



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

Evidencia de introgresión genética entre *Pteronotus fulvus* y *Pteronotus gymnonotus* (Chiroptera: Mormoopidae)

Tesis de Maestría

PRESENTA

Biól. ALINE MÉNDEZ RODRÍGUEZ

CODIRECTORES:

Dr. Ricardo López Wilchis

Dr. Luis Manuel Guevara Chumacero

ASESORA:

Dra. Alejandra Serrato Díaz



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00176

Matrícula: 2163802017

Evidencia de introgresión genética entre Pteronotus fulvus y Pteronotus gymnotus (Chiroptera: Mormoopidae).

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 16 del mes de noviembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ALEJANDRA SERRATO DIAZ
DRA. ROSA MARIA GARCIA MARTINEZ
DRA. FLOR DEL CARMEN RODRIGUEZ GOMEZ
DR. ANTONIO GONZALEZ RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA

DE: ALINE MENDEZ RODRIGUEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



ALINE MENDEZ RODRIGUEZ
ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. ALEJANDRA SERRATO DIAZ

VOCAL

DRA. ROSA MARIA GARCIA MARTINEZ

VOCAL

DRA. FLOR DEL CARMEN RODRIGUEZ GOMEZ

SECRETARIO

DR. ANTONIO GONZALEZ RODRIGUEZ

SINODALES:

Dra. Flor de Carmen Rodríguez Gómez

Departamento de Ciencias Computacionales, Universidad de
Guadalajara, Jalisco.

Dr. Antonio González Rodríguez

Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad,
Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia.

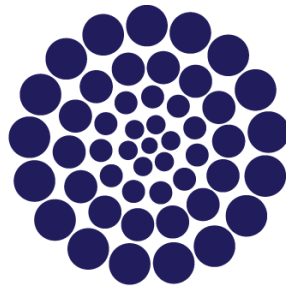
Dra. Rosa María García Martínez

Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

La Maestría en Biología de la
Universidad Autónoma Metropolitana
pertenece al Padrón de
Posgrados de Calidad del CONACyT.

El presente trabajo fue apoyado por la beca otorgada por CONACyT durante el
periodo 2016-2018 y con 790195 de número de registro.

Y a los proyectos financiados por CONACyT: CB-2009-01/128459 y CB-2014-
01/243138 a cargo del Dr. Ricardo López Wilchis y el Dr. Luis Manuel Guevara
Chumacero.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
De la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

ALINE MÉNDEZ RODRÍGUEZ

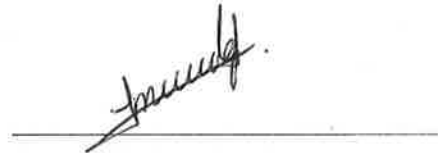
El día 16 de noviembre del año de 2018

Comité Tutorial y Jurado

Codirector: Dr. Ricardo López Wilchis



Codirector: Dr. Luis Manuel Guevara Chumacero



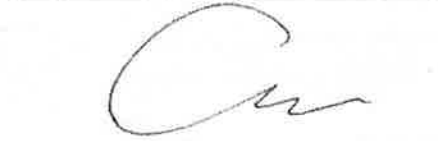
Asesora: Dra. Alejandra Serrato Díaz



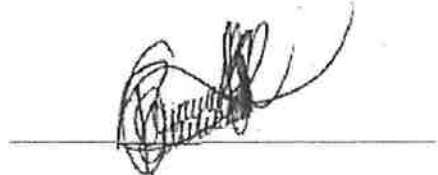
Sinodal: Dra. Flor de Carmen Rodríguez Gómez



Sinodal: Dr. Antonio González Rodríguez



Sinodal: Dra. Rosa María García Martínez



AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo en todas las decisiones que he tomado, por su cariño, su ejemplo y a quienes admiro muchísimo.

Al Dr. Luis Manuel Guevara Chumacero, por seguir brindándome oportunidades, por el conocimiento que ha compartido conmigo y la libertad de desarrollar mis proyectos.

Al Dr. Ricardo López Wilchis, por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio, por sus enseñanzas y sus consejos.

A la Dra. Alejandra Serrato Díaz, por su gran apoyo a lo largo de este y otros proyectos y sobre todo por su gran amistad que me ha brindado en buenos y malos momentos.

A la Dra. Flor del Carmen Rodríguez Gómez, por su apoyo, su conocimiento y el haberme enseñado diversos análisis de genética de poblaciones y filogeografía.

Al Dr. Javier Juste Ballesta, por su amistad, su ayuda, sus conocimientos, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y la oportunidad de conocer una cultura muy diferente.

Al Dr. Juan Luis García Mudarra por sus consejos y el haberme ayudado con el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros y amigos que me han ayudado, escuchado y animado y que sin su apoyo no hubiera podido realizar esta tesis: Luis Guillermo Constante Pérez, Zanni Hernández Pérez, Dafne Gri Zarate Martínez, Mayela Flores Romero, Kinberly Montserrat Barrios Gómez, Victor Velázquez Castañeda, Sandra Miguel Santiago, Adriana Pamela Estrada Trejo, Fernando Salgado Mejía y Guillermo Tonatiuh Flores Gálvez.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción general.....	4
Marco teórico.....	7
Especies de estudio	9
<i>Pteronotus davyi davyi</i> y <i>Pteronotus fulvus</i>	9
<i>Pteronotus gymnonotus</i>	14
Objetivo general	18
Objetivos particulares.....	18
Literatura citada.....	19
Capítulo 1. Linajes evolutivos en un complejo de especies del subgénero <i>Pteronotus</i> (Chiroptera: Mormoopidae)	23
Resumen.....	23
Introducción.....	24
Material y método.....	27
Muestreo	27
Extracción de ADN	31
Datos moleculares.....	31
Análisis filogenéticos y genealógicos	32
Árbol de especies.....	33
Tiempos de divergencia	34
Resultados	35
Análisis filogenéticos y genealógicos	35
Árbol de especies.....	39
Tiempos de divergencia	40
Discusión.....	43
Literatura citada.....	48
Anexos	56

Anexo 1. Lista de haplotipos de <i>P. fulvus</i> , <i>P. d. davyi</i> y <i>P. gymnonotus</i> para PRKC1, STAT5A RAG2 y COI	56
Anexo 2. Reconstrucción filogenética de intrones (PRKC1, STAT5A) y RAG2.....	62
Anexo 3. Reconstrucción filogenética de datos nucleares y mitocondriales (PRKC1, STAT5A, RAG2 y COI).....	63

Capítulo 2. Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para el género <i>Pteronotus</i>	64
---	----

Capítulo 3. Evidencia de introgresión genética entre <i>Pteronotus fulvus</i> y <i>Pteronotus gymnonotus</i>	70
---	----

Resumen.....	70
Introducción.....	71
Material y método.....	75
Muestreo	75
Extracción de ADN	79
Datos de microsatélites	79
Evaluación de los loci.....	79
Diversidad y diferenciación genética	80
Estructura y flujo genético	80
Tasa de migración histórica y contemporánea	81
Datos del gen mitocondrial COI.....	82
Diversidad y diferenciación genética	83
Tasa de migración	83
Análisis morfológico	84
Resultados	85
Microsatélites	85
Diversidad y diferenciación genética	85
Estructura y flujo genético	86
Tasa de migración histórica y contemporánea	89

COI.....	89
Diversidad y diferenciación genética	89
Tasa de migración	92
Análisis morfológico	92
Discusión.....	94
Literatura citada.....	102
Anexos	113
Anexo 1. Lista de haplotipos de COI para <i>P. fulvus</i> y <i>P. gymnonotus</i>	113
Conclusiones y perspectivas generales	116

RESUMEN

El subgénero *Pteronotus* comprende murciélagos insectívoros neotropicales de la familia Mormoopidae. Actualmente se consideran tres especies, *P. davyi*, *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, con dos subespecies *P. d. davyi* y *P. d. incaae*. En el presente trabajo se determinaron los linajes genéticos y las relaciones filogenéticas de *P. d. davyi*, *P. fulvus*, y *P. gymnonotus*, utilizando secuencias nucleotídicas del gen de Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial, dos intrones (PRKCL y STAT5A) y el gen nuclear Activador de la Recombinación 2 (RAG2) del ADN nuclear. Posteriormente, se evaluó una posible introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus* utilizando ADN nuclear (6 loci de microsatélites) y ADN mitocondrial (COI). Se observó una estructura genética mitocondrial bien definida, identificando tres linajes evolutivos que corresponde a los taxa descritos que se diversificaron entre 1.025 y 2.188 Ma, posiblemente en Centroamérica o al Norte de Sudamérica. Este periodo corresponde a oscilaciones climáticas y fluctuaciones del nivel del mar, que sucedieron en esta zona geográfica y que afectaron la composición y el hábitat de la región, características que pudieron haber promovido la diversificación del subgénero *Pteronotus*.

En cuanto a la introgresión entre *P. gymnonotus* y *P. fulvus*, con los microsatélites se identificaron de 10 a 42 híbridos que corresponde al 5.7-35.2% del total de las muestras estudiadas, los resultados de las tasas de migración revelan que el flujo genético es histórico, con una mayor flujo genético de *P. fulvus* a *P. gymnonotus*. Mientras que los resultados con COI revelan una captura mitocondrial de *P. fulvus* en todos los individuos de *P. gymnonotus* de México, Guatemala y parte de Panamá, con un mayor número de migrantes de *P. fulvus* a *P. gymnonotus* (6.3 migrantes por generación *P. fulvus* a *P.*

gymnonotus y 1.5 de *P. gymnonotus* a *P. fulvus*). Estos resultados indican la presencia de introgresión genética histórica y asimétrica, posiblemente facilitada por la colonización de *P. gymnonotus* en Centroamérica y México.

ABSTRACT

The subgenus *Pteronotus*, neotropical insectivorous bats includes the Mormoopidae family, the which currently has three species *P. davyi*, *P. fulvus* and *P. gymnonotus* in where two subspecies are considered *P. d. davyi* y *P. d. incae*. In the present work, the evolutionary lineages and the phylogenetic relationships of *P. d. davyi*, *P. fulvus* and *P. gymnonotus*, were studied using nucleotide sequences of the Cytochrome Oxidase subunit I (COI) from the mitochondrial DNA, also two introns (PRKCL and STAT5A) and the Nuclear Gene Activator of the Recombination 2 (RAG2) of the nuclear DNA, subsequently a possible genetic introgression between *P. fulvus* and *P. gymnonotus* was evaluated using nuclear DNA (6 microsatellite loci) and mitochondrial DNA (COI). A well-defined mitochondrial genetic structure was observed, identifying three monophyletic evolutionary lineages, which correspond to the described taxa, which diversified between 1.025 and 2.188 Ma, possibly in Central America or the north of South America, this period of time corresponds to climatic oscillations in the geographical area and that may affected the composition and habitat of the region, characteristics that could have promoted the diversification of the subgenus *Pteronotus*.

As for the introgression between *P. gymnonotus* and *P. fulvus*, we identified 10 to 42 hybrids corresponding to 5.7-35.2% of the total samples studied, while the results of the migration rates reveal that the introgression is historical and with a greater direction from *P. fulvus* to *P. gymnonotus*. The results with COI showed a mitochondrial capture of *P. fulvus* in all individuals of *P. gymnonotus* from Mexico, Guatemala and part of Panama (IMA, number of migrants by generation 6.3 from *P. fulvus* to *P. gymnonotus* and 1.545 from *P. gymnonotus* to *P. fulvus*). These results indicate the presence of historical and asymmetric genetic introgression, possibly facilitated by the colonization of *P. gymnonotus* in Central America and Mexico.

INTRODUCCION GENERAL

Los mormoopidos pertenecen a una familia de murciélagos insectívoros neotropicales que actualmente incluye dos géneros *Mormoops* y *Pteronotus*, los cuales son conocidos comúnmente como murciélagos bigotudos, rostro de fantasma o murciélagos de espalda desnuda. Estos murciélagos se caracterizan por presentar orejas en forma de embudo, el labio superior no dividido y el labio inferior con pliegues muy marcados o con excrecencias (Smith, 1972). Se distribuyen desde el Sur de Texas hasta el Sureste de Brasil, incluyendo las Antillas, y al oeste de los Andes en Perú, habitando en una amplia variedad de ambientes desde bosques tropicales húmedos a bosques subtropicales áridos, semiáridos y matorrales (Smith, 1972; Simmons y Conway, 2001).

En el género *Pteronotus* tradicionalmente se han considerado seis especies y 18 subespecies, asignadas a tres subgéneros: *Pteronotus* con dos especies, *P. davyi* (Gray, 1838) y *P. gymnonotus* (Wagner, 1843); *Chilonycteris* con tres especies, *P. macleayi* (Gray 1839), *P. personatus* (Wagner, 1843) y *P. quadridens* (Gundlach, 1840) y el subgénero *Phyllodia* con una especie *P. parnellii* (Gray, 1843) (Smith, 1972; Simmons, 2005). Sin embargo, una nueva propuesta taxonómica de acuerdo con datos de morfometría craneal y análisis moleculares, eleva a la mayoría de las subespecies del género *Pteronotus* a nivel de especie (Pavan y Marroig, 2017).

En particular el subgénero *Pteronotus* tiene una compleja historia taxonómica con una incertidumbre en el número de especies y subespecies, que en algún momento han sido consideradas como conoespecíficas o como pertenecientes a diferentes géneros

(Smith, 1972). Tradicionalmente en este subgénero, se han considerado dos especies: *P. davyi* sinonimia de *Chilonycteris gymnonotus* (Wagner, 1843), con tres subespecies *P. d. davyi* (Gray, 1838) sinonimia de *P. d. calvus* (Goodwin, 1958), *P. d. fulvus* (Miller, 1912) y *P. d. incae* (Smith, 1972), y por otro lado *P. gymnonotus* sinonimia de *Dermonotus suapuarensis* (Allen, 1904), y *P. suapuarensis* (Allen, 1991) sin ninguna subespecie descrita.

De acuerdo con la nueva propuesta taxonómica de Pavan y Marroig (2016) para el subgénero *Pteronotus*, con base en diferentes tipos de marcadores moleculares y morfología craneal, consideran tres especies *P. davyi*, *P. fulvus* y *P. gymnonotus* y dos subespecies, *P. d. davyi* y *P. d. incae*. Estas tres especies presentan monofilia y relaciones filogenéticas muy cercanas, diversificándose hace 2.5 millones de años (Ma) (Pavan y Marroig, 2017).

A pesar de estos estudios, continúan surgiendo nuevas preguntas de investigación en este grupo taxonómico. En el sur de México se han observado individuos de *P. fulvus* visiblemente más grandes que los típicos *P. fulvus* de México y parecidos a *P. gymnonotus* (Goodwin en 1958; Álvarez y Álvarez-Castañeda en 1991; Ricardo López-Wilchis, com. pers.), situación que ha llevado a abordar diferentes objetivos en este trabajo con la finalidad de explicar la presencia de estos morfotipos.

Para ello, el presente trabajo se dividió en tres capítulos. En el primer capítulo se delimitan los linajes evolutivos y las relaciones filogenéticas de *P. d. davyi*, *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, utilizando ADN nuclear (intrones y RAG2) y mitocondrial (COI). En el

segundo capítulo, se efectuó el aislamiento y caracterización de microsatélites para el género *Pteronotus*, indispensables para evaluar una posible introgresión genética contemporánea de *P. fulvus* y *P. gymnonotus*. Finalmente, en el tercer capítulo se evaluó la introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus* utilizando ADN mitocondrial (COI) y ADN nuclear (microsatélites).

MARCO TEÓRICO

Origen y diversificación de la familia Mormoopidae

Existen varias hipótesis que explican el origen y diversificación de la familia Mormoopidae en relación a su área de distribución. De acuerdo a Smith (1972) utilizando caracteres morfológicos, propuso que los mormoopidos se originaron en el Sur de Centroamérica o en el noroeste de Sudamérica, dispersándose al Caribe, Centroamérica y México. Por otro lado, Czaplewski y Morgan (2003) conforme al registro fósil y la elevada riqueza de especies y los endemismos de las Indias Occidentales, proponen que los mormoopidos se dispersaron y expandieron por las Antillas Mayores, llegando a Suramérica después de la formación del Istmo de Panamá durante el Plioceno, y por lo tanto el centro de origen de los mormoopidos no incluye el noroeste de Suramérica.

Por otra parte, Dávalos (2006) empleando secuencias nucleotídicas de genes mitocondriales (12S ARNr, ARNtval, 16S ARNr y citocromo b), un gen nuclear (Rag2) y datos morfológicos, observó una mayor divergencia entre las poblaciones de las Antillas y las poblaciones de Centroamérica que entre México/Centroamérica y Sudamérica, sugiriendo que los mormoopidos se diversificaron en el norte del Neotrópico antes de desplazarse a Sudamérica.

Por su parte, Rojas *et al.* (2016), utilizando 7 marcadores nucleares (thy, bdnf, ttn6, rag2, atp7a y plcb4), 3 mitocondriales (citocromo b, 12S ARNr y ARNtval) y registro fósil, proponen un origen en Sudamérica y una posterior colonización a las Antillas en el Mioceno, seguido de especiación.

La propuesta más reciente de Pavan y Marroig (2017), bajo un enfoque biogeográfico y empleando genes nucleares, mitocondriales y morfometría craneal, propusieron que el género *Pteronotus* se originó aproximadamente hace 16 Ma, colonizando Suramérica al principio de su historia evolutiva, posiblemente en el Mioceno. Posteriormente, tuvieron eventos de dispersión desde el centro y el norte de Suramérica hasta las islas del Caribe, facilitados por movimientos tectónicos que causaron el surgimiento de puentes terrestre temporales. Además, proponen dos saltos de dispersión independientes desde el continente Americano a las Antillas Mayores; un primer salto que tuvo lugar hace 11 Ma, a través de Jamaica o Cuba, seguido de una diversificación dando lugar a *P. quadridens* y *P. macleayi* y un segundo evento de dispersión hace 3.9 Ma, responsables del origen de los linajes insulares y el subgénero *Phyllodia* (*Pteronotus parnelli*). Asimismo, sugieren un papel importante de Centroamérica en el proceso de diversificación temprana, mientras que las oscilaciones climáticas pleistocénicas y las variaciones del nivel del mar se asociaron con la divergencia entre especies hermanas.

ESPECIES DE ESTUDIO

Pteronotus davyi davyi y *Pteronotus fulvus*



Figura 1. *Pteronotus fulvus* de los Ortices, Colima (Foto: Ricardo López-Wilchis).

Diagnos y sistemática

El subgénero *Pteronotus* también conocidos como “murciélagos de espalda desnuda”, se distinguen de otros Mormoopidos por tener las membranas alares unidas sobre la parte media del dorso. Esta característica del este subgénero no se encuentra en ningún otro microquiróptero, pero sí en varios megaquirópteros. La funcionalidad de esta característica es desconocida, aunque se cree que podría facilitar la disipación de calor cuando la temperatura ambiental es muy elevada o actuar como un "drag chute" dando un mayor grado de maniobrabilidad (Smith, 1972; Bonaccorso *et al.*, 1992) (Figura 1).

Pteronotus davyi davyi, *P. d. incae* y *P. fulvus* presentan un tamaño de antebrazo menor a 50 mm, con un uropatagio grande conectado por largos calcáreos de las tibias y una

cola de 18 a 25 mm que se extiende dos tercios de la longitud del uropatagio y con los últimos 10 a 15 mm proyectándose dorsalmente (Adams, 1989).

Taxonomía y distribución

Actualmente se reconocen tres especies y dos subespecies del subgénero *Pteronotus*: *P. d. davyi* (Gray, 1838), *P. d. incae* (Smith, 1972), *P. fulvus* (Thomas, 1892), y *P. gymnonotus* (Wagner, 1843) (Pavan y Marroig, 2017), que se distinguen principalmente por su tamaño y distribución:

- *P. d. davyi*

Holotipo: Adulto, sexo no determinado de Trinidad

Sinonimias: *Pteronotus davyi* (Gray, 1838) y *Chilonycteris gymnonotus* (Wagner, 1843).

Distribución: Desde Nicaragua a Panamá, Venezuela a Trinidad y las Antillas menores.

Características: Es más grande que los típicos *P. fulvus*, con un cráneo más largo y amplio.

- *P. d. incae*

Holotipo: Macho adulto de la provincia de Piura, Perú.

Distribución: Oeste de los Andes, Perú. El nombre “incae” se debe a que conmemora la civilización Inca que una vez estuvo en el noroeste de Perú.

Características: Es el murciélago más grande del subgénero *Pteronotus*, con un cráneo más grande, largo y amplio especialmente en el rostro. Se diferencia

de *P. gymnonotus* porque *P. d. incae* presenta pelos más largos y dispersos en la membrana dorsal alar y su tamaño es menor.

- *P. fulvus*

Holotipo: Macho adulto de Jalisco, México.

Sinonimias: *Chilonycteris davyi fulvus* (Thomas, 1892), *Pteronotus davyi fulvus* (Miller, 1912) y *Pteronotus suapurensis calvus* (Goodwin, 1958).

Distribución: Desde el Sur del estado de Sonora, Tamaulipas y Nuevo León de México hasta el Sur de Honduras.

Características: Es más pequeño del subgénero *Pteronotus*, observando un aumento gradual del tamaño al Sur, excepto en Sonora, México donde presentan un mayor tamaño y un mayor grado de dimorfismo sexual, posiblemente por factores ecológicos y fisiográficos (Smith, 1972; Adams, 1989) (Figuras 1-3).

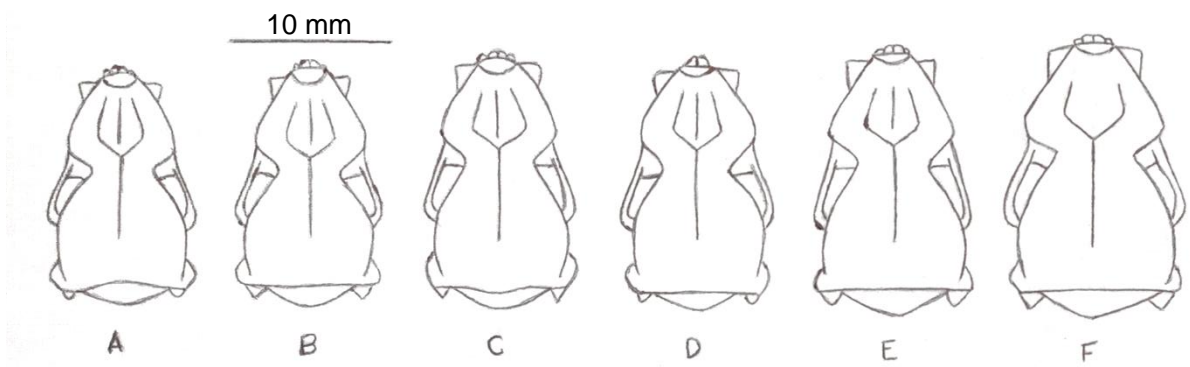


Figura 2. Vista dorsal de los cráneos de *P. fulvus* (A: Sinaloa; B: Guatemala), *P. d. davyi* (C: Nicaragua; D: Isla Dominica), *P. d. incae* (E: Perú) y *P. gymnonotus* (F: Nicaragua). Todos los especímenes son machos adultos. Tomado de Smith, 1972.

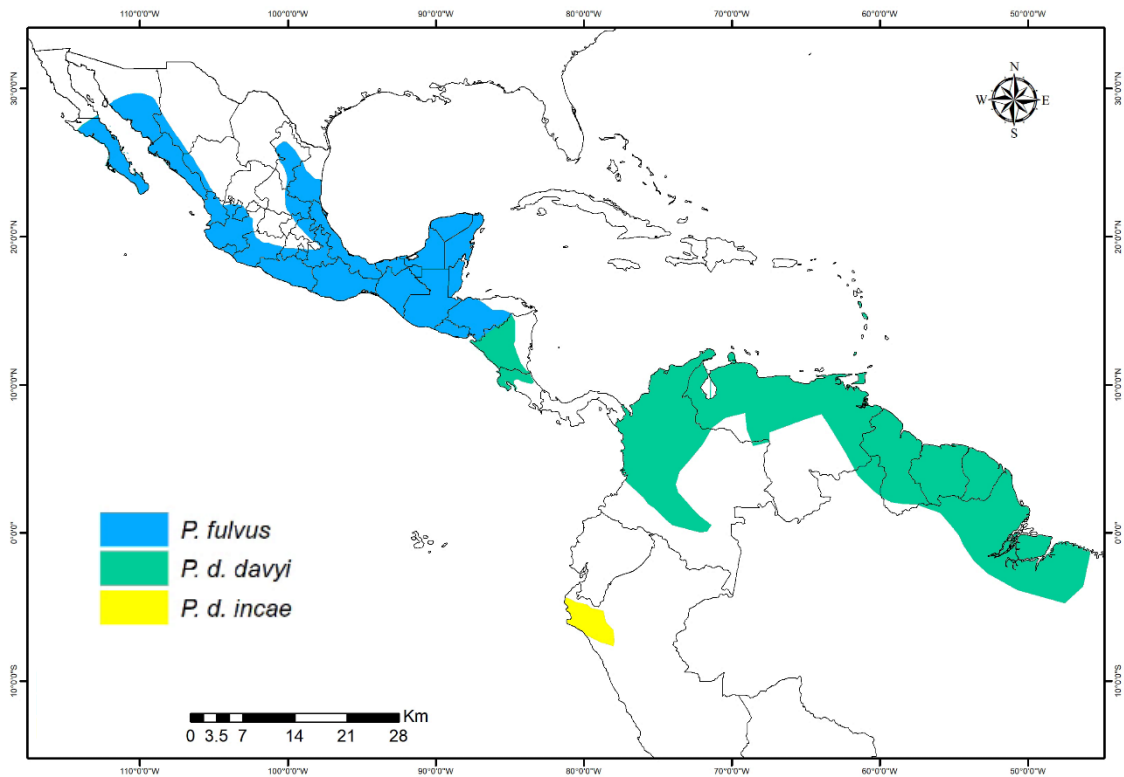


Figura 3. Distribución geográfica de *P. d. davyi*, *P. d. incae* y *P. fulvus*, de acuerdo con datos de la IUCN (Dávalos *et al.*, 2008).

Estos murciélagos han sido capturados en sitios desde el nivel del mar hasta los 2,300 msnm, en hábitats que van desde selva tropical hasta selva caducifolia, siendo más abundantes en selvas bajas caducifolias y menos comunes en selvas altas perennifolias (Adams, 1989; Simmons y Conway, 2001). Se refugian en cuevas, oquedades, túneles y minas húmedas y cálidas, formando colonias de hasta cientos de miles de individuos (Jiménez-Guzmán y Ceballos, 2005). Comparten refugios con *Pteronotus personatus*, *P. parnellii*, *P. gymnonotus*, *Mormoops megalophylla*, *Natalus mexicanus*, *Artibeus jamaicensis*, *Macrotus waterhoisii*, *Tadarida brasiliensis*, *Desmodus rotundus*, entre otros (Adams, 1989; Ibáñez *et al.*, 2000).

