



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Evaluación del estado taxonómico del
Semillero de Tumaco *Sporophila insulata*
(Fringillidae: Emberizinae)
utilizando métodos morfológicos y genéticos.**

Juan Carlos De Las Casas Serrano

Trabajo de Grado presentado como requisito
para optar el título de Biólogo.

Luis Fernando García. Ph.D.
Departamento de Biología
Universidad Nacional de Colombia
Director

Frank Gary Stiles. Ph.D.
Instituto de Ciencias Naturales
Universidad Nacional de Colombia
Co-Director



Bogotá, D.C., Colombia.
2004

© Se sugiere citar la tesis de la siguiente manera:

De Las Casas, J. C. 2004. Evaluación del estado taxonómico del Semillero de Tumaco *Sporophila insulata* (Fringillidae: Emberizinae) utilizando métodos morfológicos y genéticos. Tesis de pregrado. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Portada y contraportada:

Sporophila insulata. El Morro. Individuo N° 11. Anillo ibr.

Fotografías:

© Juan Carlos De Las Casas S.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 5 |
| ABSTRACT..... | 5 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 1.1. Aspectos Ecológicos..... | 6 |
| 1.2. Estado de Conservación..... | 6 |
| 1.3. Estado Taxonómico..... | 7 |
| 1.4. Descripción de los Taxones Estudiados..... | 8 |
| 1.5. Distribución de los Taxones Estudiados..... | 8 |
| 1.6. Herramientas Taxonómicas..... | 9 |
| 2. OBJETIVOS..... | 11 |
| 2.1. Objetivo General | |
| 2.2. Objetivos Específicos | |
| 3. MÉTODOS..... | 12 |
| 3.1. Localidades del Estudio..... | 12 |
| 3.2. Fase de Campo..... | 12 |
| 3.3. Fase de Laboratorio..... | 14 |
| 3.4. Análisis..... | 16 |
| 4. RESULTADOS..... | 18 |
| 4.1. Individuos Capturados..... | 18 |
| 4.2. Análisis Genético..... | 19 |
| 4.3. Análisis Morfométrico..... | 27 |
| 4.4. Análisis de Coloración del Plumaje..... | 31 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 36 |
| 5.1. Análisis Filogenético..... | 36 |
| 5.2. Análisis Morfométrico..... | 37 |
| 5.3. Análisis de Coloración del Plumaje..... | 37 |
| 5.4. Factores de Hibridación..... | 38 |
| 5.5. Observaciones Ecológicas..... | 39 |
| 5.5. Conservación..... | 39 |
| 6. CONCLUSIONES..... | 41 |
| 7. REFERENCIAS..... | 42 |
| 8. AGRADECIMIENTOS..... | 45 |
| 9. ANEXOS..... | 46 |
| ANEXO 1-10. Protocolos Métodos de Laboratorio | |
| ANEXO 11. Secuencia Sitios Variables Informativos Citocromo b | |
| ANEXO 12. Secuencia Sitios Variables Informativos Región Control | |
| ANEXO 13. Matriz de Distancia Citocromo b | |
| ANEXO 14. Matriz de Distancia Región Control | |
| ANEXO 15. Datos de Individuos Capturados y Medidos en la Colección | |

RESUMEN

El Semillero de Tumaco *Sporophila insulata* es un taxón endémico del sur-occidente de Colombia, se encuentra catalogado en estado crítico de extinción, pero así mismo es un taxón cuya validez taxonómica es incierta. Se ha planteado que *insulata* corresponde a la hibridación del Semillero Pechiblanco *Sporophila telasco* con el Semillero Ladrillo *Sporophila minuta*; también se ha propuesto que corresponde a una variación fenotípica de *telasco*; y por otro lado se cree que *insulata* es un taxón válido con la existencia de hibridación *insulata* x *telasco*. El objetivo de este trabajo es evaluar la validez taxonómica de *insulata*. Para resolver el problema, se utilizaron herramientas moleculares y morfológicas incluyendo patrones de coloración de las partes inferiores y la rabadilla. Fueron secuenciados para 12 machos *insulata*, 7 *telasco* y 6 *minuta* dos genes mitocondriales, citocromo b (922 pb) y la región control (1104-1107 pb). Los árboles filogenéticos de neighbor-joining y parsimonia revelaron que *insulata* se agrupa con *telasco*. Lo que indica que *insulata* no es un taxón válido. Sin embargo, este resultado dejó abierto el problema taxonómico de hibridación o una variación fenotípica. Por otra parte los individuos capturados en El Naranjo no correspondieron a *insulata* como se habían determinado inicialmente en expediciones pasadas, sino a *minuta* y posiblemente a una nueva subespecie no descrita. Aunque el análisis morfométrico no aclaró ninguna hipótesis restante, el análisis del patrón y nivel de coloración rojiza de las partes inferiores y de la rabadilla, y la variabilidad antes no reportada en el tamaño de la banda rojiza de la rabadilla en individuos *insulata*, complementan los resultados moleculares, y en conjunto sugieren que *insulata* corresponde a híbridos entre hembras *telasco* x machos *minuta*.

Palabras clave: Colombia, críticamente amenazada, Emberizinae, endémica, evaluación taxonómica, Semillero de Tumaco, *Sporophila insulata*.

ABSTRACT

The Tumaco Seedeater *Sporophila insulata* is an endemic taxon from southwestern Colombia, is critically endangered, and its taxonomic status is uncertain. It is proposed that *insulata* corresponds to hybrids between the Chestnut-throated Seedeater *S. telasco* and the Ruddy-breasted *S. minuta*; also it is proposed that *insulata* corresponds to a phenotypic variation of *telasco*; on the other hand it is believed that it corresponds to a valid taxon, and possibly there are hybrids *insulata* x *telasco*. The objective of this work is to evaluate the taxonomic status of *insulata*. To resolve this problem, it was used molecular and morphological data, this last included coloration analysis of the "reddish" underparts and rump. It was sequenced the mitochondrial genes cytochrome b (922bp) and the control region (1104-1107 bp) of 12 males *insulata*, 7 *telasco* and 6 *minuta*. The phylogenetic trees of neighbor-joining and parsimony revealed that *insulata* is grouped with *telasco*. Which means that *insulata* is not a valid taxon. However, this result left open the taxonomic problem of hybridization or phenotypic variation. On the other hand, the captured individuals from Naranjo does not corresponds to *insulata* as were initially determined in a expedition to the area, it corresponds to *minuta* and possibly to a new undescribed subspecies. Although the morphometric analysis does not permits to confirm any hypothesis; the coloration analysis and the variability in the reddish band size in the rump of *insulata*, complement the molecular data, and altogether suggest that *insulata* corresponds to hybrids between males *telasco* x males *minuta*.

Key words: Colombia, critically endangered, Emberizinae, endemic, taxonomic status, Tumaco Seedeater, *Sporophila insulata*.

1. INTRODUCCIÓN

El Semillero de Tumaco (*Sporophila insulata*), es un taxón cuya validez taxonómica es aún incierta. Es endémico de Colombia y está considerado en estado crítico de extinción. El semillero fue descubierto entre el 26 y 30 de julio de 1912 por W. B. Richardson, en la isla de Tumaco (1°49'N 78°46'W), Departamento de Nariño. Cuatro especímenes fueron colectados, depositados en el Museo de Historia Natural de New York, y descritos por Chapman (Chapman 1921, BirdLife International 1992). Solo hasta 1994 fue nuevamente encontrada por Salaman y Gandy en la isla Bocagrande, a 5 km de Tumaco (Salaman 1995), tiempo hasta el cual se consideraba posiblemente extinta debido al crecimiento de la ciudad y la destrucción de su hábitat en la isla de Tumaco (BirdLife International 1992). En 1995 Stiles colectó tres especímenes en la isla Bocagrande, que depositó en el Museo de Historia Natural del Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá, Colombia.

Recientes exploraciones en la costa pacífica han producido nuevos registros del Semillero de Tumaco, indicando que su distribución dentro de Colombia es más amplia de la que se pensaba (Estela 2000, Reyes 2002). Los registros actuales dentro del Departamento de Nariño, corresponden a la Ensenada de Tumaco en la Isla Bocagrande (Salaman 1995, Reyes 2002), en Tumaco (Carl Downing, com. pers. del 2000) y en la isla El Morro (De Las Casas, JC in litt en: Reyes 2002); en El Naranjo, población ubicada dentro del Parque Nacional Natural Sanquianga (Estela 2000, Reyes 2002); y en la isla Ají, en la desembocadura del río Naya, suroccidente del Departamento del Valle del Cauca (Estela 2000, Reyes 2002), véase Figura 1.

1.1. Aspectos Ecológicos

S. insulata, como muchos otros semilleros, se alimenta de semillas de gramíneas. Su hábitat corresponde a las playas donde crecen pastizales de la gramínea *Tumbabobos Uniola pittieri* (Salaman 1995, Estela 2000, Reyes 2002, Stiles In press) la cual se encuentra distribuida a lo largo de la costa pacífica colombiana; y pastizales no costeros compuestos por *Panicum* sp., *Digitaria* sp. y *Paspalum* spp. (De Las Casas, JC in litt en: Reyes 2002). Los semilleros realizan movimientos locales en busca de pastizales con semillas una vez se hayan agotado los recursos en donde se encontraban (Cardoso 1999): posiblemente esta es la causa de observaciones negativas en la búsqueda del Semillero en Tumaco en varias exploraciones (e.g. véase BirdLife International 1992, Estela 2000).

1.2. Estado de Conservación

El semillero *Sporophila insulata* es endémico del suroccidente de Colombia. La IUCN (BirdLife International 1992, BirdLife International 2000), así como el proyecto Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia, liderado por el Instituto Alexander von Humboldt de Colombia (Renjifo et al 2002), catalogaron este taxón en Peligro Crítico, específicamente CR B2ab (ii,iii,iv,v) y C2a(i) (categoría internacional no mostrada). Esto corresponde a la categoría más alta de amenaza, y en este caso a una especie que se encuentra al borde de la extinción debido al área de ocupación (CR B2) estimada en menos de 10 km²; (a) hábitat severamente fragmentado y (b) declinación continua de la población [b(ii)] área de ocupación, [b(iii)] calidad de hábitat, [b(iv)] número de localidades, [b(v)] número de individuos maduros, y [CR C2a(i)] su población total se estima menor a 250 individuos (Renjifo et al. 2002). Estas causas son debidas a la destrucción de sus sitios de alimentación ya sea para la urbanización o la ampliación de las playas turísticas (Salaman 1995, BirdLife International 2000). En este momento no se conocen proyectos enfocados a la conservación

de este taxón (BirdLife International 1992, BirdLife International 2000), salvo la población protegida en el PNN Sanquianga (Reyes 2002).

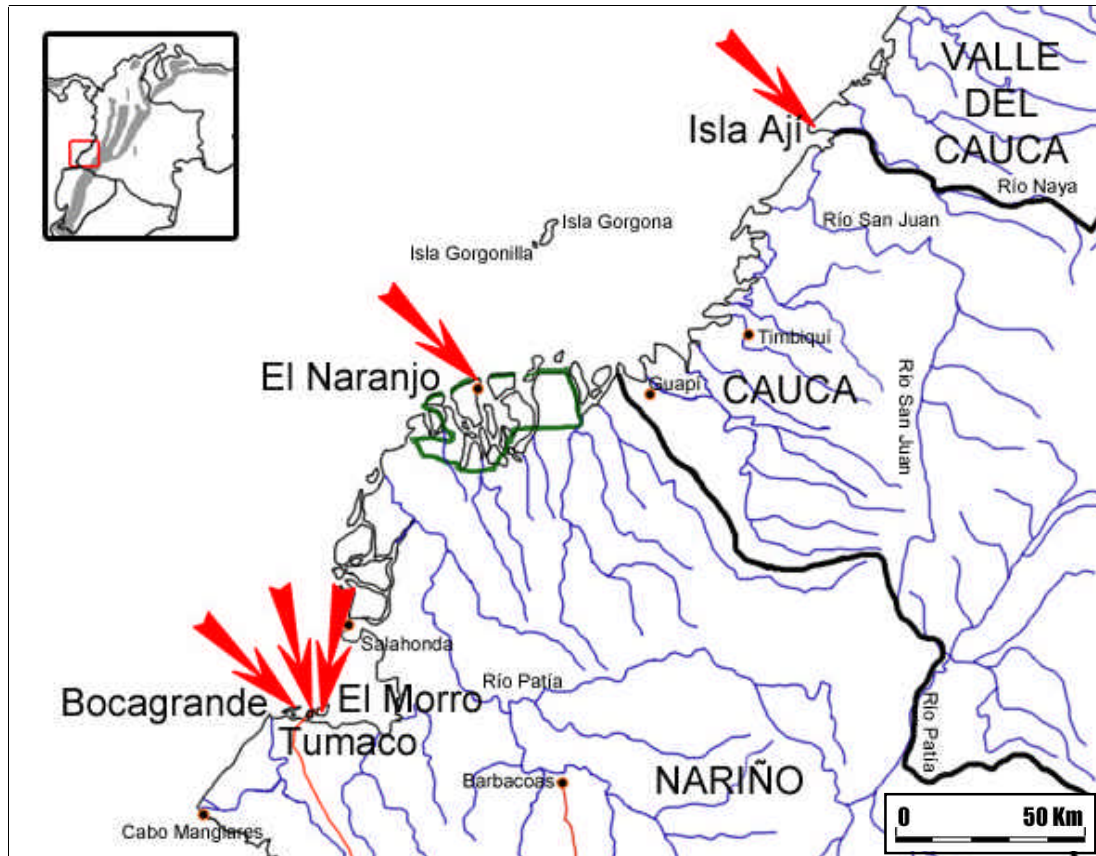


Figura 1. Registros actuales del taxón *Sporophila insulata*. La delimitación verde corresponde al PNN Sanquianga.

1.3. Estado Taxonómico

Existen bastantes problemas taxonómicos dentro del género *Sporophila*, entre ellos el de las especies reconocidas *ardesiaca*, *melanops*, *zelichi* e *insulata*, las cuales podrían llegar a ser tratadas como híbridos; o en el caso de *ardesiaca* e *insulata* como subespecies de *nigricollis* y *telasco* respectivamente (Hilty 1985, Ouellet 1992, BirdLife International 1992 y 2000, Reyes 2002). Chapman (1921) sugirió que *insulata* estaba relacionada con el Semillero Ladrillo *S. minuta*. Ridgely y Tudor (1989) cuestionaron el rango de especie de *insulata*, y sugirieron que estaba más relacionada con el Semillero Pechiblanco *S. telasco*, sin embargo también plantean que *insulata* puede corresponder a la hibridación entre *telasco* y *minuta* (aunque no tenían prueba en el momento de registros de *minuta* en la costa pacífica Colombiana o Ecuatoriana). Por otra parte, Stiles hizo un conteo de los plumajes de *insulata*, luego examinó la serie típica y concluyó que este taxón correspondía a una raza o morfo de *telasco*, no una especie aparte (Stiles In press). En el año 2000, la Expedición Calidris PNN Sanquianga 2000 realizó una búsqueda específicamente de este semillero. Se encontraron varios individuos muy cerca de la población El Naranjo aproximadamente a 110 km de Tumaco, varios fueron capturados y anillados, pero el reporte indicaba que estos

individuos tenían un patrón de coloración diferente al reportado en la descripción del tipo (Estela 2000).

1.4. Descripción de los Taxones Estudiados

Los machos adultos de los taxones *insulata* junto con *telasco* (Figura 2 a y b), se diferencian de los demás semilleros del género *Sporophila* por tener el dorso gris estriado, alas y cola negruzcas y la base de la cola blanca. El semillero *insulata* se diferencia básicamente de *telasco* por tener una delgada banda café rojiza a través de la rabadilla (descripción del tipo), en vez de blanca; y el mentón, la garganta, el pecho y parte superior del vientre tienen un color café rojizo que luego se entremezcla con blanco crema en el vientre; probablemente los individuos juveniles son los que presentan este último patrón. El semillero *telasco* solo tiene el mentón y la parte superior de la garganta café rojizo; el pico de ambas especies es negruzco y presentan un espejo alar blanco conspicuo (Chapman 1921, Hilty & Brown 1986, Ridgely & Tudor 1989).

