes B1 and C1. (Haplotype B7 from Sinaloa appears as an alternative connecting haplotype between B1 and C1). The individuals from the Tres Marias Islands show a unique haplotype-B4; one fixed mutational step separates them and from common North haplotype (B1).

The model of evolution that best fit our data according to the Akaike Information Criterion (AIC) is the HKY + I model with the following parameter values: A = 0.3063, C = 0.3089, G = 0.1625, T = 0.2223, Ti/Tv ratio = 4.5970, I = 0.8127. ML searches produces only one tree (Fig. 4) with a  $-\ln = 679.0287$ . Similar to MP analysis, ML showed the non-monophyly of geographic areas. The Tres Marias Islands appear nested within the same clade as all northern samples.

We obtained 6 most parsimonious trees of 32 steps, with CI = 0.8750, RI = 0.9574 and HI = 0.1250. A majority rule consensus was made for the 6 trees (not shown). We found three major groups; one includes haplotypes from the North, a second group includes haplotypes from the South, while the third and final group comprises haplotypes from the central part of Mexico. This does not support reciprocal monophyly of geographic areas as they are shared between populations. When the bootstrap analysis was conducted, these three groups were not retained as it resulted in a polytomy for most of the individuals from the mainland. Only three groups were supported by bootstrap values. The Tres Marias haplotype was retained in a single clade.



**Figure 2** Haplotypic median joining network as computed in Networks 4.1.1.1. Circle size is proportional for the number of individuals that presented those haplotypes. Text inside the circle is the name of the haplotype. Unsampld haplotype is shown as a solid dot. Note the distinct Tres Marias Islands haplotype, B4.



**Figure 3.** Map showing the distribution of the three major groups of haplotypes found.

TABLE 4. Population Average Pairwise differences.

Above diagonal: Average number of pairwise differences between populations.

Diagonal elements: Average number of pairwise differences within population.

Below diagonal: Corrected average pairwise differences

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	Chiapas	0	1	0	0	1	1.08	1.2	1.33	1.43	1.29	0.46	1	1.2	1	1	2
2	Colima	1	0	1	1	2	2.08	0.2	1.33	2.43	0.29	1.31	1.33	0.2	0	0	1
3	Copan	0	1	0	0	1	1.08	1.2	1.33	1.43	1.29	0.46	1	1.2	1	1	2
4	El Salvador	0	1	0	0	1	1.08	1.2	1.33	1.43	1.29	0.46	1	1.2	1	1	2
5	Nicaragua	1	2	1	1	0	0.75	2.2	1.33	0.71	2.29	1.15	0.67	2	2	2	3
6	Guerrero	0.44	1.44	0.44	0.44	0.11	1.29	2.28	1.69	1.32	2.37	1.33	1.19	2.15	2.08	2.08	3.08
7	Jalisco	1	0	1	1	2	1.44	0.4	1.53	2.63	0.49	1.51	1.53	0.4	0.2	0.2	1.2
8	Michoacán	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.12	0.4	1.87	1.90	1.62	1.56	1.33	1.43	1.33	1.33	2.33
9	Morelos	0.81	1.81	0.81	0.81	0.10	0.06	1.81	0.35	1.24	2.71	1.58	1.29	2.46	2.43	2.43	3.43
10	Nayarit	1.05	0.05	1.05	1.05	2.05	1.49	0.05	0.45	1.86	0.48	1.59	1.62	0.49	0.29	0.29	1.29
11	Oaxaca	0.01	0.86	0.01	0.01	0.71	0.23	0.86	0.18	0.51	0.91	0.90	1.21	1.48	1.31	1.31	2.31
12	Puebla	0.33	0.67	0.33	0.33	0	-0.12	0.67	-0.27	0	0.71	0.09	1.33	1.4	1.33	1.33	2.33
13	Sinaloa	1	0	1	1	1.8	1.31	0	0.3	1.64	0.05	0.83	0.53	0.4	0.2	0.2	1.2
14	Sonora	1	0	1	1	2	1.44	0	0.4	1.81	0.05	0.86	0.67	0	0	0	1
15	Zacatecas	1	0	1	1	2	1.44	0	0.4	1.81	0.05	0.86	0.67	0	0	0	1
16	Tres Marias	2	1	2	2	3	2.44	1	1.4	2.81	1.05	1.86	1.67	1	1	1	0