Alimentación

La dieta de *P. d. davyi*, *P. d. incae* y *P. fulvus* incluye numerosas especies de lepidópteros, algunos dípteros que son capturados durante el vuelo y ocasionalmente dermápteros (Howell y Burch, 1974; Adams, 1989; Jiménez-Guzmán y Ceballos, 2005).

Reproducción

Estos *Pteronotus* presentan un ligero dimorfismo sexual en el tamaño, excepto en Sonora, México, donde los machos son significativamente más grandes que las hembras en el largo del antebrazo y en varias medidas craneales (Smith, 1972). Son monoestros estacionales, con una probable copulación entre enero y marzo (Wilson, 1973; Adams, 1989). Se han observado hembras gestantes entre marzo y junio en México, Guatemala, Nicaragua y El Salvador (Nowak, 1991; Hayssen *et al.*, 1993; Adams, 1989), mientras que la lactancia se presenta de julio a agosto (López-Wilchis, com. pers.).

Registro fósil

Se han encontrado fósiles del Pleistoceno en Bahía, al este de Brasil, así como fósiles del cuaternario en Tobago y en Goiás en el centro de Brasil, lugares donde esta especie está extinta, lo que sugiere que antes el área de distribución de la especie era mucho más extensa (Eshelman y Morgan, 1985; Czaplewski y Morgan, 2003; Fracasso y Salles, 2005)

Pteronotus gymnonotus



Figura 4. *Pteronotus gymnonotus* (Foto: Merlin D. Tuttle, BCI).

Diagnosis

Pteronotus gymnonotus también conocido como “murciélago de espalda desnuda mayor” es de tamaño medio con un antebrazo de 50-56 mm (Adams, 1989; Simmons y Conway, 2001), membranas alares fusionadas en la línea media dorsal y una cola incluida en el uropatagio que se extiende hasta la mitad de la membrana, con su porción distal libre (Smith, 1972; Ortega y Arita, 2005) (Figura 4).

La diferencia más evidente entre *P. gymnonotus* y las demás especies del subgénero *Pteronotus*, es que *P. gymnonotus* presenta pelos más cortos y densos en las membranas alares dorsales fusionadas, una longitud de antebrazo mayor a 50 mm, un mayor tamaño craneal y un trago y placa labio-nasal más amplio (Smith, 1972).

Taxonomía y distribución

Actualmente no se reconoce ninguna subespecie de *Pteronotus gymnonotus* (Wagner, 1843). Presenta tres sinonimias: *Dermonotus suapurensis* (Allen, 1904), *Pteronotus suapurensis* (Allen, 1911) y *Pteronotus suapurensis centralis* (Goodwin, 1942) y el holotipo es de Venezuela (Smith, 1972). Su distribución comprende desde Veracruz, México, a la Guyana Francesa y el centro de Brasil (Smith, 1972; Pavan y Marroig, 2017) (Figura 5), aumentando de tamaño progresivamente hacia el norte de su distribución (Smith, 1972). *Pteronotus gymnonotus* ha sido capturado en sitios desde el nivel del mar hasta los 3,000 msnm en hábitats que van desde selva tropical a selva caducifolia. Esta especie suele ser poco frecuente, pero localmente abundante, especialmente en zonas secas y áreas relativamente abiertas. Prefiere refugiarse en cuevas, a menudo con otros mormoopidos y filostómidos (Simmons y Conway, 2001).

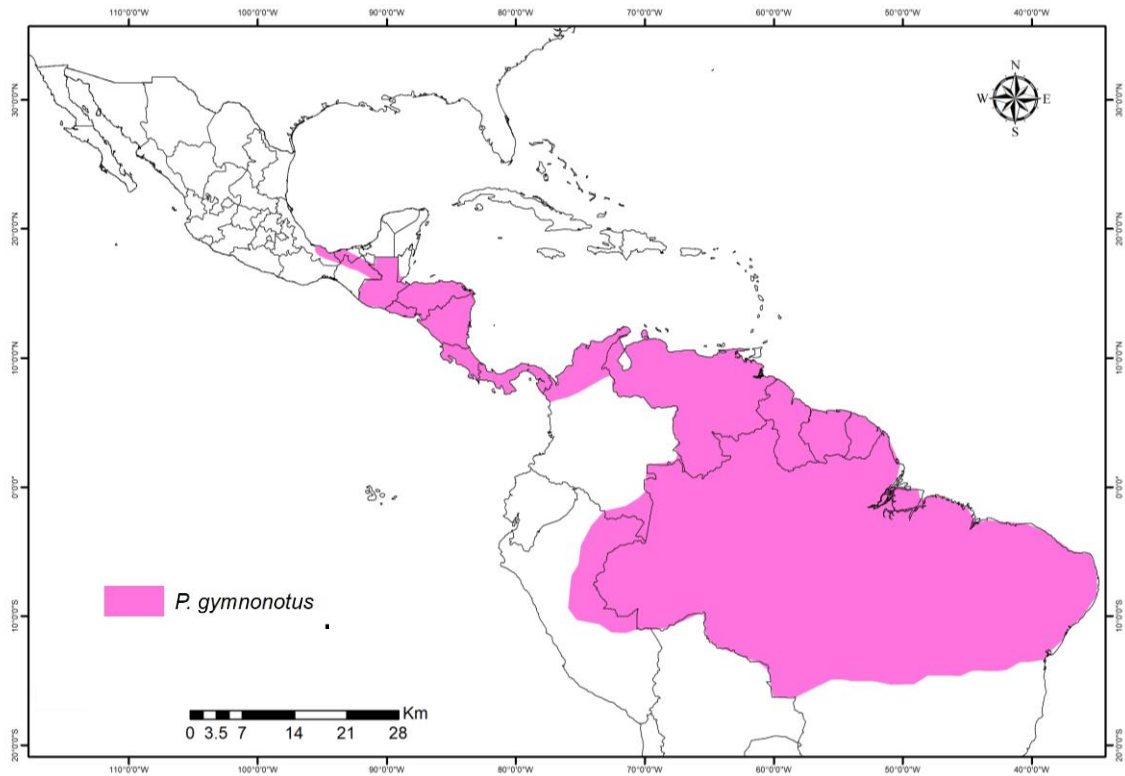


Figura 5. Distribución geográfica de *Pteronotus gymnonotus* (modificado por Pavan A. C.).

Alimentación

Poco se conoce de la dieta de *P. gymnonotus* pero datos disponibles sugieren que estos murciélagos consumen principalmente ortópteros, coleópteros y lepidópteros, que son capturados al vuelo (Simmons y Conway, 2001; Ortega y Arita, 2005).

Reproducción

Son monoestros y se han observado hembras gestantes de abril a agosto en México, El Salvador, Nicaragua y Perú (Nowak, 1991; Hayssen *et al.*, 1993; Ortega y Arita, 2005; López-Wilchis, com. pers.), mientras que la lactancia se presenta en agosto (Hayssen *et al.*, 1993)

Registro fósil

Se han encontrado fósiles del cuaternario de *P. gymnonotus* en Tobago, en donde la especie está extinta, así como en Bahía, Brasil (Simmons y Conway, 2001; Salles *et al.*, 2014).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si existe introgresión genética entre las especies *Pteronotus fulvus* y *P. gymnonotus* (Chiroptera: Mormoopidae), así como conocer sus las relaciones evolutivas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar linajes evolutivos en un complejo de especies del subgénero *Pteronotus*.
- Aislar y caracterizar loci de microsatélites para el género *Pteronotus*.
- Evaluar si *Pteronotus fulvus* y *P. gymnonotus* presentan introgresión genética histórica o contemporánea.

LITERATURA CITADA

ADAMS, J. K. 1989. *Pteronotus davyi*. Mammalian species 346:1–5.

ALLEN, J. A. 1911. Mammals from Venezuela collected by Mr. M. A. Carriker, Jr., 1909-1911. Bulletin of the American Museum of Natural History 30:239–273.

ALLEN, J. A. 1904. New bats from tropical America, with note on Otopterus. Bulletin of the American Museum of Natural History 20:227–237.

ÁLVAREZ, T. AND S. T. ÁLVAREZ-CASTAÑEDA. 1991. Notas sobre el estado taxonómico de *Pteronotus davyi* en Chiapas y de *Hylonycteris* en México (Mammalia: Chiroptera). Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas 34:223–229.

BONACCORSO, F. J., A. ARENDS, M. GENOUD, D. CANTONI AND T. MORTON. 1992. Thermal ecology of moustached and ghost-faced bats (Mormoopidae) in Venezuela. Journal of Mammalogy 73(2): 365–378.

CZAPLEWSKI, N. J. AND G. S. MORGAN. 2003. Fossil bats of the Americas. http://www.snomnh.ou.edu/collections%26research/vertebrate_paleontology/fossil_bats/index.shtml.

DÁVALOS, L. M. 2006. The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). Biological Journal of the Linnean Society 88:101–118.

DÁVALOS, L., H. MANTILLA, J. MOLINARI, B. MILLER, F. REID, J. ARROYO-CABRALES, A. D. CUARÓN AND P. C. GRAMMONT, 2008. *Pteronotus davyi*. En: IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2016-1. <www.iucnredlist.org>. (Consultado 12/08/2016).

ESHELMAN, R. E. AND G. S. MORGAN. 1985. Tobagan recent mammals, fossil vertebrates, and their zoogeographical implications. National Geographic Society Research Reports 21:137–143.

FRACASSO, M. P. D. A. AND L. D. O. SALLES. 2005. Diversity of quaternary bats from Serra da Mesa (State of Goiás, Brazil). Zootaxa 817:1–19.

GOODWIN, G. G. 1942. New *Pteronotus* from Nicaragua. Journal of Mammalogy 23(1):88–88.

GOODWIN, G. G., T. B. MACDOUGALL AND J. R. MARCUS. 1958. Two new mammals from Mexico. American Museum of Natural History. American Museum Novitates 1871:1–3.

GRAY, J. E. 1838. A revision of the genera of bats (Vespertilionidae), and the description of some new genera and species. Magazine of Zoology and Botany 2:483–505.

GRAY, J. E. 1839. Descriptions of some Mammalia discovered in Cuba by W. S. MacLeay, Esq. The Annals and magazine of natural history 4:1–7.

GRAY, J. E. 1843. [Letter addressed to Mr. Waterhouse.] Proceedings of the Zoological Society of London p.50.

HAYSEN, V., A. VAN TIENHOVEN AND A. VAN TIENHOVEN. 1993. Asdell's Patterns of Mammalian Reproduction: A Compendium of Species- Specific Data. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1027 p.

HOWELL, D. J. AND D. BURCH. 1974. Food habits of some costa rican bats. Revista de Biología Tropical 21:281–294.

IBÁÑEZ, C., R. LÓPEZ WILCHIS, J. B. JUSTE AND LEÓN-GALVÁN M. A. 2000. Echolocation calls and noteworthy record of *Pteronotus gymnonotus* (Chiroptera, Mormoopidae) from Tabasco, Mexico. *Southwestern Naturalist* 45:345–347.

JIMÉNEZ-GUZMÁN, A., G. CEBALLOS AND G. OLIVA. 2005. *Pteronotus davyi*. Pp. 179-180 En *Los mamíferos silvestres de México* (Ceballos G. Oliva G., eds.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.

KOOPMAN, K. F. 1993. Order Chiroptera. En: *Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference* (D. E. Wilson y D. M. Reeder, comp.). Pp. 137-241. Washington, D. C. Smithsonian Institution Press. 1206 p.

NOWAK, R. M. 1991. *Walker's Bats of the World*, 5th ed. The Johns Hopkins University Press. 287 p.

ORTEGA, R. J. AND T. H. ARITA. 2005. *Pteronotus gymnonotus*. Pp. 181. En: *Los mamíferos silvestres de México* (G. Ceballos, and G. Oliva, eds.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.

PAVAN, A. C. AND G. MARROIG. 2017. Timing and patterns of diversification in the Neotropical bat genus *Pteronotus* (Mormoopidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 108:61–69.

ROJAS, D., O. M. WARSI AND L. M. DAVALOS. 2016. Bats (Chiroptera: Noctilionoidea) Challenge a Recent Origin of Extant Neotropical Diversity. *Systematic Biology* 65(3):432–448.

SALLES, L. O., J. ARROYO-CABRALES, A. C. D. M. LIMA, W. LANZELOTTI, F. A. PERINI, P. M. VELAZCO AND N. B. SIMMONS. 2014. Quaternary bats from the Impossível-loiô cave system (Chapada Diamantina, Brazil): humeral remains and the first fossil record of

Noctilio leporinus (Chiroptera, Noctilionidae) from South America. American Museum Novitates 3798:1–32.

SIMMONS, N. B. 2005. Order Chiroptera. En: Wilson D.E., Reeder D.M. (Eds.). Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed. John Hopkins University Press, Baltimore. 312–529 pp.

SIMMONS, N. B. AND T. M. CONWAY. 2001. Phylogenetic relationships of mormoopids bats (Chiroptera: Mormoopidae) based on morphological data. Bulletin of the American Museum of Natural History 258:1–97.

SMITH, J. D. 1972. Systematics of the chiropteran family Mormoopidae. Miscellaneous Publications, University of Kansas, Museum of Natural History 56:1–132.

THOMAS, O. 1892. Note on Mexican examples of *Chilonycteris davyi*, Gray. Annals and magazine of natural history 6(10):410.

WAGNER, J. A. 1843. Diagnosen neuer Arten brasilischer Handflunger. Archive für Naturgeschichte 9:365–368.

WILSON, D. E. 1973. Reproduction in Neotropical bats. Periodical Biology 75:215–217.

Capítulo 1. Linajes evolutivos en un complejo de especies del subgénero *Pteronotus* (Chiroptera: Mormoopidae)

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue identificar linajes evolutivos en un complejo de especies del subgénero *Pteronotus*, con base en ADN mitocondrial (Citocromo Oxidasa subunidad I) y ADN nuclear (dos intrones y RAG2). Los resultados indican la presencia de tres linajes evolutivos (*P. fulvus*, *P. d. davyi* y *P. gymnonotus*) con una estructura genética mitocondrial bien definida. La divergencia de los linajes ocurrió entre 1.025 y 2.188 Ma, probablemente promovido por oscilaciones climáticas y fluctuaciones del nivel del mar, durante el Plioceno y Pleistoceno. Los análisis basados en datos nucleares contrastaron fuertemente con los datos mitocondriales, recuperando dos linajes, el primero conformado por *P. fulvus* y *P. d. davyi* y el segundo por *P. gymnonotus* y con poca estructura genética nuclear. Tales diferencias entre el ADN mitocondrial y nuclear son consistentes con una retención de polimorfismo ancestral y/o introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus* en México y Guatemala.

Palabras clave: COI, flujo genético, introgresión genética, intrones, istmo de Panamá, murciélagos, *Pteronotus davyi*, *Pteronotus fulvus*, *Pteronotus gymnonotus*, RAG2

INTRODUCCIÓN

Los mormoopidos son una familia de murciélagos insectívoros neotropicales, caracterizada por presentar orejas en forma de embudo, el labio superior no dividido y el labio inferior con pliegues muy marcados o con excrecencias (Smith, 1972). Actualmente incluye dos géneros descritos *Mormoops* (Leach, 1821) y *Pteronotus* (Gray, 1838). El género *Mormoops* está representado por dos especies: *Mormoops blainvillei* (Leach, 1821) y *Mormoops megalophylla* (Peters, 1864); mientras que en el género *Pteronotus* tradicionalmente han sido consideradas seis especies en tres subgéneros: *Pteronotus* con dos especies, *Pteronotus davyi* (Gray, 1838) y *P. gymnotus* (Wagner, 1843); *Chilonycteris* con tres especies, *P. macleayi* (Gray, 1839), *P. personatus* (Wagner, 1843) y *P. quadridens* (Gundlach, 1840); y el subgénero *Phyllodia* con una especie, *P. parnellii* (Gray, 1843). En los últimos años, en estas especies se ha observado una gran variación geográfica intraespecífica (Smith, 1972; Clare et al. 2011; Pavan y Marroig, 2016; López-Wilchis et al. 2016; Zárte-Martínez et al. 2018).

En particular el subgénero *Pteronotus* ha presentado una compleja historia taxonómica con cambios en el número de especies y subespecies propuestas (Smith, 1972; Clare et al. 2011; Pavan y Marroig, 2016). De acuerdo con una nueva propuesta taxonómica de Pavan y Marroig (2016), conforme a discontinuidades de datos de morfometría craneal y análisis moleculares, se consideran tres especies, *P. fulvus*, *P. davyi* y *P. gymnotus* y dos subespecies *P. d. davyi* y *P. d. incae* (Pavan y Marroig, 2016). De acuerdo a Pavan y Marroig (2017), estas tres especies presentan monofilia y relaciones filogenéticas muy cercanas, diversificándose hace 2.5 Ma. Actualmente, *P.*

fulvus presenta una distribución que va desde el estado de Sonora, Tamaulipas y Nuevo León, México, hasta el Sur de Honduras; *P. d. davyi* se encuentra desde Nicaragua a Panamá, de Venezuela a Trinidad y las Antillas menores, *P. d. incae* se ubica al oeste de los Andes, Perú y *P. gymnonotus* desde Veracruz, México, a la Guyana Francesa y el centro de Brasil (Smith, 1972; Adams, 1989; Pavan y Marroig, 2017).

Los análisis moleculares y de morfometría craneal de Pavan y Marroig (2016) identifican a *P. gymnonotus* como un grupo monofilético y débilmente estructurado, mientras que los análisis moleculares en *P. davyi* mostraron dos grupos monofiléticos alopátricos y la morfometría dio dos morfogrupos divergentes, correspondientes a la zona geográfica de las subespecies *P. d. davyi* y *P. d. fulvus* descritas por Smith (1972). Mientras que la tercera subespecie descrita *P. d. incae*, forma un grupo distintivo con los análisis de morfometría, sugiriendo que el taxón puede representar una tercera especie dentro del complejo, sin embargo, por la ausencia de datos genéticos, no se reconoce como especie, por lo tanto, se asumió la existencia de tres especies *P. davyi*, *P. fulvus* y *P. gymnonotus* y dos subespecies *P. d. davyi* y *P. d. incae*.

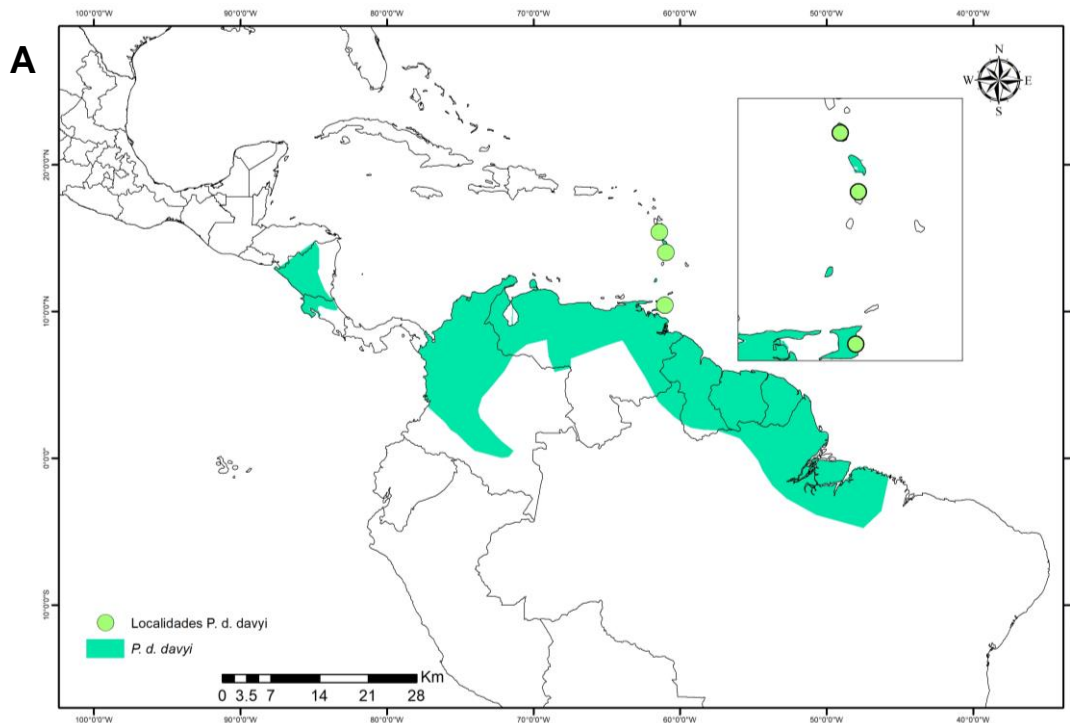
Estos taxones delimitados por Pavan y Marroig (2016) corresponden a linajes evolutivos reportados con diferentes análisis con marcadores moleculares y morfometría (Smith, 1972; Lewis-Oritt et al. 2001; Dávalos, 2006). Sin embargo, a pesar de que se han realizado estudios filogenéticos y morfológicos para describir la taxonomía del grupo, las relaciones filogenéticas no han sido del todo claras en

algunos trabajos presentando discordancias en los análisis filogenéticos y no se ha incluido un buen muestreo en México, en particular la región simpátrica de *P. fulvus* y *P. gymnonotus*.

Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo inferir relaciones filogenéticas de *P. fulvus*, *P. d. davyi* y *P. gymnonotus* con base en datos moleculares del ADN mitocondrial (ADNmt) y ADN nuclear (ADNnc) con el fin de identificar y corroborar la monofilia de estos tres los linajes evolutivos y conocer sus relaciones filogenéticas, incluyendo localidades de México, no consideradas anteriormente, así como sitios reportados previamente por Lewis-Oritt et al. (2001) y Pavan y Marroig (2016).

MATERIAL Y MÉTODO

Muestreo.- Los datos moleculares corresponden a la amplificación de tres marcadores nucleares (STAT5A, PRKCL y RAG2) y un mitocondrial (COI) de 26 murciélagos (11 *P. fulvus* y 15 *P. gymnonotus*) que fueron capturados con trampas de arpa y redes de niebla. Las especies fueron identificadas con las claves de Medellín et al. (2008). Además, en el estudio se incluyeron 89 secuencias (19 *P. d. davyi*, 15 *P. fulvus* y 55 *P. gymnonotus*) previamente publicadas por Lewis-Oritt et al. (2001) y Pavan y Marroig (2016), disponibles en GenBank. Las nuevas secuencias se subirán a GenBank (Figura 1 y Tabla 1).



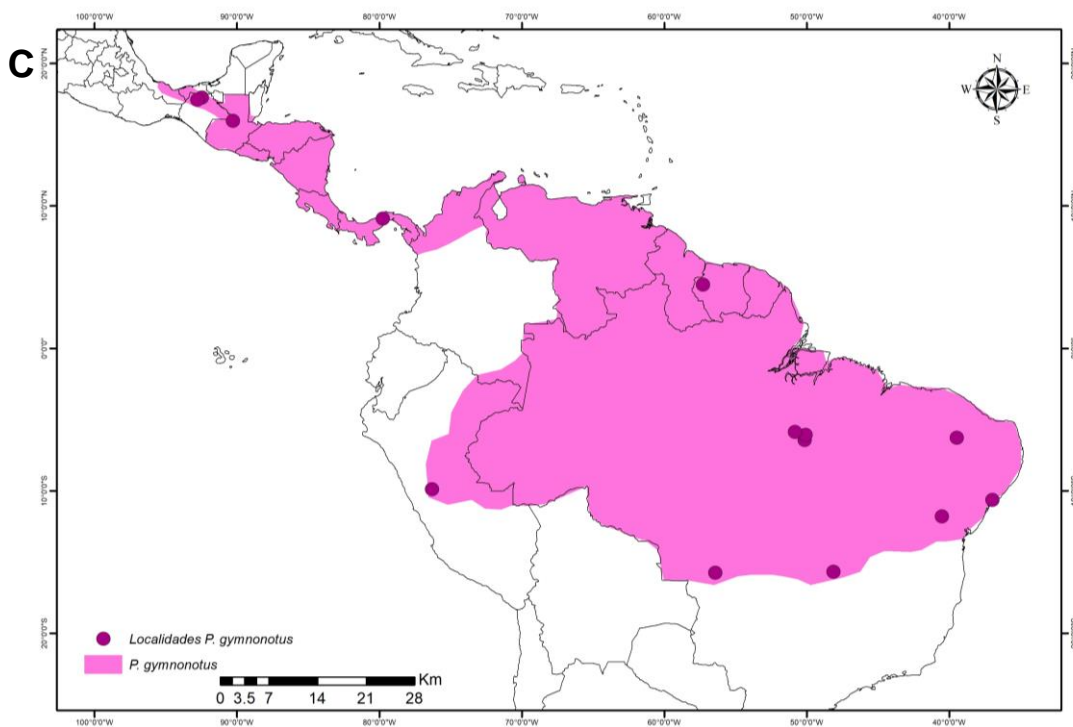
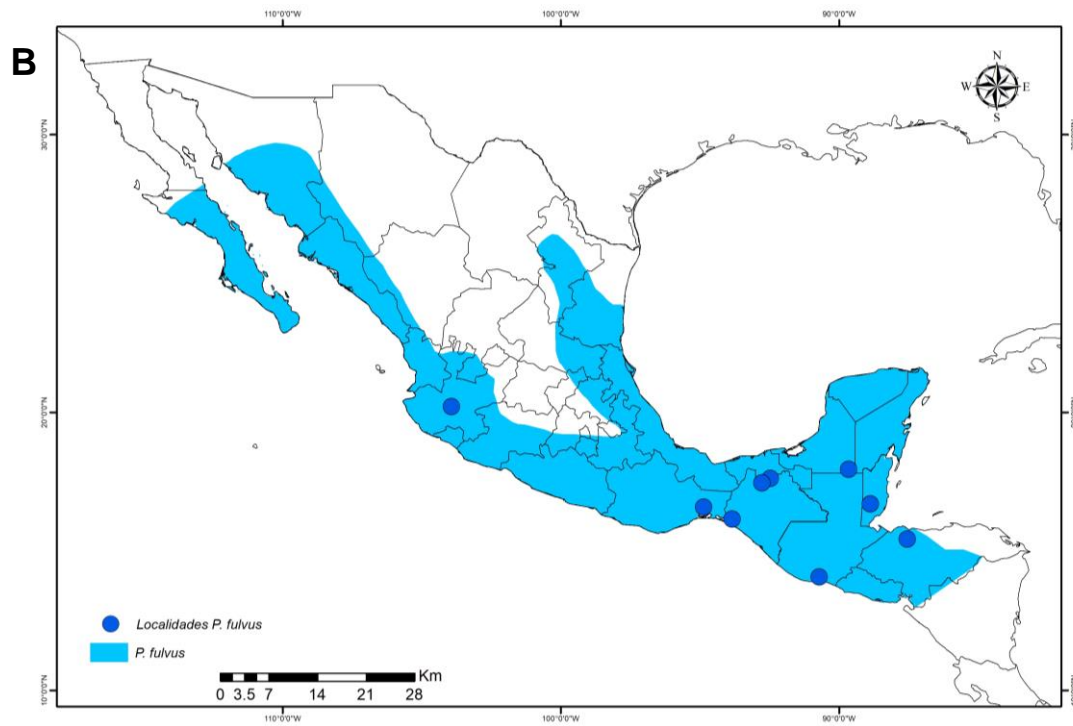


Figura 1. Ubicación de las 26 localidades y la distribución de cada una de las especies de estudio (Pavan y Marroig, 2016). **A.** *P. fulvus*, **B.** *P. d. davyi* y **C.** *P. gymnotus*.