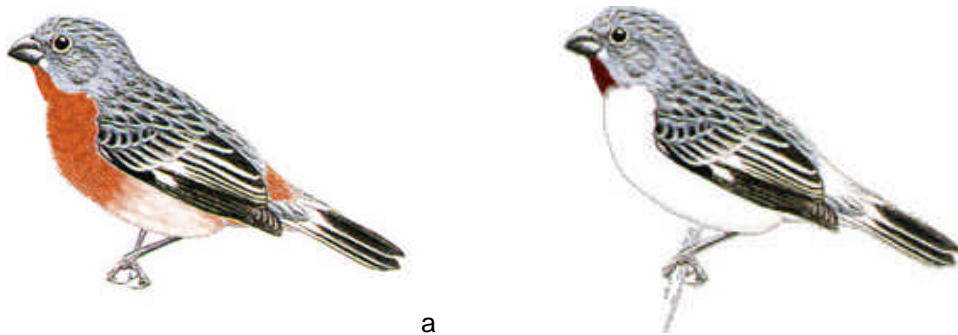


Figura 2. a: macho *Sporophila insulata* y b: macho *S. telasco*. Ilustración de *telasco* y modificada tomada de Ridgely & Tudor (1989).

Las hembras de *insulata* tienen ventralmente un color anteado volviéndose blanco en el vientre; *telasco* es blanca por debajo con un escaso rayado oscuro en el pecho y los flancos. Ambas especies tienen el pico amarillo pálido, son dorsalmente café pálido y presentan también un espejo alar (Hilty & Brown 1986, Ridgely & Tudor 1989). A pesar de esta descripción reportada para cada especie, las hembras son casi idénticas e indistinguibles aún en la mano (Stiles In press).

El semillero *minuta* (Figura 3) por el contrario, tiene el espejo alar blanco inconspicuo; y desde el mentón hasta las coberteras infracaudales y la rabadilla poseen un color canela. La subespecie *parva* la cual se distribuye desde México hasta Nicaragua, presenta la base de la cola blanca, aunque han sido reportados dos individuos, uno en Honda y otro en Santa Marta, Colombia con la misma característica (Meyer de Schauensee 1952). Las hembras ventralmente tienen un color café amarillo pálido y dorsalmente su coloración es café anteado (Hilty & Brown 1986, Ridgely & Tudor 1989).

1.5. Distribución de los Taxones Estudiados

S. insulata llega a ser simpátrica con *telasco* en la costa Pacífica del suroccidente de Colombia (Figura 1 y 4). *S. telasco* se encuentra distribuido en el suroccidente del Departamento de Cauca (tierras bajas costeras), occidente de Ecuador (principalmente en

áreas más áridas e islas hasta el sur de Loja), occidente de Perú (principalmente en tierras bajas del Pacífico, pero también en la zona alta del valle Marañón), y el extremo noroccidental de Chile (Hilty & Brown 1986, Ridgely & Tudor 1989, Ridgely & Greenfield 2001). Se encuentra por debajo de 1000 m. También existen registros de *telasco* en la isla Gorgona, pero esto se debe a la relativa cercanía de la isla al continente, permitiendo que esporádicamente lleguen individuos hasta la isla (Hilty & Brown 1986, Ortiz-Von Halle 1990).



Figura 3. macho de *Sporophila minuta*. Ilustración tomada y modificada de Ridgely & Tudor (1989).

El semillero *minuta* aparentemente es alopátrico con *insulata*. Tiene una extensión de presencia mucho mayor (Figura 4). La subespecie *parva* se encuentra distribuida desde la vertiente Pacífica de México en Nayarit hasta Nicaragua a lo largo de la vertiente Pacífica de Centroamérica; y la subespecie *minuta*, se encuentra desde Panamá, hasta el noroccidente de Ecuador, y en Colombia desde el occidente de la cordillera occidental de los Andes hasta el norte de Brasil (Meyer de Schauensee 1952, Hilty & Brown 1986, Ridgely & Tudor 1989, Ridgely & Greenfield 2001). También existen unos pocos registros en la Isla Gorgona, Colombia (Ortiz-Von Halle 1990, A. Rico com. pers. 2003), como también en Esmeraldas, Ecuador (Ridgely & Greenfield 2001); lo que indica que su extensión en el Pacífico debe ser mayor a lo documentado. Se encuentran principalmente por debajo de 1000 m, aunque también llega hasta 2300 m.

1.6. Herramientas Taxonómicas

La secuenciación de genes, además de ser una herramienta para hallar las relaciones filogenéticas entre especies (e.g. Baena 1999, Sato et al. 1999, Klicka et al. 2000, Sato et al. 2001, Burns et al. 2002, Cadena et al. In rev), es también una herramienta que puede llegar a resolver problemas taxonómicos (e.g. Klicka et al. 1999, Lee et al. 2001, Friesen et al. 2002, Baker et al. 2003). Aunque la morfometría, el análisis de coloración, de anidación, inclusive análisis etológico, entre otros, han sido el principal soporte de la taxonomía clásica en el siglo pasado (e.g. Livezey 1986, Brumfield et al. 1996, Stiles 1996), puede tener limitaciones para hallar diferencias entre taxones muy similares, como es el caso entre *insulata* y *telasco* (Stiles com. pers.). Sin embargo son importantes ya que pueden complementar la información molecular o viceversa (e.g. Hedges & Sibley 1994, Lee et al. 1996, Griffiths 1999, Zink et al. 1999).



Figura 4. Distribución en Suramérica de *minuta* (área oscura) y *telasco* (área clara); los puntos y el área negra indican los sitios donde ambos taxones se encuentran. 1: Isla Gorgona; 2: Esmeraldas.

Actualmente se utilizan genes mitocondriales para estudiar relaciones filogenéticas a nivel de especie, principalmente por su alta tasa de variabilidad con respecto a los genes nucleares. Los genes mitocondriales ampliamente utilizados son el gen no codificador región control o llamado d-loop, el gen citocromo b, la subunidad deshidrogenasa 2 NADH, entre otros. Pese a los problemas de “señal” o “ruido” que puedan tener, los análisis han aportado información muy importante, mostrando respecto a la taxonomía clásica, mejor resolución acerca de la relación filogenética entre especies cercanas (Mindell 1997). En este proyecto, los genes mitocondriales secuenciados de *insulata*, se utilizaron tanto como una herramienta filogenética, como una herramienta molecular que permitiera buscar un fragmento de gen cuya secuencia fuera única y distinguible o no de *telasco* y *minuta*.

En este trabajo, se muestra como el análisis de genes del ADN mitocondrial se complementa con la morfometría y el análisis de coloración para responder la pregunta: ¿Es el Semillero de Tumaco *Sporophila insulata* un taxón válido?.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el estado taxonómico del Semillero de Tumaco *Sporophila insulata* mediante herramientas morfológicas y moleculares.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Obtener secuencias de un fragmento del gen citocromo b de *Sporophila insulata*, *Sporophila telasco* y *Sporophila minuta*.

2.2.2. Determinar la relación filogenética de *Sporophila insulata*, *Sporophila telasco* y *Sporophila minuta* mediante las secuencias de un fragmento del gen citocromo b, y usando las secuencias disponibles en el GenBank de otras especies del mismo género y afines.

2.2.3. Determinar el grado de diferenciación de *Sporophila insulata*, *Sporophila telasco* y *Sporophila minuta* mediante los datos morfológicos obtenidos en campo y en las colecciones ornitológicas colombianas disponibles.

2.2.4. Determinar el estado de especie en *Sporophila insulata* para poder llevar a cabo proyectos encaminados a estudios demográficos y su conservación.

3. MÉTODOS

3.1. Localidades del Estudio

Con el objetivo de capturar individuos de *Sporophila insulata*, *telasco* y *minuta*, se hicieron muestreos en dos localidades del Departamento de Nariño, una en el Departamento de Cundinamarca; y una en el Departamento de Esmeraldas en Ecuador.

Entre el 16 de Julio y 17 de Agosto del 2002 se muestrearon las tres primeras localidades con el objetivo de capturar *insulata* y *telasco* (véase Figura 5). La primera localidad corresponde a la isla **El Morro**, Municipio de Tumaco, Departamento de Nariño, Colombia (78° 45' W y 1° 48' N), donde los semilleros *insulata* y *telasco* habían sido previamente observados en los pastizales aledaños al aeropuerto La Florida (De Las Casas in litt, en: Reyes 2002). La segunda localidad corresponde a los pastizales de la gramínea Tumababobos *Uniola pittieri*, aledaños a la población **El Naranjo** ubicada en el Parque Nacional Natural Sanquianga, Municipio de Mosquera, Departamento de Nariño, Colombia (78° 20' W y 2° 39' N), donde *insulata* había sido registrado en una expedición previa (Estela 2000). Luego se visitó la ciudad de **Esmeraldas**, Departamento de Esmeraldas, Ecuador. Se encontraron bandadas mixtas de semilleros cerca de la refinería de Esmeraldas, bastante distantes de la playa (79° 41' W y 0° 55' N).

Finalmente, con el propósito de obtener muestras de *minuta*, se tomaron muestras de tejido de especímenes (Leeton et al. 1993, Ellegren 1991, Taberlet & Bouvet 1991) de la colección ornitológica del Museo de Historia Natural - Instituto de Ciencias Naturales (MHN-ICN), de la Universidad Nacional de Colombia. No se logró amplificar fragmentos del gen citocromo b, debido a que el ADN se encontraba muy degradado, evidenciado por electroforesis en agarosa. Por lo tanto, se realizó una visita del 2 al 4 de Noviembre del 2002 a la finca El Pilar, vereda El Raizal, Municipio de **Guaduas**, Departamento de Cundinamarca, Colombia (véase Figura 5).

Por otra parte Max-Planck-Institut fuer Biologie, permitió usar cuatro muestras tomadas cerca de la ciudad de **Pedernales**, Departamento de Manabi, Ecuador (véase Figura 5).

3.2. Fase de Campo

3.2.1. *Captura de Aves*

Los individuos fueron localizados directamente con binoculares. Para capturarlos se utilizaron 10 redes de niebla color negro (ojo 36mm, 12m x 2.5m) - en Esmeraldas se utilizaron 3 redes y en Guaduas 5 - Las redes fueron ubicadas al frente de los pastizales en donde los semilleros habían sido observados previamente. Las redes se abrieron a las 5:30 horas y se cerraban aproximadamente a las 15:00 horas o más tarde.

3.2.2. *Toma de Medidas*

A cada ave capturada de las especies en estudio, se tomaron las siguientes medidas morfológicas: longitud del culmen total (CT), longitud del culmen expuesto (CE), longitud del pico hasta la narina (CN), ancho de comisura (Co), altura del pico (AP), longitud del tarso (LT), longitud de la cuerda alar (LA), longitud de la cola (LC) y el peso (Pe); también se

observó el estado de la muda y la presencia de parche de cría o protuberancia cloacal. Adicionalmente cada individuo fue marcado con anillos de celuloide de 2.3 mm. Se combinaron cuatro colores: blanco=b, negro=n, naranja=o y rojo=r; por ejemplo dnr = derecho negro rojo, o iob = izquierdo naranja blanco.



Figura 5. Localidades donde se realizaron los muestreos de semilleros. Limite verde comprende el PNN Sanquianga. La flecha negra en el mapa pequeño indica la localidad de Guaduas, en donde se realizó el muestreo de *minuta*.

3.2.3. Toma de Muestras de Sangre

Las muestras de sangre (5-10 μ l aprox.) fueron tomadas a partir de un corte en la uña del tercer dedo (Gaunt et al. 1997) y de cañones con pulpa de las plumas remeras o rectrices en formación (Marsden & May 1984). Como máximo se extrajeron 3 plumas. La base de la pluma se cortaba (Gaunt et al. 1997, Marsden & May 1984) y se depositaba en tubos Eppendorf, los cuales contenían la solución *Queen's lysis buffer* (véase Anexo 1) la cual permite conservar las cadenas de ADN en un ambiente cálido hasta 36°C por 24 semanas (Seutin et al. 1991). Los cortes se realizaron con una tijera fina, la cual se esterilizaba con alcohol y fuego de un encendedor, antes de tomar cada muestra.

3.2.4. Registro Fotográfico

La mayoría de las aves capturadas fueron fotografiadas dorsal, ventral y lateralmente. Inmediatamente después de la toma de datos y el anillamiento, las aves eran liberadas.

3.3. Fase de Laboratorio

3.3.1. Revisión de Pieles

Tres 3 especímenes machos catalogados como *Sporophila telasco/insulata*, 15 machos y 15 hembras de *Sporophila minuta* de la colección del MHN-ICN, se utilizaron para la toma de medidas morfológicas: CT, CE, CN, LT, LA y LC. El peso no se encontraba disponible en ninguna etiqueta salvo los tres individuos *S. telasco/insulata*.

3.3.2. Extracción de ADN total, Amplificación y Purificación

La fase de laboratorio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá y en el Max-Planck-Institut fuer Biologie, Departamento de Inmunogenética, en Tuebingen, Alemania.

ADN genómico total fue extraído siguiendo el método de Saghai-Marroof et al. 1984 (véase Anexo 2) para las muestras de sangre y algunos tejidos. También se utilizó el kit de extracción de ADN de tejido QIAamp® DNA Mini Kit, de QIAGEN (véase Anexo 3). Para verificar la presencia del ADN genómico total extraído, se corrieron pruebas de electroforesis en geles de agarosa 1% y teñidos en bromuro de etidio ($5\mu\text{l}/100\text{ml}_{\text{gel}}$).

Inicialmente, mediante la técnica de PCR (Saiki et al. 1988, véase Anexo 4.1), el objetivo del proyecto era amplificar un fragmento de 391 pb del gen citocromo b (CB). Finalmente en el Max-Planck-Institut fuer Biologie fue posible amplificar fragmentos de 922 pb de CB, que corresponde a las posiciones 14994-15915 de *Gallus gallus* (Desjardins & Morais 1990, acceso GenBank X52392); y además fragmentos de 1104 a 1107 pb de la región control o d-loop (CR: “control region” en inglés), que corresponde a las posiciones 15719-16840 aprox. de *Corvus frugilegus* (Harlid & Arnason 1999, acceso GenBank NC_002069). El gen CR, el cual no codifica para proteína, tiene la mayor tasa de mutación con respecto a otros genes mitocondriales, y así ofrece mejor resolución a nivel de especie, aún intraespecíficamente (Mindell 1997). Se utilizaron los primers listados en la Tabla 1.

Tabla 1. Primers usados para la amplificación de fragmentos de los genes mitocondriales citocromo-b y región control.

| Primer | Secuencia | Referencia |
|--------|---------------------------------|-------------------------|
| CBS-F | 5'-CCAACATCTCHKCHTGATGAAAYTT-3' | Sato et al. (1999) |
| CBS-R | 5'-GATGAAKGGGTVTTCTACTGGTTG-3' | Sato et al. (1999) |
| CR 1-F | 5'-CATCAGACAGTCCATGAAATGTAGG-3' | Sato et al. (1999) |
| CR 1-R | 5'-AGGTACCATCTTGGCATCTTC-3' | Baker & Marshall (1997) |

CBS: citocromo-b, CR: región control (Control Region), F: Universal (Forward), R: Reverso (Reverse).

Para verificar la presencia del fragmento amplificado, se corrieron pruebas de electroforesis en geles de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio ($5\mu\text{l}/100\text{ml}_{\text{gel}}$).

Luego, con el fin de cortar bandas y proceder a purificar, se corrieron electroforesis en geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP por sus siglas en inglés) al 2%, agregando 10µl de cada muestra, a 60V durante 30min. Cada banda cortada fue purificada utilizando el kit GFX™ de Amersham Bioscience (véase Anexo 5).