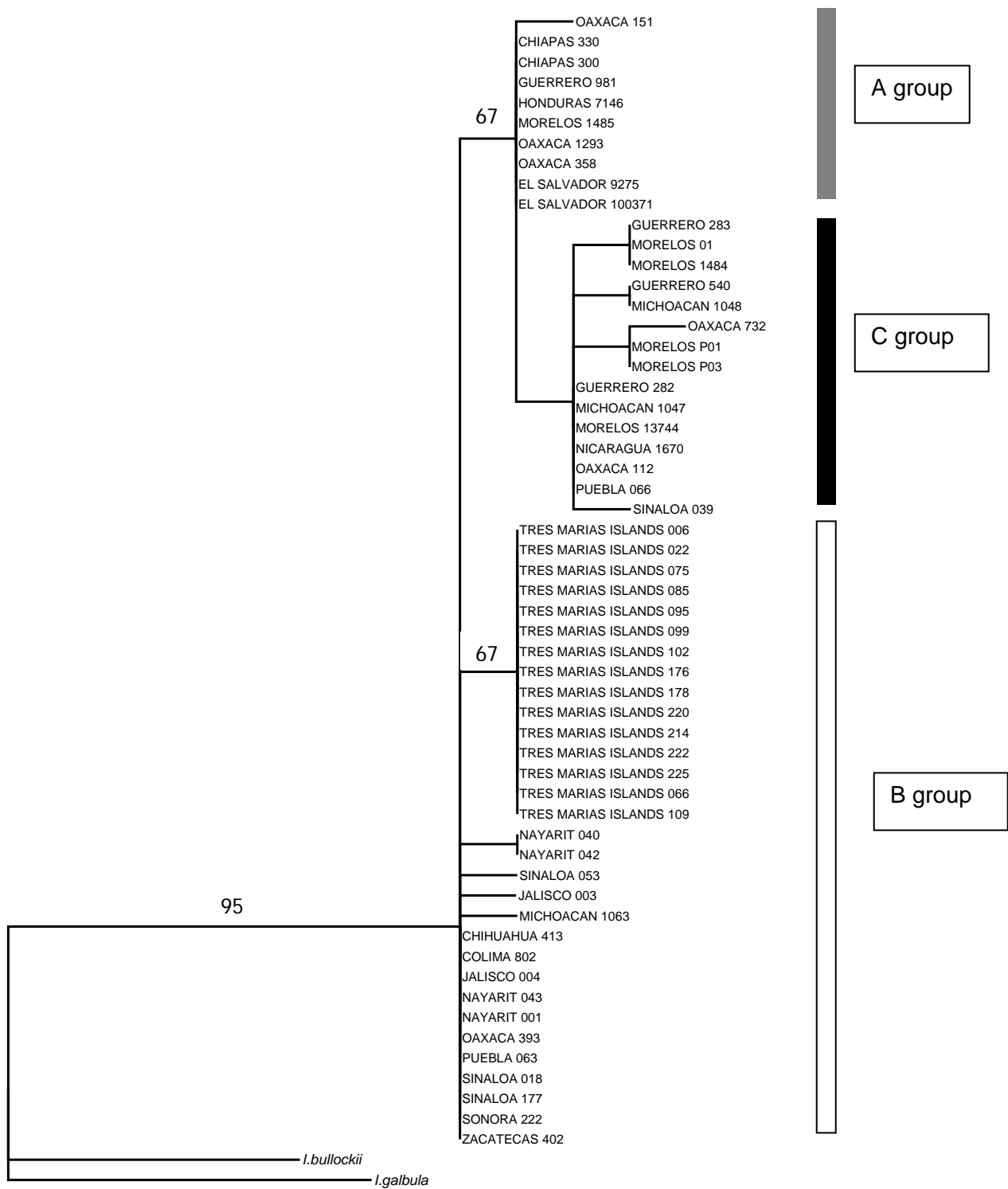


FIG. 4. Maximum-likelihood phylogram of *Icterus pustulatus* showing bootstrap values of Parsimony analysis. None of the haplotypes from South Mexico and Central America appeared within the North clade, however some of the northern clade appear nested into the Central Mexico clade. The mayor difference is that individuals from central Mexico and the south are supported by a clade with 0.003. The southern individuals are basal in this clade.



### 3. Population genetic analysis

We tested the three major taxonomic proposals using AMOVA. The first analysis was performed using Howell and Webb's (1995) where the majority of variation (55%, Table 5) can be accounted by among-group divergence (*microstictus*, *pustulatus*, *graysonii* and *alticola*). The second analysis was according to Jaramillo and Burke's (1999) proposal which partitioned 45% of the variation among groups (Scarlet-headed Oriole, Tres Marias Oriole and Streak-backed Oriole). The final analysis following was Navarro and Peterson (2004), which found only the 42% of the variation was partitioned among groups (*pustulatus*, *sclateri*, *graysonii*). When we conducted a separate analysis comparing northern Mexico to the Tres Marias Islands, we found a high level of genetic differentiation (64 %). The  $\Phi_{ST}$  value was of 0.70 ( $P < 0.0001$ ), even though they have only one fix difference.

Differentiation index ( $F_{ST}$ ) values between populations ranged between zero (negative values) and one in populations where high amounts of gene flow was found, and as a consequence, no genetic differentiation. The highest values observed different from one was between San Miguel Tecuicapan (Guerrero) and Tres Marias Islands with 0.84, but see Table 5. Moreover, considering this high amounts of gene flow, we computed the number of migrants per populations which can be estimated as follows:  $M = \frac{1-F_{ST}}{2F_{ST}}$ . (Slatkin 1991). Many of the populations share more than one individual per generation being an infinite number for many of them. Tres Marias Islands had less than one migrant per generation, with an average of 0.55 migrant and an  $F_{ST} = 0.47$  meaning that even though they share no haplotypes, we can not exclude some low level of gene flow

We computed a mismatch distribution for the whole species complex (Fig. 5). It showed a unimodal distribution consistent with a population that has undergone a sudden demographic expansion (Rogers and Harpending 1992). Values obtained were as follows: Raggedness index = 0.08, P value = 0.130.

**TABLE 5.** Two main AMOVA results for Arlequin v3.01 (Excoffier *et al* 2006).

A) Howell and Webb proposal (1995)

Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	% of variation	<i>P</i> value
Among groups	3	30.6	0.53	55.67	<0.00001
Among populations within groups	34	24.3	0.18	18.75	<0.00001
Within populations	64	15.8	0.24	25.58	<0.00001
Total	101	70.7	0.96		

B) Tres Marias Island vs. Mainland

Source of Variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	% of variation	<i>P</i> value
Among groups	1	9.4	0.49	64.03	<0.005
Among populations within groups	12	4.2	0.04	5.99	<0.00001
Within populations	29	6.6	0.22	29.99	<0.00001
Total	42	20.3	0.76		