Tabla 1. Localidades de estudio, tipo de marcador amplificado (B=COI; C=PRKC1; D=STAT5A; F=RAG2) y número de acceso al GenBank.

Localidad	Especie	Marcador	GenBank
Jalisco	<i>P. fulvus</i>	BCD	KX590178; KX590469; KX589689
La Venta, Oaxaca, México	<i>P. fulvus</i>	BCDF BCDF BCDF BCDF BCDF BCDF	Este estudio
Agua Blanca, Tabasco, México	<i>P. fulvus</i>	BCDF BCDF BCDF	Este estudio
Tapijulapa, Tabasco, México	<i>P. fulvus</i>	BCDF BCDF	Este estudio
Chiapas, México	<i>P. fulvus</i>	BCDF	KX590181; KX590471; KX589691; KX590385
Campeche, México	<i>P. fulvus</i>	BCD	JF447313 ; KX590455; KX589675
Tikal, El Petén, Guatemala	<i>P. fulvus</i>	BCD	JF446816; KX590459; KX589679
Gallon Jug, Distrito de Orange Walk, Belice	<i>P. fulvus</i>	BCD	KX590085; KX590412; KX589631
Colón, Honduras	<i>P. fulvus</i>	BCD	KX590179 ; KX590470; KX589690
Saint Joseph, Dominica	<i>P. d. davyi</i>	CD	KX590467; KX589687
Castries, Santa Lucía	<i>P. d. davyi</i>	BCD BCDF BCD	KX590183; KX590472; KX589692 KX590193; KX590473; KX589693; KX590386 KX590195; KX590474; KX589694
Reserva Arena, Nariva, Trinidad y Tobago	<i>P. d. davyi</i>	BCD	KX590177 ; KX590468; KX589688
Agua Blanca, Tabasco, México	<i>P. gymnonotus</i>	BCDF BCDF BCDF BCDF BCDF	Este estudio

		BCDF BCDF BCDF BCDF BCDF	
Tapijulapa, Tabasco, México	<i>P. gymnonotus</i>	BCDF BCDF BCDF BCDF BCDF	Este estudio
Grutas de Lanquín, Alta Verapaz, Guatemala	<i>P. gymnonotus</i>	BCDF	KX590174 ; KX590457; KX589677; KX590384
Parque Nacional Altos de Campana, Panamá	<i>P. gymnonotus</i>	BCD	JF447432; KX590462; KX589682
Brokopondo, Surinam	<i>P. gymnonotus</i>	BCD	KX590198; KX590477; KX589697
Huanuco, Perú	<i>P. gymnonotus</i>	BCD BCD	KX590196; KX590475; KX589695 KX590197; KX590476; KX589696
Jangada, Mato Grosso, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCD	KX590156; KX590450; KX589669
Barro Alto, Goiás, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCD	KX590169; KX590453; KX589673
Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCDF BCD	KX590285; KX590510; KX589731; KX590396 KX590288 ; KX590511; KX589732
Itabaiana, Sergipe, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCD BCD	KX590304; KX590515; KX589736 KX590305; KX590516; KX589737
Chapada Diamantina, Bahía, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCDF BCD	KX590308; KX590517; KX589738; KX590398 KX590310; KX590518; KX589739
Canaã dos Carajás, Pará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCD	KX590312; KX590519; KX589740
Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCD BCD	KX590360; KX590524; KX589745 KX590364 ; KX590525; KX589746

Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	BCDF	KX590138; KX590441; KX589658; KX590381
Westmoreland; Revival; Monarva Cave, Jamaica	<i>P. macleayii</i>	BCDF	KX590077, KX590407, KX589626, KX590375
St. Anns Parish, Jamaica	<i>P. quadridens</i>	BCDF	KX590268, KX590502, KX589722, KX590394

Extracción de ADN.- La extracción del ADN total se realizó a partir de 20 µg de músculo o membrana alar, utilizando el protocolo de extracción de sal común (Lopera-Barrero et al. 2008).

Datos moleculares.- Se amplificaron mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR); 422 pb del intrón PRKCL (Proteína-quinasa C), 475 pb del intrón STAT5A (Transductor de señal y activador de la transcripción 5A) (Eick et al. 2005), 717 pb del gen nuclear Activador de la Recombinación 2 (RAG2) con los primers RAG2-F1B y RAG2-R1 (Baker et al. 2000) y 651 pb del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) con los primers VF1d y VR1d (Ivanova et al. 2006) y utilizando las condiciones descritas previamente para cada uno de los fragmentos. Las amplificaciones fueron secuenciadas en un sentido (3´-5´) para el RAG2, PRKCL y STAT5A y en ambos sentidos (3´-5´ y 5´-3) para COI, en un equipo ABI PRISM 370xl.

Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon utilizando el programa Geneious v. 5.6.4 (Kearse et al. 2012) por medio del algoritmo Clustal W y se confirmaron a partir

de un análisis de BLAST estándar nucleótido-nucleótido en la base de datos de GenBank (Altschul et al. 1990).

Análisis filogenéticos y genealógicos.- Para evaluar el grado de diferenciación genética entre las poblaciones y divisiones taxonómicas se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando Arlequín v .3.5.1.2 con 10 000 permutaciones (Excoffier et al. 2005). Las relaciones filogenéticas entre las especies fueron reconstruidas tomando en cuenta cinco bases de datos: 1. Intrones (PRKC1, STAT5A) (Anexo 2), 2. RAG2 (Anexo 2), 3. Datos nucleares (PRKC1, STAT5A y RAG2), 4. Datos mitocondriales (COI) y 5. Datos nucleares y mitocondriales (Anexo 2). Para cada conjunto de datos se realizaron, análisis de inferencia bayesiana (IB) con cinco cadenas de Markov, 10 000 000 generaciones y descartando el 25% de burn-in, empleando el programa Mr. Bayes v 3.2 (Ronquist et al. 2012) en CIPRES Science Gateway (Miller et al. 2010) y un análisis de Máxima verosimilitud (ML) con el programa PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 2002), por medio de una búsqueda heurística con 1000 réplicas de Bootstrap (Felsenstein, 1985), utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii* y *P. quadridens* (Tabla 1).

El modelo evolutivo que mejor explica los cambios en las sustituciones nucleotídicas, de cada uno de los loci, fue estimado con el programa jModeltest v 2.1.6 utilizando el Criterio de Información de Akaike (Posada, 2008; Alfaro y Huelsenbeck, 2006), que permitió análisis particionados en los análisis filogenéticos multi-locus, incorporando así distintos modelos evolutivos, TIM3+I para PRKC1, GTR+G para STAT5A, TPM2uf+I para RAG2 y TIM2+G para COI.

Para inferir las relaciones genealógicas entre los individuos de las especies con los diferentes loci, se realizó una red de haplotipos con el programa Networks v.4.6.1.3 (Bandelt et al. 1999), resolviendo los bucles (loops) de acuerdo con los criterios de Pfenninger y Posada (2002), calculando las distancias genéticas entre haplogrupos con el programa MEGA v. 5.0.5 (Tamura et al. 2011), empleando el modelo Kimura 2 Parámetros (K2P) para el ADNmt y p-distance para el ADNnc.

Árbol de especies.- Se estimó un árbol de especies en StarBEAST con el programa BEAST 2.4.8 (Bouckaert et al. 2014) a partir de datos multilocus (marcadores nucleares + mitocondriales). Se realizó un primer análisis, tomando en cuenta los cuatro marcadores, con la tasa de mutación previamente estimado para la familia Mormoopidae por Pavan y Marroig (2017), un segundo análisis considerando los datos de RAG2 y COI, utilizando la tasa de mutación estimado por Clare et al. (2011), posteriormente se realizó otro análisis considerando las tres especies, donde los individuos se asignaron de acuerdo a su morfotipo y otro considerando los resultados filogenéticos.

Cada análisis en BEAST se realizó dos veces con 30 000 000 de generaciones, utilizando un modelo de especiación Yule con una media exponencial de 0.8 (yule.birthRate), uncorrelated lognormal relaxed clock y una tasa de sustitución para cada partición (ucl.d.mean) con una tasa de sustitución de 0.01 sustituciones por sitio por millón de años (s/s/my) para PRKCL y STAT5A, 0.005 s/s/my para RAG2 y 0.025 s/s/my para COI, de acuerdo a lo reportado por Pavan y Marroig (2017); mientras que para el segundo análisis se utilizó una tasa de 0.00097 s/s/my para RAG2 y para COI

0.0175 s/s/my, la media del intervalo de la tasa de mutación reportado por Clare et al. (2011).

Tiempos de divergencia.- De acuerdo con los análisis filogenéticos por individuos, se estimaron los tiempos de divergencia con el programa BEAST 1.8.0 (Drummond y Rambaut, 2007), con todos los loci y se realizó un segundo análisis utilizando RAG2 y COI. El programa se corrió dos veces por 30 000 000 de generaciones, utilizando un Yule tree prior (yule.birthRate= 0.8), uncorrelated lognormal relaxed clock y con la misma tasa de sustitución por sitio por millón de años que los árboles de especies. Las filogenias, los árboles de especies y tiempos de divergencia fueron visualizados en FigTree 1.1.2 (Rambaut y Drummond, 2008).

RESULTADOS

La alineación de los intrones juntos PRKCL y STAT5A (897 pb) de 54 individuos, presentaron 13 haplotipos, 15 sitios polimórficos y una composición de bases de: T: 32.2%, C: 21.8, A: 24.1% y G: 21.9%. El RAG2 (712 pb) amplificado en 32 individuos, presentó 8 haplotipos, 8 sitios polimórficos, con una composición de bases de: T: 25.5%, C: 22, A: 30.2% y G: 22.3%; mientras que el COI (651 pb) de 53 individuos mostró 25 haplotipos, 69 sitios polimórficos y una composición de bases de: T: 29.4%, C: 26.9, A: 25.3% y G: 18.5% (Anexo 1).

Análisis filogenéticos y genealógicos.- El AMOVA realizado con los datos del ADNnc indicó una F_{ST} de 0.7 y un mayor porcentaje de la variación (91%) entre las especies, contrario a los datos del ADNmt, con una F_{ST} de 0.93 y donde el mayor porcentaje de la variación se presentó entre las poblaciones dentro de las especies (66%).

Los análisis de IB y ML convergieron en la misma topología. De acuerdo con las filogenias basadas en los datos nucleares, se encuentran dos clados monofiléticos, uno que corresponde a *P. fulvus* y *P. d. davyi* y el segundo por *P. gymnonotus*, mostrando así una mayor relación filogenética entre *P. fulvus* y *P. d. davyi*, que antes eran consideradas como subespecies (Smith, 1972). Se encontró una distancia genética de 0.2% (p-distance) entre *P. fulvus* y *P. d. davyi* y de 0.8% entre *P. fulvus/P. d. davyi* vs *P. gymnonotus*.

En la red de haplotipos de los intrones, no se observan haplotipos compartidos, mientras que en el gen RAG2, sí se encontraron haplotipos mixtos, un haplotipo

compartido entre *P. fulvus* y *P. d. davyi* y un haplotipo entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus* (Figura 2 y Anexo 2).

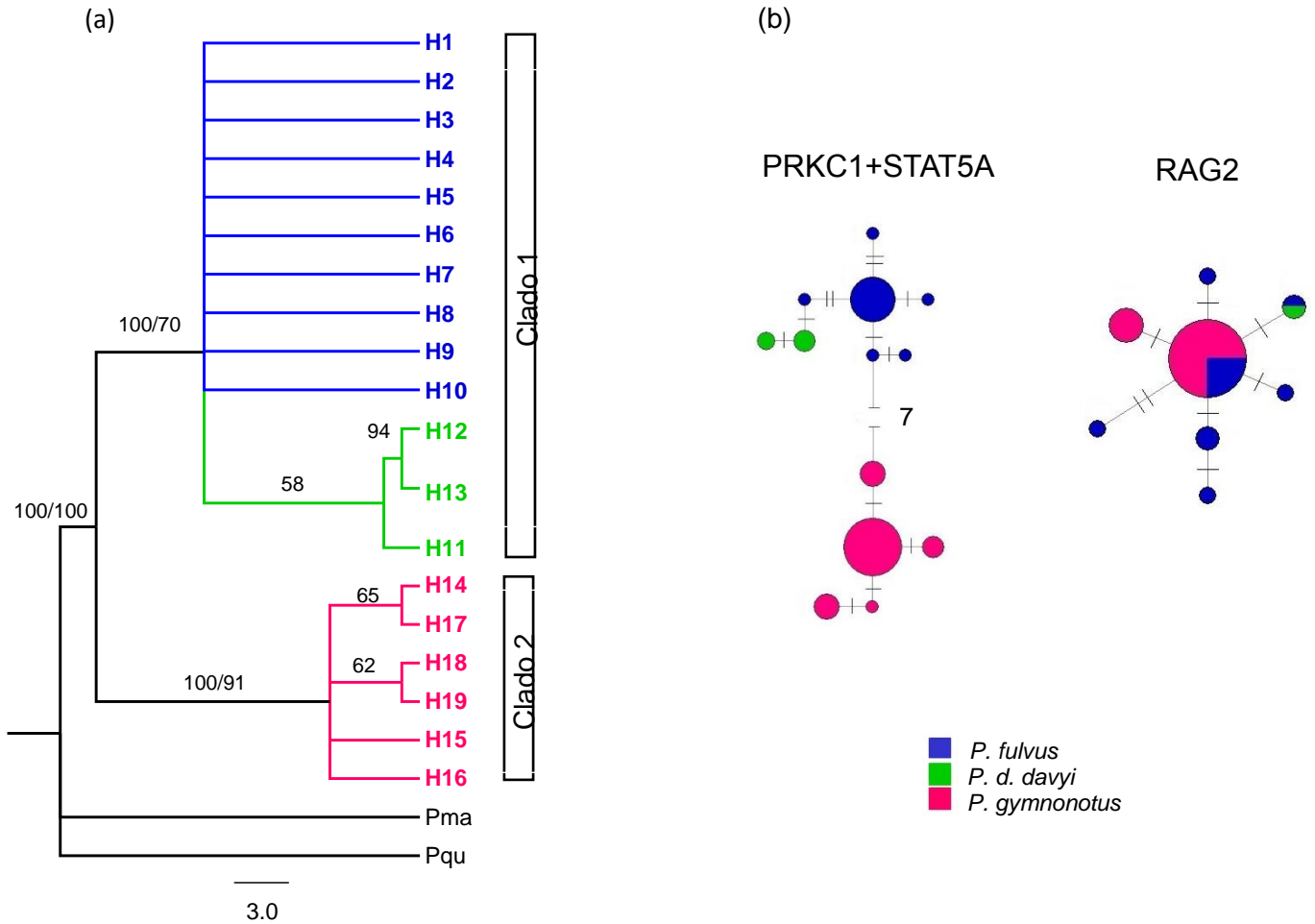


Figura 2. ADN nuclear. (a) Reconstrucción filogenética de datos nucleares (PRKC1, STAT5A y RAG2). Los valores de soporte en las ramas indican: Probabilidad Posterior (IB)/Bootstrap (ML), utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii* y *P. quadridens*. Los colores indican las diferentes especies en azul *P. fulvus*, en verde *P. d. davyi* y en rosa *P. gymnonotus*. (b) Redes de haplotipos de los intrones (PRKC1+STAT5A) y el RAG2. Las líneas pequeñas que conectan a cada uno de los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos, mientras que el tamaño de los círculos representa la frecuencia de cada haplotipo.

Los árboles filogenéticos obtenidos con el ADNmt difirieron del ADNnc, obteniendo tres clados que corresponden a cada una de las especies (*P. d. davyi*, *P. fulvus* y *P. gymnonotus*), separados por $\geq 6.2\%$ de distancia genética (K2P) y ≥ 32 pasos mutacionales y observando una mayor relación filogenética entre *P. d. davyi* y *P. gymnonotus*. El primer clado se encuentra conformado por *P. fulvus* y por individuos de *P. gymnonotus* de México y Guatemala, países que corresponden a la distribución simpátrica de estas dos especies. En este clado se pueden observar siete haplotipos pertenecientes a *P. fulvus*, dos a *P. gymnonotus* y dos haplotipos compartidos. El segundo clado conformado por cuatro haplotipos de *P. d. davyi* y un haplotipo compartido por un individuo de *P. fulvus* y dos de *P. gymnonotus* ambos de México, mientras que el tercer clado se encuentra conformado por nueve haplotipos de *P. gymnonotus* del Sur de su distribución (Panamá-Brasil) (Figura 3).

Pteronotus gymnonotus fue la única especie que presentó una estructuración intraespecífica, con dos linajes, uno al Norte (México-Guatemala) y otro clado al Sur (Panamá-Brasil) de su distribución (Figura 3).

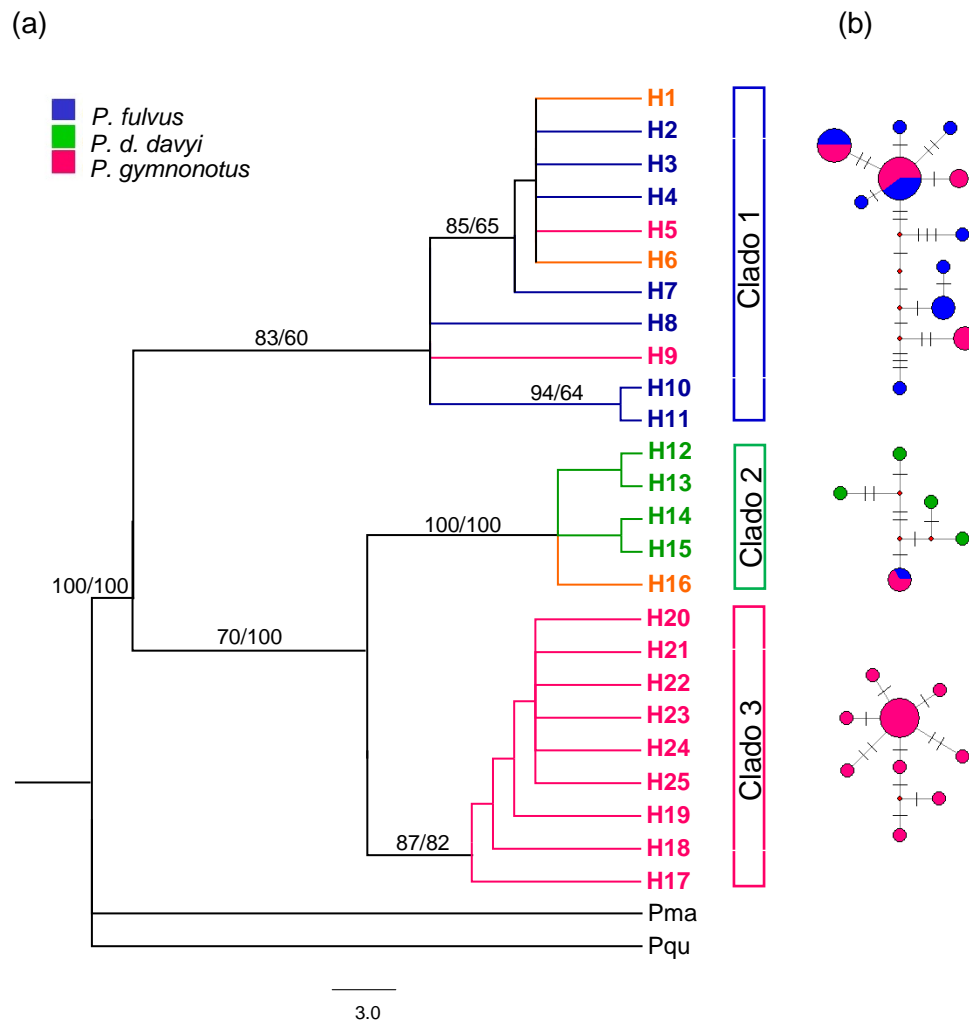


Figura 3. ADN mitocondrial. (a) Reconstrucción filogenética de datos mitocondriales (COI). Los valores de soporte en las ramas indican: Probabilidad Posterior (IB)/Bootstrap (ML), utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii* y *P. quadridens*. Los colores indican las diferentes especies en azul *P. fulvus*, en verde *P. d. davyi*, en rosa *P. gymnonotus* y en naranja lo haplotipos compartidos entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*. (b) Red de haplotipo de COI. Las líneas pequeñas que conectan a cada uno de los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos, los círculos pequeños en rojo representan a los haplotipos hipotéticos y el tamaño de los círculos representa la frecuencia de cada haplotipo.

Árbol de especies.- Se encontró un mayor soporte en los análisis cuando se separaron los individuos de *P. gymnonotus* del Norte y del Sur de acuerdo con los resultados filogenéticos del ADNmt. Los resultados indicaron la presencia de cuatro especies: *P. d. davyi*, *P. fulvus*, *P. gymnonotus* del Norte y *P. gymnonotus* del Sur. Se obtuvo como especie basal a *P. gymnonotus* Sur, mientras que *P. fulvus* y *P. gymnonotus* del Norte especies derivadas (Figura 4).

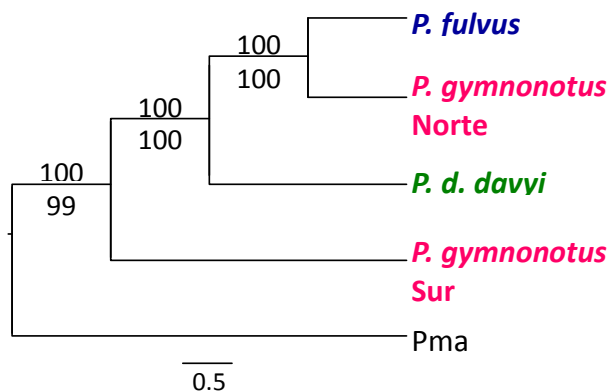


Figura 4. Árbol de especies generando en StarBEAST, utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii*. Los valores de soporte (Pp) son indicados para cada clado, arriba el análisis utilizando los Intrones, RAG2 y COI con la tasa de mutación reportada por Pavan y Marroig (2016); abajo utilizando RAG2 y COI con la tasa de mutación reportada por Clare (2011).

Tiempos de divergencia.- De acuerdo con los intrones, RAG2 y COI, empleando la tasa de sustitución reportada por Pavan y Marroig (2016), el tiempo de divergencia obtenido entre *P. gymnonotus* del Sur con el resto (*P. d. davyi*, *P. fulvus* y *P. gymnonotus* Norte) fue de 1.025 Ma (0.848-1.233); de *P. d. davyi* / *P. gymnonotus* Norte vs *P. fulvus* fue de 0.778 Ma (0.649-0.924); mientras que el tiempo de divergencia entre *P. fulvus* vs *P. gymnonotus* del Norte fue de 0.713 Ma (0.576-0.856) (Figura 5).

Por otra parte, utilizando los marcadores COI y RAG2, utilizando la tasa de sustitución reportada por Clare (2011), se estimó un tiempo de divergencia entre *P. gymnonotus* del Sur con el resto (*P. d. davyi*, *P. fulvus*, *P. gymnonotus* Norte) de 2.188 Ma (1.758-2.657); entre *P. d. davyi* / *P. gymnonotus* Norte vs *P. fulvus* de 1.571 Ma (1.267-1.908); y entre *P. fulvus* vs *P. gymnonotus* del Norte fue de 1.363 Ma (1.018-1.699) (Figura 6). Presentando una diferencia en la mayoría de los nodos de alrededor de 1 millón de años entre las diferentes tasas de mutación.

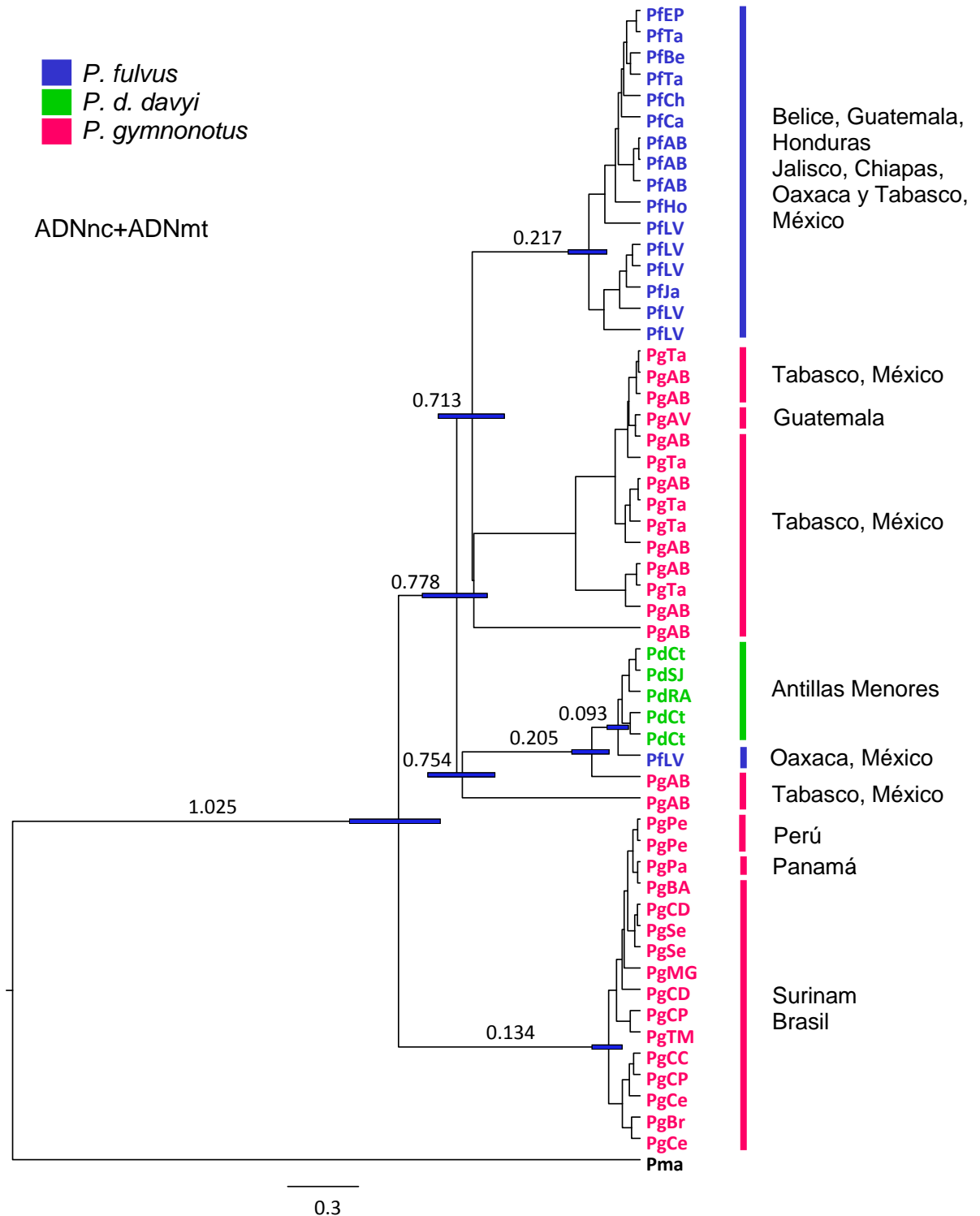


Figura 5. Reconstrucción Bayesiana con tiempos de divergencia para ADNnc+ADNmt, y utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii*. Las barras corresponden al intervalo de 95% de la densidad alta posterior (HPD). Sobre las ramas se muestra el tiempo de divergencia en millones de años.