3.3.3. Clonación y Purificación del Plásmido

Se realizó clonación utilizando el vector TOPO 10 y la bacteria *E.coli* del Kit TOPO TA CLONING de Invitrogen (véase Anexo 6). Cada muestra obtenida se cultivó en cajas de Petri (una caja por cada individuo) con medio de agar LB, kanamicina y XGal (véase preparación Anexo 7). Se incubó durante la noche 12 horas aprox, y luego fueron almacenadas a 4°C indefinidamente hasta su uso.

Se tomaron 5 colonias (réplicas) blancas de *E.coli* por cada caja de Petri (por cada individuo), y cada colonia fue cultivada independientemente durante 3 horas, en 300 µl de medio agar LB líquido y kanamicina, y agitación constante a 37°C (véase Anexo 7).

Luego se realizó una prueba de PCR para confirmar la presencia del fragmento del gen clonado, y para ver el resultado, se corrieron pruebas de electroforesis en gel de agarosa 2%, a 100V durante 30 min (véase Anexo 4.2). De las 5 muestras cultivadas, se tomaron 70µl de uno o dos clones con el fragmento amplificado correcto, para cultivar nuevamente durante 12 horas, en 10 ml de medio de agar LB líquido y kanamicina.

Posteriormente se llevaron los tubos a una centrífuga Eppendorf modelo 5810R a una temperatura de 18°C, 4000 rpm durante 10 min. Con el fin de obtener el plásmido, el sobrenadante se descartó y el precipitado (células de *E.coli*) se purificó de membranas, organelos y ADN con el kit E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II de PeqLab (véase Anexo 8).

Para observar la presencia de ADN o plásmido extraído, se corrieron pruebas de electroforesis en geles de agarosa al 2%, con 1 µl de muestra y 1 µl de bromofenol azul 1X, a 100V durante 10 min.

3.3.4. Secuenciación

La secuenciación de fragmentos se llevó a cabo por medio del secuenciador Li-Cor 3 el cual utiliza geles de poliacrilamida (véase Anexo 9). La amplificación se realizó previo a la secuenciación utilizando el kit Thermo Sequenase™ Primer Cycle Sequencing Kit, de Amersham Biosciences (véase Anexo 10).

Una vez el sistema estaba montado en el Li-Cor 3, se ubicaron las muestras amplificadas. El secuenciador corre las muestras durante 18 horas y permite leer hasta 1000 pb, tanto de la cadena liviana como de la cadena complementaria.

3.3.5. Lectura, Alineación y Corrección de Ambigüedades

Se utilizó el programa e-Seq v. 2.0, software para Li-Cor 3, para realizar la corrección de ambigüedades o errores de lectura manualmente y para leer las secuencias obtenidas.

Se eliminaron las secuencias de los primers, y luego se invirtieron las secuencias de la cadena complementaria utilizando el programa Seq-Pup 0.6f (Gilbert 1996-1998). Para

alinear las secuencias se utilizó Clustal X (Thompson et al. 1997). Para traducir el fragmento del gen CB y así detectar posibles ambigüedades o *numts* ("nuclear mitochondrial") secuenciados, se utilizó el programa Sequencer™ ver Demo 4.1.4. También se utilizó la función BLAST en el GenBank para corroborar que las secuencias obtenidas correspondieran al gen esperado.

3.4. Análisis

3.4.1. Análisis Molecular

Las secuencias fueron transferidas a PAUP 4.0b10 (Swofford 2002), a partir del programa Seq-Pup 0.6f (Gilbert 1996-1998).

3.4.1.1. Grupo Externo (Outgroup) y Secuencias del GenBank

Con el objetivo de identificar un buen grupo externo, se realizaron varias reconstrucciones filogenéticas por el método de neighbor-joining y UPGMA en PAUP 4.0b10 (Swofford 2002). Se utilizaron especies afines y cercanas al género *Sporophila* e.g. *Tiaris*, *Oryzoborus*, *Fringilla*, *Miliaria*, *Coereba*, *Geospiza*, *Emberiza*, entre otras (Lee et al. 2001, Burns et al. 2002, Grapputo et al. 2001). Únicamente el género *Fringilla* y *Emberiza* eran parafiléticos con respecto a todo el grupo analizado que incluía al género *Sporophila*, y así mismo eran los más cercanamente relacionados. Así, se escogió a *Emberiza citrinella* como grupo externo para ambos genes analizados.

Las secuencias del gen CB para el género *Sporophila* y las obtenidas en el GenBank, se utilizaron para realizar las reconstrucciones filogenéticas (véase Tabla 2). Por otro lado, hasta ahora no existen secuencias en el GenBank de CR para este género, por lo cual solo se utilizó el grupo externo y las secuencias obtenidas en este proyecto.

3.4.1.2. Reconstrucción Filogenética

Con el propósito de evaluar saturación de nucleótidos, se realizó un análisis de tasa de divergencia de transiciones y transversiones. Para CB, se analizó la tasa de divergencia de cada posición del codón. Se estimaron divergencias genéticas dentro y entre especies, usando el modelo de sustitución de nucleótidos de Tamura-Nei (1993). También se usó la prueba de homogeneidad para evaluar la posibilidad de combinar ambos genes secuenciados para la reconstrucción filogenética. Se realizaron reconstrucciones filogenéticas utilizando el método de neighbor-joining y máxima parsimonia.

3.4.2. Morfometría

El análisis morfométrico pretende determinar si existen diferencias ($H_0 : \mu_B = \mu_A$) entre *insulata* y *telasco*. Si hay diferencias significativas entre estos dos grupos, los individuos *insulata* podrían considerarse híbridos.

Debido a que las hembras son muy similares y difíciles de diferenciar en los taxones *insulata* y *telasco*, y los juveniles no están descritos (véase Hilty & Brown 1986, Ridgely & Tudor 1989), los individuos capturados tanto en la localidad de El Morro como en El Naranjo no fueron tenidos en cuenta para el análisis morfométrico. Así, fueron utilizados únicamente los datos de los machos y machos juveniles.

Tabla 2. Especies del género *Sporophila* y outgroup encontradas en el GenBank para citocromo b y región control.

| Código GenBank | Especie | N° de bases | Referencia |
|-----------------------|---|-------------------|----------------------|
| AF310056 | <i>Sporophila castaneiventris</i> | 922 | Sato et al. 2001 |
| AF310054 | <i>Sporophila americana</i> (<i>corvina</i>) | 922 | Sato et al. 2001 |
| AF310053 | <i>Sporophila nigricollis</i> | 922 | Sato et al. 2001 |
| AF290149 | <i>Sporophila schistacea</i> | 894 | Klicka et al. 2000 |
| AF489896 | <i>Sporophila ruficollis</i> | 1045 | Burns et al. 2002 |
| AF489895 | <i>Sporophila collaris</i> | 1030 | Burns et al. 2002 |
| AF284080 | <i>Emberiza citrinella</i> | 1104 | Grapputo et al. 2001 |
| AJ243927 ^α | <i>Emberiza citrinella</i> ^α | 1167 ^α | Lee et al. 2001 |

Los individuos machos se agruparon en dos grupos diferentes según su patrón de coloración: machos *insulata*, son los individuos que presentan en la garganta y parte superior del pecho coloración “rojiza”, y el resto de las partes inferiores blancuzcas, hasta aquellos individuos totalmente color “rojizo” incluyendo la rabadilla; y los machos *telasco*, son los individuos que solo presentan color marrón en la garganta y el borde superior del pecho, las otras zonas inferiores y la rabadilla son blancuzcas.

Para todos los análisis, los datos fueron transformados a \log_{10} para corregir distribuciones no normales. Para comparar los promedios derivados entre los taxones estudiados, se llevó a cabo el análisis de varianza ANOVA de una vía; y las variables en donde se encontraron diferencias significativas, fueron analizadas con la prueba de Tukey (Zar 1984).

Un análisis multivariante discriminante fue ejecutado mediante el programa Statgraphics Plus 5.0, versión temporal. Este análisis asume *a priori* y según el criterio de uno, la identificación de los taxones. Permite determinar la variable que aporta el mayor peso para diferenciar los grupos taxonómicos, determina el grado de diferenciación entre los grupos formados, y también fue usado para determinar si los individuos de un taxón medidos en la colección se agrupaban con los medidos en campo (McGarigal et al. 2000, Hair et al. 1998).

3.4.3. Coloración del Plumaje

Se realizó un análisis de coloración utilizando la guía de colores de Smithe (1975-1981). Únicamente se analizó la coloración de las partes inferiores – garganta, pecho, vientre, plumas infracaudales – y la rabadilla de los machos de los taxones estudiados. Para los machos adultos y machos inmaduros se cuantificó el porcentaje de coloración en dichas zonas corporales teniendo en cuenta cada individuo fotografiado en campo y aquellos que fueron colectados. Los machos adultos y machos inmaduros se diferenciaron teniendo en cuenta la coloración gris del dorso de un macho adulto y gris con amarillo pálido en machos inmaduros, como se observó en campo. Los tres especímenes que se hallaban previamente en la colección del MHN-ICN, también fueron incluidos tanto en el análisis de morfometría como en este.

4. RESULTADOS

4.1. Individuos capturados

En la localidad El Morro se capturaron 21 machos del taxón *insulata*, 15 machos de *telasco*, 14 hembras y 7 juveniles no identificados. En la localidad de El Naranjo se capturaron 10 machos de *minuta* de los cuales uno fue una recaptura, anillado como *insulata* por la Expedición Calidris PNN Sanquianga 2000 (Estela 2000). También se capturaron 3 hembras y 2 juveniles de la misma especie. En la localidad de Esmeraldas se capturaron 2 machos y una hembra de *telasco*. En la localidad de Guaduas se capturaron 3 machos de *minuta*.

En total se colectaron 11 individuos y se depositaron en la colección ornitológica del MHN-ICN con los códigos: ICN-34253, ICN-34254, ICN-34255, ICN-34256, ICN-34257, ICN-34259, ICN-34261, ICN-34263, ICN-34273, ICN-34274 e ICN-34328 (véase Anexo 15). Dentro de los individuos capturados el taxón *telasco* es nuevo para esta colección, también se colectaron hembras y juveniles no identificados, y dos individuos machos del taxón *insulata*. En el Naranjo no se colectó ningún individuo.

Se obtuvieron en total 38 muestras de sangre y 11 de tejido (corazón, hígado y cañón de pluma en desarrollo), que incluyeron hembras y juveniles. Adicionalmente se colectaron 6 muestras de sangre de *Sporophila corvina* en El Morro.

Se tomaron 214 fotografías así: en la localidad de El Morro se fotografiaron 19 machos de *insulata*, 13 machos de *telasco*, 9 hembras y 3 juveniles. En El Naranjo, se fotografiaron todos los individuos capturados. En Esmeraldas se fotografió un macho inmaduro. En Guaduas se fotografiaron los 3 individuos capturados. Además también se obtuvieron fotos de los individuos de Pedernales. Posteriormente a la captura, toma de medidas, anillamiento y fotografías, los individuos fueron liberados. Véase resumen de esta información en la Tabla 3 e información completa en Anexo 15.

Tabla 3. Número de individuos capturados y colectados durante el estudio, también se indica el número de muestras de sangre y/o tejido tomados, individuos fotografiados, y el número de individuos para los cuales se obtuvieron secuencias. M = macho, H = hembra y J = juvenil. Ind = individuo, Cap = capturado, Col = colectado, Sec = secuenciado.

| Localidad | Taxón | Sexo | Ind Cap | Ind Col | Ind Foto | Muestras de Sangre o Tejido | Ind Sec |
|------------|-------------------------|------|---------|---------|----------|-----------------------------|---------|
| El Morro | <i>insulata</i> | M | 21 | 2 | 19 | 13 | 12 |
| | <i>telasco</i> | M | 15 | 3 | 13 | 11 | 4 |
| | <i>insulata/telasco</i> | H | 14 | 2 | 9 | 7 | 3 |
| | <i>insulata/telasco</i> | J | 7 | 1 | 3 | 4 | 1 |
| El Naranjo | <i>minuta</i> | M | 10 | - | 10 | 5 | 3 |
| | | H | 3 | - | 3 | 2 | 2 |
| | | J | 2 | - | 2 | 2 | 1 |
| Guaduas | <i>m. minuta</i> | M | 3 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| Esmeraldas | <i>telasco</i> | M | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | H | 1 | 1 | - | 1 | - |
| Pedernales | <i>telasco</i> | M | 2 | - | 2 | 2 | 2 |
| | | H | 2 | - | 2 | 2 | 2 |
| Total | | | 83 | 11 | 67 | 53 | 34 |

4.2. Análisis genético

Se presenta este análisis previo al morfométrico, ya que el análisis filogenético permitió concluir y resolver dos puntos muy importantes: La validez de *Sporophila insulata* y por otro lado, la re-determinación de los individuos capturados en El Naranjo.

4.2.1. Métodos de laboratorio

4.2.1.1. Extracción de ADN total

El método de fenol-cloroformo para la extracción de ADN total, fue exitoso en el 96% de las muestras tratadas (n = 49). Tres muestras no amplificaron inicialmente, probablemente debido a la poca cantidad de ADN total extraído. Pero posteriormente se logró amplificarlas usando Taq marca Sigma.

4.2.1.2. Amplificación y purificación

Se logró amplificar CB en 49 individuos de 50 muestras de ADN purificado, y el gen CR en 28 individuos de 30 muestras de ADN purificado. Adicionalmente se amplificaron muestras de *telasco* de la localidad de Pedernales, Departamento de Manabi, Ecuador, aportadas por Max-Planck Institut fuer Biologie. Se amplificaron 2 individuos para CB y 4 individuos para CR.

Durante las amplificaciones, se obtuvieron en algunas muestras bandas adicionales a la esperada. Estas bandas posiblemente corresponden a fragmentos no específicos o *numts* (copias mitocondriales que se han incorporado al genoma nuclear durante su evolución), véase Figura 7. Estas bandas aparecieron tanto en amplificaciones del gen citocromo b, como en la región control. Por medio del corte de bandas, estos posibles *numts* fueron eliminados.

4.2.1.3. Clonación

El método de clonación fue efectivo en el 100 % de las muestras tratadas. Así mismo, a pesar de haber purificado las amplificaciones, en varias ocasiones se obtuvieron fragmentos clonados de pequeño tamaño, estos fragmentos corresponden a cadenas cortas y residuos que quedaron dentro de la banda cortada (e.g. véase Figura 8). Así mismo, todas las purificaciones realizadas para la extracción del plásmido de *E. coli*, previo a la secuenciación, fue exitosa en un 100% (e.g. véase Figura 9).

4.2.1.4. Secuenciación

La secuenciación con geles de policrilamida tiene la ventaja de leer hasta 1000 pb, con respecto a un secuenciador automático por electroforesis por capilar, el cual máximo lee hasta 500 pb seguidos.

Se realizaron 13 secuenciaciones, cada una con 16 muestras. De las cuales 9 (70%) generaron secuencias legibles. En cada caso, algunas muestras no corrieron adecuadamente resultando en secuencias ilegibles. Algunas de estas muestras fueron nuevamente secuenciadas.

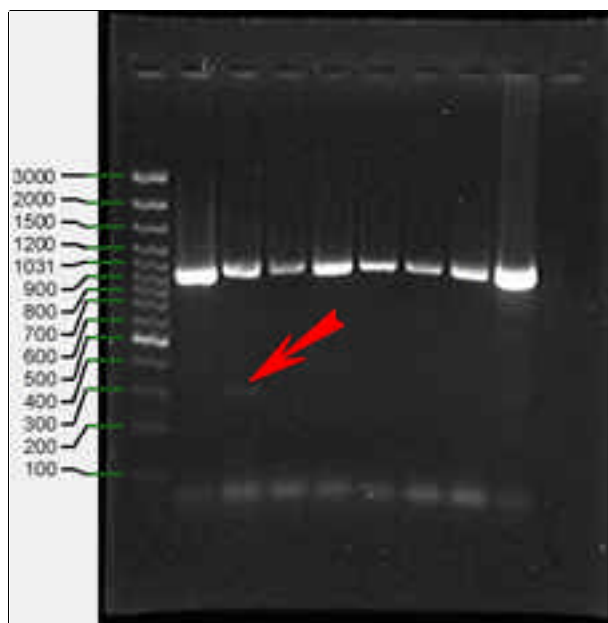


Figura 7. Prueba de electroforesis para evidenciar la presencia del fragmento amplificado de CB (922pb + 50pb de primers) en agarosa 2%. Nótese en el tercer pozo la presencia de un fragmento no específico. En cada pozo se encuentra una muestra de diferentes individuos *Sporophila*.