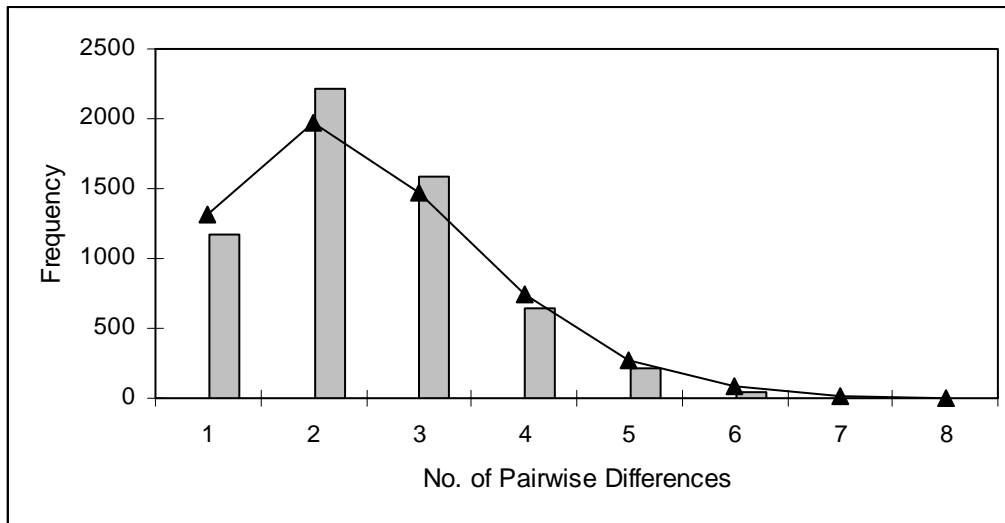


FIG. 5. Mismatch distribution histogram for the whole species complex,  $\tau = 1.277$ ,  $\theta_0 = 0$  and  $\theta_1 = 2239.062$ . This Poisson-like distribution is consistent with a population that has undergone demographic expansion.

## DISCUSSION

### *Genetic variation and species limits*

Low amounts of genetic variability in the control region sequences and the intermixing of haplotypes within the Streak-backed Orioles' (*Icterus pustulatus*) populations suggest a very recent origin. The average species divergence is 0.4131%, while the average of divergence between populations from the islands and the continent is 0.6140%. Similar amounts of divergence have been observed in other species of the genus *Icterus* (Baker et al. 2003, Kondo et al. 2004). Assuming a 3.4% of divergence rate in mitochondrial control region sequences between oriole species (Kondo 2006), we estimate that these two morphologically differentiated groups began to split between 170,000-200,000 years. Compared to its sister species (*Icterus bullockii*, Omland and Lanyon 2000) they might have started diverging 260000-250000 years ago which could be the very rough origin of *Icterus pustulatus*.

Geographic groupings of the Streak-backed Oriole individuals did not show reciprocal monophyly. This is a pattern that has been reported at early stages of speciation in other species of birds (Avice et al. 1990, Baker et al. 2003, Funk and Omland 2003). This mtDNA polyphyly could be as a consequence of incomplete lineage sorting due to insufficient time since separation and/or high amounts of gene flow (Seutin et al. 2003, Baker et al. 2003). This lack of reciprocal monophyletic groups may be because most of the subspecies sampled do not denote evolutionary independent history and are only arbitrary divisions of morphological clines (Avice 1994, Zink et al. 2002). There is no current biological definition of subspecies; however, their names indicate groups for the study of geographic variation (Johnson 1982, McKittrick and Zink 1988). It is likely that the majority of them are neither valid as subspecies, nor as phylogenetic species (McKittrick and Zink 1988).

Several birds phylogenies have presented a non monophyletic relation among its individuals e.g. *Melospiza melodia* (Zink and Dittman 1993), *Passerculus sandwichensis* (Zink et al. 2005), *Corvus corax* (Omland et al. 2006), among others, suggesting many species are going through a speciation process. The general pattern of plumage variation in *Icterus pustulatus* may reflect the environmental heterogeneity of Mexico and Central

America. Omland and Lanyon (2000) reported how rapidly and homoplastic plumage characters evolve in orioles, which could explain the highly diversity of plumage forms found on this species. Many species of birds have shown variation in plumage coloration, in spite of little or no molecular variation (Greenberg et al. 1998, Baker et al. 2003, Zink et al. 2005).

The AMOVA results were consistent with the probable existence of four groups as proposed by Howell and Webb (1995). This proposal showed 55% of variation explained by differentiation among these four groups. However, no discrete break exists between these groups except for the Tres Marias Island populations. The distribution of haplotypes is consistent with a process of isolation by distance; however, the haplotypes from the B group in the network are interconnected directly with haplotypes from the A group, rather than with those from the center (C group). The observed pattern is a very rare phylogeographic pattern (Type III, Zink 2002) with shallow haplotype trees showing weak geographic structure. This specific pattern usually is due recent population expansion and a lack of isolating barriers (Zink 2002).

#### *Population history*

As mentioned above, the observed geographic distribution of haplotypes can be the result of recent colonization from a less widespread recent common ancestor without sufficient time for geographic differentiation, involving incomplete genetic drift with reasonable amounts of gene flow ( $\Phi_{ST} = 0.67466$ ). However, there is still uncertainty of where was the original range of this ancestor. Mismatch analysis are consistent with a recent range and population expansion, whether the direction of colonization was from the north to the south or vice versa is unknown. There are two most likely hypotheses for the origin of the species that we will discuss below; an origin in Central Mexico or an origin in the North.

1) The ancestor's original distributional range might have been in central Mexico given the high haplotype diversity that region presents (8 of the 13 haplotypes). Some individuals crossed the Isthmus of Tehuantepec moving south while others expanded to the north. Individuals who moved north gaining migratory behavior and perhaps as a consequence, females became duller. This has been observed not only in *Icterus pustulatus* (Dickey and van Rossem 1938), but also in many species of *Icterus* that breed

in the temperate zone of North America (Beecher 1950, Omland and Hoffman 2006). Although this pattern seems like isolation by distance, it is important to notice that none of the southern individuals have haplotypes typical of the north, which could be due to the presence of the Isthmus of Tehuantepec that has been acting as a geographic barrier in many taxa (Baker 1963, Halfter 1987).

2) Many of the different haplotypes (8 haplotypes in total) are more closely related with the most common haplotype found on the north of its distribution. The ancestor's original distributional range could have been in the northern part of Mexico or in the United States, where the distributional range of its sister species is (*Icterus bullockii*, Omland and Lanyon 2000). This northern haplotype might be the ancestor because of haplotype B7 and B8 in MP and ML analysis. Possibly during the Pleistocene they began to move southern Mexico where climate was warmer. In this scenario as they started to loose migration and females may have become brighter. The high diversity of haplotypes in central Mexico might result from the heterogeneous vegetation and geology in that particular region (Ramamoorthy 1988). The existence of the Transvolcanic Belt has been also important since its appearance in the late Pliocene-Pleistocene (Beecher 1950), separating populations from the north and the south although, the history is different than that of the Isthmus of Tehuantepec.