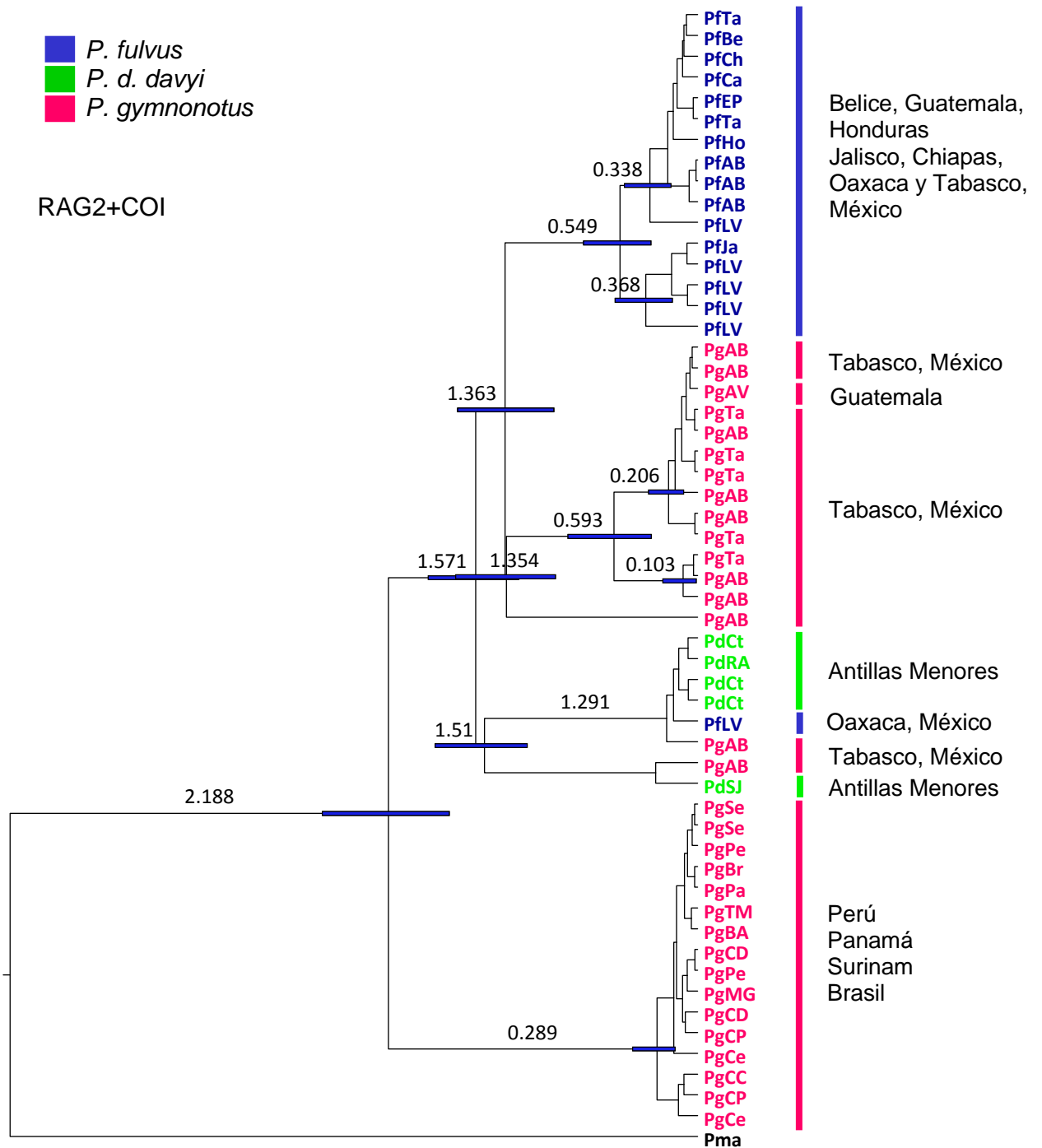


Figura 6. Reconstrucción Bayesiana con tiempos de divergencia para los genes RAG2 y el COI, utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii*. Las barras corresponden al intervalo de 95% de la densidad alta posterior (HPD). Sobre las ramas se muestra el tiempo de divergencia en millones de años.

DISCUSIÓN

Las relaciones filogenéticas obtenidas a partir del ADNnc indican la presencia de dos clados (*P. fulvus* + *P. d. davyi* y *P. gymnonotus*), esto se puede encontrar porque las especies se encuentran estrechamente relacionadas y los marcadores nucleares utilizados (PRKCL, STAT5A y RAG2), presentan una menor tasa de mutación que el marcador mitocondrial empleado (COI) (Clare et al. 2011; Pavan y Marroig, 2017). Con el ADNmt, se infirieron tres clados, el primer clado conformado por *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, el segundo por *P. d. davyi* y el tercer clado por *P. gymnonotus*.

Las diferencias en los resultados filogenéticos basados en ADNnc y ADNmt suele ser resultados de diferentes factores como selección natural, introgresión, clasificación incompleta de linajes (Funk y Omland, 2003; Avise, 2004), y otras explicaciones que han sido propuestas por diversos trabajos (Berthier et al. 2006; Newbound et al. 2008; Vallo et al. 2013; Khan et al. 2014). Considerando la diferencia en la tasa de mutación entre los diferentes marcadores moleculares empleados, es probable que la incongruencia del ADNnc y ADNmt es el resultado de clasificación incompleta de linajes y/o introgresión genética, siendo muy difícil distinguir entre estos dos procesos, debido a que producen patrones genéticos similares (Buckley et al. 2006).

El haplotipo compartido (H16) entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, observado en las filogenias del ADNmt y cercanamente relacionado con *P. d. davyi*, puede ser rastro de polimorfismo ancestral (clasificación incompleta de linajes), debido a que en este haplotipo no se observa una relación geográfica y la presencia del polimorfismo

ancestral es común entre especies cercanas filogenéticamente (Buckley et al. 2006; Mao et al. 2013b; Sullivan et al. 2014; Mao et al. 2016).

Mientras que los haplotipos compartidos entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus* (H1 y H6) pueden estar explicados por introgresión genética (flujo genético entre taxa), debido a que los individuos de *P. gymnonotus* que presentan estos haplotipos, fueron colectados en México y Guatemala, países donde se distribuyen ambas especies y en donde la introgresión genética entre estas especies ha sido sugerida (Pavan y Marroig, 2016). Este flujo genético entre especies, pudo haber sido la causa de haber estimado un menor tiempo de divergencia en este estudio, en comparación con lo reportado por Pavan y Marroig (2017), en donde reportan 2.5 Ma de separación entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, mientras que en este estudio se encuentra una separación de 2.188 a 1.025 Ma de *P. fulvus* con *P. gymnonotus* del Sur de su distribución y 1.363 a 0.713 Ma con los *P. gymnonotus* del Norte, individuos que presentan los haplotipos compartidos con *P. fulvus*. Estos datos podría corresponder a la fecha de contacto entre estas dos especies, entre 2.188 a 0.713 Ma, periodo que coincide con la emergencia del Istmo de Panamá en el Plioceno tardío y su permanente enlace con Sudamérica hace 3.1 a 1.8 Ma, permitiendo el intercambio de fauna terrestre entre ambos continentes, que pudo haber propiciado cambios en la distribución de las especies y formando un contacto secundario en Centroamérica entre estas especies de murciélagos (Bagley y Johnson, 2014).

La introgresión genética del ADNmt, también puede ser la causa de un mayor porcentaje de la variación encontrada, entre las poblaciones dentro de las especies

(66%) en el AMOVA con los datos mitocondriales, contrariamente a lo encontrado con el AMOVA realizado con datos nucleares (porcentaje de variación entre las especies de 91%). Del mismo modo el flujo genético entre especies puede ser la causa de los dos linajes encontrados en *P. gymnonotus*, observados en las filogenias con los datos del ADNnc+ADNmt y en los árboles de especies. Esta estructuración intraespecífica en *P. gymnonotus* no ha sido observada con caracteres morfológicos, a pesar de presentar una distribución con una gran extensión geográfica (México a Brasil), ni con caracteres moleculares, a excepción del COI y citocromo b, donde se ha observado una baja divergencia genética (<1%) entre Suramérica y Centroamérica (Smith,1972; Pavan, 2014; Pavan y Marroig 2016).

Estos resultados se suman a varios estudios, donde diferentes regiones genómicas de taxones estrechamente relacionados muestran una variación en la estructuración genética encontrada (Hulva et al. 2010; Mao et al. 2014; Dong et al. 2014; Naidoo et al. 2016). Por lo tanto, es necesario utilizar una mayor cantidad de marcadores moleculares y de muestras, para confirmar la introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*.

De acuerdo con los análisis de los datos nucleares y mitocondriales, se sugiere la presencia de tres linajes evolutivos y hermanos, que corresponden *P. fulvus*, *P. d. davyi* y *P. gymnonotus*, especies anteriormente identificadas por Pavan y Marroig (2016), y que presentan una distancia genética $\geq 6.2\%$ (K2P) con el marcador mitocondrial (COI). Estos valores de distancias genéticas encontradas con este marcador molecular son mayores a lo reportado entre especies del género *Pteronotus* (Pavan et al. 2018) y en

otras especies de murciélagos (Clare et al. 2011). Sin embargo, para ubicar los límites geográficos entre los linajes de este complejo de especies y los procesos evolutivos que los han originado, son necesarias muestras de *P. d. davyi* de Centroamérica.

De acuerdo con los tiempos de divergencia calculada para el subgénero *Pteronotus*, la separación entre los linajes ocurrió entre 2.188 y 1.025 Ma, que corresponde al Plioceno y Pleistoceno. Durante este periodo, Centroamérica y el Norte de Sudamérica, que es donde se ha sido sugerido un papel importante en el proceso de diversificación temprana en el género *Pteronotus* (Pavan y Marroig, 2017), presentó oscilaciones climáticas y fluctuaciones del nivel del mar, que afectaron la composición y el hábitat de la región, que ha limitado el flujo de genes y definido patrones genéticos entre poblaciones de peces y especies terrestres, incluyendo murciélagos, características que pudieron haber promovido la diversificación del subgénero *Pteronotus* (Hoffman y Baker, 2003; Wang et al. 2008; Bagley y Johnson, 2014).

Código de barras de la vida

De acuerdo con los resultados de este estudio, se tiene que tomar con precaución la identificación molecular de las especies realizada únicamente con una región del ADN. Tradicionalmente el gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) del ADNmt, ha sido utilizada en el código de barras de la vida, por presentar una alta tasa de sustitución en la mayoría de animales, lo que resulta en una alta variación de las secuencias entre las especies del mismo género permitiendo así su identificación (Hebert et al. 2003).

Sin embargo, existen limitaciones al usar únicamente la diferenciación de este gen para la identificación y para inferir los límites de las especies, como es el caso de la presencia de retención del polimorfismo ancestral e introgresión genética, que ha sido ampliamente documentada en la literatura (Degnan 1993; Weckstein et al. 2001; Ballard y Whitlock 2004; Moritz y Cicero, 2004; Mao et al. 2016) y que puede provocar una mala interpretación de los datos, en particular cuando el ADNmt es discordante con los análisis de marcadores nucleares y con la morfología (Newbound et al. 2008).

Por lo tanto, la divergencia del ADNmt no debería ser el único criterio para delimitar a las especies, si no también tomar en cuenta datos genéticos nucleares y evidencia morfológica y ecológica (Newbound et al. 2008).

LITERATURA CITADA

ALFARO, M. E., AND J. P. HUELSENBECK. 2006. Comparative performance of Bayesian and AIC-based measures of phylogenetic model uncertainty. *Systematic Biology* 55(1):89–96.

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, AND D. J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410.

AVISE, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*, 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer.

BAKER, R., C. PORTER, J. PATTON, AND R. VAN DEN BUSSCHE. 2000. Systematics of Bats of the Family Phyllostomidae Based on RAG2 DNA Sequences. *Occasional Papers of the Museum of Texas Tech University* 202:1–16.

BALLARD, J. W. O AND M. C. WHITLOCK. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729–744.

BANDELT, H-J., P. FORSTER, AND A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.

BAGLEY, J.C. AND J. B. JOHNSON. 2014. Phylogeography and biogeography of the lower Central American Neotropics: diversification between two continents and between two seas. *Biological Reviews* 89:767–790.

BERTHIER, P., L. EXCOFFIER AND M. RUEDI. 2006. Recurrent replacement of mtDNA and cryptic hybridization between two sibling bat species *Myotis myotis* and *Myotis blythii*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 273(1605):3101–3123.

Bouckaert, R., J. Heled, D. Kühnert, T. Vaughan, C-H. Wu, D. Xie, M. A. Suchard, A. Rambaut and A. J. Drummond. 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology* 10(4).

BUCKLEY, T. R., M. CORDEIRO, D. C. MARSHALL, AND C. SIMON. 2006. Differentiating between Hypotheses of Lineage Sorting and Introgression in New Zealand Alpine Cicadas (*Maoricicada dugdale*), *Systematic Biology* 5(3):411–425.

CLARE, E. L., B. K. LIM, M. B. FENTON, AND P. D. N. HEBERT. 2011. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *PLoS ONE* 6(7):e22648. doi:10.1371/journal.pone.0022648.

DÁVALOS, L. M. 2006. The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 88:101–118.

DEGNAN, S. 1993 The perils of single gene trees Mitochondrial versus single-copy nuclear DNA variation in white eyes (Aves: Zosteropidae). *Molecular Ecology* 2(4): 219–225.

DRUMMOND A. J., A. RAMBAUT AND M. SUCHARD. BEAST 1.8.0. 2013. <http://beast.bio.ed.ac.uk>. Accessed 16 March 2018.

DONG, J., X. MAO, H. SUN, D. M. IRWIN, S. ZHANG AND P. HUA. 2014. Introgression of mitochondrial DNA promoted by natural selection in the Japanese pipistrelle bat (*Pipistrellus abramus*). *Genetica* 142(6):483–494.

EICK, G. N., D. S. JACOBS, AND C. A. MATTHEE. 2005. A nuclear DNA phylogenetic perspective on the evolution of echolocation and historical biogeography of extant bats (Chiroptera). *Molecular Biology and Evolution* 22(9):1869–1886.

EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.

FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783–791.

FUNK, D. J. AND K. E. OMLAND. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34:397–423.

GRAY, J. E. 1838. A revision of the genera of bats (Vespertilionidae), and the description of some new genera and species. *Magazine of Zoology and Botany* 2:483–505.

GRAY, J. E. 1839. Descriptions of some Mammalia discovered in Cuba by W. S. MacLeay, Esq. *The Annals and magazine of natural history* 4:1–7.

GRAY, J. E. 1843. Letter addressed to the Curator. *Proceedings of the Zoological Society of London* :50.

GUNDLACH, J. 1840. Beschreibung von vier auf Cuba gefangnen Fledermausen. *Archiv fur Naturgeschichte* 6:356–358.

HEBERT, P. D., S. RATNASINGHAM AND J. R. DE WAARD. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (Suppl 1), S96–S99.

HOFFMANN, F. G. AND R. J. BAKER. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (*Carollia*: Phyllostomidae). *Molecular Ecology* 12(12):3403–3414.

HULVA, P., I. HORÁČEK, P. P. STRELKOV AND P. BENDA. 2004. Molecular architecture of *Pipistrellus pipistrellus/Pipistrellus pygmaeus* complex (Chiroptera: Vespertilionidae): further cryptic species and Mediterranean origin of the divergence. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 32(3):1023–1035.

IVANOVA, N. V., J. R. DEWAARD, AND P. D. N. HEBERT. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6:998–1002.

KEARSE, M., R. MOIR, A. WILSON, S. STONES-HAVAS, M. CHEUNG, S. STURROCK, S. BUXTON, A. COOPER, S. MARKOWITZ, C. DURAN, T. THIERER, B. ASHTON, P. MENTJIES, AND A. DRUMMOND. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12):1647–1649.

KHAN, F. A. A., C. D. PHILLIPS, AND R. J. BAKER. 2014. Timeframes of Speciation, Reticulation, and Hybridization in the Bulldog Bat Explained Through Phylogenetic Analyses of All Genetic Transmission Elements. *Systematic Biology* 63(1):96–110.

LEACH, W. E. 1821. The characters of seven genera of bats with foliaceous appendages to the nose. *Transactions of the Linnean Society of London* 13:73–82.

LEWIS-ORITT, N., C. A. PORTER, AND R. J. BAKER. 2001. Molecular systematics of the family Mormoopidae (Chiroptera) based on cytochrome b and recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20(3):426–436.

LOPERA-BARRERO, N. M., J. A. POVH, R. P. RIBEIRO, P. C. GOMES, C. B. JACOMETO, AND T. D. SILVA LOPES. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria* 35(1):77–86.

LÓPEZ-WILCHIS, R., M. FLORES-ROMERO, L. M. GUEVARA-CHUMACERO, A. SERRATO-DÍAZ, J. DÍAZ-LARREA, F. SALGADO-MEJIA, C. IBAÑEZ, L. O. SALLES AND J. JUSTE. 2016. Evolutionary scenarios associated with the *Pteronotus parnellii* cryptic species-complex (Chiroptera: Mormoopidae). *Acta Chiropterologica* 18(1): 91–116.

MAO, X., G. HE, J. ZHANG, S. J. ROSSITER, AND S. ZHANG. 2013b. Lineage divergence and historical gene flow in the Chinese horseshoe bat (*Rhinolophus sinicus*). *Plos One*, 8(2): e56786.

MAO, X., S. ZHANG AND S. J. ROSSITER. 2016. Differential introgression suggests candidate beneficial and barrier loci between two parapatric subspecies of Pearson's horseshoe bat *Rhinolophus pearsoni*. *Current Zoology* 62(4):405–412.

MAO, X., G. ZHU, L. ZHANG, S. ZHANG AND S. J. ROSSITER. 2014. Differential introgression among loci across a hybrid zone of the intermediate horseshoe bat (*Rhinolophus affinis*). *BMC evolutionary biology* 14(1):154.

MEDELLÍN, R. A., H. T. ARITA, AND O. SÁNCHEZ. 2008. Identificación de los murciélagos de México, clave de campo, Segunda Edición. Instituto de Ecología, UNAM. 78 p.

MILLER, M. A., W. PFEIFFER, AND T. SCHWARTZ. 2010. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp 1–8.

MORITZ, C. AND C. CICERO. 2004. DNA barcoding: Promise and pitfalls. *PLoS Biology* 2(10):e354.

NAIDOO, T., M. C. SCHOEMAN, S. M. GOODMAN, P. J. TAYLOR AND J. M. LAMB. 2016. Discordance between mitochondrial and nuclear genetic structure in the bat *Chaerephon pumilus* (Chiroptera: Molossidae) from southern Africa. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde* 81(2):115–122.

NEWBOUND, C. N., S. HISHEH, A. SUYANTO, R. A. HOW AND L. H. SCHMITT. 2008. Markedly discordant mitochondrial DNA and allozyme phylogenies of tube-nosed fruit bats, *Nyctimene*, at the Australian–Oriental biogeographical interface. *Biological journal of the Linnean Society* 93(3):589–602.

PAVAN, A. C. 2014. Sistemática e história evolutiva do gênero de morcegos notropical *Pteronotus* (Chiroptera: Mormoopidae). Dr. Thesis, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

PAVAN, A. C., AND G. MARROIG. 2016. Integrating multiple evidences in taxonomy: species diversity and phylogeny of mustached bats (Mormoopidae: *Pteronotus*). *Molecular phylogenetics and evolution* 103:184–198.

PAVAN, A. C., AND G. MARROIG. 2017. Timing and patterns of diversification in the Neotropical bat genus *Pteronotus* (Mormoopidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 108:61–69.

Pavan, A. C., P. E. Bobrowiec, and A. R. Percequillo. 2018. Geographic variation in a South American clade of mormoopid bats, *Pteronotus* (*Phyllodia*), with description of a new species. *Journal of Mammalogy* 99(3):624-645.

PETERS, W. 1864. Berichtete iiber einige neue saugetheire (*Mormops*, *Macrotus*, *Vesperus*, *Molossus*, *Capromys*), amphibien (*Platydactylus*, *Otocryptis*, *Euprepes*, *Ungalia*, *Dromicus*, *Tropidodontus*, *Xenodon*, *Hylodes*) und fische (*Sillago*, *Sebastes*, *Channa*, *Myctophum*, *Carassius*, *Barbus*, *Capoeta*, *Poecilia*, *Saurenhelys*, *Leptocephalus*). *Monatsbericht des Akademie der Wissenschaften zu Berlin* 1864:381–399.

PFENNINGER, M., AND D. POSADA. 2002 Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56:1776–1788.

POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7):1253–1256.

RAMBAUT, A. & A. DRUMMOND. 2008. Figtree v1. 1.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom.

RONQUIST, F., M. TESLENKO, P. VAN DER MARK, D. L. AYRES, A. DARLING, S. HÖHNA, B. LARGET, L. LIU, M. A. SUCHARD, AND J. P. HUELSENBECK. 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61:539–542.

SMITH, J. D. 1972. Systematics of the chiropteran family Mormoopidae. *Miscellaneous Publications, University of Kansas, Museum of Natural History* 56:1–132.

SULLIVAN, J., J. R. DEMBOSKI, K. C. BELL, S. HIRD, B. SARVER, N. REID, AND J. M. GOOD. 2014. Divergence with gene flow within the recent chipmunk radiation (*Tamias*). *Heredity* 113(3):185–194.

SWOFFORD, D. L. 2002. Paup*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). Version 4.0b10 Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.

VALLO, P., P. BENDA, J. ČERVENÝ AND P. KOUBEK. 2013. Conflicting mitochondrial and nuclear parphyly in small-sized West African house bats (*Vespertilionidae*). *Zoologica scripta* 42(1):1–12.

WAGNER, J. A. 1843. Diagnosen neuer Arten brasilischer Handflunger. *Archive für Naturgeschichte* 9:365–368.

WANG, I. J., A. J. CRAWFORD AND E. BERMINGHAM. 2008. Phylogeography of the Pygmy Rain Frog (*Pristimantis ridens*) across the lowland wet forests of isthmian Central America. *Molecular phylogenetics and evolution* 47(3):992–1004.

WECKSTEIN, J. D., R. M. ZINK, R. C. BLACKWELL-RAGO AND D. A. NELSON. 2001. Anomalous variation in mitochondrial genomes of White-crowned (*Zonotrichia leucophrys*) and Golden-crowned (*Z. atricapilla*) sparrows: Pseudogenes, hybridization, or incomplete lineage sorting? *The Auk* 118:231–236.

ZÁRATE-MARTÍNEZ, D. G., R. LÓPEZ-WILCHIS, J. D. RUIZ-ORTÍZ, I. D. L. A. BARRIGA-SOSA, A. SERRATO DÍAZ, C. IBÁÑEZ, J. JUSTE AND L. M. GUEVARA-CHUMACERO. 2018 Intraspecific evolutionary relationships and diversification patterns of the Wagner's mustached bat, *Pteronotus personatus* (Chiroptera: Mormoopidae). *Acta Chiropterologica* 20:51–58.

ANEXOS

Anexo 1. Lista de haplotipos de *P. fulvus*, *P. davyi* y *P. gymnonotus* para PRKC1, STAT5A, RAG2 y COI.

Se muestra el número de haplotipos, la especie, la localidad y entre paréntesis el número de individuos correspondientes a cada localidad

Intrones (PRKC1 + STAT5A)

Haplotipos	Especie y localidad
H1	<i>P. fulvus</i> . Jalisco, México (1).
H2	<i>P. fulvus</i> . Gallon Jug, Distrito de Orange Walk, Belice (1); Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (1); Agua Blanca, Tabasco, México (3); Tapijulapa, Tabasco, México (2); La Venta, Oaxaca, México (5).
H3	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H4	<i>P. fulvus</i> . Chiapas, México (1).
H5	<i>P. fulvus</i> . Campeche, México (1).
H6	<i>P. fulvus</i> . Colón, Honduras (1).
H7	<i>P. davyi</i> . St. John, Dominica (1); Castries, Santa Lucia (2).
H8	<i>P. davyi</i> . Praslin, Trinidad y Tobago (1); Castries, Santa Lucía (1).
H9	<i>P. gymnonotus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (2); Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H10	<i>P. gymnonotus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (7); Tapijulapa, Tabasco, México (3); Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (1); Parque Nacional Altos de Campana, Panamá (1);

	Huanuco, Perú (2); Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil (1); Jangada, Mato Grosso, Brasil (1); Barro Alto, Goiás, Brasil (1); Itabaiana, Sergipe, Brasil (1); Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1); Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (1).
H11	<i>P. gymnonotus</i> . Itabaiana, Sergipe, Brasil (1); Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1); Agua Blanca, Tabasco, México (1); Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H12	<i>P. gymnonotus</i> . Brokopondo, Surinam (1); Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (2); Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (1).
H13	<i>P. gymnonotus</i> . Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (1).

RAG2

Haplotipos	Especie y localidad
	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (1); Tapijulapa, Tabasco, México (1). La Venta, Oaxaca, México (3).
H1	<i>P. gymnonotus</i> . Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (1); Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil (1); Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (1); Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1); Agua Blanca, Tabasco, México (6); Tapijulapa, Tabasco, México (5).
H2	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H3	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H4	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1) <i>P. davyi</i> . Castries, Santa Lucia (1).