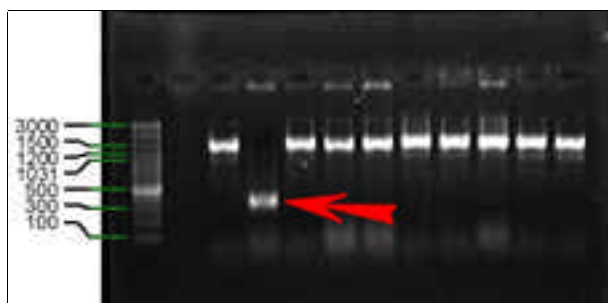


Figura 8. Prueba PCR que confirma presencia del fragmento clonado correcto. Se muestra 5 réplicas de la región control para dos individuos. Los fragmentos corresponden a 1100 pb aprox. de la región control + 46 pb de primers iniciales + 230 pb del vector y los primers para esta prueba. Nótese en el cuarto pozo, que corresponde a la segunda réplica del primer individuo, un fragmento no específico de 400 pb aprox. que un vector inicial adhirió. En cada pozo se encuentra una muestra de diferentes individuos *Sporophila*.

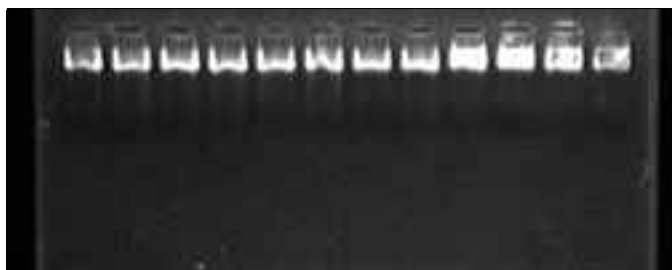


Figura 9. Prueba de electroforesis en agarosa 2%, 100 V y 10 min, para visualizar el plásmido extraído y purificado.

En total se obtuvieron 36 secuencias legibles que corresponden a 31 individuos para CB y 28 individuos para CR. Para CB se secuenciaron 11 machos *insulata*, 6 machos *telasco*, 6 machos *minuta*, 5 hembras y 3 juveniles no determinados. Para CR, se secuenciaron 12 machos *insulata*, 5 machos *telasco*, 4 machos *minuta*, 5 hembras y 2 juveniles no determinados.

Fueron secuenciados 922 pb para CB; y 1104 a 1107 pb para el gen CR. El gen CR tanto de *Corvus* como de *Sporophila* no pudieron ser alineados con *Gallus gallus*, debido a la alta divergencia y presencia de delecciones y adiciones.

Las secuencias de CB fueron traducidas y todas correspondieron a la proteína producida por el gen mitocondrial. Por otro lado, de 12 individuos secuenciados para CB y CR, 8 individuos del taxón *insulata* y *telasco* presentaron secuencias idénticas para gen CB y 6 individuos para CR. De estos individuos solo *insulata* 2 (MOR) y Juvenil 2 (MOR) compartieron para ambos genes esta similitud.

4.2.2. Análisis Molecular

La composición de bases para CB de las especies en estudio es: adenina 25.1%, citocina 36.1%, guanina 14.8% y timina 24%. Estos valores son muy similares tanto con especies del mismo género, la misma familia (Mindell 1997), como con especies bastante lejanas como la gallina *Gallus gallus* (véase Desjardins & Morais 1990).

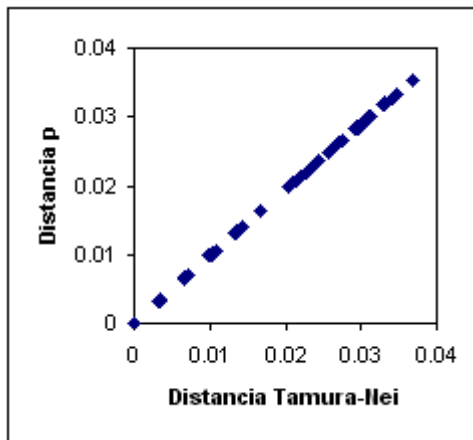
La composición de bases para CR es: adenina 30.3%, citocina 27.9%, guanina 13.4% y timina 28.4%, igualmente lo esperado comparando con otras especies (Mindell 1997).

4.2.2.1. Análisis de Tranversiones y Transiciones

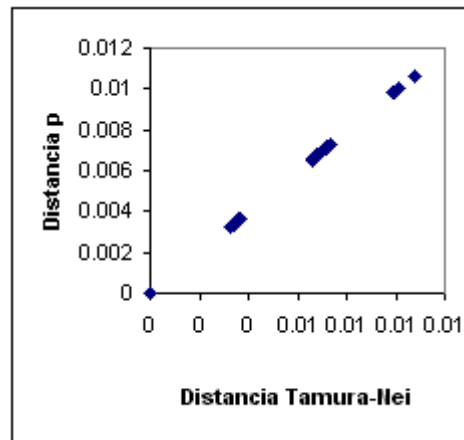
Se realizaron regresiones lineales con distancias no corregidas (p) vs. distancias corregidas según el modelo de Tamura-Nei (1993), con el objetivo de ver el grado de saturación para cada sustitución y posición del codón (para el caso de CB). Para CB, solo se encontró saturación en las transiciones de la 3^{ra} posición del codón (véase Fig. 10e). En CR no se encontró saturación.

Puesto que las transiciones de la 3^{ra} posición de CB evidenciaron saturación, se hicieron análisis filogenéticos previos eliminando dicha posición. Sin embargo esto reflejó pérdida de resolución filogenética, por lo cual para los análisis finales se tuvieron en cuenta todas las posiciones. La relación transiciones vs. transversiones para CB fue de 7:1 y para CR 4:1. Diversos análisis filogenéticos se realizaron usando diferentes esquemas del peso para tt vs tv. Puesto que no se observaron diferencias con respecto a la topología y resolución, se usaron todos los caracteres con igual peso.

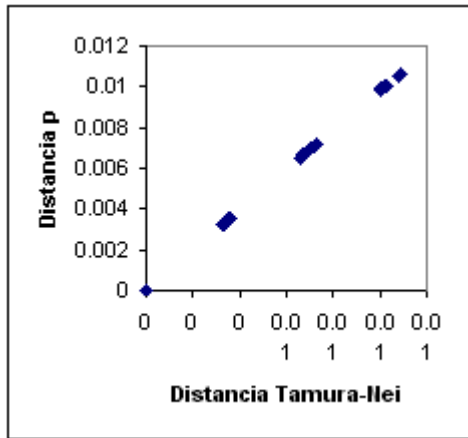
Bajo el criterio de parsimonia, de los 922 pb de CB, 846 caracteres son constantes, 19 son variables no informativos y 57 caracteres son variables informativos. Para la primera posición del codón 299 caracteres son constantes, 5 son variables no informativos y 3 caracteres son variables informativos; para la segunda posición 302, 4 y 2 respectivamente; y para la tercera posición 245, 10 y 52 respectivamente. De los 1104-1107 pb de CR, 1027 son constantes, 30 son variables no informativos y 66 caracteres son variables informativos.



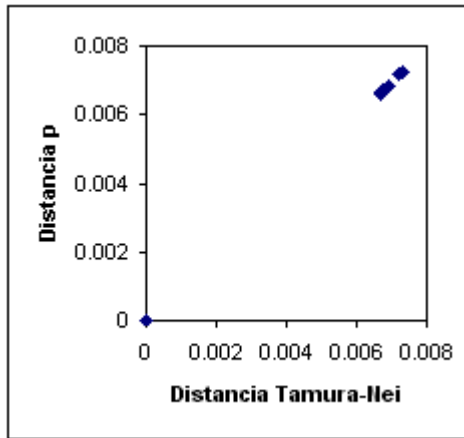
a. Transiciones 1^{ra} posición



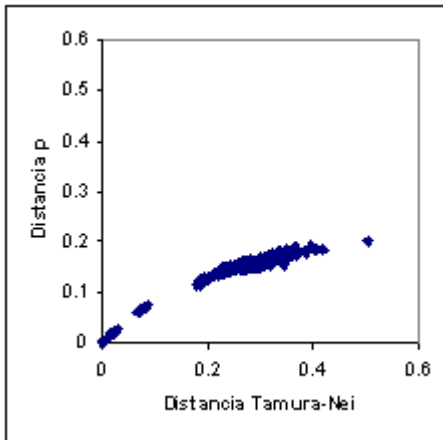
b. Transversiones 1^{ra} posición



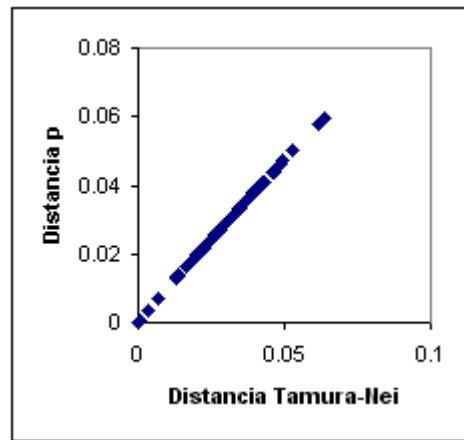
c. Transiciones 2^{da} posición



d. Transversiones 2^{da} posición



e. Transiciones 3^{ra} posición



f. Transversiones 3^{ra} posición

Figura 10. Distancia Tamura-Nei vs Distancia p para las diferentes posiciones de codón de CB.

4.2.3. Análisis Filogenético

4.2.3.1. Análisis de Neighbor-joining y Parsimonia

Se realizaron prueba de neighbor-joining y parsimonia con 1000 réplicas para Bootstrap. Parsimoniosamente se generaron 30 árboles igualmente parsimoniosos para CB, y 48 para CR. Posteriormente se realizaron árboles consenso estrictos, en los cuales colapsaron varias ramas, pero los nudos importantes están claramente definidos. El resultado de los árboles para CB como para CR resultaron en la misma topología intragenérica.

Las topologías resultantes para neighbor-joining (véase Fig. 12 y 13) y para parsimonia (Fig. 15 y 16) muestran 2 clados importantes con un alto Bootstrap (100%); uno de ellos donde agrupa a *insulata* con *telasco* en un solo clado común, y otro clado donde agrupa los individuos de la localidad de El Naranjo con los *minuta* de Guaduas.

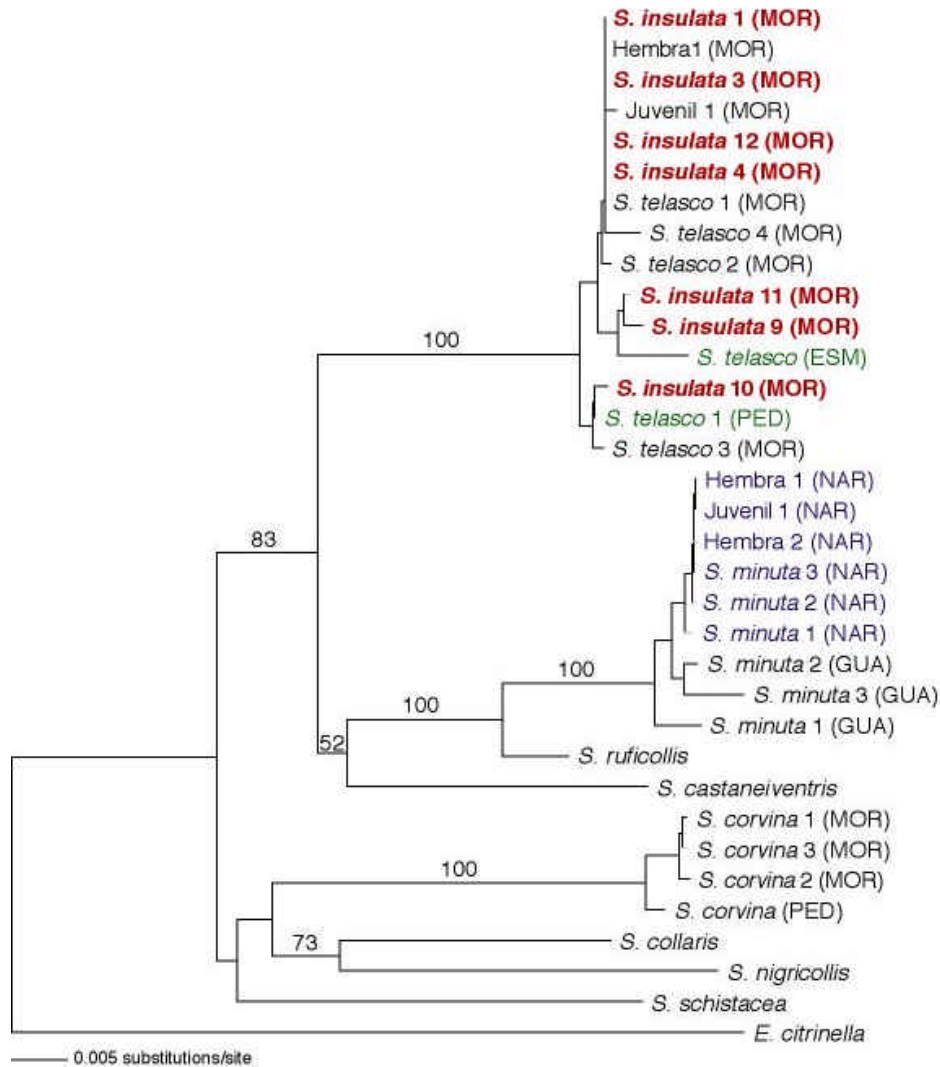


Figura 12. Topología de neighbor-joining con valores de Bootstrap a partir del análisis de CB.

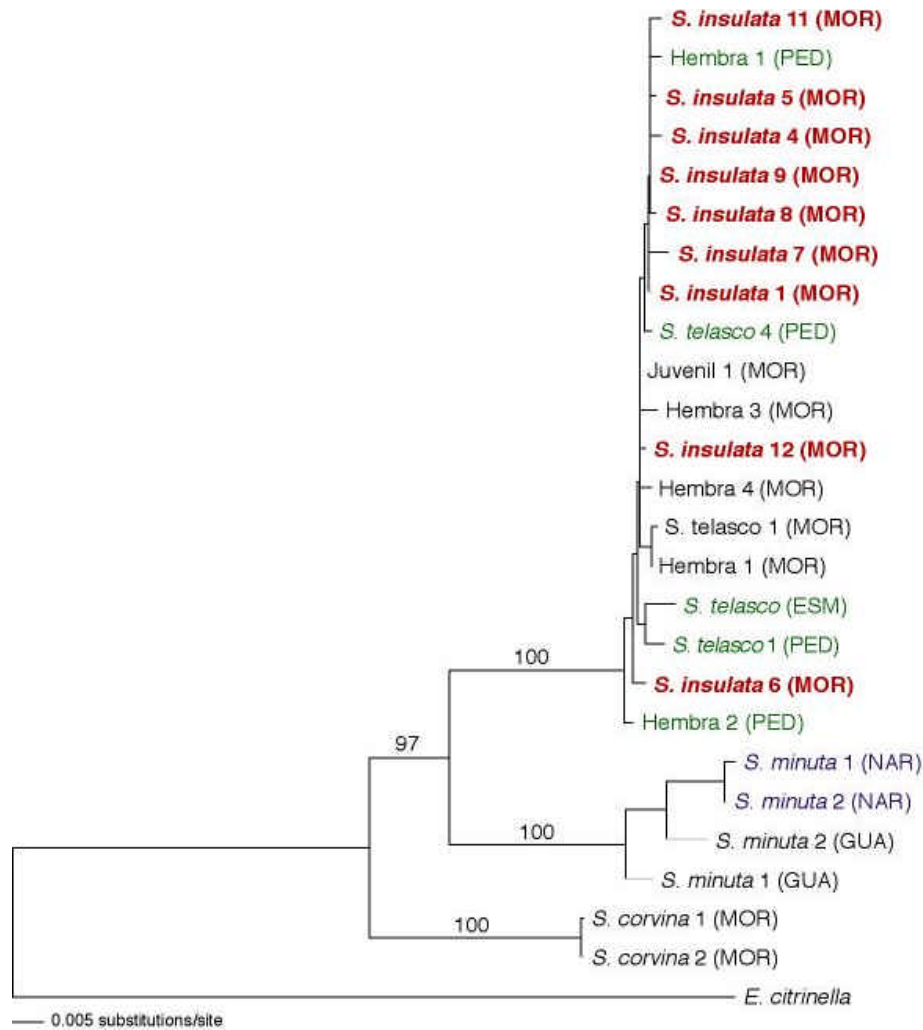


Figura 13. Topología de neighbor-joining con valores de Bootstrap a partir del análisis de CR.