#### *Island populations*

Populations from Tres Marias Islands of the Streak-backed Oriole *Icterus pustulatus graysonii* have long been known for their morphological distinctiveness (Cassin 1867, Ridgway 1911, Howell and Webb 1995, AOU 1998, Jaramillo and Burke 1999, Navarro and Peterson 2004). They are paler than the individuals from the continent, lack most streaks on the back, and seem to differ in some measurements presented by Jaramillo and Burke (1999). This particular pattern of plumage coloration, in which the continental counterpart is brighter than individuals from the Islands has been found in other birds endemic to the Tres Marias Islands such as *Melanotis caerulescens* and *Tyrannus melancholicus* whose are much paler than their continental counterparts (Grant 1965). Individuals from the islands show one fixed nucleotide substitution that separates them from all sampled continental haplotypes. Hence, this suggests that populations from the

islands have been isolated for a long period of time, especially considering the recent origin of this species and its overall low genetic variation.

*I. p. graysonii* differs in multiple characters from the rest of the species, which argues that they could be considered as a distinct unit. There are differences in mtDNA, plumage and perhaps morphometrics and vocalizations. Based on Cracraft's (1983) phylogenetic species concept, or the diagnosable approach, a species can be recognized based on at least one diagnostic character. These differences will be sufficient for establishing this population as *Icterus graysonii*.

Based on plumage coloration and mitochondrial DNA, this insular group could also be considered as a different evolutionary unit. Also, there is a fixed difference between the island and the continent individuals. As a result we recommend that the subspecies known as *I. p. graysonii* should be identified as *I. graysonii* given the differences in plumage, distribution and mitochondrial DNA, which suggests that this species has had an independent evolutionary history of at least 20,000 years. Newly species concepts such as the generally lineage species concept by de Queiroz (1999), where a species is a segment of population level evolutionary lineages are also useful in ranking species names. We should be aware that molecular data might give paraphyletic trees as a result of lineage sorting, thus the non monophyly does not necessarily says there are not different species (Helbig et al 2003).

### *Geographic pattern*

The most interesting result in this study is that even though the distribution of *Icterus pustulatus* is mostly tropical (Northern Mexico to Costa Rica), the geographic pattern and haplotype diversity is similar to that of some temperate species (Ball et al. 1988, Greenberg et al. 1998, Milá et al. 2000, Baker et al. 2003, Kondo et al. 2004). It is important to mention that even though there are migratory populations, these did not bias in the analysis. The highest number of haplotypes was found in the middle of its distribution; however, the northern populations presented greater haplotype diversity (with 8 haplotypes in total). Migratory populations from the north might have developed this behavior as a response to climatic change, changing their life history and genetic plasticity as shown by the many diverse haplotypes found (Bennett and Owen 2002).

The Streak-backed Oriole presents an interesting case study of a species whose distribution across the temperate/tropical boundary shows characteristics of a species from both geographic zones. On one hand, the Streak-backed Oriole has a strong geographically structured plumage variation. On the other, it does not show many genetic differences. It is important to emphasize that even though *Icterus pustulatus* show high amounts of plumage variation across its distributional range, the mitochondrial DNA does not seem to show the same pattern. The low amounts of genetic variation observed suggest this is a recent diverged species complex that is undergoing through slow speciation events. It is important to emphasize that both protein coding genes (ND2 and Cytochrome b) showed no variation at all, supporting the recent speciation in this species. Although the species limits within the species weren't conclusive by means of genetic data, we can propose that the subspecies described earlier may represent only a morphological and mitochondrial DNA cline. The only fixed difference within the Tres Marias Islands populations means that they have been isolated for a long period of time given the low levels of variation for the whole complex. These particular insular populations could be considered as a different phylogenetic unit; however, further morphological and behavioral work should be done in order to elucidate its taxonomic situation. The further understanding of the morphological pattern, in addition to molecular data for this species will be of great importance. Only the inclusion of more characters will contribute to the knowledge of the speciation and lineage diversification of this recent species.

## LITERATURE CITED

- Allen, E. S. and K. E. Omland. 2003. Novel intron phylogeny supports plumage convergence in Orioles (*Icterus*). *The Auk* 120:961-969.
- AOU. 1998. Check-list of North American Birds. AOU, Washington, D.C
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge USA
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Niegel, C. A. Reeb and N. C. Saunders. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Avise, J. C. and D. Walker. 1998. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265:457-463.
- Baker, A. J. and H. D. Marshall. 1997. Mitochondrial Control Region Sequences as Tools for Understanding Evolution. En: Mindell D. P. (ed) *Avian Molecular Evolution and Systematics*. Academic Press, San Diego, p 51-82.
- Baker, J. M., E. Lopez-Medrano, A. G. Navarro-Sigüenza, O. R. Rojas-Soto and K. E. Omland. 2003. Recent speciation in the Orchard Oriole group: Divergence of *Icterus spurius* and *Icterus spurius fuertesi*. *The Auk* 120:848-859.
- Baker, R. H. 1963. Geographical Distribution of Terrestrial Mammals in Middle America. *American Midland Naturalist* 70:208-249.
- Bates, J. M., S. J. Hackett and J. M. Goerck. 1999. High Levels of Mitochondrial DNA Differentiation in two Lineages of Antbirds (*Drymophila* and *Hypocnemis*). *The Auk* 116:1093-1106.
- Beecher, W. J. 1950. Convergent evolution in the American Orioles. *Wilson Bulletin* 62:51-86.
- Bowie, R. C. K., J. Fjelsa, S. Hackett and T. M. Crowe. 2004. Molecular Evolution in space and through time mtDNA phylogeography of the Olive Sunbird (*Nectarina olivacea/obscura*) throughout continental Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33:56-74.
- Burns, K. J., S. J. Hackett and N. K. Klein. 2002. Phylogenetic Relationships and Morphological Diversity in Darwin's Finches and their Relatives. *Evolution* 56:1240-1252.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis *Current Ornithology*, p 159-187.
- deQueiroz, K. 1998. The General Lineage Concept of Species, Species Criteria, and the Process of Speciation. En: Howard D. J. and Berlocher S. H. (eds) *Endless*