H5	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (2).
H6	<i>P. fulvus</i> . Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H7	<i>P. fulvus</i> . Chiapas, México (1).
H8	<i>P. gymnonotus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (4).

ADNnc (PRKC1 + STAT5A+ RAG2)

Haplotipos	Especie y localidad
H1	<i>P. fulvus</i> . Jalisco, México (1).
H2	<i>P. fulvus</i> . Gallon Jug, Distrito de Orange Walk, Belice (1); Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (1); Agua Blanca, Tabasco, México (1); Tapijulapa, Tabasco, México (1); La Venta, Oaxaca, México (3).
H3	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H4	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H5	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H6	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (2).
H7	<i>P. fulvus</i> . Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H8	<i>P. fulvus</i> . Chiapas, México (1).
H9	<i>P. fulvus</i> . Campeche, México (1).

- H10** *P. fulvus*. Colón, Honduras (1).
- H11** *P. davyi*. St. John, Dominica (1); Castries, Santa Lucia (2).
- H12** *P. davyi*. Praslin, Trinidad y Tobago (1).
- H13** *P. davyi*. Castries, Santa Lucía (1).
- H14** *P. gymnonotus*. Agua Blanca, Tabasco, México (3); Tapijulapa, Tabasco, México (4).
- H15** *P. gymnonotus*. Agua Blanca, Tabasco, México (5); Tapijulapa, Tabasco, México (3); Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (1); Parque Nacional Altos de Campana, Panamá (1); Huanuco, Perú (2); Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil (1); Jangada, Mato Grosso, Brasil (1); Barro Alto, Goiás, Brasil (1); Itabaiana, Sergipe, Brasil (1); Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (2);
- H16** *P. gymnonotus*. Agua Blanca, Tabasco, México (1); Tapijulapa, Tabasco, México (1); Itabaiana, Sergipe, Brasil (1); Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1);
- H17** *P. gymnonotus*. Agua Blanca, Tabasco, México (1).
- H18** *P. gymnonotus*. Brokopondo, Surinam (1); Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (2); Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (1).
- H19** *P. gymnonotus*. Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (1).

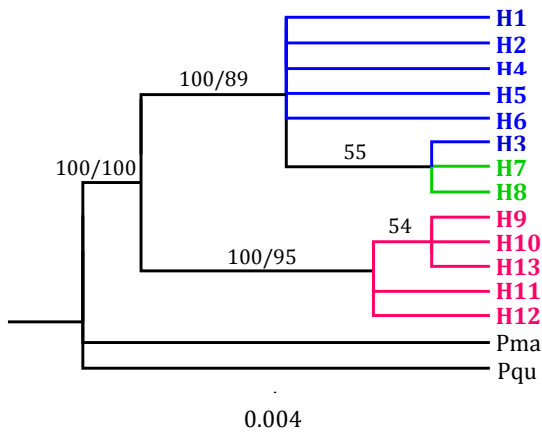
COI

Haplotipos	Especie y localidad
H1	<i>P. fulvus</i> . Campeche, México (1); Chiapas, México (1); Agua Blanca, Tabasco, México (2); Tapijulapa, Tabasco, México (4); Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (2).
H2	<i>P. fulvus</i> . Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H3	<i>P. fulvus</i> . Gallon Jug, Distrito de Orange Walk, Belice (1).
H4	<i>P. fulvus</i> . Colón, Honduras (1).
H5	<i>P. gymnonotus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (2).
H6	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (5); Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H7	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H8	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (1).
H9	<i>P. gymnonotus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (2); Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H10	<i>P. fulvus</i> . Jalisco, México (3).
H11	<i>P. fulvus</i> . La Venta, Oaxaca, México (3).
H12	<i>P. davyi</i> . Nariva, Trinidad y Tobago (1).
H13	<i>P. davyi</i> . Castries, Santa Lucia (1).

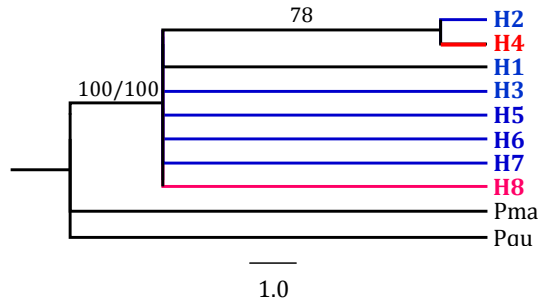
- H14** *P. davyi*. Castries, Santa Lucia (1).
- H15** *P. davyi*. Castries, Santa Lucia (1).
- H16** *P. fulvus*. La Venta, Oaxaca, México (1).
P. gymnonotus. Agua Blanca, Tabasco, México (2).
- H17** *P. gymnonotus*. Parauapebas; Pará, Brasil (1).
- H18** *P. gymnonotus*. Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (1).
- H19** *P. gymnonotus*. Aiuba, Ceará, Brasil (1).
- H20** *P. gymnonotus*. Brokopondo, Surinam (1); Parque Nacional Altos de Campana, Panamá (1); Huanuco, Perú (2); Barro Alto, Goiás, Brasil (1); Itabaiana, Sergipe, Brasil (2); Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1).
- H21** *P. gymnonotus*. Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1).
- H22** *P. gymnonotus*. Jangada, Mato Grosso, Brasil (1).
- H23** *P. gymnonotus*. Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil (1).
- H24** *P. gymnonotus*. Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (1).
- H25** *P. gymnonotus*. Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (1).

Anexo 2. Reconstrucción filogenética de intrones (PRKC1, STAT5A) y RAG2. Los valores de soporte en las ramas indican: Probabilidad Posterior (IB)/Bootstrap (ML) y abajo Booststrap de MP. IC= 92, IR= 97, utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii* y *P. quadridens*. Los colores indican las diferentes especies en azul *P. fulvus*, en verde *P. d. davyi*, en rosa *P. gymnonotus* y en rojo haplotipos compartidos entre *P. fulvus* y *P. d. davyi*.

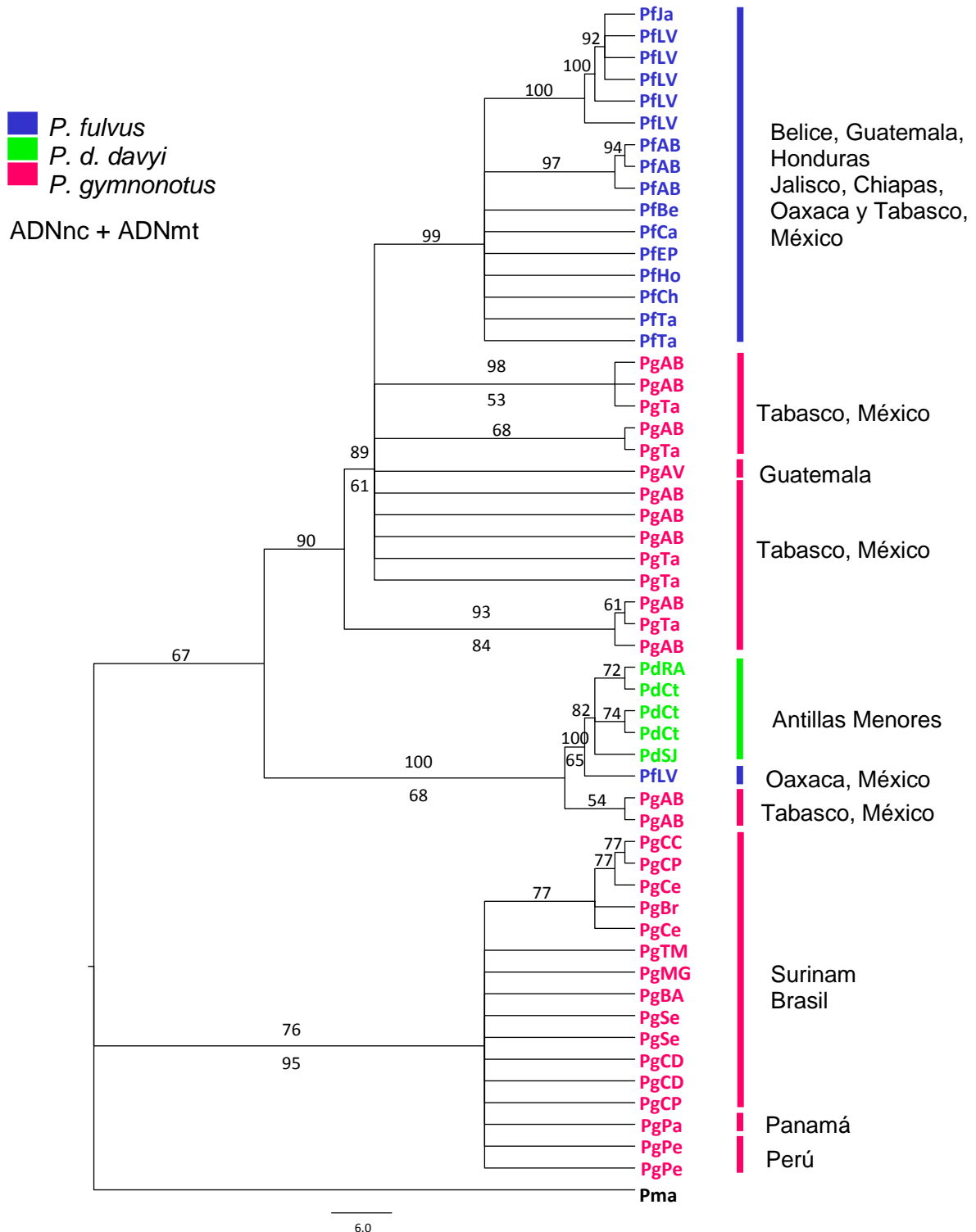
PRKC1+STAT5A



RAG2



Anexo 3. Reconstrucción filogenética Bayesiana del ADNnc+ADNmt. Los valores de soporte en las ramas indican: arriba Probabilidad Posterior (IB) y abajo Bootstrap (ML), utilizando como grupo externo a *Pteronotus macleayii*. Los colores indican las diferentes especies en azul *P. fulvus*, en verde *P. d. davyi* y en rosa *P. gymnonotus*.



Capítulo 2. Aislamiento y caracterización de loci de microsatélites para el género *Pteronotus*

Artículo publicado

MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, A., R. LÓPEZ-WILCHIS, A. SERRATO DÍAZ, M. A. DEL RÍO-PORTILLA Y L. M. GUEVARA-CHUMACERO. 2018. Isolation and characterization of microsatellite marker loci in the Wagner's mustached bat *Pteronotus psilotis* (Chiroptera: Mormoopidae) and cross-amplification in other related species. *Journal of Genetics*.

RESEARCH ARTICLE



Isolation and characterization of microsatellite marker loci in the Wagner's mustached bat *Pteronotus psilotis* (Chiroptera: Mormoopidae) and cross-amplification in other related species

A. MÉNDEZ-RODRÍGUEZ¹, R. LÓPEZ-WILCHIS^{1*}, A. SERRATO DÍAZ², J. JUSTE^{3,4},
M. A. DEL RÍO-PORTILLA⁵ and L. M. GUEVARA-CHUMACERO^{1*}

¹Departamento de Biología, and ²Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Avenida San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina. Del. Iztapalapa, C.P. 09340 Ciudad de México, Mexico

³Estación Biológica de Doñana, C.S.I.C., Avda. Américo Vespucio 26, 41092 Sevilla, Spain

⁴CIBER de Epidemiología y Salud Pública, CIBERESP, Madrid, Spain

⁵Departamento de Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C., Carretera Ensenada-Tijuana #3918, Zona Playitas, Ensenada, B. C., C.P. 22860, Mexico

*For correspondence. E-mail: R. López-Wilchis, rlw@xanum.uam.mx; L. M. Guevara-Chumacero, lmgc@xanum.uam.mx.

Received 20 November 2017; revised 20 April 2018; accepted 25 April 2018

Abstract. *Pteronotus psilotis*, a mormoopid bat, is an insectivorous, gregarious and strict cave-dwelling species that is found areas between the sea level and an elevation of about 1000 masl. This species is present in diverse habitats ranging from rain forest to dry deciduous forest. Nine microsatellite loci were developed for Wagner's mustached bat, *Pteronotus psilotis* using the next-generation sequencing approach, and their utility for population genetics studies was assessed. All loci were polymorphic (7–15 alleles) and characterized in 30 individuals from three *P. psilotis* populations, with the levels of observed and expected heterozygosity ranging from 0.280 to 0.867 and 0.584 to 0.842, respectively. One locus showed significant departures from Hardy–Weinberg expectations after Bonferroni correction. Cross-amplification in 11 other bat species was tested, for which eight microsatellites were successfully amplified, and of these seven were polymorphic. The development of these new microsatellite loci will contribute to investigations of genetic population structure, genetic diversity and gene flow in *P. psilotis* populations, as well as in other closely related bat species.

Keywords. microsatellites; cross-amplification; polymorphism; Mormoopidae; *Pteronotus psilotis*.

Introduction

Mormoopidae is one of the six bat families exclusive to the New World (Findley 1993). The family comprises of two genera: *Mormoops* (ghost-faced bats) and *Pteronotus* (mustached and naked-backed bats) whose taxonomic diversity has been traditionally accepted as 10 species, two of which are known only from fossils (Smith 1972; Simons and Conway 2001). *Pteronotus personatus* (Wagner 1843), Wagner's mustached bat is an insectivorous, gregarious and strict cave-dwelling species, found in areas between Mexico and South America, inhabiting the lowlands of tropical semi-deciduous forests (De la Torre and Medellín 2010). A recent work, however, has indicated the need

for taxonomic reorganization within *P. personatus*. Smith (1972) recognized morphologically two subspecies within *P. personatus* (*P. p. psilotis* and *P. p. personatus*), but Dávalos (2006) suggested, in a molecular revision, that the two subspecies should be considered as different species. Pavan and Marroig (2016, 2017) and Zárate-Martínez *et al.* (2018) have also recommended the elevation of *P. personatus* and *P. psilotis* to the species rank. In this investigation, we follow these recent taxonomic recommendations and, therefore, as the study specimens were collected in Mexico they correspond to the species *P. psilotis*.

P. psilotis is considered as 'least concern' according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN) conservation categories (Dávalos *et al.* 2008).

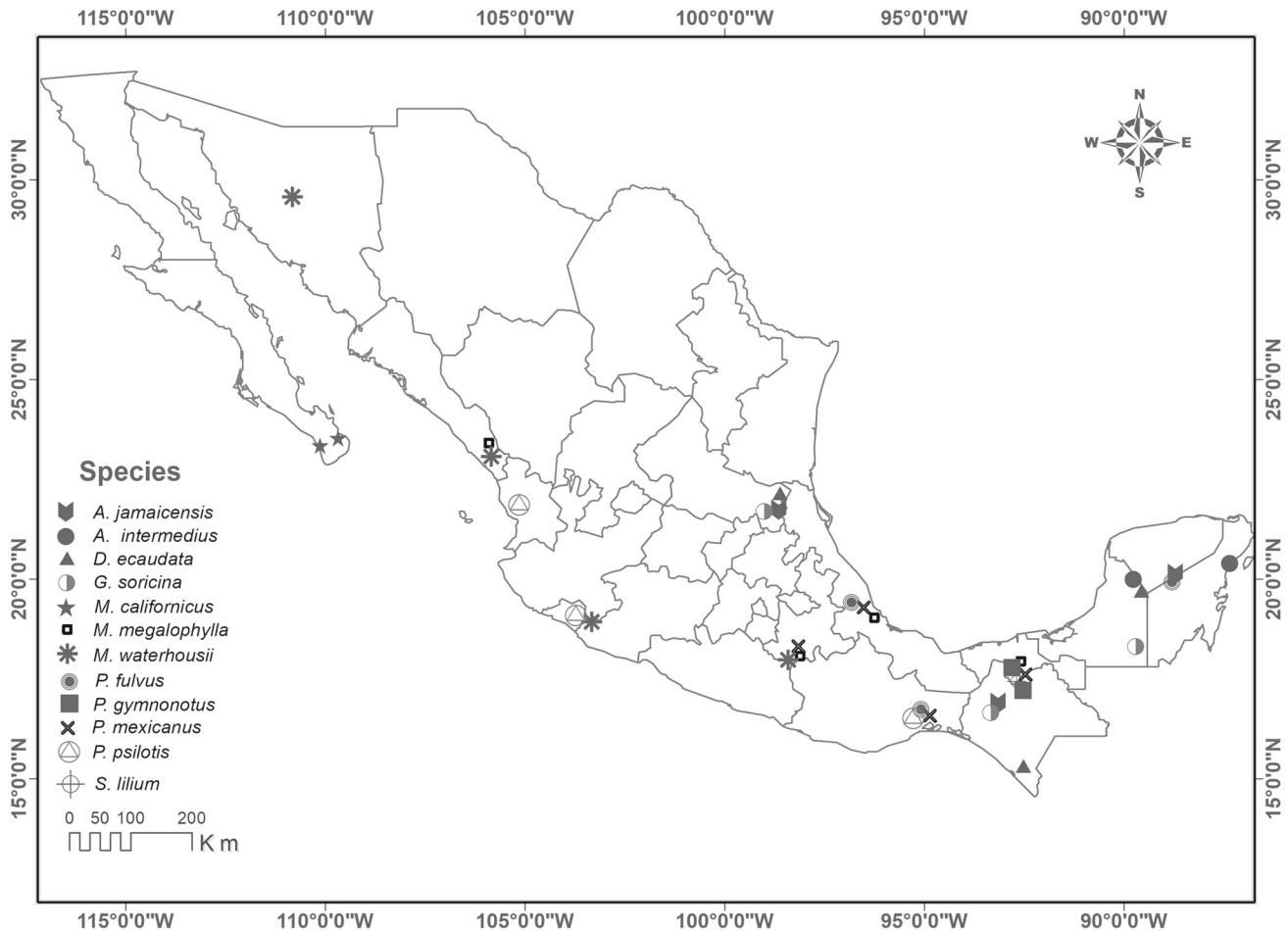


Figure 1. Sampling sites of *P. psilotis* and of 11 bat species used for cross-amplification.

Despite this assessment, land use is changing quite rapidly and the associated habitat fragmentation may cause threats in the near future, and thus a basic understanding of the genetic patterns in this species is needed before this trend continues. The generation of a library of microsatellite markers using a next-generation sequencing approach provides tool markers that will be useful in analyses to estimate genetic diversity or gene flow of the proposed lineages. In addition, cross-species transferability of these loci was assessed in 11 bats, four from the family Mormoopidae and seven from the family Phyllostomidae. These are the first microsatellite loci developed for mormoopid bats.

Materials and methods

In the present study, the required ethical guidelines were followed (Sikes 2016), and all specimens were collected under Mexican Government permits (SGPA/DGVS nos. 09131/14, 05853/13 and CC 08450/92). For library construction, genomic DNA was extracted from the muscular tissue of one *P. psilotis* individual (Santiago Ixcuintla, Nayarit, Mexico; voucher UAM-I RLV140304Ppe74)

using a salt-extraction protocol (Aljanabi and Martinez 1997). The sample was sent to the Georgia Genomics Facility (University of Georgia, Athens, USA). DNA was sheared using Covaris S2. Fragmented DNA was ligated to Illumina universal TruSeq adapters containing 10 custom nucleotide indexes (Fisher et al. 2011; Faircloth and Glenn 2012). These fragments were enriched through polymerase chain reaction (PCR), purified and normalized, and sequenced using an Illumina HiSeq 2000 to produce paired-end 100-bp nucleotide reads. The resulting FASTQ files were demultiplexed and the readings were filtered and executed through the PALfinder pipeline to identify adequate microsatellites and for the design of primers (Castoe et al. 2012). More than 11 million 100-bp readings were obtained, and we registered 8321 loci with primer of which 12 were selected by applying the parameters indicated by Méndez-Rodríguez et al. (2015). All selected primers were perfect microsatellite dinucleotide motifs and the minimum number of repeats was 20.

A total of 30 wing membrane biopsies from *P. psilotis* individuals was collected from three natural populations: 10 biopsies from bats captured in each of the localities of La Venta, Oaxaca, Mexico (16°35.197'N 94°52.424'O),

Table 1. Characterization of nine polymorphic microsatellite markers for *P. psilotis*.

Locus	Primer sequence (5' to 3')	T _a (°C)	SSR motif	Allelic size range (bp)	GenBank accession number
Pps1	F: 5'-NED-GCAACCTCCTAACCTGGTGG-3' R: 5'-GCCGTGAAACTCTGCTGTC-3'	62	(TC) ₃₈	209–245	MH186029
Pps2	F: 5'-6-FAM-CTGGTGTGAAGTCCGC-3' R: 5'-TCTAAGGATAGTGGTGGC-3'	59	(AC) ₂₈	120–132	MH186030
Pps3	F: 5'-VIC-AGTCCCTGCTGACC-3' R: 5'-GGTGTATTGTCCAGACC-3'	60	(AC) ₂₄	102–128	MH186031
Pps4	F: 5'-PET-GCCTTGGATTGTTAGGG-3' R: 5'-AACTGGCAGTTGAGTGC-3'	60	(AC) ₃₀	192–212	MH186032
Pps5	F: 5'-6-FAM-AACTGTGGACAGCACG 3' R: 5'-CGCTCTCCGCCATTCC 3'	60	(AC) ₂₂	133–147	MH186033
Pps6	F: 5'-VIC-ATCATCTGTGGACTGGG-3' R: 5'-TGAGGTTAICCTTCCACCCC-3'	60	(TC) ₂₂	298–316	MH186034
Pps7	F: 5'-6-FAM-GGAGATACCTGCCATAGG-3' R: 5'-GTTGCTGTATTTCTGTGC-3'	61	(AC) ₂₈	258–280	MH186035
Pps8	F: 5'-VIC-TTAGAAGCGTTCCCTGC-3' R: 5'-GAGTTTGGTTCCCTCCACC-3'	61	(AC) ₂₂	234–260	MH186036
Pps9	F: 5'-PET-GCACTCCCAAGAGTCC-3' R: 5'-AATGCTCTCTCTGTCCC-3'	61	(AC) ₂₂	195–217	MH186037

T_a, annealing temperature; SSR motif, simple sequence repeat pattern; size (bp).**Table 2.** Measures of genetic diversity for *P. psilotis*.

Locus	Mexico, n = 30			
	N _a	N _e	H _o	H _e
Pps1	15	6.338	0.867	0.842
Pps2	7	5.631	0.280	0.822*
Pps3	12	5.643	0.800	0.823
Pps4	9	6.000	0.726	0.833
Pps5	7	3.482	0.667	0.713
Pps6	10	4.380	0.767	0.772
Pps7	8	4.724	0.633	0.788
Pps8	13	5.960	0.800	0.832
Pps9	8	2.406	0.600	0.584

N_a, number of alleles per locus; N_e, number of effective alleles; H_o, observed heterozygosity; H_e, expected heterozygosity.*Significant deviation from the HWE ($P \leq 0.05$).

Las Viejas, Nayarit, Mexico (21°51.40'N, 105°08.81'O) and Los Ortices, Colima, Mexico (19°04.81'N, 103°43.59'O). For cross-amplification, biopsies from *P. fulvus*, *P. gymnonotus*, *P. mexicanus*, *Mormoops megalophylla* (Mormoopidae), *Diphylla ecaudata*, *Artibeus intermedius*, *A. jamaicensis*, *Macrotus californicus*, *M. waterhousii* and *Glossophaga soricina* (Phyllostomidae) were used, all of these were obtained from the tissue collection at the Mammal Biology and Ecology Laboratory of the Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. The geographic origins of these specimens are presented in figure 1.

DNA was extracted using a salt-extraction method (Aljanabi and Martinez 1997). PCR amplification was performed using a T100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). The amplification was carried out for each locus separately. The 25- μ L reaction volume contained 20 ng template DNA, 1 \times PCR buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 0.2 mM dNTPs, 0.25 μ M of each primer (the 5' tail of the forward primer for each selected primer pair was fluorescently labelled with 6FAM, NED, VIC or PET, Applied Biosystems), 3.0 mM magnesium chloride (MgCl₂) and 0.25 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Cycling conditions were: 2 min denaturation at 94°C; 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing for 30 s with temperatures varying by locus (table 1) and an extension at 68°C for 30 s; final extension of 5 min at 68°C, using a MultiGene thermocycler (Labnet International, USA). To ascertain locus amplification intensity, consistency and polymorphism fragment visualization was performed at Macrogen (Korea, ABI3730XL, Applied Biosystems) using a standard size GeneScan 500 LIZ.

Allele size was estimated using GeneMarker 2.4.2 software (SoftGenetics, LLC, USA). Observed (H_o) and expected heterozygosity (H_e) were calculated using GenAlEx 6.501 (Peakall and Smouse 2012). Deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) by locus and population were tested using the GenePop 4.0 program

Table 3. Cross-amplification in 11 bats from the Mormoopidae and Phyllostomidae families.

Species (n)	Pps1	Pps2	Pps3	Pps4	Pps5	Pps6	Pps7	Pps8	Pps9
<i>P. fulvus</i> (4)	P (5) 254–277	0	P (5) 106–122	P (2) 184–188	0	P (6) 326–340	P (2) 264, 266	0	0
<i>P. gymnonotus</i> (4)	P (5) 253–263	P (4) 124–146	P (4) 116–126	M 184	0	P (6) 328–350	P (2) 270, 272	0	M 199
<i>P. mexicanus</i> (4)	P (4) 237–245	0	P (6) 104–134	P (2) 208, 210	P (5) 115–149	P (4) 314–336	P (5) 266–278	0	0
<i>M. megalophylla</i> (4)	0	0	0	P (2) 196, 198	0	0	0	0	0
<i>D. ecaudata</i> (4)	0	0	P (2) 112, 114	0	0	0	0	0	0
<i>A. intermedius</i> (4)	0	0	P (4) 116–122	0	0	0	0	0	0
<i>A. jamaicensis</i> (4)	0	0	P (4) 108–136	0	0	0	0	0	0
<i>S. lilium</i> (3)	0	0	P (5) 108–116	0	0	0	0	0	0
<i>M. californicus</i> (4)	0	0	0	0	M 137	0	0	0	0
<i>M. waterhousii</i> (4)	0	0	P (6) 110–138	0	P (3) 135–139	0	0	0	0
<i>G. soricina</i> (3)	0	0	P (5) 118–140	0	P (2) 135, 137	P (3) 302–306	0	0	0

n, Sample size; P, polymorphic in all samples (no. of alleles) and below the size range of alleles amplified; M, monomorphic; 0, unsuccessful amplification.

(Raymond and Rousset 1995). Linkage disequilibrium (LD) was evaluated using Arlequin 3.0 (Excoffier et al. 2005). For HWE and LD, an exact test was applied with sequential Bonferroni correction. The significance level was set at $P \leq 0.05$ (Rice 1989). The presence and frequency of null alleles was evaluated using MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). For each population, the number of alleles (N_a) per locus and effective alleles (N_e) were calculated using GenAlEx 6.501 (Peakall and Smouse 2012).