El análisis molecular determina claramente que *insulata* no es una especie válida, pero deja abierta dos posibles hipótesis aún: a) que los individuos agrupados como *insulata* correspondan a una variación fenotípica de *telasco* (Stiles In press), tanto en la coloración del pecho como en la rabadilla (véase Fig. 14a y b); b) que *insulata* corresponda a un híbrido (Ridgely & Tudor 1989). En este caso, sería hibridación unilateral entre hembras de *telasco* y machos de *minuta*, ya que no se encontraron secuencias de *minuta* dentro de los individuos agrupados como *insulata*, como lo demuestran las topologías de las Figuras 12, 13, 15 y 16.

Por otra parte, estos análisis también dejan claro que los individuos capturados en la localidad de El Naranjo, pertenecen a la especie *minuta*, y no a una posible variación fenotípica de *insulata*, como se había planteado (Estela 2000). Las secuencias obtenidas revelan que los individuos *minuta* del Naranjo, se diferencian de los de Guaduas, por dos transiciones G-A en la posición 607 y 709 de los 922 pb secuenciados del gen CB; y dos transiciones T-C en el gen CR (véase Anexo 11 y 12).



Figura 14. Observar las posiciones de a) *S. telasco* 4 (MOR) y b) *S. insulata* 6 (MOR) en las topologías de neighbor-joining y parsimonia.

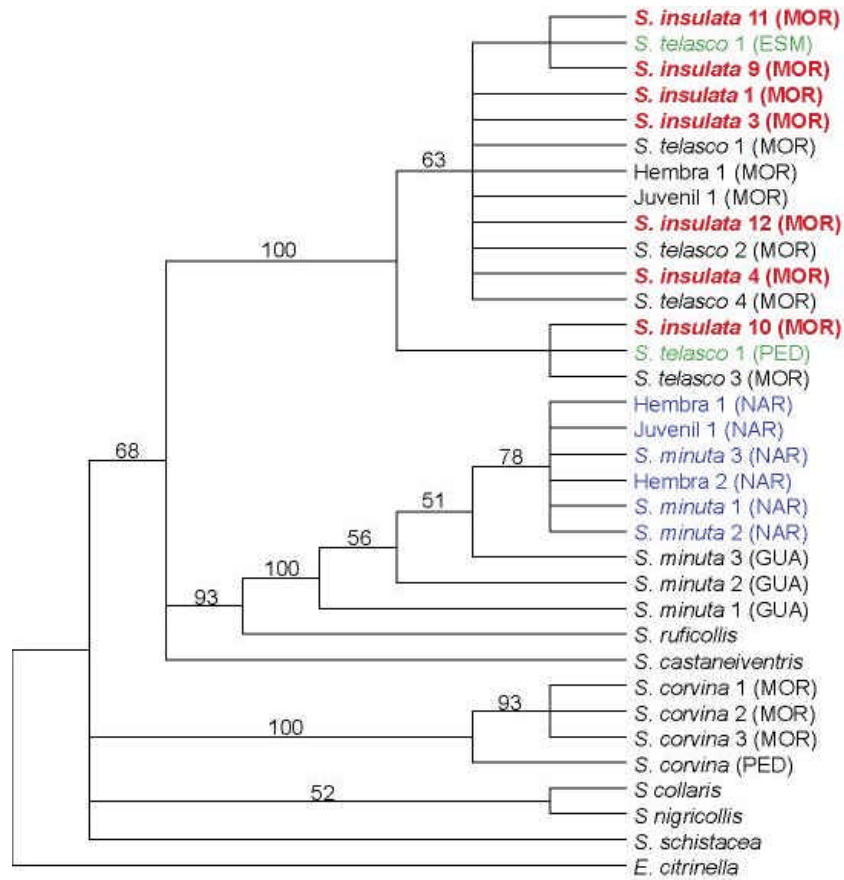


Figura 15. Topología de parsimonia con valores de Bootstrap a partir del análisis de CB.

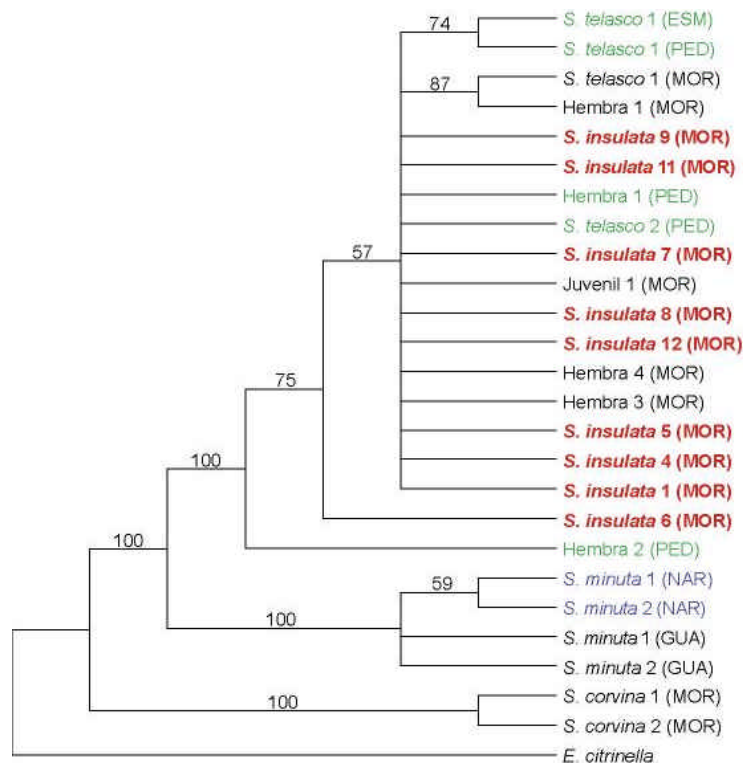


Figura 16. Topología de parsimonia con valores de Bootstrap a partir del análisis de CR.

4.2.4. Distancias Genéticas

Los promedios de las distancias genéticas fueron calculados para estimar la divergencia entre los taxones estudiados (véase Tabla 4, Anexo 13 y 14 distancias genéticas de todos los individuos). Asumiendo una tasa de divergencia de 2% por Millón de años para CB (Mindell 1997, Fleicher et al. 1998), se puede estimar que *telasco/insulata* y *minuta* comenzaron a divergir de un ancestro común hace aproximadamente 3 millones de años, lo cual corresponde al Plioceno en donde se dio lugar a los últimos levantamientos en las cordilleras Colombianas (Bürgl 1960). Por otra parte la divergencia entre *minuta* de la localidad de El Naranjo y Guaduas es de 0.0066 (valor máximo 0.0089), lo cual es similar a la distancia genética dentro de *telasco* (0.0061, valor máximo 0.0121) que incluye individuos de El Morro hasta Pedernales; e inclusive menor a la distancia dentro de *minuta* GUA (0.0078, valor máximo 0.0100).

Tabla 4. Distancias genéticas (promedios) dentro y entre taxones (porcentajes corregidos para CB según el modelo de Tamura-Nei 1896).

| | S.i | S.t | S.i+S.t | S.m NAR | S.m GUA |
|---------|--------|--------|---------|---------|---------|
| S.i | 0.0029 | | | | |
| S.t | 0.0044 | 0.0061 | | | |
| S.i+S.t | - | - | 0.0040 | | |
| S.m NAR | 0.0605 | 0.0612 | 0.0608 | 0.0000 | |
| S.m GUA | 0.0629 | 0.0627 | 0.0631 | 0.0066 | 0.0078 |

S.i = insulata; S.t = telasco; S.i+S.t = se sumaron los dos grupos; S. m = minuta; NAR = Naranjo; GUA = Guaduas.

4.3. Análisis Morfométrico

Los individuos capturados en El Naranjo (NAR) los cuales correspondieron a *minuta*, fueron tratados independientemente de los individuos capturados en Guaduas para comparar así posibles subespecies diferentes; y estos últimos individuos fueron incluidos junto con los especímenes medidos en la colección MHN-ICN dentro del grupo *S. minuta* (COL), los cuales corresponden a la subespecie *minuta* distribuida ampliamente en las cordilleras Colombianas. Los individuos capturados en Esmeraldas fueron incluidos en el grupo *telasco* capturados en El Morro. Las medidas morfológicas tomadas en campo y tomadas en el museo, no tuvieron diferencias aparentes, por lo cual fueron tratadas en conjunto, véase Tabla 5 y Anexo 15.

Tabla 5. Medidas en milímetros (promedio, desviación estándar y tamaño de muestra) de machos de 4 grupos de semilleros. El tamaño de muestreo está entre paréntesis.

| Medidas | <i>insulata</i> | <i>telasco</i> | <i>minuta</i> (NAR) | <i>minuta</i> (COL) |
|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Culmen Total (CT) | 10.9 ± 0.6 (24) | 10.8 ± 0.2 (17) | 10.8 ± 0.3 (10) | 10.1 ± 0.4 (18) |
| Culmen Expuesto (CE) | 9.0 ± 0.3 (24) | 8.8 ± 0.4 (17) | 8.8 ± 0.3 (10) | 8.0 ± 0.4 (18) |
| Culmen Narina (CN) | 6.2 ± 0.2 (24) | 6.2 ± 0.3 (17) | 6.0 ± 0.2 (10) | 5.5 ± 0.3 (18) |
| Comisura (Co) | 7.8 ± 0.4 (21) | 7.6 ± 0.4 (17) | 7.9 ± 0.4 (10) | 7.9 ± 0.2 (3) |
| Altura Pico (AP) | 6.3 ± 0.2 (21) | 6.1 ± 0.2 (17) | 6.2 ± 0.2 (10) | 6.1 ± 0.3 (3) |
| Tarso (LT) | 14.7 ± 0.5 (24) | 14.7 ± 0.6 (17) | 14.3 ± 0.3 (10) | 13.7 ± 0.6 (18) |
| Cuerda Alar (LA) | 51.2 ± 1.5 (24) | 52.0 ± 1.4 (17) | 50.5 ± 1.1 (10) | 50.4 ± 1.5 (18) |
| Cola (LC) | 38.4 ± 1.1 (24) | 39.6 ± 2.3 (16) | 38.7 ± 1.4 (10) | 37.9 ± 1.2 (18) |
| Peso (Pe) | 9.0 ± 0.7 (24) | 8.8 ± 0.5 (16) | 8.3 ± 0.4 (10) | 7.7 ± 0.4 (3) |

4.3.1. Revisión de pieles

Los especímenes que se encuentran depositados en la colección del MHN-ICN catalogados como *telasco/insulata* y capturados en la isla Bocagrande, tienen un patrón de coloración “rojizo” similar a algunos individuos capturados en El Morro. Para el análisis morfométrico, estos individuos fueron ubicados dentro del grupo de machos del taxón *insulata* de El Morro (MOR).

Quince especímenes de *minuta* fueron escogidos al azar y corresponden a diferentes localidades de las cordilleras del país. Los 3 individuos capturados en Guaduas, fueron incluidos en este grupo.

4.3.2. Análisis de varianza (ANOVA - una vía)

Cuando se realizó el análisis con las variables comisura y altura del pico, se excluyó *minuta* (COL) debido que no se tienen suficientes datos para este grupo. Estas dos variables no presentaron diferencias significativas entre los tres taxones estudiados ($P > 0.05$). Los promedios (véase Tabla 5) son muy similares al encontrado para *minuta* (COL).

Las variables restantes si presentaron diferencias significativas entre los grupos formados (véase Tabla 6). Las medidas del pico y tanto como las del tarso, tuvieron una diferencia significativa muy alta ($P < 0.001$); la longitud de la cuerda alar tuvo una diferencia significativa alta ($P < 0.01$); y la longitud de la cola y el peso también tuvieron una diferencia significativa pero menor ($P < 0.05$).

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza de medidas morfológicas. α = variables donde no se incluyó el taxón *minuta* (COL). Valores p en negrilla indican diferencias significativas entre grupos.

| Medidas | F | Valor crítico | p | n |
|---------------------------|-------|---------------|---------------------|----|
| Culmen Total (CT) | 13.80 | 6.11 | P < 0.001 | 65 |
| Culmen Expuesto (CE) | 30.01 | 6.11 | P < 0.001 | 65 |
| Culmen Narina (CN) | 30.08 | 6.11 | P < 0.001 | 65 |
| Comisura α (Co) | 1.81 | 3.20 | $P > 0.05$ | 45 |
| Altura pico α (AP) | 2.08 | 3.20 | $P > 0.05$ | 45 |
| Tarso (LT) | 15.26 | 6.11 | P < 0.001 | 65 |
| Cuerda Alar (LA) | 4.33 | 4.09 | P < 0.01 | 65 |
| Cola (LC) | 3.51 | 2.75 | P < 0.05 | 64 |
| Peso α (Pe) | 4.26 | 3.20 | P < 0.05 | 47 |

4.3.3. Prueba de Tukey

Para las variables de CT, CE, CN y LT se encontró una diferencia significativa muy alta ($P < 0.001$) entre *minuta* (COL) y los tres grupos restantes, salvo para la variable LT entre *minuta* (COL) y *minuta* (NAR), que igualmente fue significativo pero en menor proporción ($P < 0.05$), véase Tabla 7. En cuanto a la longitud de cuerda alar (LA), *minuta* (NAR) y *minuta* (COL), tuvieron diferencias significativas únicamente con *telasco* ($P < 0.05$ y 0.01 respectivamente). La longitud de la cola (LC) solo tuvo diferencias significativas entre *minuta* (COL) y *telasco* ($P < 0.05$). Solo entre *insulata* y *minuta* (NAR) el peso tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$).

Claramente se observa que no existen diferencias significativas entre los grupos *insulata* y *telasco* para las medidas morfológicas tomadas, como también en la mayoría de variables entre *minuta* (NAR) y los primeros grupos nombrados. Por otra parte, existe incongruencia en las comparaciones entre *minuta* con *telasco* e *insulata*. Considerando que *insulata* no es significativamente diferente de *telasco*, y suponiendo que *insulata* es una variación fenotípica de *telasco*, se hubiera esperado encontrar concordancia de estos dos grupos con las diferencias encontradas tanto con *minuta* (NAR) como con *minuta* (COL). Sin embargo a pesar de haber incongruencias en las variables LA, LC y Pe, y de no haber encontrado diferencias significativas entre *insulata* y *telasco*, no podemos descartar ninguna de las posibles hipótesis restantes.

Se observó una clara y gran diferencia significativa de *minuta* (COL) con *minuta* (NAR), en las medidas del pico y la longitud del tarso. La variable del peso no es concluyente ya que fueron solo pesados 3 individuos del grupo *minuta* (COL). Los individuos *minuta* (NAR) son más grandes tanto en el tamaño del pico, como en el tarso. Esto permite indicar que *minuta* de la localidad del Naranjo se trata posiblemente de una nueva subespecie hasta ahora no descrita.