- Forms: Species and Speciation      Oxford University Press, New York, p 496.
- Dickey, D. R. and A. J. vanRossem. 1938. The Birds of El Salvador. Field Museum of Natural History
- Edwards, S. V. 1993. Long-Distance Gene Flow in a Cooperative Breeder Detected in Genealogies of Mitochondrial DNA Sequences. *Proceedings: Biological Sciences* 252:177-185.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier, L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA Haplotypes: Application to human Mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Friedman, H., L. Griscom and R. T. Moore. 1950. Distributional Check-list of birds of Mexico. *Pacific Coast Avifauna*
- Funk, D. J. and K. E. Omland. 2003. Species-Level Paraphyly and Polyphyly: Frequency, Causes, and Consequences, with Insights from Animal Mitochondrial DNA. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34:397-423.
- García-Moreno, J., A. G. Navarro-Sigüenza, A. T. Peterson and L. A. Sánchez-González. 2004. Genetic variation coincides with geographic structure in the Common Bush-Tanager (*Chlorospingus ophthalmicus*) complex from Mexico. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33:186-196.
- Grant, P. R. 1965. Plumage and the Evolution of Birds on Islands. *Systematic Zoology* 14:47-52.
- Greenberg, R., P. J. Cordero, S. Droege and R. C. Fleischer. 1998. Morphological Adaptation with no mitochondrial DNA differentiation in the Coastal Plain Swamp Sparrow. *The Auk* 115:706-712.
- Hackett, S. J. 1993. Phylogenetic and Biogeographic Relationships in the Neotropical Genus *Gymnophithys* (Formicariidae). *Wilson Bulletin* 105:301-315.
- Helbig, A. J., A. G. Knox, D. T. Parkin, G. Sangster and M. Collinson. 2002. Guidelines for assigning species rank. *Ibis* 144:518-525.
- Hoekstra, H. E. and T. Price. 2004. Parallel Evolution Is in the Genes. *Science* 303:1779-1781.
- Howell, S. and S. Webb. 1995. A guide to the birds of Mexico. Oxford University Press
- James, F. C. 1983. Environmental Component of Morphological Differentiation in Birds. *Science* 221:184-186.

- Jaramillo, A. and P. Burke. 1999. *New World Blackbirds: The Icterids*. Princeton University Press, New Jersey
- Johnson, N. K. and C. Cicero. 2004. New mtochondrial DNA data affirm the importance of Pleistocene Speciation in North American Birds. *Evolution* 58:1122-1130.
- Kirchman, J. J., L. A. Whittingham and F. H. Sheldon. 2000. Relationships among Cave Swallow Populations (*Petrochelidon fulva*) Determined by Comparisons of Microsatellite and Cytochrome b Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 14:107-121.
- Klicka, J. and R. M. Zink. 1997. The Importance of Recent Ice Ages in Speciation: A Failed Paradigm. *Science* 277:1666-1669.
- Kondo, B., J. M. Baker and K. E. Omland. 2004. Recent speciation between the Baltimore Oriole and the Black-Backed Oriole. *The Condor* 106:674-680.
- Marshall, H. D. and A. J. Baker. 1997. Structural Conservation and Variation in the Mitochondrial Control Region of Fringilline Finches (*Fringilla* spp.) and the Greenfinch (*Carduelis chloris*). *Mol. Biol. Evol.* 14:173-184.
- Milá, B., D. J. Girman, M. Kimura and T. B. Smith. 2000. Genetic evidence for the effect of a postglacial population expansion on the phylogeography of a North American songbird. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267:1033-1040.
- Moritz, C., T. E. Dowling and W. M. Brown. 1987. Evolution of Animal Mitochondrial DNA: Relevance for Population Biology and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 18:269-292.
- Navarro-Sigüenza, A. G. and A. T. Peterson. 2004. An Alternative Species Taxonomy of the Birds of Mexico. *Biota Neotropica* 4:1-32.
- Omland, K. E., J. M. Baker and J. L. Peters. 2006. Genetic signatures of intermediate divergence: population history of Old and New World Holarctic ravens (*Corvus corax*). *Molecular Ecology* 15:795-808.
- Omland, K. E. and S. M. Lanyon. 2000. Reconstructing plumage evolution in Orioles (*Icterus*): Repeated convergence and reversal in patterns. *Evolution* 54:2119-2133.
- Omland, K. E., S. M. Lanyon and 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.
- Omland, K. E., C. L. Tarr, W. I. Boarman, J. M. Marzliff and R. C. Fleischer. 2000. Cryptic Genetic Variation and Paraphyly in Ravens. *Proceedings: Biological Sciences* 267:2472-2482.

- Peters, J. L. 1968. Check-List of Birds of the World. Museum of Comparative Zoology, Massachusetts
- Peterson, A. T. 1992. Phylogeny and Rates of Molecular Evolution in the *Aphelocoma* Jays (Corvidae). *The Auk* 109:133-147.
- Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot and J. Fa (1988) Biological Diversity of México: Origins and Distribution. Oxford University Press, New York
- Ridgway, R. 1911. The birds of North and Middle America. U.S. National Museum Bulletin
- Rogers, A. R. and H. Harpending. 1992. Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Mol. Biol. Evol.* 9:552-569.
- Seutin, G., J. Brawn, R. E. Ricklefs and E. Bermingham. 1993. Genetic Divergence among Populations of a Tropical Passerine, the Streaked Saltator (*Saltator Albicollis*). *The Auk* 110:117-126.
- Swofford, D. L. (1999) PAUP\* Phylogenetic analysis using parsimony, Versión 4.0 Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Zink, R. M. 1991. The Geography of Mitochondrial DNA variation in Two Sympatric Sparrows. *Evolution* 45:329-339.
- Zink, R. M. and D. L. Dittmann. 1993a. Gene flow, refugia and evolution of geographic variation in the Song Sparrow (*Melospiza melodia*). *Evolution* 47:717-729.
- Zink, R. M. and D. L. Dittmann. 1993b. Population Structure and Gene Flow in the Chipping Sparrow and a Hypothesis for Evolution in the Genus *Spizella*. *Wilson Bulletin* 105:399-413.
- Zink, R. M., J. D. Rising, S. Mockford, A. G. Horn, J. M. Wright, M. Leonard and M. C. Westberg. 2005. Mitochondrial DNA variation, species limits, and rapid evolution of plumage coloration and size in the Savannah Sparrow. *The Condor* 107:21-28.