Results and discussion

Of the 12 microsatellite markers tested in all samples of *P. psilotis*, three did not amplify in any sample and nine, which were polymorphic, were successfully amplified by PCR (table 1). The number of alleles per locus ranged from 7 to 15, similar to those found for other bats of the family Phyllostomidae (Ortega et al. 2002; Romero-Meza et al. 2012) and Vespertilionidae (Piaggio et al. 2009). The H_o ranged from 0.280 to 0.867 with an average of 0.687, while the H_e ranged from 0.584 to 0.842 with a mean of 0.779 (table 2). These results are similar to values reported previously for other New World bats (Bardleben et al. 2007; Ramírez et al. 2011). One locus showed significant departures from HWE as a result of heterozygote deficiency (Pps2). No evidence was found for LD among the loci. The presence of null alleles was detected in two loci (Pps2 and Pps7) (table 2).

Cross-species amplification indicates that seven polymorphic loci (Pps1–Pps7), in different degrees, will provide new insights into the intraspecific variation of mormoopid bats (table 3). Further, some polymorphic loci could be applied to phyllostomid bats, such as Pps3 for *D. ecaudata*, *A. intermedius*, *A. jamaicensis* and *S. lilium*, Pps3 and Pps5 for *M. waterhousii* and Pps3, Pps5 and Pps6 for *G. soricina* (table 3).

The nine microsatellite loci reported here represent the first set of molecular markers developed for the genus *Pteronotus*, and they will be useful for population genetic analysis in *P. psilotis*, where they have been shown to be highly polymorphic and reliable across populations. These markers can also be used to provide information about changes in the historical distribution and connectivity of mormoopid populations.

Acknowledgements

This work was developed in the Divisional Laboratory of Molecular Biology at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa and was financially supported by CONACYT fellowships to RLW (CB-2009-01/128459) and LMGCH (CB-2014-01/243138).

References

- Aljanabi S. M. and Martinez I. 1997 Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4692–4693.

- Bardeleben C., Campbell P., Lara M. and Moore R. L. 2007 Isolation of polymorphic tetranucleotide microsatellite markers for the silky short-tailed bat *Carollia brevicauda*. *Mol. Ecol. Notes* **7**, 63–65.
- Castoe T. A., Poole A. W., de Koning A. P. J., Jones K. L., Tomback D. F., Oyler-McCance S. J. et al. 2012 Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS One* **7**, e30953.
- Dávalos L. M. 2006 The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). *Biol. J. Linn. Soc.* **88**, 101–118.
- Dávalos L., Molinari J., Mantilla H., Medina C., Pineda J. and Rodríguez B. 2008 *Pteronotus personatus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Accessed 8 Dec 2016 (www.iucnredlist.org).
- De la Torre J. A. and Medellín R. A. 2010 *Pteronotus personatus* (Chiroptera: Mormoopidae). *Mamm. Species* **42**, 244–250.
- Excoffier L., Laval G. and Schneider S. 2005 Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinf. Online* **1**, 47–50.
- Faircloth B. C. and Glenn T. C. 2012 Not all sequence tags are created equal: designing and validating sequence identification tags robust to indels. *PLoS One* **7**, e42543.
- Findley J. S. 1993 *Bats: a community perspective*. Cambridge University Press, New York.
- Fisher S., Barry A., Abreu J., Minie B., Nolan J., Delorey T. M. et al. 2011 A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biol.* **12**, R1.
- Méndez-Rodríguez A., López-Wilchis R., Serrato-Díaz A., Del Río-Portilla M. A. and Guevara-Chumacero L. M. 2015 Isolation and characterization of microsatellite markers for funnel-eared bats *Natalus mexicanus* (Chiroptera: Natalidae) and cross-amplification using next-generation sequencing. *Biochem. Syst. Ecol.* **62**, 69–72.
- Ortega J., Maldonado J. E., Arita H. T., Wilkinson G. S. and Fleischer G. S. 2002 Characterization of microsatellite loci in the Jamaican fruit-eating bat *Artibeus jamaicensis* and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes* **2**, 462–464.
- Pavan A. C. and Marroig G. 2016 Integrating multiple evidences in taxonomy: species diversity and phylogeny of mustached bats (Mormoopidae: *Pteronotus*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **103**, 184–198.
- Pavan A. C. and Marroig G. 2017 Timing and patterns of diversification in the Neotropical bat genus *Pteronotus* (Mormoopidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **108**, 61–69.
- Peakall R. and Smouse P. E. 2012 GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* **28**, 2537–2539.
- Piaggio A. J., Figuero J. A. and Perkins S. L. 2009 Development and characterization of 15 polymorphic microsatellite loci isolated from Rafinesque's big-eared bat, *Corynorhinus rafinesquii*. *Mol. Ecol. Resour.* **9**, 1191–1193.
- Ramírez J., Munguía-Vega A. and Culver M. 2011 Isolation of microsatellite loci from the lesser long-nosed bat (*Leptonycteris yerbabuenae*). *Conserv. Genet. Resour.* **86**, 248–249.
- Raymond M. and Rousset F. 1995 GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* **86**, 248–249.
- Rice W. R. 1989 Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223–225.
- Romero-Meza J. A., Lance S. L. and Ortega J. 2012 A new set of microsatellite loci for *Leptonycteris yerbabuenae* and cross species amplification with other glossophagines. *Conserv. Genet. Resour.* **4**, 291–294.
- Sikes R. S. 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J. Mammal.* **97**, 663–688.
- Simmons N. B. and Conway T. M. 2001 Phylogenetic relationships of mormoopid bats (Chiroptera: Mormoopidae) based on morphological data. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **258**, 1–100.
- Smith J. D. 1972 Systematics of the Chiropteran family Mormoopidae. *Misc. Publ. Mus. Nat. Hist. Univ. Kansas* **56**, 1–132.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M. and Shipley P. 2004 MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting and genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* **4**, 535–538.
- Wagner J. A. 1843 Diagnosen neuer Arten brasilischer Handflügler. *Arch. Naturgesch.* **9**, 365–368.
- Zárate-Martínez, D. G., López-Wilchis R., Ruiz-Ortíz J. D., Barriga-Sosa I. D. L. A., Serrato Díaz A., Ibáñez C. et al. 2018 Intraspecific evolutionary relationships and diversification patterns of the Wagner's mustached bat, *Pteronotus personatus* (Chiroptera: Mormoopidae). *Acta Chiropt.* **20**, 51–58.

Capítulo 3. Evidencia de introgresión asimétrica entre *Pteronotus fulvus* y *Pteronotus gymnonotus* (Chiroptera: Mormoopidae)

RESUMEN

Las dos especies hermanas de murciélagos *Pteronotus fulvus* y *Pteronotus gymnonotus* se encuentra simpátricamente desde el Sur de México a Honduras. La evidencia genética, morfológica y ecológica apoya la opinión de que estas especies constituyen dos grupos bien diferenciados. Sin embargo análisis filogenéticos han demostrado que las dos especies comparten haplotipos del ADN mitocondrial cuando ocurren en simpatría. Para conocer si existe intercambio genético entre estas dos especies se emplearon seis loci de microsatélites (n=176) y un marcador mitocondrial (COI) (n=231), de ambas especies en localidades en simpatría y en alopatría. Los análisis de asignación bayesianos con los microsatélites mostraron dos grupos bien diferenciados (K=2), identificando de 10 a 62 híbridos que corresponde al 5.7-35.2% del total de las muestras estudiadas. Los resultados de las tasas de migración revelaron que la introgresión es histórica y con una mayor dirección de *P. fulvus* a *P. gymnonotus*. Esta asimetría en el patrón de la hibridación también se observa con los resultados del ADNmt, donde se observa una captura mitocondrial de *P. fulvus* en todos los individuos de *P. gymnonotus* de México, Guatemala y parte de Panamá (número de migrantes por generación= 6.3 de *P. fulvus* a *P. gymnonotus* y 1.545 de *P. gymnonotus* a *P. fulvus*). Los resultados con ambos tipos de marcadores indican la presencia de introgresión genética histórica y asimétrica con una dirección de *P. fulvus*

a *P. gymnonotus*, posiblemente facilitada por la colonización de *P. gymnonotus* en Centroamérica y México.

Palabras clave: COI, estructura genética, flujo genético, híbridos, introgresión asimétrica, microsatélites, murciélagos

INTRODUCCIÓN

La introgresión genética es la incorporación de genes de un taxón a otro, debido a retrocruzadas repetidas de los híbridos con las especies parentales, lo que resulta en la conformación de nuevos genotipos y cambios en las frecuencias alélicas (Anderson, 1948; Tovar-Sánchez y Oyama, 2004). La introgresión puede ocurrir durante divergencia simpátrica o por contacto secundario tras un periodo de alopatría (Mao et al. 2012).

Es frecuente que taxones estrechamente relacionados compartan una historia de introgresión genética, sugiriendo que la hibridación puede ser una fase transitoria del aislamiento reproductivo; sin embargo, a menudo la introgresión es críptica y se desconoce el impacto evolutivo para las especies parentales (Good et al. 2008; Good et al. 2015).

La dirección y el grado de introgresión genética, así como las consecuencias evolutivas, presentan una dinámica muy variable debido a que dependen de una variedad de factores tales como el grado de solapamiento de la distribución de las especies parentales, la compatibilidad del genoma, las estrategias de apareamiento,

la dispersión, los patrones en su estructura social y las presiones selectivas (Arnold, 1992; Mao et al. 2010). Una forma común de detectar la introgresión es mediante la discordancia en los análisis filogenéticos a partir de ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADN nuclear (ADNnc) (Dong et al. 2014). Sin embargo, la discordancia filogenética también puede ser resultado de la clasificación incompleta de linajes por polimorfismo ancestral (Ballard y Whitlock, 2004; Buckley et al. 2006).

La introgresión genética ha sido documentada en varios grupos de mamíferos (Lehman et al. 1991; Alves et al. 2003; Payseur et al. 2004; Banes et al. 2016; Cabria et al. 2011). Para el caso de los murciélagos, de las 1,116 especies en el mundo (Simmons, 2005), hasta el momento solamente se ha documentado en 32 especies de 5 familias (Pteropodidae, Phyllostomidae, Rhinolophidae, Noctilionidae y Vespertilionidae), esto puede deberse a un menor estudio con este enfoque en comparación a otros mamíferos.

En este trabajo se estudió la introgresión genética entre dos especies hermanas de murciélagos insectívoros neotropicales de la familia Mormoopidae, *P. fulvus* (Thomas, 1892), y *P. gymnonotus* (Wagner, 1843), especies que se distinguen de otros mormoópodos por tener la membrana alar unida sobre el dorso y, de acuerdo con caracteres morfológicos y genéticos, son especies filogenéticamente cercanas (Smith, 1972; Simmons y Conway, 2001; Lewis-Oritt et al. 2001; Dávalos, 2006; Pavan y Marroig, 2016). La principal diferencia morfológica entre estas dos especies es la longitud del antebrazo, para *P. fulvus* un antebrazo <50 mm y para *P. gymnonotus* >50 mm (Adams, 1989).

Estos murciélagos tienen una distribución simpátrica desde el Sur de México hasta Honduras (Smith, 1972) (Figura 1). Ambas especies comparten refugios y son monoestros estacionales, con un traslape en los meses de gestación y lactancia (Wilson, 1973; Adams, 1989; Nowak, 1991; Hayssen et al. 1993; Simmons y Conway, 2001; Jiménez-Guzmán y Ceballos, 2005; Ortega y Arita, 2005), características que podrían ayudar a mantener un apareamiento interespecífico.

Una posible introgresión genética del ADNmt de *P. fulvus* en *P. gymnonotus* ha sido reportada por Pavan y Marroig (2016), quienes realizaron un estudio de sistemática molecular del género *Pteronotus*, en donde encontraron a un individuo de *P. gymnonotus* de Guatemala agrupado con individuos de *P. gymnonotus* utilizando marcadores nucleares y con un gen del cromosoma Y (DBY), pero agrupado mitocondrialmente (citocromo b y COI) con *P. fulvus*. Sin embargo, en este estudio el muestreo fue limitado para estas dos especies en la zona de contacto y los análisis realizados no fueron enfocados para detectar la introgresión genética.

En 1958, Goodwin describió la subespecie *Pteronotus suapurensis calvus* en los estados de Oaxaca y Chiapas (México), sinonimia de *P. davyi calvus* con base en el tamaño del antebrazo (46.1 a 48.3 mm), visiblemente más grandes que en los típicos *P. fulvus* observados en México (≤ 45 mm) y más pequeños que *P. gymnonotus* (< 50 mm) (Goodwin, 1958; Álvarez y Álvarez-Castañeda, 1991). Posteriormente estos murciélagos fueron considerados como individuos grandes de *P. fulvus* (Goodwin, 1969; Smith, 1972). Estos individuos de *P. fulvus* que presentan una longitud de antebrazo cercano al límite que caracteriza a la especie, han sido encontrados

recientemente en Oaxaca y Tabasco, México (Ricardo López-Wilchis, com. pers.) y podrían corresponder a híbridos de *P. fulvus* y *P. gymnonotus*.

A partir de estos antecedentes, en el presente estudio se pretende determinar si existe introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, así como caracterizar los patrones de introgresión asociados, mediante el uso y comparación de dos tipos de marcadores moleculares, tales como microsatélites (con herencia biparental) y un gen mitocondrial (herencia uniparental).



Figura 1. Distribución geográfica de *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, señalando la distribución simpátrica.

MATERIAL Y MÉTODO

Muestreo.- Los datos moleculares corresponden a la amplificación de seis loci de microsatélites de 176 murciélagos (137 *P. fulvus* y 39 *P. gymnonotus*) de cinco localidades, que fueron capturados con trampas de arpa y redes de niebla. Las especies fueron identificadas con las claves taxonómicas de Medellín et al. (2008).

Para el fragmento del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), se incluyeron las secuencias de 165 murciélagos colectados (125 *P. fulvus* y 40 *P. gymnonotus*) más 66 secuencias (16 *P. fulvus* y 50 *P. gymnonotus*) previamente publicadas por Borisenko et al. (2008); Clare et al. (2011); Khan et al. (2014); Pavan y Marroig (2016) y Engstrom et al. (No publicado), disponibles en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Las nuevas secuencias se subirán a GenBank. El muestreo presentado cubre una gran parte de la distribución del complejo de especies, incluyendo su distribución alopátrica y simpátrica (Figura 2 y Tabla 1).

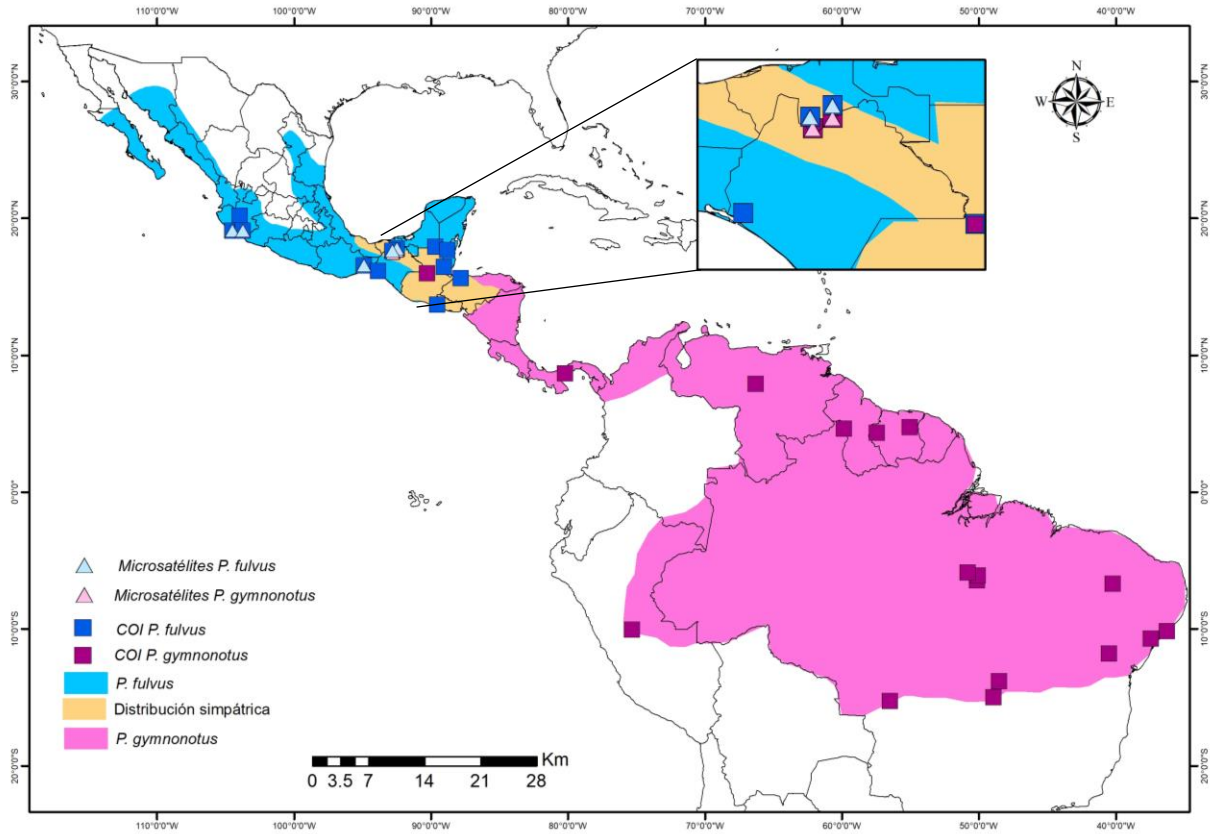


Figura 2. Localidades de estudio para los microsatélites y el marcador mitocondrial COI.

Tabla 1. Localidades de colecta y número de acceso al GenBank, para *P. fulvus* y *P. gymnonotus* del presente estudio para cada marcador. Acrónimo (A); tamaño de muestra (N).

A	Localidad	Especie	Marcador	N	GenBank
Ja	Jalisco, México	<i>P. fulvus</i>	COI	2	KX590178 KX590180
PO	Playa de Oro, Colima, México	<i>P. fulvus</i>	Microsatélites COI	11 11	Este estudio
LO	Los Ortices, Colima, México	<i>P. fulvus</i>	Microsatélites COI	6 6	Este estudio
LV	La Venta, Oaxaca, México	<i>P. fulvus</i>	Microsatélites COI	35 35	Este estudio
AB	Agua Blanca, Tabasco, México	<i>P. fulvus</i>	Microsatélites COI	53 49	Este estudio
		<i>P. gymnonotus</i>	Microsatélites COI	29 26	Este estudio
Ta	Tapijulapa, Tabasco, México	<i>P. fulvus</i>	Microsatélites COI	32 25	Este estudio
		<i>P. gymnonotus</i>	Microsatélites COI	10 10	Este estudio
Ch	Chiapas, México	<i>P. fulvus</i>	COI	1	KX590181
Ca	Campeche, México	<i>P. fulvus</i>	COI	1	JF447313
AV	Grutas de Lanquín, Alta Verapaz, Guatemala	<i>P. fulvus</i>	COI	5	JF446817 JF446818 JF446819 JF446820 JF446821
		<i>P. gymnonotus</i>	COI	1	KX590174
EP	Tikal, El Petén, Guatemala	<i>P. fulvus</i>	COI	1	JF446816
Be	Gallon Jug, Distrito de Orange Walk, Belice	<i>P. fulvus</i>	COI	2	KX590084 KX590085
ES	El Refugio, Ahuachapan, El Salvador	<i>P. fulvus</i>	COI	3	JF446540 JF446541 JF446542
Ho	Colón, Honduras	<i>P. fulvus</i>	COI	1	KX590179
Pa	Parque Nacional Altos de Campana, Panamá	<i>P. gymnonotus</i>	COI	3	JF447431 JF447432 JF459487
Ve	Hato la Florida, Bolivar, Venezuela	<i>P. gymnonotus</i>	COI	1	JF447854
Gu	Reserva Iwokrama, Potaro-Siparuni, Guyana	<i>P. gymnonotus</i>	COI	4	EF080589 EF080590 EF080591

					KC011684
Si	Bakhuis, Sipaliwini, Surinam	<i>P. gymnonotus</i>	COI	1	EU096900
Br	Brokopondo, Surinam	<i>P. gymnonotus</i>	COI	5	KX590198 EU096898 EU096899 EU096901 JF447711
Pe	Huánuco, Perú	<i>P. gymnonotus</i>	COI	2	KX590196 KX590197
CB	Caverna do Bigode, Goiás, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	4	Este estudio
MG	Jangada, Mato Grosso, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	1	KX590156
BA	Barro Alto, Goiás, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	1	KX590169
Ce	Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	6	KX590284 KX590285 KX590286 KX590287 KX590288 KX590293
Se	Itabaiana, Sergipe, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	4	KX590294 KX590296 KX590304 KX590305
Al	Usina Serra Grande, Alagoas, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	1	KX590306
CD	Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	4	KX590307 KX590308 KX590309 KX590310
Ca	Canaã dos Carajás, Pará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	5	KX590312 KX590313 KX590329 KX590339 KX590341
CP	Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	9	KX590354 KX590357 KX590358 KX590359 KX590360 KX590364 KX590368 KX590370 KX590372

TM	Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil	<i>P. gymnonotus</i>	COI	2	KX590138 KX590140
----	--	----------------------	-----	---	----------------------

Extracción de ADN.- La extracción del ADN total se realizó a partir de 20 µg de músculo o membrana alar, utilizando un protocolo de extracción de sal común (Lopera-Barrero et al. 2008).

Datos de microsatélites.- Se utilizaron seis primers microsatélites polimórficos para ambas especies, cinco diseñados y caracterizados para *Pteronotus psillotis* (Pps1, Pps3, Pps6, Pps7 (Méndez-Rodríguez et al., aceptado), Pps10 (Méndez-Rodríguez et al. en preparación) y NAC8 diseñado para *Artibeus jamaicensis* (Ortega et al. 2002), utilizando las condiciones de amplificación descritas para cada primer. Para conocer los distintos alelos se llevó a cabo una electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM 370xl, con una LIZ (GeneScan™ 500® LIZ Size Standar) como estándar de tamaño de alelos. El tamaño de los alelos en pares de bases se registró utilizando el programa GeneMarker v 2.4.2 (SoftGenetics, LLC, PA, USA).

Evaluación de los loci.- Se realizó una evaluación de los loci de microsatélites por especie para determinar si son adecuados para este estudio. Se verificó la presencia y frecuencia de los alelos nulos por locus, localidad y especie, con el programa MICROCHECKER v 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Para identificar si la presencia de alelos nulos modifica significativamente los resultados de los análisis se calcularon los valores de F_{ST} y distancias genéticas con y sin corrección ENA (estimación de alelos nulos), utilizando el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007) y aplicando una t-Student con el programa NCSS v. 11 para saber si los resultados son

significativamente diferentes (Hintze, 2011). Se evaluó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) y el desequilibrio de ligamiento entre los pares de loci con el programa GENEPOP v 4.0 (Raymond y Rousset, 1995) y aplicando la corrección de Bonferroni secuencial con un nivel de significancia de $P < 0.05$ (Rice, 1989).

Diversidad y diferenciación genética.- Se calculó la diversidad genética de las especies usando el programa GenAlEx v. 6.3 (Peakall y Smouse, 2006), estimando el número de alelos (N_a), alelos exclusivos (N_p), heterocigosis observada (H_o) y heterocigosis esperada (H_e). Para conocer la diferenciación genética se estimó la F_{ST} basada en el modelo de mutación de alelos infinitos (IAM) y la R_{ST} en función del modelo de mutación gradual (SMM) utilizando Arlequín v .3.5.1.2 con 10 000 permutaciones (Excoffier et al. 2005).

Estructura y flujo genético.- Para visualizar como se encuentra distribuida la diversidad genética se llevó a cabo un análisis bayesiano de asignación a grupos genéticos con el programa STRUCTURE v. 2.2 (Pritchard et al. 2000), con condiciones de 1 000 000 burn-in y 500 000 de MCMC, probando desde $K=2$ hasta $K=8$, con 20 réplicas por K . El número de grupos genéticos (K) más probable se determinó estimando la Delta K (ΔK) y la probabilidad logarítmica de K , $\ln P(K)=L(K)$ (Evanno et al. 2005) utilizando el sitio web Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2012).

Para identificar y clasificar a los posibles híbridos se utilizó el programa NEWHYBRIDS v.1.0 con 100 000 sweeps de cinco cadenas y un burn-in de 50 000 (Anderson y Thompson, 2002). Este programa calcula las frecuencias de alelos en las dos especies

parentales y para cada genotipo su probabilidad de ser puro o híbrido, asignando a los individuos en 6 clases genotípicas: dos grupos parentales puros (*P. fulvus* y *P. gymnonotus*), primera generación de híbridos (F1), segunda o más generaciones de híbridos (F2), retrocruzamientos con *P. fulvus* y retrocruzamientos con *P. gymnonotus*. Para evitar una asignación falsa de individuos, los resultados de STRUCTURE y NEWHYBRIDS se analizaron siguiendo los criterios definidos por Burgarella et al. (2009), considerando como híbridos, a aquellos individuos que presentaron un valor de asignación de q inferior a 0.75 en STRUCTURE y valores de q superiores a 0.75 para las categorías híbridas (híbridos F1, F2 y retrocruzamientos) en NEWHYBRIDS.

Tasa de migración histórica y contemporánea.- Para conocer si existe flujo genético histórico (n generaciones) o contemporáneo entre las especies se utilizaron dos métodos. Con el primer método se estimó la tasa de migración histórica, con un enfoque coalescente utilizando el programa MIGRATE v. 3.6.11 (Beerli, 2009). Este programa asume que el tamaño de las poblaciones y la tasa de migración son constantes en el tiempo. Después de las pruebas iniciales, se utilizaron 10 réplicas de una cadena larga de 1 000 000 con un total de 10 000 0000, descartando los primeros 10 000 pasos de burn-in. La tasa de migración ($\mu:\theta$) se calculó utilizando la ecuación $4Nm=\theta M$, donde se promediaron las últimas n generaciones, donde n es igual al número de generaciones, donde las poblaciones han estado en equilibrio mutación-deriva, incorporando dos parámetros a la tasa de mutación, el tamaño efectivo de población ($4N_e\mu$) y (M) la tasa de flujo de genes (m/μ), donde m es el número efectivo de migrantes por generación, tomando en cuenta una tasa de mutación de 5×10^{-4} que ha sido estimada para los microsatélites (Garza y Williamson, 2001). Con el segundo

método se estimó la tasa de migración contemporánea (1-3 generaciones) con un enfoque bayesiano usando el programa BayesAss v. 1.3 con 10 000 000 iteraciones, 2 000 de frecuencia de muestreo, 1 000 000 de burn-in, utilizando en un primer análisis los valores delta predeterminados de tasa de migración (m), frecuencia de alélica (a) y coeficiente de endogamia (f). En los análisis posteriores empleando diferentes valores delta de modo que cada parámetro se encuentre entre el 40-60% del número total de iteraciones, una vez que los valores de delta ($\Delta m=0.03$, $\Delta a=0.07$ y $\Delta f=0.2$) estuvieron dentro de la proporción aceptada, el análisis se llevó a cabo tres veces más utilizando diferentes semillas (Wilson y Rannala, 2003).