Tabla 7. Resultados prueba de Tukey.

| Grupo / Variable | CT | CE y CN | LT | LA | LC | Pe α |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| S.i vs S.t | NO DF | NO DF | NO DF | NO DF | NO DF | NO DF |
| S.i vs S.m (NAR) | NO DF | NO DF | NO DF | NO DF | NO DF | P < 0.05 |
| S.t vs S.m (NAR) | NO DF | NO DF | NO DF | P < 0.05 | NO DF | NO DF |
| S.m (COL) vs S.m (NAR) | P < 0.005 | P < 0.001 | P < 0.05 | NO DF | NO DF | - |
| S.m (COL) vs S.i | P < 0.001 | P < 0.001 | P < 0.001 | NO DF | NO DF | - |
| S.m (COL) vs S.t | P < 0.001 | P < 0.001 | P < 0.001 | P < 0.01 | P < 0.05 | - |

α = variables donde no se incluyó el taxón *S. minuta* (COL). S.i = *Sporophila insulata*, S.t = *S. telasco*, S.m (NAR) = *S. minuta* Naranjo y S.m (COL) = *S. minuta* Colección. En negrilla se indican los grupos con diferencias significativas. CT = culmen total, CE = culmen expuesto, CN = culmen narina, LT = longitud tarso, LA = longitud cuerda alar, LC = longitud cola y P = peso. NO DF = No hay Diferencia Significativa.

4.3.4. Análisis Multivariante

Se llevó a cabo un análisis multivariante discriminante con el objetivo de encontrar que variables causan la mayor separación entre los grupos. Se incluyeron los grupos *insulata*, *telasco*, *minuta* (NAR) y *minuta* (COL). Para este análisis se excluyeron las siguientes variables: comisura (Co) y altura del pico (AP), las cuales no presentaron diferencias significativas en el análisis de varianza; además la variable peso (Pe), fue excluida porque para *minuta* (COL) no existe información.

Previamente se realizó un análisis de correlación entre variables para hallar posible multicolinealidad entre las variables analizadas, lo cual causa problemas de mal interpretación de las funciones halladas dentro del análisis discriminante. Las variables con valores por encima de 0.7 indican correlaciones altas y así mismo multicolinealidad, por lo cual se deben eliminar algunas variables implicadas. El valor más alto encontrado fue entre CE y CN igual a 0.67, lo que indica que es apropiado usar todas las variables escogidas.

El análisis multivariante discriminante muestra que la primera función obtenida tiene un valor $P < 0,0000$, lo que significa que tiene un alto valor significativo para separar los grupos. Las dos funciones restantes no tienen un buen soporte estadístico (véase Tabla 9a y b y Fig. 17).

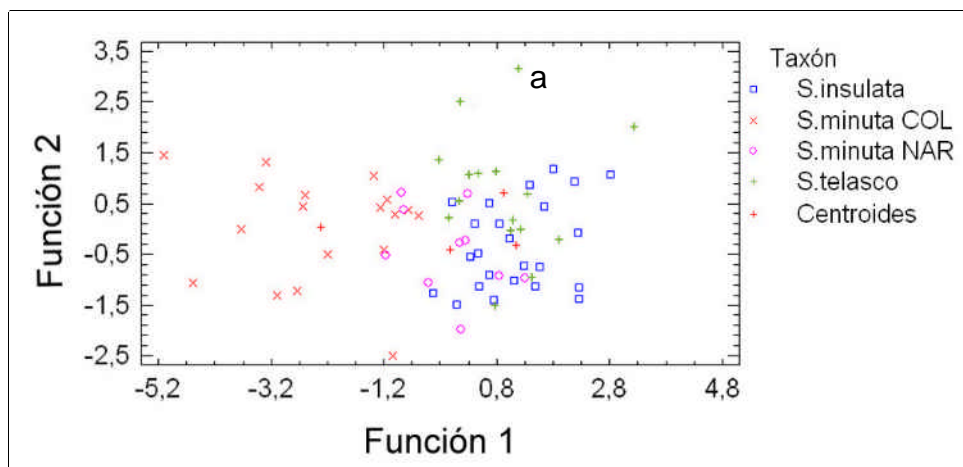


Figura 17. Cuadro de funciones discriminates. Incluye la especie *minuta* (COL).

Tabla 9 a y b. Funciones derivadas en el análisis discriminante para los taxones: *insulata*, *telasco*, *minuta* (NAR) y *minuta* (COL).

Tabla 9a.

| Función Discriminante | Eigenvalue | Porcentaje Relativo | Correlación Canónica |
|-----------------------|------------|---------------------|----------------------|
| 1 | 2,21616 | 88,79 | 0,83010 |
| 2 | 0,190925 | 7,65 | 0,40040 |
| 3 | 0,088766 | 3,56 | 0,28553 |

Tabla 9b.

| Función Derivada | Wilks Lambda | Chi-Square | DF | Valor P |
|------------------|--------------|------------|----|---------------|
| 1 | 0,239797 | 88,5338 | 18 | 0,0000 |
| 2 | 0,771225 | 16,1061 | 10 | 0,0966 |
| 3 | 0,918471 | 5,2728 | 4 | 0,2604 |

Existe una gran dispersión de algunos individuos *telasco*, que puede ser causado por valores extremos en una o más de sus variables, p.ej. el individuo *a* que corresponde a *telasco* 1 (ESM) (véase Fig. 17 y Anexo 15) tiene la longitud alar igual a 56, el valor más extremo del grupo. Por otra parte, la variable CN fue la que presentó el mayor peso para separar los grupos con respecto a las variables restantes según los coeficientes estandarizados (véase Tabla 10).

Tabla 10. Coeficientes estandarizados para la primera y segunda función derivada.

| Variable | 1 | 2 |
|----------|-----------------|-----------|
| CE | 0,313954 | -0,829312 |
| CN | 0,511632 | 0,231956 |
| CT | 0,133759 | 0,0531694 |
| LC | -0,241163 | 0,556629 |
| LA | 0,3664 | 0,41753 |
| LT | 0,396861 | 0,463059 |

4.4. Análisis Coloración del Plumaje

Se comparó la coloración “rojiza” de las partes inferiores y la rabadilla de los individuos machos colectados en El Morro, incluyendo los 3 especímenes colectados en Bocagrande en 1996, depositados en la colección del MHN-ICN.

Se identificaron 4 colores según la guía de colores de Smithe (1975, 1981) que se pueden diferenciar en las pieles colectadas:

1. Burnt Sienna 132 (BS132): color similar al marrón “chestnut” pero más oscuro. Presente en la mayoría de individuos *telasco*.
2. Chestnut 32 (C32): color marrón. Presente en pocos individuos del grupo *insulata* y algunos individuos *telasco*.
3. Intermedio entre Raw Sienna 136 y Chestnut 32 principalmente con tendencia hacia el primer color, color no identificado en la guía de colores, parece un color rojo oscuro. Presente en la mayoría de individuos del grupo *insulata*.
4. Raw Sienna 136 (RS136): color similar al leonado “tawny”. Presente en *S. minuta* (COL) y (NAR).

Puesto que no se colectó ningún individuo en la localidad de El Naranjo, no se puede asegurar que la coloración sea idéntica a la observada en el individuo colectado en Guaduas. De acuerdo a las fotografías tomadas y analizadas, todos los individuos de El Naranjo, tuvieron una coloración similar al leonado (Raw Sienna 136), véase Figura 19. Se realizó un análisis detallado de las fotografías tomadas en campo para identificar la coloración de cada individuo macho (véase Tabla 11), en total se analizaron 45 individuos entre especímenes y fotografías.



Figura 19. *Sporophila minuta* de la localidad de El Naranjo, este individuo corresponde a *S. minuta* 2 (NAR).

Todos los individuos dentro del grupo *telasco*, presentaron coloración marrón (C32) y marrón oscuro (BS132) en la garganta. Las demás partes inferiores como la rabadilla, presentaron una coloración blancuzca. La banda blanca a través de la rabadilla de todos los individuos analizados en colección y fotos ($n = 11$) era delgada, excepto en uno, el cual tenía las coberteras supracaudales blancuzcas posiblemente debido a su estado aún inmaduro (véase Fig. 20a y b). Solo hay dos individuos machos colectados que se encuentran en la

colección, la banda blanca mide 5 mm. Los individuos capturados en El Naranjo, presentaron la rabadilla “rojiza” gruesa, aproximadamente tres (3) a cuatro (4) veces mayor al grosor de la rabadilla de *telasco*. Los juveniles presentaron la rabadilla parcialmente coloreada (véase Fig. 21a y b). El largo de la rabadilla “rojiza” de varios individuos *minuta* analizados (n = 15) en la colección, oscila entre 19 y 26mm (promedio = 22.9mm). Esta medida debe ser similar para los individuos *minuta* de El Naranjo, los cuales no fueron medidos.

Tabla 11. Comparación de colores “rojizos” presentes en las partes inferiores y la rabadilla de los grupos estudiados según la guía de colores de Smithe (1975, 1981).

| Taxón/ Color | BS132 | C32 | RS136/C32 | RS136 | N° individuos |
|-----------------------|-------|-------|-----------|--------|---------------|
| <i>insulata</i> (MOR) | - | 4 | 15 (2) | - | 19 |
| <i>insulata</i> (BOC) | - | 1 (1) | 2 (2) | - | 3 |
| <i>telasco</i> | 9 (4) | 4 | - | - | 13 |
| <i>minuta</i> (NAR) | - | - | - | 10 (0) | 10 |
| | | | | Total | 45 |

BS132 = Burnt Sienna 132, C32 = Chestnut 32, RS136 = Raw Sienna 136 y RS136/C32 = color intermedio entre RS136 y C32. No hay especímenes de *S. minuta* (NAR), las fotografías fueron comparadas con especímenes de la misma especie en el MHN-ICN. Números entre paréntesis indican el número de especímenes en la misma colección ornitológica.



Figura 20. Vista dorsal para mostrar longitud de la banda blanca de la rabadilla de *S. telasco* de El Morro; a: macho adulto; b: macho inmaduro. Nótese coberteras supracaudales (flecha) y café claro sobre el dorso y bordes de las remeras.

Los individuos agrupados como *insulata* presentaron variación en el patrón de coloración de las partes inferiores y la rabadilla, y así mismo en la longitud de esta última. Se analizaron 19 individuos machos, de los cuales 5 no presentaron una clara coloración blancuzca ni “rojiza” en la rabadilla, posiblemente por ser inmaduros o quizá no hayan expresado ni coloración rojiza, ni blancuzca; otros no tenían coberteras en esta zona porque presentaban el plumaje bastante desgastado (véase Fig. 22a y b). De los individuos que se encuentran en la colección, 4 tienen plumaje en el dorso como adultos, uno de ellos no tiene plumas supracaudales y la parte inferior de la rabadilla, los otros individuos son aunque son machos, presentan plumaje aún de juveniles, por lo cual no se tuvieron en cuenta. La

medida del largo de la banda blanca en la rabadilla de los tres machos analizados es de 10 a 12mm (promedio = 11mm).

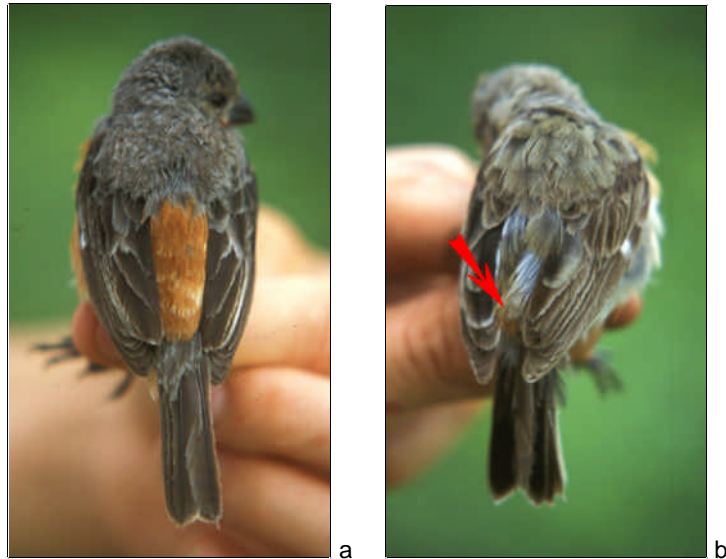


Figura 21. Vista dorsal para mostrar ancho de la rabadilla de *S. minuta* de El Naranjo, PNN Sanquianga; a: macho adulto; b: macho inmaduro.

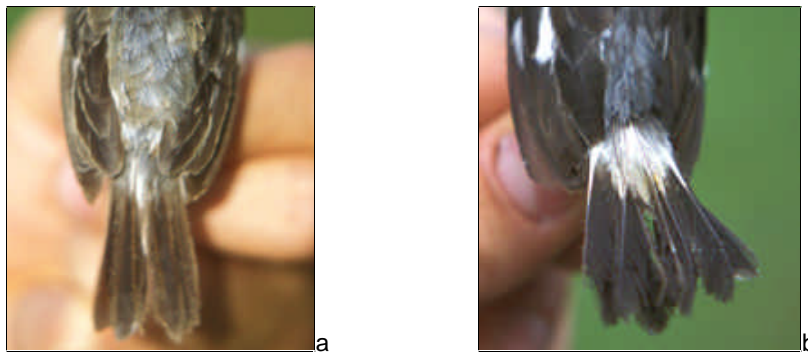


Figura 22. Vista dorsal de individuos *insulata*, 16 y 17 (MOR) respectivamente; a: no presenta coloración blancuzca o rojiza definida. b: no presenta coberteras supracaudales, ni coloración diferente al gris en la rabadilla.

Por otra parte, 4 individuos presentaron rabadilla totalmente “rojiza” como los individuos de *minuta* (véase Fig. 23), lo cual no había sido reportado antes. Solo un individuo con este patrón está colectado (ICN-34257), y el largo de su rabadilla mide 21mm. Los individuos restantes (10), presentaron rabadilla con banda delgada, tanto rojiza (4 individuos), como blancuzca (6 individuos). Dentro de estos últimos individuos, la banda también presentó pintas “rojizas” en dos individuos (véase Fig. 24 a, b y c).

Se realizó una comparación entre los individuos *insulata* analizados anteriormente según el tamaño y color de la rabadilla con la proporción o porcentaje de coloración “rojiza” de las partes inferiores. Se asignaron los siguientes porcentajes por cada zona de las partes inferiores: 10% para la garganta, 40% para el pecho, 40% para el vientre y 10% para las

coberteras infracaudales. También se asignó un porcentaje subjetivo, si las plumas presentaban coloración “rojizo” y blancuzco a la vez.



Figura 23. Vista dorsal de individuo *insulata* 9 (MOR).

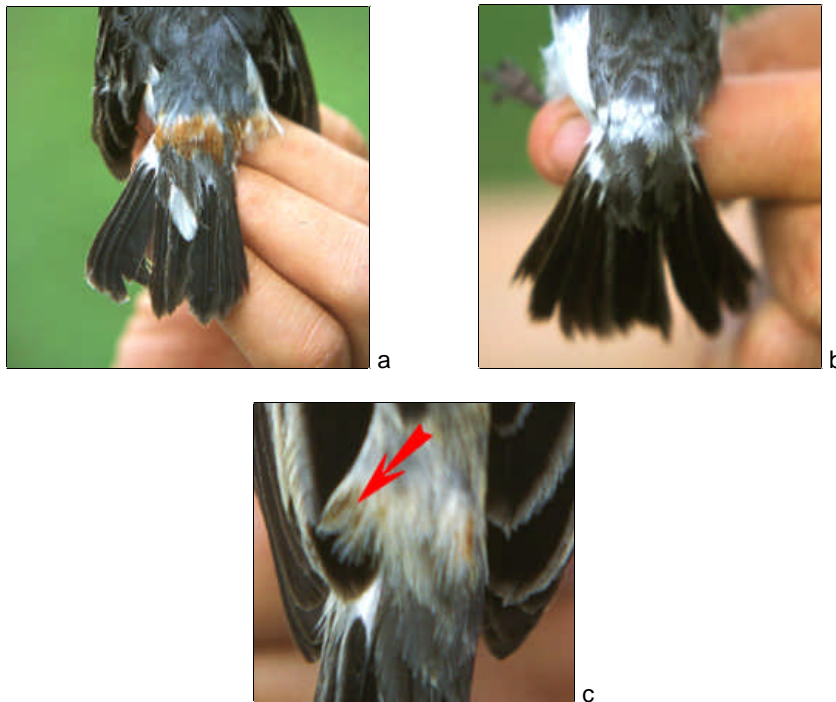


Figura 24. Vista dorsal individuos *insulata* 2, 7 y 12 (MOR) respectivamente, mostrando rabadilla; a: rabadilla “rojiza”; b: rabadilla blancuzca; y c: rabadilla blancuzca con pintas “rojizas”.