## Appendix 1

### Specimens sequenced in this project, showing locality and country of origin.

No.	Country	State	Locality	Catalog Number
1	El Salvador	Dpto. de la Paz	Cantón Animas Abajo	UK 9274
2	El Salvador	Dpto. de la Paz	Cantón Animas Abajo	UK 9277
3	El Salvador	Dpto. de la Paz	Zacatecoluca	UK 9275
4	El Salvador	Dpto. de la Paz	Zacatecoluca	UK 9524
5	El Salvador	Dpto. El Sonsonate	Cruz Grande	UK 6005
6	El Salvador	Dpto. El Sonsonate	Cruz Grande	UK 6001
7	El Salvador	Dpto. San Miguel	Volcán de San Miguel	Yale100371
8	El Salvador	Dpto. San Vicente	San Vicente	UK 7691
9	El Salvador	Dpto. San Vicente	San Vicente	UK 7693
10	Honduras	Copan	Copan, Ruinas	MBM 7147
11	Honduras	Copan	Copan, Ruinas	MBM 7146
12	Honduras	Copan	Copan, Ruinas	MBM 7737
13	Honduras	Copan	Copan, Ruinas	MBM 7762
14	Honduras	Copan	Copan, Ruinas	MBM 7763
15	México	Chiapas	Ocozocuatla	SRF 300
16	México	Chiapas	Ocozocuatla	SRF 304
17	México	Chiapas	Rancho Bellavista Tonalá	CHIS 330
18	México	Chiapas	Rancho Bellavista Tonalá	CHIS 329
19	México	Chiapas	Rancho Bellavista Tonalá	CHIS 340
20	México	Chiapas	Tuxtla Gutiérrez	KEO 10
21	México	Chiapas	Tuxtla Gutiérrez	KEO 09
22	México	Colima	Laguna la María	Conacyt 804
23	México	Colima	Laguna la María	Conacyt 802
24	México	Guerrero	El Carmen 2km NE	Conacyt 987
25	México	Guerrero	El Carmen 2km NE	Conacyt 997
26	México	Guerrero	El Carmen 2km NE	Conacyt 981
27	México	Guerrero	Laguna Nuxco	Conacyt 898
28	México	Guerrero	Los Cirulos Petatlan	CHIS 540
29	México	Guerrero	Los Cirulos Petatlan	CHIS 535
30	México	Guerrero	San Miguel Tecuiziapan	BAL 294
31	México	Guerrero	San Miguel Tecuiziapan	BAL 283
32	México	Guerrero	San Miguel Tecuiziapan	BAL 282
33	México	Guerrero	San Miguel Tecuiziapan	BAL 275
34	México	Guerrero	San Miguel Tecuiziapan	BAL 291
35	México	Guerrero	San Miguel Tecuiziapan	BAL 338
36	México	Jalisco	Chapala 3km E	KEO 038
37	México	Jalisco	Chapala 3km E	KEO 036
38	México	Jalisco	Emiliano Zapata	JAL 2
39	México	Jalisco	Emiliano Zapata	JAL 3
40	México	Jalisco	Emiliano Zapata	JAL 4
41	México	Michoacán	Las Haciendas	Conacyt 879

<b>No.</b>	<b>Country</b>	<b>State</b>	<b>Locality</b>	<b>Catalog Number</b>
42	México	Michoacán	Presa Infiernillo	Conacyt 1066
43	México	Michoacán	Presa Infiernillo	Conacyt 1048
44	México	Michoacán	Presa Infiernillo	Conacyt 1047
45	México	Michoacán	Presa Infiernillo	Conacyt 1090
46	México	Michoacán	Presa Infiernillo	Conacyt 1063
47	México	Morelos	Huautla	Huau1
48	México	Morelos	Limón	P 01
49	México	Morelos	Limón	P 02
50	México	Morelos	Limón	P 03
51	México	Morelos	Puente de Ixtla	MZFC 13744
52	México	Morelos	Yautepec 1 km. S El Recreo	PEP 1485
53	México	Morelos	Yautepec 1 km. S El Recreo	PEP 1484
54	México	Nayarit	Isla Maria Madre	ITM 176
55	México	Nayarit	Isla Maria Madre	ITM 178
56	México	Nayarit	Isla Maria Madre	ITM 214
57	México	Nayarit	Isla Maria Madre	ITM 220
58	México	Nayarit	Isla Maria Madre	ITM 222
59	México	Nayarit	Isla Maria Madre	ITM 225
60	México	Nayarit	Isla Maria Magdalena	ITM 006
61	México	Nayarit	Isla Maria Magdalena	ITM 022
62	México	Nayarit	Isla Maria Magdalena	ITM 075
63	México	Nayarit	Isla Maria Magdalena	ITM 085
64	México	Nayarit	Isla Maria Magdalena	ITM 095
65	México	Nayarit	Isla Maria Magdalena	ITM 099
66	México	Nayarit	Isla Maria Magdalena	ITM 102
67	México	Nayarit	San Blas	KEO 044
68	México	Nayarit	San Blas	KEO 039
69	México	Nayarit	San Blas	KEO 043
70	México	Nayarit	San Blas	KEO 040
71	México	Nayarit	San Blas	KEO 041
72	México	Nayarit	San Blas	KEO 042
73	México	Nayarit	Tepic	EAG 001
74	México	Oaxaca	Cerro Piedra Larga	OMVP 768
75	México	Oaxaca	Cerro Piedra Larga	OMVP 732
76	México	Oaxaca	Cerro Piedra Larga	Conacyt 04-38
77	México	Oaxaca	Cerro Piedra Larga	Conacyt 04-151
78	México	Oaxaca	Cerro Piedra Larga	Conacyt 04-112
79	México	Oaxaca	Cerro Piedra Larga	Conacyt 04-43
80	México	Oaxaca	Nizanda, Camino al Aguaje	Conacyt 1310
81	México	Oaxaca	Nizanda, Enclave1	Conacyt 1265
82	México	Oaxaca	Nizanda, Enclave1	Conacyt 1293
83	México	Oaxaca	Rancho Las Minas	CHIS 393
84	México	Oaxaca	San Pedro Tepanatepec	SRF 357