Datos del gen mitocondrial COI.- La amplificación de un fragmento del gen COI, se realizó utilizando los primers VF1d y VR1d y utilizando las condiciones descritas para los primers (Ivanova et al. 2006). Las amplificaciones fueron secuenciadas en sentido 3'-5' y 5'-3, en un secuenciador ABI PRISM 370xl.

Las secuencias obtenidas se editaron representando a las posiciones heterocigas de los nucleótidos con el código IUPAC, tomando en cuenta todos los nucleótidos de cada sitio variable. Posteriormente las secuencias se confirmaron a partir de un análisis de BLAST estándar nucleótido-nucleótido en la base de datos de GenBank (Altschul et al. 1990) y se alinearon utilizando el algoritmo Clustal W en el programa Geneious v. 5.6.4 (Drummond et al. 2012).

Diversidad y diferenciación genética.- Se estimó el número de sitios segregantes (s), composición de bases y el número de haplotipos por especie, con los programas

MEGA v. 5.0.5 y Networks v. 4.6.1.3 (Bandelt et al. 1999; Tamura et al. 2011), mientras que los índices de diversidad, la diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) con DnaSP v. 5 (Librado y Rozas, 2009), tanto en la distribución simpátrica como alopátrica. La diferenciación genética se estimó calculando la F_{ST} entre las especies con el programa Arlequín v. 3.5.1.2 con 10 000 permutaciones (Excoffier et al. 2005).

Las relaciones haplotípicas y la presencia de haplotipos compartidos entre especies, se determinaron mediante una red de haplotipos con el método de Median-Joining con el programa Networks v. 4.6.1.3 (Bandelt et al. 1999), resolviendo los bucles (loops) de acuerdo con los criterios de Pfenninger y Posada (2002). Las distancias genéticas entre los haplogrupos se calcularon con el programa MEGA v. 5.0.5 (Tamura et al. 2011), empleando el modelo Kimura 2 Parámetros (K2P).

Tasa de migración.- Se estimó el número de migrantes por generación entre las especies a partir de un modelo coalescente de aislamiento con migración, implementado en IMA (Hey y Nielsen, 2007). Utilizando una tasa de mutación de 0.025 subs/sitie/my (Pavan y Marroig, 2017), el modelo de evolución de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), los parámetros determinados empíricamente en las ejecuciones preliminares para corroborar la convergencia de los priors y juntando dos corridas independientes de 30 millones de generaciones. Para convertir los resultados en valores biológicamente informativos se utilizó un tiempo generacional de 6 años (López-Wilchis, com. pers.)

Análisis morfológico.- Para conocer si existen diferencias morfológicas significativas entre los individuos de *P. fulvus* que presentaron una longitud de antebrazo ≥ 46 mm, y los típicos individuos de *P. fulvus* (< 46 mm) y *P. gymnonotus* (> 50 mm), se midió el tamaño de antebrazo de 176 murciélagos utilizados en los análisis genéticos, separando hembras y machos en los análisis. Se evaluó la normalidad de los datos con una prueba de D'Agostino Omnibus con una $p = 0.05$ y posteriormente se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn's en el programa NCSS v. 11 (Hintze, 2011).

RESULTADOS

Microsatélites. Evaluación de los loci.- Se presentaron alelos nulos en la mayoría de los loci en al menos una localidad, pero no fue necesario excluir ningún loci debido a que los valores de F_{ST} y las distancias genéticas con y sin corrección ENA no presentaron diferencias significativas. Tres loci (Pps7, Pps10 y NAC8) presentaron evidencia de desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en *P. fulvus*, debido a un exceso de homocigos, probablemente por la presencia de alelos nulos. Por otro lado no se detectó desequilibrio de ligamiento entre ningún loci.

Diversidad y diferenciación genética.- Se registraron un total de 355 alelos con 6 loci en 176 individuos, 269 alelos para *P. fulvus* (137 individuos) y 86 alelos para *P. gymnonotus* (39 individuos). Se encontraron 34 alelos exclusivos en *P. fulvus* y cinco en *P. gymnonotus* con una frecuencia baja (0.004-0.037), a excepción de un alelo de *P. fulvus* que presenta una frecuencia alta (0.360). Para *P. fulvus* los valores de H_o variaron de 0.630 a 0.794 y H_E de 0.631 a 0.785, mientras que para *P. gymnonotus* los valores de H_o son de 0.550 y 0.619 y para H_E de 0.603 y 0.673, lo que sugiere que la diversidad genética global es relativamente moderada (Tabla 2) (Vázquez-Domínguez, 2013; Romero-Nava et al. 2014). Los valores de diferenciación genética, F_{ST} y R_{ST} , calculados entre las especies fueron significativos ($p=0.05$) y altos ($F_{ST}= 0.162$ y $R_{ST}= 0.070$) (Bogdanowicz et al. 2012).

Tabla 2. Estadísticos de diversidad genética con microsatélites para cada localidad de *P. fulvus* y *P. gymnonotus*. Número de muestras (N); suma y promedio de alelos por locus (Na); alelos exclusivos (Np); heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_E)

Especie	Localidad	N	Na	Np	H_o	H_E
<i>P. fulvus</i>	PO	11	$\Sigma = 43$ $\bar{x} = 7.167$	1	0.794	0.767
	LO	6	$\Sigma = 34$ $\bar{x} = 5.667$	1	0.667	0.631
	AB	49	$\Sigma = 68$ $\bar{x} = 11.333$	6	0.630	0.785
	Ta	25	$\Sigma = 66$ $\bar{x} = 11$	3	0.640	0.781
	LV	35	$\Sigma = 58$ $\bar{x} = 9.667$	4	0.630	0.781
<i>P. gymnonotus</i>	AB	26	$\Sigma = 48$ $\bar{x} = 8$	15	0.619	0.673
	Ta	25	$\Sigma = 38$ $\bar{x} = 6.333$	5	0.550	0.603

Estructura y flujo genético.- El análisis bayesiano realizado con STRUCTURE separó a *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, dividiendo a los individuos genotipados en dos grupos ($K=2$), sin estructura intraespecífica. De acuerdo con los criterios de Burgarella et al. (2009), los resultados de STRUCTURE y NEWHYBRIDS clasificaron al 30% de los individuos en categorías diferentes, así que los resultados se presentan de forma separada (Figura 3).

Conforme a los resultados de STRUCTURE, se encontraron 10 híbridos (5.7%), todos en *P. fulvus*, mientras que NEWHYBRIDS asignó 62 híbridos (35.2%), 42 en *P. fulvus*

y 20 en *P. gymnonotus*. Ambos análisis detectaron híbridos dentro y fuera de la zona de contacto y una frecuencia de híbridos desigual para cada especie (Figura 3).

De acuerdo con el programa STRUCTURE, siete murciélagos identificados morfológicamente como *P. fulvus* fueron clasificados como individuos puros de *P. gymnonotus* ($q > 0.83$), dos de los cuales presentan un antebrazo ≥ 46 mm y uno clasificado de la misma forma por NEWHYBRIDS. Asimismo, un murciélago morfológicamente caracterizado como *P. gymnonotus* fue clasificado como puro de *P. fulvus* ($q > 0.9$). Por otro lado, de 18 murciélagos de *P. fulvus* que presentaron un antebrazo ≥ 46 mm, uno fue clasificado como híbrido con el programa STRUCTURE y seis con NEWHYBRIDS.

El haber encontrado ocho individuos asignados como puros de *P. fulvus* o *P. gymnonotus* contrariamente a la identificación morfológica y el no haber una mayor correspondencia de los híbridos putativos (*P. fulvus* con un antebrazo ≥ 46 mm) con una asignación genotípica híbrida, revela que no existe una clara relación entre el tamaño del antebrazo con la asignación a las clases genotípicas.

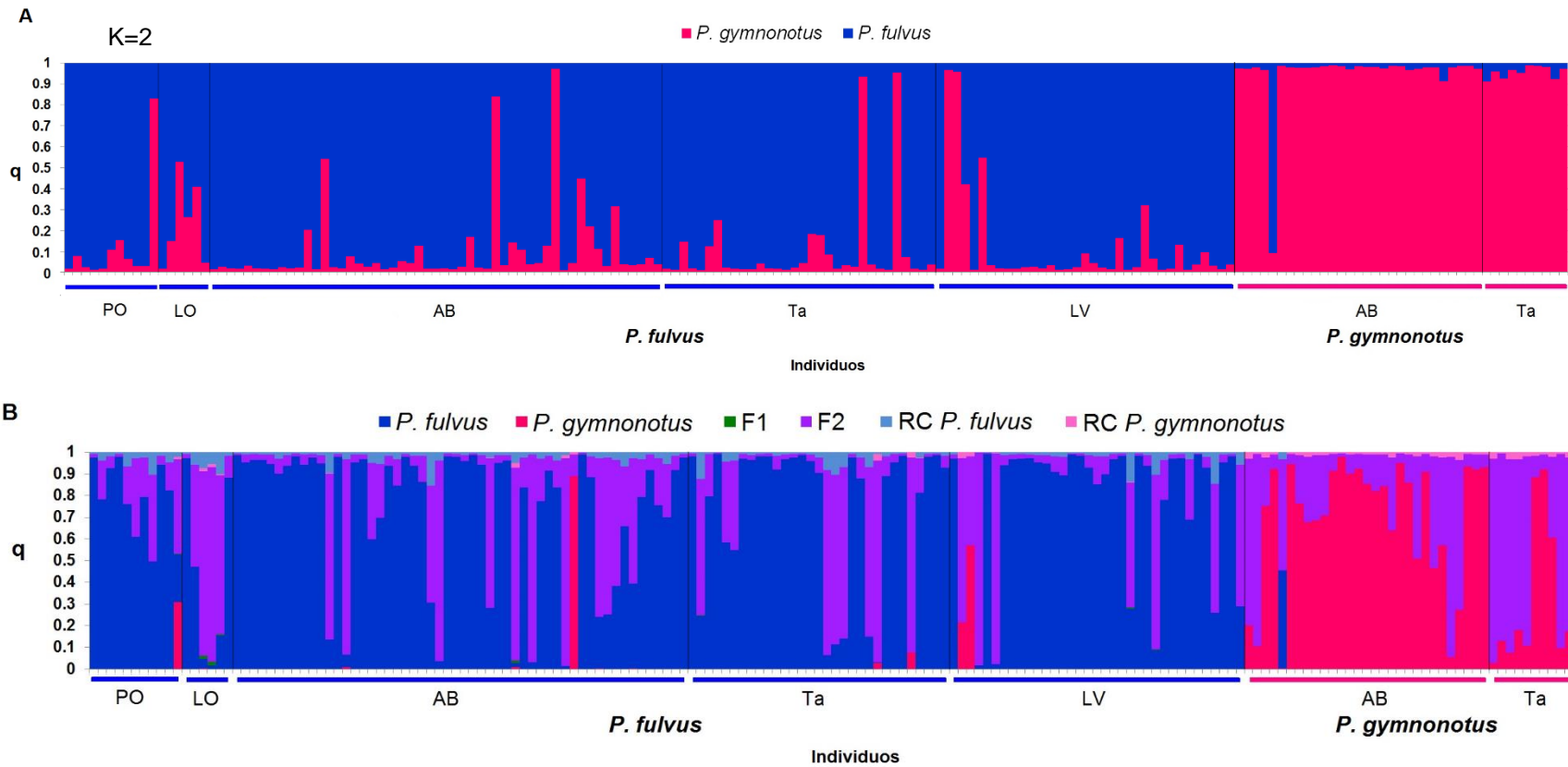


Figura 3. Identificación y clasificación de híbridos. A. Resultados de STRUCTURE que muestran la pertenencia de los individuos a cada especie. B. Asignación de los individuos a las seis categorías genóticas (*P. fulvus*, *P. gymnonotus*, F1, F2 y retrocruzamientos con las especies parentales) obtenido con NEWHYBRID. Cada individuo se encuentra representado por una barra vertical y las abreviaturas corresponden a las localidades de la Tabla 1.

Tasa de migración histórica y contemporánea.- La tasa de migración histórica calculada con MIGRATE reveló una migración asimétrica, de *P. fulvus* a *P. gymnonotus* de 17.573 y de *P. gymnonotus* a *P. fulvus* de 3.025, con un número de migrantes por generación de diez de *P. fulvus* a *P. gymnonotus* y de dos de *P. gymnonotus* a *P. fulvus*, indicando flujo genético histórico entre las especies. En cambio, la tasa de migración contemporánea estimada con BayesAss resultó de 0.13 de *P. fulvus* a *P. gymnonotus* y 0.009 de *P. gymnonotus* a *P. fulvus*, estos valores muy cercanos a cero indican poca o ninguna migración reciente entre las especies (Tabla 3).

Tabla 3. Estimaciones de la tasa de migración histórica y el número de migrantes por generación (Migrate) y tasa de migración contemporánea (BayesAss).

Especie receptora	Especie Donadora	
	<i>P. fulvus</i>	<i>P. gymnonotus</i>
Migrate (tasa M)		
<i>P. fulvus</i>	-	3.025 (2.213-3.947)
<i>P. gymnonotus</i>	17.573 (15.68-20)	-
N_{em} (migrantes por generación)		
<i>P. fulvus</i>	-	2 (1-5)
<i>P. gymnonotus</i>	10 (6-14)	-
BayesAss (tasa M)		
<i>P. fulvus</i>	0.987 (0.972-0.998)	0.009 (0.0003-0.032)
<i>P. gymnonotus</i>	0.013 (0.002-0.028)	0.991 (0.968-0.999)

COI. Diversidad y diferenciación genética.- Se amplificó un fragmento de 651 pb del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) del ADNmt. Las 142 secuencias

obtenidas para *P. fulvus*, presentaron una composición de bases de: T: 29.3%, C: 27%, A: 25% y G: 18.7%, con 582 sitios conservados, 69 sitios variables y 54 sitios parsimoniosamente informativos. Se identificaron 36 haplotipos de los cuales 28 fueron únicos y 8 compartidos entre las localidades. La diversidad haplotípica general resultó de 0.512 y la diversidad nucleotídica de 0.0062. Los *P. fulvus* de las localidades que se encuentran en la distribución alopátrica presentaron una diversidad genética de $h=0.803$ y $\pi= 0.0143$, mientras que en la distribución simpátrica $h=0.512$ y $\pi= 0.0062$.

Se secuenciaron 90 individuos de *P. gymnonotus*, con una composición de bases de T: 29.3%, C: 26.9%, A: 25.4% y G: 18.4% con 571 sitios conservados, 80 sitios variables, 69 sitios parsimoniosamente informativos e identificando 23 haplotipos, de los cuales 13 fueron únicos y 10 compartidos entre localidades, presentando una diversidad haplotípica general de 0.860 y diversidad nucleotídica de 0.0339. Los *P. gymnonotus* de las localidades que se encuentran en la distribución alopátrica presentaron una diversidad genética de $h= 0.707$ y $\pi= 0.0020$, mientras que en la distribución simpátrica $h= 0.754$ y $\pi= 0.0248$.

Entre las dos especies se reportan 56 haplotipos, 34 haplotipos exclusivos de *P. fulvus*, 19 de *P. gymnonotus* y tres haplotipos compartidos (H1, H18 y H56), que corresponden a 79 individuos de *P. fulvus* y 30 individuos de *P. gymnonotus* (Anexo 1).

El valor de diferenciación genética (F_{ST}) entre ambas especies es alto (0.504). No obstante, la red de haplotipos muestra una estructura muy marcada y concordante con la distribución geográfica de donde fueron colectadas las muestras, encontrando tres haplogrupos claramente diferenciados con ≥ 33 pasos mutacionales y $\geq 5.6\%$ de distancias genéticas (Figura 4):

El primer haplogrupo presenta 37 haplotipos, pertenecientes a 137 individuos de *P. fulvus* de México, Guatemala, Belice, El Salvador y Honduras, y a 30 individuos de *P. gymnonotus* de la distribución simpátrica (México y Guatemala) y a Panamá. Resultados que indican una captura mitocondrial de *P. fulvus* en *P. gymnonotus*.

El segundo haplogrupo presenta 18 haplotipos que corresponde a *P. gymnonotus* del Sur de su distribución con muestras de Panamá, Venezuela, Surinam, Guyana, Perú y Brasil (H38-H55).

El tercer haplogrupo está representado por un solo haplotipo compartido (H56), integrado por 5 individuos de *P. fulvus* de Oaxaca y 7 individuos de *P. gymnonotus* de Tabasco. Este haplogrupo se encuentra separado de los demás por una distancia genética $\geq 6.5\%$.

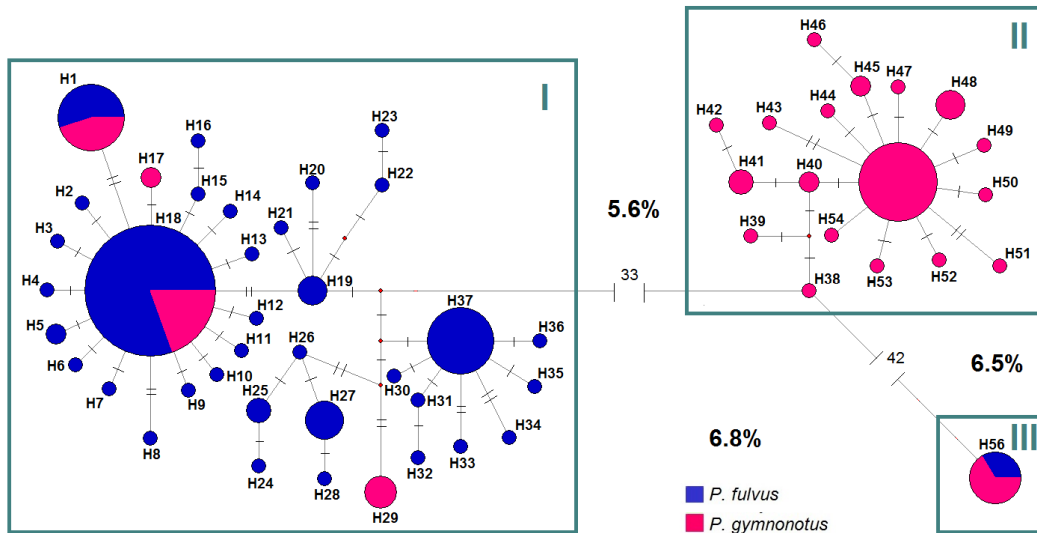


Figura 4. Red de haplotipos de *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, indicando los tres haplogrupos. Las líneas pequeñas que conectan a cada uno de los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos. Los círculos en rojo representan a los haplotipos no muestreados (hipotéticos) y el tamaño de los círculos representa la frecuencia de cada haplotipo, mientras que el porcentaje indica la distancia genética entre los haplogrupos.

Tasa de migración.- Se encontró un número de migrantes por generación de 6.3 (0.5-16.7) de *P. fulvus* a *P. gymnonotus* y 1.54 (0.007-4.5) de *P. gymnonotus* a *P. fulvus*, indicando mayor flujo genético de *P. fulvus* a *P. gymnonotus*.

Análisis morfológico.- De los 137 murciélagos de *P. fulvus* colectados, 18 (13.1% del total) presentaron un antebrazo de ≥ 46 mm (híbridos putativos). Los datos del tamaño de antebrazo no cumplieron con la normalidad ($F= 27.24$ y $p< 0.001$) y se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en ambas especies (*P. fulvus* $H=9.92$ y $p= 0.02$; *P. gymnonotus* $H=4.42$ y $p=0.04$). La prueba de Kruskal-Wallis indicó que existen diferencias entre al menos un grupo de datos ($H=119.65$ y $p< 0.001$) y la prueba Dunn's que los híbridos putativos no presentan diferencias significativas con *P. gymnonotus* y son significativamente diferentes a *P. fulvus*. De

acuerdo a estos resultados los híbridos putativos son morfológicamente similares a *P. gymnonotus* (Figura 5).

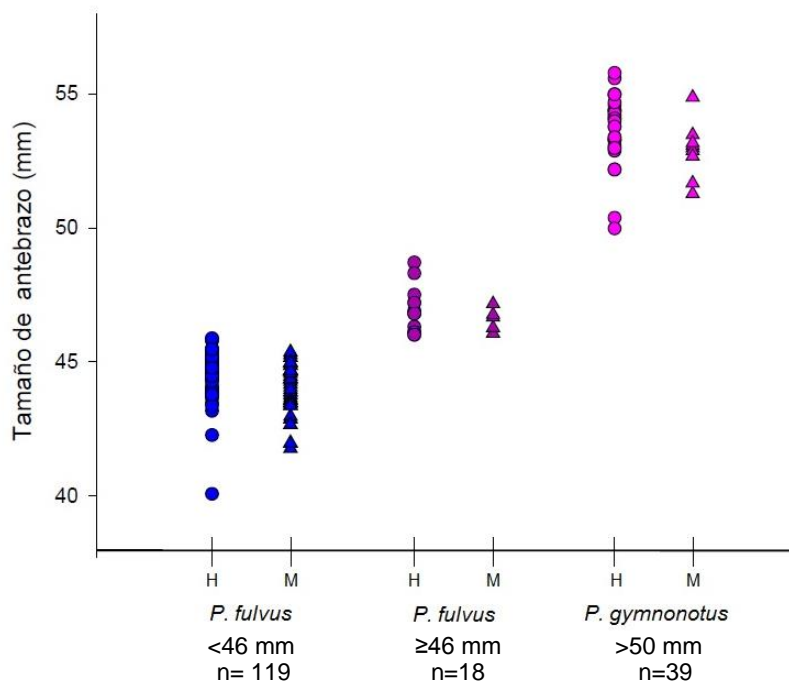


Figura 5. Tamaño de antebrazos en milímetros (mm). En azul *P. fulvus*, en morado los híbridos putativos, en rosa *P. gymnonotus*; los triángulos corresponden a las hembras y los círculos a los machos; tamaño de muestra (n).

DISCUSIÓN

Los análisis del presente estudio muestran haplotipos y alelos compartidos entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*. Esto contrasta con previos estudios genéticos, morfológicos y ecológicos que apoyan que son dos especies bien diferenciadas (Smith, 1972; Simmons y Conway, 2001; Lewis-Oritt et al. 2001; Dávalos, 2006; Pavan y Marroig, 2016).

Introgresión asimétrica del ADNnc

Los valores de diferenciación genética de los microsatélites F_{ST} y R_{ST} ($F_{ST}= 0.162$ y $R_{ST}= 0.070$, $p=0.05$) calculada entre las especies, presentaron valores más altos que los reportados entre diversas especies (Bogdanowicz et al. 2012).

A pesar de las discordancias en la asignación de clases genotípicas entre los resultados obtenidos con los programas STRUCTURE y NEWHYBRIDS con los microsatélites, ambos indican introgresión diferencial entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*. La introgresión diferencial ha sido observada en otros animales, posiblemente por diferencias en las estrategias de apareamiento o facilitado por la diferencia en la abundancia de los taxones que hibridan (Gomes et al. 2009; Bogdanowicz et al. 2012).

Esta introgresión diferencial parece ser histórica debido a la baja tasa de migración contemporánea estimada con BayesAss (0.013 y 0.009) en comparación a la tasa histórica estimada con Migrate (3.025 y 17.573). Otro indicativo es que todos los híbridos encontrados fueron asignados a la categoría F2 con el programa

NEWHYBRIDS sin evidencias de la F1 o retrocruzas con las especies parentales, no obstante, la ausencia de la F1 también ha sido atribuido a una menor adecuación (Bilgin et al. 2012).

Introgresión asimétrica y diversidad genética del ADNmt

Los resultados de COI indicaron que existen haplotipos compartidos o cercanamente relacionados entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, lo que sugiere la presencia de introgresión genética y/o clasificación incompleta de linajes, siendo muy difícil distinguir entre estos dos procesos, debido a que producen patrones genéticos similares (Buckley et al. 2006).

De acuerdo a los resultados se plantea la presencia de introgresión y clasificación incompleta de linajes del ADNmt, la introgresión por la reproducción e incorporación de genes entre individuos de ambas especies y clasificación incompleta de linajes por la retención aleatoria de alelos que son compartidos entre especies cercanas filogenéticamente (Buckley et al. 2006; Mao et al. 2016). Todos los individuos de *P. gymnonotus* colectados en la distribución simpátrica y un individuo colectado en Panamá, presentan haplotipos compartidos o cercanamente relacionados con *P. fulvus* (H1, H18, H17 y H29). Estos haplotipos son indicativo de introgresión genética, debido a que están estructurados geográficamente, es decir no se distribuyen aleatoriamente a través de la distribución de *P. gymnonotus* como se esperaría si fuera el resultado de clasificación incompleta de linajes (Mao et al. 2013b; Sullivan et al. 2014), además los resultados son congruentes con los datos de microsatélites. De acuerdo con estos resultados parece haber una fijación de

COI de *P. fulvus* en todos los individuos de *P. gymnonotus* de México, Guatemala y parte de Panamá consecuencia de una antigua introgresión genética.

Por otro lado, el tercer haplogrupo encontrado en este estudio (Figura 4), conformado exclusivamente por el haplotipo H56, constituido por *P. fulvus* de Oaxaca y *P. gymnonotus* de Tabasco (México), presenta una distancia genética mayor al 5.6% de las especies parentales y se encuentran cercanamente relacionados con *P. davyi* de las Antillas Menores (Capítulo 1). Esta incongruencia geográfica puede deberse a que este haplotipo corresponde a polimorfismo ancestral entre estas especies que son muy cercanas filogenéticamente.

En cuanto a la diversidad genética, *P. fulvus* ($h= 0.860$ y $\pi= 0.00622$), presenta una alta diversidad haplotípica y una baja diversidad nucleotídica y *P. gymnonotus* ($h= 0.512$ y $\pi= 0.03396$) una moderada diversidad haplotípica y una alta diversidad nucleotídica, al compararla con otras especies del género *Pteronotus* ($h= 0.793$ y $\pi= 0.014$ para *P. mexicanus* en México y $h= 0.819$; $\pi= 0.00991$ para *P. psilotis*) (Flores-Romero et al. en preparación; Zarate-Martínez et al. en preparación). Esta diferencia en de los valores de diversidad entre las especies implica diferentes historias demográficas. La baja diversidad nucleotídica de *P. fulvus* y la topología de la red de haplotipos, podría ser un indicativo de un cuello de botella o un efecto fundador. Mientras que en *P. gymnonotus*, la alta diversidad nucleotídica es indicativo de una población estable con un tamaño efectivo grande o bien contacto secundario entre diferentes linajes evolutivos (Grant y Bowen, 1998; Mao et al. 2013a).