Los individuos con rabadilla totalmente rojiza (4/14), presentaron un 70% a 100% de coloración “rojiza” en las partes inferiores (véase Fig. 25). Los individuos con banda delgada y blanca en la rabadilla, con o sin pintas “rojizas” (6/14), presentaron coloración entre 15% a 35%, desde la garganta hacia las demás partes inferiores (véase Fig. 26). Los individuos con

banda delgada y "rojiza" (4/14), presentaron coloración "rojiza" entre el 35% al 100% en las partes inferiores (véase Fig. 27).



Figura 25. *S.insulata*11 (MOR).



Figura 26. *S.insulata* anillo dno.



Figura 27. *S.insulata*4 (MOR).

5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis Filogenético

Los resultados moleculares y los análisis filogenéticos revelaron que los individuos capturados en la localidad de El Naranjo corresponden a *minuta* y no a *insulata* como se habían determinado previamente en la Expedición Calidris PNN Sanquianga 2000 (Estela 2000). Ningún individuo fue colectado ya que el permiso de colecta fue negado. Pese a esto, con los individuos capturados y observados en campo, se notó que su coloración “rojiza” era totalmente diferente a los individuos capturados en El Morro. Los machos adultos presentan las partes inferiores y la rabadilla completamente “rojizas”, y los machos juveniles presentan un cambio de muda uniforme en todo el cuerpo. Por otra parte, todos los individuos machos presentan la base de la cola blanca. El análisis filogenético junto con estas características fenotípicas indican claramente que los individuos de la población de El Naranjo corresponden a *minuta*; posiblemente a la subespecie *parva* o una subespecie aún no descrita. Es importante comparar genéticamente los *minuta* (NAR), con la subespecie *parva*, para determinar si se trata de la misma subespecie.

Así se puede concluir que *insulata* esta restringida al área de Tumaco, y por otro lado la hipótesis planteada por Ridgely & Tudor (1989) tiene mayor soporte, ya que la distribución de *minuta* en la Costa Pacífica Colombiana, es mayor a lo que estaba reportado (Ortiz von Halle, 1990, Ridgely & Greenfield 2001, Alejandro Rico com. pers. 2003).

Las topologías tanto de neighbor-joining y parsimonia, revelan un clado común para *insulata* con *telasco* (véase Fig. 12, 13, 15 y 16); lo cual permite afirmar que *insulata* no es un taxón válido. Sin embargo este resultado deja abierta nuevamente dos hipótesis. La hipótesis planteada por Stiles (In press) quién propone que *insulata* corresponde a una variación fenotípica de *telasco*, sigue siendo válida con este resultado; y así mismo puede ocurrir que *insulata* corresponda a híbridos de hembras *telasco* x machos *minuta*, y no viceversa, es decir a un cruce unilateral, ya que no se encontró haplotipos de *minuta* en individuos *insulata*. Inclusive *insulata* podría corresponder a un taxón recién separado de *telasco*, compartiendo aún haplotipos, pero el contacto y flujo genético evidente que existe entre *insulata* y *telasco*, evitaría algún evento de especiación y separación reproductiva. Todos los individuos agrupados como *insulata* de la localidad El Morro, presentaron secuencias casi idénticas para el gen CB y CR (algunas se diferencian solo por las mutaciones individuales o haplotipos compartidos para CR) con respecto a *telasco* de la isla El Morro, como aquellos de las localidades Ecuatorianas (véase Anexo 11 y 12).

La distancia genética existente dentro de *minuta* (El Naranjo+Guaduas), similar a la encontrada dentro de *telasco* y localmente dentro de *minuta* de la localidad de Guaduas, sugieren que existe una gran variabilidad intraespecífica dentro del género *Sporophila* lo cual dificulta aún más definir límites entre que es una subespecie o una especie aparte. Por ejemplo Baker y colegas (2003) sugieren tratar a *Icterus spurius spurius* e *I.s.fuertesii*, como dos especies totalmente diferentes, las cuales según sus resultados compartieron un ancestro común desde hace solo 200.000 años. Cabe anotar que estas poblaciones se pueden diferenciar fenotípica, geográfica y etológicamente. Existe gran diferencia comparando este dato con los resultados encontrados entre los *Sporophila* estudiados e intraespecíficamente, lo que dirige a la pregunta ¿Cómo definir límites entre subespecies y especies usando marcadores moleculares?.

5.2. Análisis Morfométrico

No se encontraron diferencias significativas entre los machos *insulata* y *telasco* en ninguna de las variables analizadas, como se ejemplifica en el plot del análisis discriminante (véase Fig. 17). Sin embargo, comparando *insulata* vs. *minuta* y *telasco* vs. *minuta*, se encontraron diferencias significativas por un lado y por otro no (véase Tabla 7). Sin embargo, esto puede ocurrir, más aún cuando variables como LA y LC las cuales pueden tener gran variación entre individuos del mismo grupo y causar así diferencias significativas o no entre grupos cuando uno espera lo contrario. Así mismo los datos pueden llegar a ser incongruentes cuando se mezclan mediciones de campo con mediciones de museo, pero en este caso solo tres individuos *insulata* colectados fueron incluidos dentro del grupo respectivo, y sus medidas estuvieron dentro del promedio. La variable Peso por otra parte, no es una buena variable que pueda diferenciar especies de similar tamaño, ya que puede variar en el tiempo rápidamente, y pequeñas diferencias impiden buena resolución. Por lo tanto, los resultados morfométricos no permiten concluir ninguna de las hipótesis que quedan por resolver.

Por otro lado, las diferencias entre *minuta* (NAR) y *minuta* (COL) son aún más claras. Existen diferencias significativas en las medidas del pico CT, CE, CN, así como LT. El análisis discriminante permite ver que la variable CN tiene el mayor peso para separar los grupos taxonómicos estudiados. Las medidas morfológicas de los individuos de El Naranjo son mayores que los individuos de la subespecie *minuta*, como se ejemplifica en el análisis discriminante. Por otra parte los *S. minuta* del Naranjo presentan en la base de la cola coloración blanca. Solamente la subespecie *parva* presenta esta última característica, salvo dos individuos examinados por Meyer de Schauensee (1952) de las localidades de Santa Marta y Honda, en Colombia. La descripción y medidas morfológicas de subespecie *minuta centralis* descrita en 1918 (Bangs & Penard 1918) y considera como subespecie *minuta* por Meyer de Schauensee (1952), tampoco concuerda con las características presentes en la población de El Naranjo. El tamaño del pico de la subespecie *parva*, también es mayor a la subespecie *minuta* y *centralis*, pero sin embargo es menor a los *minuta* de El Naranjo. La subespecie *parva* se encuentra distribuida desde la vertiente Pacífica de México en Nayarit hasta Nicaragua a lo largo de la vertiente Pacífica de Centroamérica (Meyer de Schauensee 1952).

Por estas razones, se propone que los individuos de El Naranjo, corresponden a la subespecie *parva* o a una subespecie no descrita anteriormente. En el primer caso indicaría la extensión de la distribución de *parva* en la vertiente Pacífica. Así mismo se puede sospechar que los individuos observados en las localidades de Isla Ají (Reyes 2002) e Isla Gorgona (Ortiz-Von Halle 1990, A.R. com. pers. 2003), corresponden a la misma subespecie no descrita. Sin embargo, no es posible afirmar lo mismo para los registros de Esmeraldas (Ridgely & Greenfield 2001), los cuales podrían corresponder a la extensión de la subespecie *minuta* desde los Andes Ecuatorianos.

5.3. Análisis de Coloración del Plumaje

La mayoría de los individuos *insulata* (17 de 22 analizados), que presentaron del 15% al 100% la coloración “rojiza” en sus partes inferiores y la rabadilla, tenían un color “rojizo” intermedio entre el marrón Chestnut 32 y el “canela” Raw Sienna 136 de la escala de colores de Smithe (1975, 1981).

Por otra parte, el registro de la rabadilla totalmente “rojiza”, similar a la presente en la especie *minuta*, es una característica importante no registrada anteriormente, que presentaron varios individuos *insulata* capturados, entre ellos uno colectado (ICN-34257).

Este carácter no está reportado para *insulata*, ya que los especímenes depositados en 1912 en el American Museum of Natural History de New York (Chapman 1921), y los individuos colectados por Stiles en 1995, presentan una banda (rojiza en unos o blancuzca en otros), a través de zona inferior de la rabadilla, como aparece en la especie *telasco*. Sin embargo, este nuevo fenotipo podría corresponder a individuos homocigotos, los cuales expresan el fenotipo más extremo de *insulata*, considerándolo una variación fenotípica de *telasco* (F. G. Stiles com. pers.).

Es posible suponer que la coloración “rojiza intermedia” presente en la mayoría de los individuos *insulata*, puede corresponder a la mezcla de pigmentos de *telasco* y *minuta*, producidos en los híbridos. Aunque es poco conocido acerca del control genético y herencia de los colores en el plumaje, se conoce que la presencia, ausencia, o patrones de deposición de los pigmentos es controlado frecuentemente por leyes Mendelianas que se segregan y recombinan en combinaciones previsibles (Gill 1995). De la misma manera, los individuos *insulata* que presentan una gradación de la coloración “rojiza” de las partes inferiores, y así mismo que presentan la rabadilla totalmente “rojiza” (como lo es en *minuta*), una banda blancuzca (como lo es en *telasco*), o una banda “rojiza”, puede estar determinado igualmente por leyes Mendelianas y factores genéticos dominantes de *telasco* sobre *minuta* o viceversa.

Estas especulaciones dirigen hacia la posibilidad que *insulata* corresponda al cruce unilateral entre hembras de *telasco* x machos de *minuta*. Sin embargo, con los datos actuales no es posible afirmar cual subespecie de *minuta* es la que se cruza o se cruzaba con *telasco*, debido a que actualmente no hay reportes de *minuta* en la región de Tumaco.

5.4. Factores de Hibridación

El entrecruzamiento de *telasco* con *minuta* en la región de Tumaco, se puede deber a la destrucción de hábitat en esta región Pacífica que sucedió durante finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX, lo que causó el contacto entre estas dos especies.

Posiblemente factores comportamentales en la formación de parejas, sistemas de apareamiento similares dentro de especies del mismo género o inclusive entre géneros, permite que exista una selección sexual positiva o extra-copulación con otras especies, como sucede entre los saltarines Barbiamarillo y Barbiblanco, o los pinzones de Darwin en Galápagos (véase Parsons et al. 1993, Freeland & Boag 1999). Así mismo, los jóvenes que salen pronto de su nido tienden a ser pájaros promiscuos (Mindell 1997), lo cual puede favorecer que hembras jóvenes *telasco* entren en contacto con machos *minuta* en algún momento, antes de volver a su grupo *telasco*, o por otro lado que individuos machos *minuta* realicen cortejos dentro de la población *telasco*, provocando la cópula interespecífica. Pero porqué no sucede lo contrario?. Posiblemente el sistema de cortejo y fenotipo llamativo presentes en *minuta*, provoca que hembras *telasco* permitan ser copuladas por ellos.

De esta manera, la información sugiere que *insulata* representa la introgresión de genes de *minuta* en la población de *telasco*, debido a una selección sexual positiva. Aunque en la ensenada de Tumaco no existen registros de *minuta*, debe existir alguna zona de contacto permanente cerca a donde se encuentra *insulata*, o quizás solo un evento de hibridación ocurrió en el pasado, provocando una introgresión de genes de *minuta* sobre la población de *telasco*.

Por otra parte, no se encontró una gradación progresiva de la coloración ni introgresión unidireccional, como la que existe entre *Manacus vitellinus* y *M. candei* en Costa Rica (véase Parsons et al. 1993). En el Morro, en donde se capturaron todos los *insulata* del

estudio, se encontraron todos los fenotipos y variaciones posibles, salvo uno: no se observaron individuos con la rabadilla totalmente blanca, lo cual puede estar determinado por una baja frecuencia alélica en la recombinación de genes o quizás factores genéticos que impidan su expresión.

Considerando el primer caso, es decir, el cruce con la subespecie *minuta*, la deforestación desde los Andes Colombianos hacia Tumaco para abrir camino de comunicación, causó posiblemente que la subespecie *minuta* descendiera; de esta manera se cruzaría con *telasco* en la Ensenada de Tumaco mucho antes del descubrimiento de *insulata*, pero a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, la deforestación vía Pasto-Tumaco sería tan poca que esta hipótesis no sería posible.

Para el segundo caso, se plantea que ha habido una población residente de *minuta*, la cual ha estado distribuida en la costa Pacífica Colombiana, pasando desapercibida para muchas exploraciones pioneras del siglo XIX y en la primera mitad del siglo XX. La destrucción del hábitat en la costa Ecuatoriana y Colombiana, puede haber permitido que *telasco* haya extendido su distribución hacia el norte, mientras *minuta* se haya extendido hacia el sur, generando así el entrecruzamiento de ellas en la Ensenada de Tumaco.

Debido a que los genes mitocondriales no permiten observar la existencia de hibridación, es importante realizar secuenciación de genes nucleares en especies con problemas taxonómicos, previos a los mitocondriales.

5.5. Observaciones Ecológicas

Observaciones ecológicas adicionales, permiten plantear una hipótesis ecológica adicional y soportar aún más las conclusiones propuestas acerca del estado taxonómico de *insulata*. En Esmeraldas, como en El Morro, la especie *telasco* estaba asociada principalmente a pastizales como *Panicum* sp. y *Paspalum* spp. (Reyes 2002), los cuales crecen lejos de la zona costera. Por otro lado *minuta* se encontró asociada con la especie *Uniola pittieri*, un pastizal que crece en playas del Pacífico distribuida desde México en Baja California hasta el norte de Perú en Tumbes (Peterson 2001). De esta manera, la destrucción del ecosistema en la Ensenada de Tumaco durante los siglos pasados, pudo haber provocado el contacto entre *minuta* y *telasco* en esta localidad; y rompiendo así la barrera ecológica que las separaba.

Durante la fase de campo, los individuos *insulata* siempre se observaron junto a *telasco* y *corvina* en bandadas de 30 a 40 individuos en pastizales no costeros, o a veces en pequeños grupos o solos cuando se encontraban en pastizales de *Uniola pittieri*. Según la hipótesis propuesta, esto es congruente con los resultados expuestos, ya que son las hembras de *telasco* quienes crían a los híbridos *insulata* y por eso se encuentran estos dos grupos juntos.

5.5. Conservación

El análisis expuesto anteriormente, propone que el Semillero de Tumaco *Sporophila insulata*, es una especie inválida, y la evidencia presentada dirige hacia la hibridación producto del cruce unilateral *telasco* x *minuta*, entre hembras y machos respectivamente. Este trabajo muestra la importancia de la genética de la conservación, como una herramienta que se complementa con información morfológica, fenotípica y ecológica para resolver problemas taxonómicos de especies amenazadas. Aunque *insulata* pierde su estado taxonómico como especie y así mismo como especie críticamente amenazada, se

abren nuevas posibilidades para estudios en evolución e hibridación. Por otra parte, es importante enfatizar las consecuencias que la destrucción de ecosistemas y hábitats puede estar generando, permitiendo que especies hermanas lleguen a entrecruzarse y así provocar progresivamente la pérdida de variabilidad genética de las unidades genéticas, pese a la posible especiación a partir de la hibridación. Estos resultados demuestran que la divergencia de *telasco* y *minuta* (3 millones de años), no es suficiente para evitar el entrecruzamiento de especies separadas hace miles o varios millones de años.