<b>No.</b>	<b>Country</b>	<b>State</b>	<b>Locality</b>	<b>Catalog Number</b>
85	México	Oaxaca	San Pedro Tepanatepec	SRF 358
86	México	Oaxaca	San Pedro Tepanatepec	SRF 369
87	México	Puebla	Venta Salada, 6 km. Coaxcatlan	ORRS 63
88	México	Puebla	Venta Salada, 6 km. Coaxcatlan	ORRS 64
89	México	Puebla	Venta Salada, 6 km. Coaxcatlan	ORRS 66
90	México	Sinaloa	Copala	SIN 156
91	México	Sinaloa	Copala	SIN 078
92	México	Sinaloa	Copala	SIN 177
93	México	Sinaloa	Copala	SIN 160
94	México	Sinaloa	Cosalá	EAG 039
95	México	Sinaloa	Cosalá	EAG 053
96	México	Sinaloa	Cosalá	EAG 055
97	México	Sinaloa	El Limón	EAG 018
98	México	Sinaloa	El Limón	EAG 033
99	México	Sinaloa	El Magistral 2km O	SIN 136
100	México	Sonora	Isla Tiburón, El Caracol	Conacyt 222
101	México	Zacatecas	Jalpa	Conacyt 402
102	Nicaragua	Dpto. de Rivas	La Flor	DAB 1670

## CONCLUSION

La calandria dorsirayada (*Icterus pustulatus*) es una especie interesante de reciente aparición aproximadamente hace 260,000 años que presenta gran variedad de morfos debido a la heterogeneidad de su plumaje. Sin embargo, los patrones generales de variación de plumaje en *Icterus pustulatus* podrían reflejar la heterogeneidad ambiental de México y Centro América principalmente debido a presiones ecológicas que no necesariamente tienen que verse reflejadas en las relaciones filogenéticas moleculares. Pudiera decirse que aún cuando exista una gran variedad de formas tanto en el tamaño como en la coloración de los individuos, éstos no necesariamente tendrían que considerarse especies diferentes, especialmente al utilizar marcadores provenientes del DNA mitocondrial, en donde sus ventajas o virtudes, son precisamente las causas de que en muchos estudios se presenten polifilias o parafilias en organismos de parentesco cercano. En lo referente a los individuos de las Islas Tres Marías podría ser elevado al nivel de especie debido no solo a diferencias genéticas fijas, sino a lo diferente de su plumaje y de su conducta.

Así también, el patrón de variación genética que presenta es similar al de muchas especies de regiones templadas aún cuando su área de distribución sea en la zona tropical y templada de México y Centro América. La distribución de los haplotipos pudiera ser el resultado de la colonización reciente de un ancestro común sin el tiempo suficiente para su diferenciación genética-geográfica y con flujo génico que impide la diferenciación de estas poblaciones. Cabe señalar que el patrón encontrado en el que se observa un árbol de haplotipos muy débil pero aún con cierta estructura geográfica es muy raro en aves. Y pudiera deberse debido a aislamiento por distancia. Cabe señalar que la nula variación en el gen Citocromo b también es como resultado de la reciente aparición de esta especie, por lo que sería también interesante el contrastar estos resultados genéticos con los de variación morfológica y/o de plumaje, para tener toda la gama de caracteres en *Icterus pustulatus*.

## LITERATURA CITADA

- AOU. 1998. Check-list of North American Birds. AOU, Washington, D.C
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman and Hall USA
- Avise, J. C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge USA
- Baker, J. M., E. Lopez-Medrano, A. G. Navarro-Sigüenza, O. R. Rojas-Soto y K. E. Omland. 2003. Recent speciation in the Orchard Oriole group: Divergence of *Icterus spurius* and *Icterus spurius fuertesi*. The Auk 120:848-859.
- Beecher, W. J. 1950. Convergent evolution in the American Orioles. Wilson Bulletin 62:51-86.
- Bledsoe, A. H. 1988. Nuclear DNA Evolution and Phylogeny of the New World Nine-Primaried Oscines. The Auk 105:504-515.
- Cassin, J. 1967. A third study on the Icterinae. Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia 19: 45-74.
- Cracraft, J. 1983. Species Concepts and speciation analysis. Curr. Ornithol. 1:159-187
- Crisci, J. 1994 La especie: realidad y conceptos. En: Llorente-Bousquets J.yVega I. L. (eds) Taxonomía Biológica. FCE, México
- Curson, J., D. Quinn y D. Beadle. 1994. New World Warblers. A y C. Blackell, London
- Eguiarte, L., C. M. d. Rio y H. Arita. 1987. El nectar y el polen como recursos: el papel ecológico de los visitantes a las flores de *Pseudobombax ellipticum* (H.B.K.) Dugand. Biotrópica 19:74-82.
- Eldredge, N. y J. Cracraft. 1980. Phylogenetic Patterns and the Evolutionary Process. Columbia University Press, New York
- Espinosa de los Monteros, A y J. Cracraft. 1997. Intergeneric relationship of the New World Jays inferred from cytochrome b gene sequences. Condor 99:490-502
- Freeman, S. y R. M. Zink. 1995. A phylogenetic study of the blackbirds based on variation in mitochondrial DNA restriction sites. Systematic Biology 44:409-420.
- Friedman, H., L. Griscom y R. T. Moore. 1950. Distributional Check-list of birds of Mexico. Pacific Coast Avifauna
- García-Deras, G. (2003) Límites de especies dentro del complejo *Cyananthus latirostris* (Aves:Trochilidae) Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, p 59.
- Griscom, L. 1930. Studies from the Dwight collection of Guatemala birds. III. Am. Mus. Novit. 438.
- Griscom, L. 1934. The ornithology of Guerrero, Mexico. Bull. Mus. Comp. Zool. 75:402-409.
- Hennig, W. 1966. Phylogenetic Systematics. Urbana. University of Illinois Press
- Howell, S. y S. Webb. 1995. A guide to the birds of Mexico. Oxford University Press



- Ibáñez-Hernández, P. G. (2000) Variación geográfica de las poblaciones del Turco Real (*Momotus momota*), Momotidae, Aves Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México
- Jaramillo, A. y P. Burke. 1999. New World Blackbirds: The Icterids. Princeton University Press, New Jersey
- Kirchman, J. J., L. A. Whittingham y F. H. Sheldon. 2000. Relationships among Cave Swallow Populations (*Petrochelidon fulva*) Determined by Comparisons of Microsatellite and Cytochrome b Data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* Vol. 14:107-121.
- Kondo, B., J. M. Baker y K. E. Omland. 2004. Recent speciation between the Baltimore Oriole and the Black-Backed Oriole. *The Condor* 106:674-680.
- Miller, W. deW y L. Griscom, 1925. Descriptions of new birds from Nicaragua. *Amer. Mus. Novit.* 159:1-9.
- Mishler, B. D. y M. J. Donohue. 1982. Species concepts: A case for pluralism. *Syst. Zool.* 31:491-503
- Moore, W. S. 1995. Inferring Phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-Gene Trees versus Nuclear-Gene Trees. *Evolution* 49:718-726.
- Moore, W. S. 1997. Mitochondrial-Gene Trees versus Nuclear-Gene Trees, a reply to Hoelzer. *Evolution* 51:627-629.
- Navarro-Sigüenza, A. G. y A. T. Peterson. 2004. An Alternative Species Taxonomy of the Birds of Mexico. *Biota Neotropica* 4:1-32.
- Nelson, G. y N. Platnick. 1981. Systematics and Biogeography. Cladistics and Vicariance. Columbia University Press, New York
- Omland, K. E. y S. M. Lanyon. 2000. Reconstructing plumage evolution in Orioles (*Icterus*): Repeated convergence and reversal in patterns. *Evolution* 54:2119-2133.
- 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.
- Peterson, A. T. 1992. Phylogeny and Rates of Molecular Evolution in the *Aphelocoma* Jays (Corvidae). *The Auk* 109:133-147.
- Peterson, A. T. 1998. New species and new species limits in birds. *The Auk* 115:555-558.
- Phillips, A. R. 1995. The Northern races of *Icterus pustulatus* (Icteridae), Scarlet-headed or Streaked-backed Oriole. *Bull. B. O. C.* 115:98-105.
- Rojas-Soto, O. R. (1998) Variación geográfica de las poblaciones de *Toxostoma curvirostre* (Mimidae) de las zonas áridas de Norteamérica Facultad de Ciencias. UNAM
- Sánchez-González, L. A. (2002) Variación geográfica y límites de especies en las poblaciones de *Chlorospingus ophthalmicus* (Aves:Thraupidae) de mesoamérica Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México
- Sibley, C. G. y J. E. Ahlquist. 1990. Phylogeny and Classification of birds: a study in molecular evolution. Yale University Press
- Zink, R. M. y D. L. Dittman. 1991. Evolution of Brown Towhees: Mitochondrial DNA Evidence. *The Condor* 93:98-105.

**Apéndice 2.** Secuencias de los 15 haplotipos observados dentro del complejo *Icterus pustulatus* de un total de 102 individuos secuenciados para el primer dominio de la Región Control, 344 pares de bases. Se incluyen también las secuencias de *I. bullockii* e *I. galbula* utilizados como grupos externos.

```

A1      GAAATGTAGAATAATCCAAGCTATACGTAATGCTCTTCCATTAAGAACCCAAACATTATCTCCAAAACGGACCTCATTTCGGCCATAGTCCCCACCAGGAA
A2      .....
A3      .....T.....C.....
A4      .....
A5      .....T.....
A6      .....
A7      .....G.....T.....
A8      .....
A9      .....
A10     .....G.....T.....
A11     .....NN.....
A12     .....
A13     .....T.....
A14     .....A.....
A15     .....T.....
I.bullockii ..G.....G.....CAT..C.....TC.....C.....C.....
I.galbula  ....G.....CAT..C.....TC.T.....

A1      CATCCTTGTTTCAGGTACCATACAGCCCAGATCTTCCTACCCAAGGCCAAGCCGCAAGCGTCACCCAGAGACCCAGGAACCTTATCAGCTATACACAACAC
A2      ...T.....
A3      .....
A4      .....A.....A.....T.....
A5      .....A.....
A6      ...T...C.....
A7      .....
A8      ...T.....
A9      .....A.....
A10     .....G.....
A11     ...T.....
A12     ...T.....
A13     .....
A14     ...T.....
A15     ...T.....
I.bullockii ..T.....T.....
I.galbula  ...T.....G.....A.....A.....

```

```

A1      CCAACCTAGTGAACGAGGAATGTCCAGCACACCTTTGAATTCCCCTAGTCTACTGAATTCGCCCACCTCCTAGGTAATATTCTCGGTCAACAGCCTTCA
A2      .....
A3      .....
A4      .....
A5      .....
A6      .....
A7      .....
A8      .....
A9      .....
A10     .....
A11     .....
A12     .....
A13     .....
A14     .....
A15     .....
I.bullockii .....
I.galbula .....

```

```

A1      AGAACACCCAAGCCAGAGAGCATGGTTATCTATTGATCGCGCTT
A2      .....
A3      .....
A4      .....
A5      .....
A6      .....
A7      .....
A8      .....G.....
A9      .....
A10     .....
A11     .....A.....
A12     .....T.....
A13     .....
A14     .....
A15     .....
I.bullockii .....
I.galbula .....
;

```