El género *Sporophila*, como muchos otros géneros de aves del Nuevo Mundo, están siendo afectadas genéticamente debido a la destrucción de sus hábitats y barreras ecológicas. Esto puede ocurrir para el taxón amenazado *S. zechili* del noroccidente del cono patagónico, como con el taxón *S. melanops* descrito en 1823 para un solo ejemplar, y del cual no se tienen nuevos registros. Ambos podrían corresponder a híbridos (BirdLife International 2000) debido a entrecruzamientos de especies que posiblemente fueron alopátricas en algún momento y que debido a la deforestación, nuevamente se encontraron.

6. CONCLUSIONES

1. Se propone que el Semillero de Tumaco *Sporophila insulata* NO es un taxón válido, y posiblemente corresponde a híbridos entre machos de *S.minuta* y hembras de *S.telasco*, como lo dirigen los resultados genéticos y fenotípicos.
2. No es posible afirmar cual subespecie de *S.minuta* es quién está cruzándose con *S.telasco*, si fuera el caso.
3. Los individuos identificados en El Naranjo, corresponden al Semillero Ladrillo *S.minuta* y NO a *S.insulata* como se habían asignado en pasadas exploraciones.
4. Posiblemente *S.minuta* de la localidad del Naranjo corresponde a la subespecie *parva* o a una subespecie no descrita hasta ahora.
5. La distribución de *S.insulata* se limita al área alrededor de Tumaco.
6. Siendo *S.insulata* un híbrido o una variación fenotípica de *telasco*, Colombia reduce su riqueza en avifauna, así como el número de aves críticamente amenazadas.

7. REFERENCIAS

- Baena, A. 1999. Determinación de las relaciones filogenéticas entre los géneros *Basileuterus* (Parulidae) y *Hemispingus* (Thraupidae): Evidencia de ADNmt, citocromo b. Tesis para optar el título de biólogo, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Baker, A. J. and H. D. Marshall. 1997. Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution. Pp. 51-82 in D. P. Mindell, ed. Avian molecular evolution and systematics. Academic Press, San Diego.
- Baker, J.M., E. López-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 spurius* and *Icterus spurius fuertesi*. The Auk, 120: 848-859.
- Bangs, O. and T. E. Penard. 1918. Notes on collection of Surinam birds. Bulletin of the Museum of Comparative Zoology. 62: 90.
- BirdLife International. 1992. Aves amenazadas de las Américas (Libro Rojo de BirdLife International/UICN). Cambridge, UK: BirdLife International.
- BirdLife International. 2000. Threatened birds of the world. Barcelona and Cambridge, UK: Lynx Edicions and BirdLife International. *Sporophila insulata*. In: IUCN 2003. 2003 IUCN Red List of Threatened Species.
- Brumfield, R.T. and J.V. Remsem Jr. 1996. Geographic variation and species limits in *Cinnycerthia* wrens of the Andes. Will. Bull. 108: 205-227.
- Bürgl, H. 1960. Historia geológica de Colombia. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fís. Natur. 11: 137-191.
- Burns, K.J., Hackett, S.J. and Klein, N.K. 2002. Phylogenetic relationships and morphological diversity in Darwin's finches and their relatives. Evolution 56: 1240-1252.
- Cadena, C. D., A. M. Cuervo & S. M. Lanyon. In revision. Phylogenetic Relationships of the Red-bellied Grackle (Icteridae: *Hypopyrrhus pyrohypogaster*) Inferred From Mitochondrial DNA Sequence Data. Condor.
- Cardoso, J. M. 1999. Seasonal movements and conservation of seedeaters of the genus *Sporophila* in South America. pp 272-280. In: Vickery, P. D. and J. R. Herkert (eds). 1999. Studies in avian biology: Ecology and Conservation of Grassland Birds of the Western Hemisphere, 19.
- Chapman, F. M. 1921. Descriptions of proposed new birds from Colombia, Ecuador, Peru and Brazil. American Museum Novitates. N°18: 12.
- Desjardins, P. and Morais, R. 1990. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. J. Mol. Biol. 212: 599-634.
- Ellegren, H. 1991. DNA typing of museum birds. Nature, 354: 113.
- Estela, F. 2000. El semillero de Tumaco en la costa de Nariño, Colombia. Calidris, Asociación para el estudio y conservación de las aves acuáticas de Colombia. Boletín informativo N° 7.
- Fleischer, R. C., C. E. McIntosh, and C. L. Tarr. 1998. Evolution on a volcanic conveyor belt: using phylogeographic reconstructions and K-Ar-based ages of the Hawaiian Islands to estimate molecular evolutionary rates. Molecular Ecology, 7: 533-545.
- Freeland, J. R. and P. T. Boag. 1999. Phylogenetics of Darwin's finches: paraphyly in the tree-finches, and two divergent lineages in the warbler finch. The Auk, 116: 577-588.
- Friesen, V. L., D. J. Anderson, T. E. Steeves, H. Jones, and E. A. Schreiber. 2002. Molecular support for species status of the Nazca Booby (*Sula granti*). The Auk, 119: 820-826.
- Gaunt, A. S., L. W. Oring, K. P. Able, D. W. Anderson, L. F. Baptista, J. C. Barlow y J. C. Wingfield. 1997. Guía para la utilización de aves silvestres en investigación. Segunda edición. Publicación especial por The Ornithological Council, Washington, D.C.
- GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Gilbert, D. G. 1996-1998. SeqPup, biosequence editor and analysis software for molecular biology. Bionet Software, July 1996. <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/seqpup/>

- Gill, F. B. 1995. Ornithology. W. H. Freeman and Company. New York.
- Grapputo, A., A. Pilastro, A. J. Baker and G. Marin. 2001. Molecular evidence for phylogenetic relationships among buntings and American sparrows (Emberizidae). *J. Avian Biol.*, 32: 95-101.
- Griffiths, C. S. 1999. Phylogeny of the Falconidae inferred from molecular and morphological data. *The Auk*, 116: 116-130.
- Hackett, S. J. and K. V. Rosenberg. 1990. Comparison of phenotypic and genetic differentiation in South American antwrens (Formicariidae). *The Auk*, 107: 473-489.
- Hackett, S. J. 1996. Molecular phylogenetics and biogeography of tanagers in the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 368-382.
- Hair J. F., R. E. Anderson, R. L. Tatham and W. Black. 1998. Multivariate data analysis. Fifth edition. Prentice Hall College, New Jersey.
- Harlid, A. and Arnason, U. 1999. Analyses of mitochondrial DNA nest ratite birds within the Neognathae-supporting a neotenuous origin of ratite morphological characters. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 266, 305-309
- Hedges, S. B. and C. G. Sibley. 1994. Molecules vs. morphology in avian evolution: the case of the "pelecaniform" birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91: 9861-9865.
- Hilty, S. L. 1985. Distributional changes in the Colombian avifauna: a preliminary blue list. *Neotropical Ornithology, Ornithological Monographs*, 36: 1000-1012.
- Hilty, S. L. and W. L. Brown. 1986. A guide to the birds of Colombia. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Klicka, J., R. M. Zink, J. C. Barlow, W. B. McGillivray and T. J. Doyle. 1999. Evidence supporting the recent origin and species status of the Timberline Sparrow. *The Condor*, 101: 577-588.
- Klicka, J., K. P. Johnson and S. M. Lanyon. 2000. New world nine-primaried oscine relationships: constructing a mitochondrial DNA framework. *The Auk*, 117: 321-336.
- Lee, P. L., D. H. Clayton, R. Griffiths and R. D. M. Page. 1996. Does behavior reflect phylogeny in swiftlets (Aves: Apodidae)? A test using cytochrome b mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 7091-7096.
- Lee, P. L. M., L. J. Richardson and R. B. Bradbury. 2001. The phylogenetic status of the Corn Bunting *Miliaria calandra* based on mitochondrial control-region DNA sequences. *Ibis*, 143: 299-303.
- Leeton, P., L. Christidis and M. Westerman. 1993. Feathers from museum bird skins – a good source of DNA for phylogenetic studies. *The Condor*, 95: 465-466.
- Livezey, B. C. 1986. A phylogenetic analysis of recent anseriform genera using morphological characters. *The Auk*, 103: 737-754.
- McGarigal K., S. Cushman and S. Stafford. 2000. Multivariate statistics for wildlife and ecology research. Springer-Verlag New York.
- Marsden J. E. and B. May. 1984. Feather pulp: a non-destructive sampling technique for electrophoretic studies of birds. *The Auk*, 101: 173-175.
- Meyer de Schauensee, R. 1952. A review of the genus *Sporophila*. *Proc. Acad. Natl. Sci. Phila.*, 104: 153-196.
- Mindell, D. P. (ed). 1997. Avian molecular evolution and systematics. Academic Press. San Diego.
- Mindell, D. P., M. D. Sorenson and D. E. Dimcheff. 1998. Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 10693-10697.
- Ortiz-Von Halle, B. 1990. Adiciones a la avifauna de Colombia de especies arribadas a la isla Gorgona. *Caldasia*, 16: 209-214.
- Ouellet, H. 1992. Speciation, zoogeography, and taxonomic problems in the Neotropical genus *Sporophila* (Aves: Emberizinae). *Bull. Brit. Ornithol. Cl.*, 112A Suppl: 225-235.

- Parsons T. J., S. L. Olson and M. J. Braun. 1993. Unidirectional spread of secondary sexual plumage traits across an avian hybrid zone. *Science*, 260: 1643-1646.
- Peterson, P. M. 2001. *Uniola*. In Catalogue of New World Grasses (Poaceae): II. Subfamily Chloridoideae. Contributions from the United States National Herbarium. 41: 232-233.
- Remsen, J. V. Jr. 1984. Geographic variation, zoogeography, and possible rapid evolution in some *Cranioleuca* Spinetails (Furnariidae) of the Andes. *Will. Bull.*, 96: 515-523.
- Renjifo, L. M., A. M. Franco-Maya, J. D. Amaya-Espinel, G. H. Kattan y B. López-Lanús (eds.). 2002. Libro rojo de aves de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia.
- Reyes, M. 2002. *Sporophila insulata*. en: Renjifo, L. M., A. M. Franco-Maya, J. D. Amaya-Espinel, G. Kattan y B. López-Lanús (eds.). 2002. Libro rojo de aves de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt y Ministerio del Medio Ambiente. Bogotá, Colombia.
- Ridgely, R. S. and G. Tudor. 1989. The birds of South America. University of Texas Press, Austin. Vol 1.
- Ridgely, R. S. and P. J. Greenfield. 2001. The birds of Ecuador. Status, distribution and taxonomy. Vol 1. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Saghai-Marooif, M. A., K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer length in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 8018.
- Saiki, R. J., D. H. Gelfand, S. J. Sharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Salaman, P. G. 1995. The rediscovery of Tumaco seedeater *Sporophila insulata*. *Cotinga*, 4: 33-35.
- Sato, A., C. O'hUigin, F. Figueroa, P. R. Grant, B. R. Grant, H. Tichy and J. Klein. 1999. Phylogeny of Darwin's finches as revealed by mtDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 5101-5106.
- Sato, A., H. Tichy, C. O'hUigin, P.R. Grant, B.R. Grant and J. Klein. 2001. On the origin of Darwin's finches. *Mol. Biol. Evol.* 18: 299-311.
- Seutin, G., B. N. White and P. T. Boag. 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.*, 69: 82-90.
- Smith, F. 1975, 1981. Naturalist's color guide. Amer. Mus. Natl. Hist., New York.
- Stiles, F. G. 1996. When black plus white equals gray: the nature of variation in the Variable Seedeater complex (Emberizinae: *Sporophila*). *Ornitología Neotropical*, 7: 75-107.
- Stiles, F. G. In press. The Tumaco Seedeater, *Sporophila insulata* (Emberizidae): a species that never was?. *Neotropical Ornithology*.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P. and J. Bouvet. 1991. A single plucked feather as a source of DNA for bird genetic studies. *The Auk*, 108: 959-960.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25: 4876-4882.
- Zar, J. H. 1984. Biostatistical analysis. Second edition. Englewood Cliffs.
- Zink, R. M., D. L. Dittmann, J. Klicka and R. C. Blackwell-Rago. 1999. Evolutionary patterns of morphometrics, allozymes, and mitochondrial DNA in thrashers (Genus *Toxostoma*). *The Auk*, 116: 1021-1038.

8. AGRADECIMIENTOS

Personalmente quiero agradecer al profe Luis Fernando García, quién desde el principio no dudo en respaldar el proyecto y en todo momento estuvo atento. Al profe Gary Stiles, quién siempre se mostró interesado y atento como iba caminando el proyecto, a sus opiniones y recomendaciones.

A aquellos que de una u otra forma me apoyaron, colaboraron o me aportaron comentarios durante el proyecto, entre ellos quiero agradecer en especial a Johanna Murillo, Gustavo Alarcón, Gabriel Estupiñán, Sandra Rojas, Mónica Murillo, Hernando Cruz, Gabriel Pantoja, Diana Santacruz, Natalia Lamprea, Liliana Ospina, Fabiola Santos, Camilo Quintero, Irene López, Héctor Gasca, Néstor García, Diego Fernando Higuera, Ligia Benavides, André Josafat Riveros, Walter Weber, Paul Salaman, Loreta Rosselli, Carl Downing, Robin Restall, Luis Eugenio Andrade, Luis Germán Olarte, David Riaño, Felipe Estela, Ana María Castaño, Oscar Laverde, Aquiles Gutiérrez, Andrés Cuervo, Daniel Cadena, Jorge Velásquez, Alejandro Chaparro, Alejandro Rico; A todas las personas que me brindaron su apoyo en el Max-Planck-Institut fuer Biologie - Tuebingen (Especialmente a Felipe Figueroa, Jan Klein, Warner Mayer, Richard Lorenz, Zofia Zaleska-Rutczynska, también a Jane Kraushaar, Herbert Tichy, Akie Sato, Irene Samonte, Tanya Uinuk-ool, Roman Dongak y Volkmar Schiebel). A Leodis Angulo, Comisionado Consultivo de Comunidades Negras de la Ensenada de Tumaco y a sus colegas; al Parque Nacional Natural Sanquianga (Luis Jiménez).

Agradezco al Departamento de Biología, la Facultad de Ciencias, a la Unidad de Gestión de Proyectos de la Universidad Nacional de Colombia y a National Fish and Wildlife Foundation quienes posibilitaron mi asistencia y presentación de este trabajo en el VII Congreso de Ornitología Neotropical celebrado en Termas de Puyehue – Chile; y al Instituto Alexander von Humboldt, en el XVI Encuentro Nacional de Ornitología, celebrado en Jardín Antioquia 2003.

Tampoco hubiera sido posible realizar este proyecto sin el apoyo financiero de la División Nacional de Investigaciones (DINAIN) convocatoria Pleyade de 2001 y la Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Colombia, Max-Planck-Institut fuer Biologie - Tuebingen, Becas para la Conservación de Especies Amenazadas de Extinción del Instituto Alexander von Humboldt, IdeaWild, Neotropical Bird Club Conservation Award (NBC), y Royal Society for the Protection of Birds (RSPB). Agradezco enormemente el apoyo económico de todas estas instituciones y organizaciones.

A mis padres, mis hermanos, a mi familia por su apoyo y amor. A Valeria, mi sobrina, por estar aquí. A Babú, mi tía bisabuela, por haber estado. A Ana María, por su amor y por estar siempre presente a distancia. A mis amigas y amigos por su amistad.

Y agradezco por supuesto a... *Sporophila insulata* el Semillero de Tumaco, que ya no sé como llamarlo.

GRACIAS.

9. ANEXOS

ANEXO 1-10. Protocolos Métodos de Laboratorio.

ANEXO 11. Secuencia Sitios Variables Informativos Citocromo b.

ANEXO 12. Secuencia Sitios Variables Informativos Región Control.

ANEXO 13. Matriz de Distancia Citocromo b.

ANEXO 14. Matriz de Distancia Región Control.

ANEXO 15. Datos de Individuos Capturados y Medidos en la Colección.

Solicitar información directamente con el autor:

JC@sentidonatural.org / JCbird21@yahoo.com