En la zona simpátrica (México y Guatemala), los individuos de *P. gymnonotus* presentaron mayor diversidad genética (distribución simpátrica: $h= 0.754$ y $\pi= 0.024$; distribución alopátrica $h= 0.707$ y $\pi= 0.00203$). Una mayor diversidad genética en la zona geográfica donde existe un intercambio de material genético entre especies ha sido reportado en plantas, aves y mamíferos (Bearthier et al. 2006; Melo-Ferreira et al. 2007; Mao et al. 2010; Mao et al. 2013a).

Discordancia de la introgresión del ADNnc y ADNmt

Los resultados del ADNmt indicaron que existe introgresión genética de *P. fulvus* en todos los individuos de *P. gymnonotus* que se ubican geográficamente en la zona de simpatria de ambas especies, sugiriendo un frecuente apareamiento histórico. De manera que se esperaba encontrar una mayor introgresión nuclear, que lo observado (7.3%-35.2% individuos de origen híbrido). Estos resultados podrían estar influidos por patrones diferenciales de introgresión del ADN nuclear y mitocondrial o por haber trabajado con una pequeña porción del ADNnc.

La introgresión diferencial entre marcadores mitocondriales y nucleares está ampliamente documentada (Bachtrong et al. 2006; Chen et al. 2009; Nesi et al. 2011; Mao et al. 2012; Kuo et al. 2015) y son los diferentes mecanismos de aislamiento pre y postcigóticos de las especies (ej. apareamiento selectivo, dispersión sesgada, esterilidad parcial o diferencias de aptitud de los híbridos o de algún sexo híbrido) que han sido propuestos como promotores del intercambio genético unidireccional y favorecer una introgresión diferencial (Gompert et al. 2008; Chan y Levin, 2005).

La fuerte introgresión asimétrica observada con COI, puede reflejar una preferencia de apareamiento entre las hembras de *P. fulvus* con los machos de *P. gymnonotus*, resultando en una introgresión del ADNmt que con el tiempo reemplazó al de *P. gymnonotus* ya sea por deriva o selección natural. En diversos estudios en insectos, peces y mamíferos se ha encontrado esta captura mitocondrial por parte de una de las especies parentales en todos los híbridos muestreados (Chan y Levin, 2005; Bearthier et al. 2006; Gompert et al. 2008; Mao et al. 2013a), a veces sin detectar rastro de introgresión nuclear o cambio morfológico (Chen et al. 2009).

Causas de la introgresión histórica entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*

De acuerdo con los resultados con los diferentes tipos de marcadores moleculares, se infiere que el flujo genético entre las especies es histórico, estos eventos de introgresión pudieron haber ocurrido repetidamente durante la colonización de *P. gymnonotus* a Centroamérica y México (Pavan, 2016).

La hipótesis más reciente de diversificación del género *Pteronotus* con un enfoque biogeográfico, menciona que estos murciélagos se dispersaron de América del Sur hacia el Norte (Pavan y Marroig, 2017). Los resultados del presente estudio sugiere que *P. fulvus* ya se encontraba en Centroamérica y México, en el momento en que *P. gymnonotus* amplió su distribución geográfica colonizando el Sur de México, estableciéndose un contacto secundario entre estas dos especies, donde los haplotipos del ADNmt de *P. fulvus* fueron capturados y fijados en las poblaciones de *P. gymnonotus* durante su expansión demográfica. Esta hipótesis se sustenta por evidencias de un rápido crecimiento poblacional de *P. gymnonotus* encontradas

en este estudio y por Pavan (2014). Esta expansión demográfica posiblemente fue facilitada por la emergencia del Istmo de Panamá, así como por las oscilaciones climáticas y las fluctuaciones del nivel del mar que coinciden con la fecha de contacto estimada para estas especies (2.188 a 0.713 Ma) (Bagley y Johnson, 2014; ver Capítulo 1).

Este escenario histórico coincide con el modelo Hubbs o neutral, que explica la mayoría de los casos de introgresión asimétrica (Petit y Excoffier, 2009). Simulaciones de este modelo han demostrado que los genes no adaptativos típicamente fluyen y se propagan de la población residente que es más estable demográficamente a la población colonizadora. Este fenómeno es frecuentemente asociado con una expansión demográfica abrupta del taxón invasor (Currat et al. 2008; Petit y Excoffier, 2009; Mao et al. 2012). Este modelo ha sido observado en varias especies de murciélagos, donde el ADNmt de la población colonizadora ha sido reemplazado por el de la población residente (Berthier et al. 2006; Dong et al. 2014; Kuo et al. 2015).

Otro escenario alternativo que podría explicar el patrón obtenido con el ADNmt, es una introgresión adaptativa en donde la selección favorece el movimiento de genes ventajosos en una dirección y en donde una alta frecuencia o reemplazo del ADNmt será más rápido que a través de la difusión neutral, debido a que se encuentra involucrada la adaptación al entorno local (Bachtrog et al. 2006; Mao et al. 2013a). Debido a la importancia de las proteínas codificadas por el ADNmt en la fosforilación oxidativa del ADNmt, la selección purificadora ha sido considerada como la fuerza

dominante en su historia evolutiva, no obstante existen estudios que han proporcionado evidencia de selección adaptativa en los genes mitocondriales de los mamíferos (Stewart et al. 2008; Mao et al. 2014), también encontrada en murciélagos (Dong et al. 2014) y se sabe que el metabolismo mitocondrial es altamente sensible a las condiciones ambientales, especialmente a la variación de la temperatura (Dong et al. 2014).

La introgresión adaptativa al clima del ADNmt se ha observado en la liebre ibérica que presenta haplotipos mitocondriales compartidos con la liebre ártica (Melo-Ferreira et al. 2005) y entre *Rhinolophus affinis macrurus* y *R. a. himalayanus* donde se conjetura que la introgresión confiere una ventaja selectiva en un ambiente más frío (Mao et al. 2012). De acuerdo con esta hipótesis, *P. fulvus* pudo haberse adaptado al hábitat de Centroamérica y México, mientras que *P. gymnonotus* se habría adaptado mejor a Suramérica, ambas especies con genomas mitocondriales óptimos para las diferentes demandas metabólicas; posteriormente cuando *P. gymnonotus* comenzó a colonizar hábitats de una mayor latitud, el ADNmt de *P. fulvus* fue fijado como respuesta adaptativa.

No obstante, faltarían estudios de selección adaptativa en las especies de estudio, para poder afirmar que el ADNmt de *P. fulvus* ofrece una ventaja adaptativa en Centroamérica y México comparativamente con el ADNmt de *P. gymnonotus*, hipótesis que concordaría con la actual distribución de *P. fulvus* de México a Honduras.

Los resultados que se obtuvieron en este estudio utilizando marcadores moleculares con diferentes tipos de herencia, demuestran que diferentes regiones del genoma pueden tener distintas dinámicas evolutivas, por lo tanto, destaca la importancia de combinar múltiples marcadores moleculares para una mejor interpretación.

Diferencias fenotípicas en los híbridos

Los 18 individuos considerados como híbridos putativos (*P. fulvus* de ≥ 46 mm), visiblemente más grandes que los típicos *P. fulvus*, observados en México, son más parecidos a los *P. gymnonotus* morfológicamente. Sin embargo como observamos anteriormente, el marcador nuclear indicó que no todos estos murciélagos resultaron ser híbridos. Estos resultados sugieren que las diferencias en el tamaño del antebrazo son caracteres independientes a los resultados de introgresión genética y puede ser que solamente correspondan a individuos grandes de *P. fulvus*. La ocurrencia de estos individuos grandes en el Sur de México, puede corresponder a un incremento de tamaño de Norte a Sur, que ha sido observado en *P. fulvus* (Smith, 1972). Mientras que el parecido de los híbridos putativos con los *P. gymnonotus*, puede deberse a una disminución de tamaño de Sur a Norte, que ha sido encontrada en esta especie (Smith en 1972). Sin embargo, en otro estudio de *P. gymnonotus*, utilizando morfometría craneal, no se observaron diferencias de tamaño en toda su distribución (Pavan, 2014). De acuerdo con estos resultados, es importante realizar un análisis más fino del tamaño de estas especies y tomar con cautela el tamaño del antebrazo en la identificación de estas especies en campo.

LITERATURA CITADA

ADAMS, J. K. 1989. *Pteronotus davyi*. Mammalian species 346:1–5.

ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, AND D. J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410.

ÁLVAREZ, T., AND S. T. ÁLVAREZ-CASTAÑEDA. 1991. Notas sobre el estado taxonómico de *Pteronotus davyi* en Chiapas y de *Hylonycteris* en México (Mammalia: Chiroptera). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 34:223–229.

Alves, P. C., Ferrand, N., Suchentrunk, F., and Harris, D. J. 2003. Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27(1):70–80.

ANDERSON, E. 1948. Hybridization of the hábitat. *Evolution* 2:1–9.

ANDERSON, E. C., AND E. A. THOMPSON. 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160:1217–1229.

ARNOLD, M. L. 1992. Natural hybridization as an evolutionary force. *Annual Review of Ecology and Systematics* 23:237–261.

ARNOLD, M. L. 1998. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press. p.232.

BACHTROG, D., K. THORNTON, A. CLARK, AND P. ANDOLFATTO. 2006. Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear genes in the *Drosophila yakuba* species group. *Evolution* 60: 292–302.

BALLARD, J. W. O., AND M. C. WHITLOCK. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13:729–744

BANDELT, H-J., P. FORSTER, AND A. RÖHL. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.

BANES, G. L., B. M. GALDIKAS AND L. VIGILANT. 2016. Reintroduction of confiscated and displaced mammals risks outbreeding and introgression in natural populations, as evidenced by orang-utans of divergent subspecies. *Scientific reports* 6:22026.

Beerli, P. 2009. How to use migrate or why are Markov chain Monte Carlo programs difficult to use? Pp. 42–79 in *Population Genetics for Animal Conservation*, volume 17 of *Conservation Biology* (G. Bertorelle, M. W. Bruford, H. C. Hauffe, A. Rizzoli, and C. Vernesi, eds.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.

BERTHIER, P., L. EXCOFFIER, AND M. RUEDI. 2006. Recurrent replacement of mtDNA and cryptic hybridization between two sibling bat species *Myotis* and *Myotis blythii*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 273:3101–3109.

BILGIN, R., K. GÜRÜN, Ö. MARACI, A. FURMAN, P. HULVA, E. ÇORAMAN, AND I. HORÁČEK. 2012. Syntopic occurrence in Turkey supports separate species status for *Miniopterus schreibersii* and *M. schreibersii pallidus* (Mammalia: Chiroptera). *Acta Chiropterologica* 14(2):279–289.

BOGDANOWICZ, W., K. PIKSA, AND A. TEREBA. 2012. Hybridization hotspots at bat swarming sites. *Plos one* 7(12):1–10.

BORISENKO, A. V., B. K. LIM, N. V. IVANOVA, R. H. HANNER, AND P. D. HEBERT. 2008. DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources* 8 (3):471-479.

BUCKLEY, T. R., M. CORDEIRO, D. C. MARSHALL, AND C. SIMON. 2006. Differentiating between Hypotheses of Lineage Sorting and Introgression in New Zealand Alpine Cicadas (*Maoricicada dugdale*). *Systematic Biology* 5(3):411–425.

BURGARELLA, C., Z. LORENZO, R. JABBOUR-ZAHAB, R. LUMARET, E. GUICHOUX, R. J. PETIT, Á. SOTO, AND L. GIL. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity* 102 (5):442–452.

CABRIA, M. T., J. R. MICHAUX, B. J. GÓMEZ-MOLINER, D. SKUMATOV, T. MARAN, P. FOURNIER, J. LÓPEZ DE LUZURIAGA AND R. ZARDOYA. 2011. Bayesian analysis of hybridization and introgression between the endangered european mink (*Mustela lutreola*) and the polecat (*Mustela putorius*). *Molecular Ecology* 20(6):1176–1190.

CHAN, K. M. A., AND S. A. LEVIN. 2005 Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution* 59:720–729.

CHAPUIS, M-P, AND A. ESTOUP. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular and Biology Evolution* 24: 621–631.

CHEN, W., K. BI, AND J. K. FU. 2009. Frequent mitochondrial gene introgression among high elevation Tibetan megophryid frogs revealed by conflicting gene genealogies. *Molecular Ecology* 18:2856–2876.

CLARE, E. L., B. K. LIM, M. B. FENTON, AND P. D. N. HEBERT. 2011. Neotropical Bats: Estimating Species Diversity with DNA Barcodes. *PLoS ONE* 6(7):e22648. doi:10.1371/journal.pone.0022648.

CURRAT, M., M. RUEDI, R. J. PETIT, AND L. EXCOFFIER. 2008. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution* 62:1908–1920.

DÁVALOS, L. M. 2006. The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 88:101–118.

DRUMMOND, A. J., B. ASHTON, S. BUXTON, M. CHEUNG, A. COOPER, C. DURAN, M. FIELD, J. HELED, M. KEARSE, S. MARKOWITZ, R. MOIR, S. STONES-HAVAS, S. STURROCK, T. THIERER, AND A. WILSON. 2012. Geneious v. 5.6.4.

EARL, D. A., AND B. M. VONHOLDT. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4 (2):359–361.

EVANNO, G., S. REGNAUT, AND J. GOUDET. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611–2620.

EXCOFFIER, L., G. LAVAL, AND S. SCHNEIDER. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47–50.

FURMAN, A., E. ÇORAMAN, Z. L. NAGY, T. POSTAWA, R. BILGIN, M. GAJEWSKA, AND W. BOGDANOWICZ. 2013. Phylogeography of the large *Myotis* bats (Chiroptera: Vespertilionidae) in Europe, Asia Minor, and Transcaucasia. *Biological Journal of the Linnean Society* 108:189–209.

GARZA, J. C., AND E. G. Williamson. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10:305–318.

GOMES, B., C. A. SOUSA, M. T. NOVO, F. B. FREITAS, R. ALVES, A. R. CÔRTE-REAL, P. SALGUEIRO, M. J. DONNELLY, A. P. G. ALMEIDA, AND J. PINTO. 2009. Asymmetric introgression between sympatric molestus and pipiens forms of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in the Comporta region, Portugal. *BMC Evolutionary Biology* 9: 262.

GOMPERT, Z., M. L. FORISTER, J. A. FORDYCE, AND C. C. NICE. 2008. Widespread mitochondrial discordance with evidence for introgressive hybridization and selective sweeps in *Lycaeides*. *Molecular Ecology* 17:5231–5244.

GOOD, J. M., S. HIRD, N. REID, J. R. DEMBOSKI, S. J. STEPPAN, T. R. MARTIN-NIMS, AND J. SULLIVAN. 2008. Ancient hybridization and mitochondrial capture between two species of chipmunks. *Molecular Ecology* 17(5):1313–1327.

GOOD, J. M., D. VANDERPOOL, S. KEEBLE, AND K. BI. 2015. Negligible nuclear introgression despite complete mitochondrial capture between two species of chipmunks. *Evolution* 69(8):1961–1972.

GOODWIN, G. G., T. B. MACDOUGALL, AND J. R. MARCUS. 1958. Two new mammals from Mexico. *American Museum of Natural History. American Museum Novitates* 1871:1–3

GOODWIN, G. G., AND T. B. MACDOUGALL. 1969. Mammals from the State of Oaxaca, Mexico, in the American Museum of Natural History. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 141:1–270

GRANT, W. S., AND B. W. BOWEN. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lesson for conservation. *The Journal of Heredity* 89:415–426.

GUEVARA-CHUMACERO, L. M., R. LÓPEZ-WILCHIS, F. F. PEDROCHE, J. JUSTE, C. IBÁÑEZ, AND I. D. BARRIGA-SOSA. 2010. Molecular phylogeography of *Pteronotus davyi* (Chiroptera: Mormoopidae) in Mexico. *Journal of Mammalogy* 91(1):220–232.

HAYSEN, V., A. VAN TIENHOVEN AND A. VAN TIENHOVEN. 1993. *Asdell's Patterns of Mammalian Reproduction: A Compendium of Species- Specific Data*. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, New York.

HINTZE, J. 2011. PASS 11. NCSS, LLC. Kaysville, Utah. www.ncss.com

IVANOVA, N. V., J. R. DEWAARD, P. D., AND N. HEBERT. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes* 6:998–1002.

KHAN, F. A. A., C. D. PHILLIPS, AND R. J. BAKER. 2014. Timeframes of Speciation, Reticulation, and Hybridization in the Bulldog Bat Explained Through Phylogenetic Analyses of All Genetic Transmission Elements. *Systematic Biology* 63(1):96–110.

KUO, H. C., S. F. CHEN, Y. P. FANG, J. A. COTTON, J. D. PARKER, G. CSORBA, B. K. LIM, J. L. EGER, C. H. CHEN, C. H. CHUO, AND S. J. ROSSITER. 2015. Speciation processes in putative island endemic sister bat species: false impressions from mitochondrial DNA and microsatellite data. *Molecular ecology* 24(23):5910–5926.

LEHMAN, N., A. EISENHAWER, K. HANSEN, L. D. MECH, R. O. PETERSON, P. J. GOGAN AND R. K. WAYNE. 1991. Introgression of coyote mitochondrial DNA into sympatric North American gray wolf populations. *Evolution* 45(1):104–119.

LEWIS-ORITT, N., C. A. PORTER, AND R. J. BAKER. 2001. Molecular Systematics of the Family Mormoopidae (Chiroptera) based on cytochrome b and recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20:426–436.

LIBRADO, P., AND J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* doi: 10. 1093/bioinformatics/btp187.

LOPERA-BARRERO, N. M., J. A. POVH, R. P. RIBEIRO, P. C. GOMES, C. B. JACOMETO, AND T. D. SILVA LOPES. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria* 35(1):77–86.

MAO, X., G. ZHU, L. ZHANG, S. ZHANG, AND S. J. ROSSITER. 2014. Differential introgression among loci across a hybrid zone of the intermediate horseshoe bat (*Rhinolophus affinis*). *BMC Evolutionary Biology* 14:154.

MAO, X., V. D. THONG, P. J. J. BATES, G. JONES, S. ZHANG, AND S. J. ROSSITER. 2013a. Multiple cases of asymmetric introgression among horseshoe bats detected by phylogenetic conflicts across loci. *Biological Journal of the Linnean Society* 110 (2):346–361.

MAO, X., G. HE, J. ZHANG, S. J. ROSSITER, AND S. ZHANG. 2013b. Lineage divergence and historical gene flow in the Chinese horseshoe bat (*Rhinolophus sinicus*). *Plos One*, 8(2): e56786.

MAO, X., G. HE, P. HUA, G. JONES, S. ZHANG, AND S. J. ROSSITER. 2012. Historical introgression and the persistence of ghost alleles in the intermediate horseshoe bat (*Rhinolophus affinis*). *Molecular ecology* 22:1035–1050.

MAO, X., J. ZHANG, S. ZHANG, AND S. J. ROSSITER. 2010. Historical male-mediated introgression in horseshoe bats revealed by multilocus DNA sequence data. *Molecular Ecology* 19:1352–1366.

MAO, X., S. ZHANG AND S. J. ROSSITER. 2016. Differential introgression suggests candidate beneficial and barrier loci between two parapatric subspecies of Pearson's horseshoe bat *Rhinolophus pearsoni*. *Current Zoology* 62(4):405–412.

MEDELLÍN, R. A., H. T. ARITA, AND O. SÁNCHEZ. 2008. Identificación de los murciélagos de México, clave de campo, Segunda Edición. Instituto de Ecología, UNAM. 78 p.

MELO-FERREIRA, J., P. BOURSOT, E. RANDI, A. KRYUKOV, F. SUCHENTRUNK, N. FERRAND, AND P. C. ALVES. 2007. The rise and fall of the mountain hare (*Lepus*

timidus) during Pleistocene glaciations: expansion and retreat with hybridization in the Iberian Peninsula. *Molecular Ecology* 16:605–618.

MÉNDEZ-RODRÍGUEZ, A., R. LÓPEZ-WILCHIS, A. S. DÍAZ, M. A. DEL RÍO-PORTILLA AND L. M. GUEVARA-CHUMACERO. 2018. Isolation and characterization of microsatellite marker loci in the Wagner's mustached bat *Pteronotus psilotis* (Chiroptera: Mormoopidae) and cross-amplification in other related species. *Journal of Genetics*

NESI, N., E. NAKOUNÉ, C. CRUAUD, AND A. HASSANIN. 2011. DNA barcoding of African fruit bats (Mammalia, *Pteropodidae*). The mitochondrial genome does not provide a reliable discrimination between *Epomophorus gambianus* and *Micropteropus pusillus*. *Comptes Rendus Biologies* 334(7):544–554.

NOWAK, R. M. 1991. *Walker's Bats of the World*, 5th ed. The Johns Hopkins University Press.

ORTEGA, J., J. E. MALDONADO, H. T. ARITA, G. S WILKINSON, AND R. C. FLEISCHER. 2002. Characterization of microsatellite loci in the Jamaican fruit-eating bat *Artibeus jamaicensis* and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 2(4):462–464.

ORTEGA, R. J, AND T. H. ARITA. 2005. *Pteronous gymnonotus*. Pp. 181. En: *Los mamíferos silvestres de México* (G. Ceballos, and G. Oliva, eds). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.

PAVAN, A. C. 2014. Sistemática e história evolutiva do gênero de morcegos notropical *Pteronotus* (Chiroptera: Mormoopidae). Dr. Thesis, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

PAVAN, A. C., AND G. MARROIG. 2016. Integrating multiple evidences in taxonomy: species diversity and phylogeny of mustached bats (Mormoopidae: *Pteronotus*). *Molecular phylogenetics and evolution* 103:184–198.

PAVAN, A. C., AND G. MARROIG. 2017. Timing and patterns of diversification in the Neotropical bat genus *Pteronotus* (Mormoopidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 108:61–69.

PAYSEUR, B. A., J. G. KRENZ AND M. W. NACHMAN. 2004. Differential patterns of introgression across the X chromosome in a hybrid zone between two species of house mice. *Evolution* 58(9):2064–2078.

PEAKALL, R., AND P. E. SMOUSE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288–295.

PFENNINGER, M., AND D. POSADA. 2002 Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56:1776–1788.

PETIT, R. J., AND L. EXCOFFIER. 2009. Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & evolution* 24(7):386–393.

PRITCHARD, J. K., M. STEPHENS, AND P. DONELLY. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetic* 155(2):945–959.

RAYMOND, M., AND F. ROUSSET, 1995. GENEPOP (version 4.0): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.

RICE, W. R. 1989 Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.

ROMERO-NAVA, C., L. LEÓN-PANIAGUA AND J. ORTEGA. 2014. Microsatellites loci reveal heterozygosity and population structure in vampire bats (*Desmodus rotundus*) (Chiroptera: Phyllostomidae) of Mexico. *Revista de Biología Tropical* 62:659–669.

SIMMONS, N. B. 2005. Order Chiroptera. Pp. 312–529 in *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. (D. E. Wilson and D.M. Reeder, eds). 3rd ed. John Hopkins University Press, Baltimore.

SIMMONS, N. B., AND T. M. CONWAY. 2001. Phylogenetic relationships of mormoopids bats (Chiroptera: Mormoopidae) based on morphological data. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 258:1–97.

SMITH, J. D. 1972. Systematics of the chiropteran family Mormoopidae. *Miscellaneous Publications, University of Kansas, Museum of Natural History* 56:1–132.

SULLIVAN, J., J. R. DEMBOSKI, K. C. BELL, S. HIRD, B. SARVER, N. REID, AND J. M. GOOD. 2014. Divergence with gene flow within the recent chipmunk radiation (*Tamias*). *Heredity* 113(3):185–194.

STEWART, J. B., C. FREYER, J. L. ELSON, A. WREDENBERG, Z. CANSU, A. TRIFUNOVIC, AND N. G. LARSSON. 2008. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS biology* 6(1):63–71.

TAMURA, K., D. PETERSON, N. PETERSON, G. STECHER, M. NEI, AND S. KUMAR. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28(10):2731–2739.

THOMAS, O. 1892. Note on Mexican examples of *Chilonycteris davyi*, Gray. *Annals and magazine of natural history* 6 (10):410.

TOVAR-SÁNCHEZ, E., AND K. OYAMA. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91(9):1352–1363.

VAN OOSTERHOUT, C, W. F. HUTCHINSON, D. P. M. WILLS, AND P. SHIPLEY. 2004. MICROCHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.

VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., A. MENDOZA-MARTINEZ, L. OROZCO-LUGO AND A. D. CUARON. 2013. High dispersal and generalist habits of the bat *Artibeus jamaicensis* on Cozumel Island, Mexico: an assessment using molecular genetics. *Acta Chiropterologica* 15: 411–421.

WAGNER, J. A. 1843. Diagnosen neuer Arten brasilischer Handflunger. *Archive für Naturgeschichte* 9:365–368.

WILSON, D. E. 1973. Reproduction in Neotropical bats. *Periodical Biology* 75:215–217.

WILSON, G. A., AND B. RANNALA. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163:1177–1191.

ANEXOS

Anexo I. Lista de haplotipos de COI para *P. fulvus* y *P. gymnonotus*. Se muestra el número de haplotipos, la especie, la localidad y entre paréntesis el número de individuos correspondientes a cada localidad.

Haplotipos	Especie y localidad
H1	<i>P. fulvus</i> . Playa de Oro, Colima, México (1); Los Ortices, Colima, México (1); Agua Blanca, Tabasco, México (3); Tapijulapa, Tabasco, México (5); La Venta, Oaxaca, México (1). <i>P. gymnonotus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (6); Tapijulapa, Tabasco, México (3).
H2	<i>P. fulvus</i> . Alta Verapaz, Grutas De Lanquin, Guatemala (1).
H3	<i>P. fulvus</i> . Alta Verapaz, Grutas De Lanquin, Guatemala (1).
H4	<i>P. fulvus</i> . Gallon Jug, Distrito de Orange Walk, Belice (1).
H5	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (1); Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H6	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (1).
H7	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (1).
H8	<i>P. fulvus</i> . Colón, Honduras (1).
H9	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (1).
H10	<i>P. fulvus</i> . Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H11	<i>P. fulvus</i> . Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H12	<i>P. fulvus</i> . El Refugio; Ahuachapan, El Salvador (1).
H13	<i>P. fulvus</i> . Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H14	<i>P. fulvus</i> . Tapijulapa, Tabasco, México (1).
H15	<i>P. fulvus</i> . Gallon Jug, Distrito de Orange Walk, Belice (1).
H16	<i>P. fulvus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (1).
H17	<i>P. gymnonotus</i> . Agua Blanca, Tabasco, México (2).
H18	<i>P. fulvus</i> . El Refugio; Ahuachapan, El Salvador (1); Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (4); Chiapas, México (1); Campeche, México (1); Agua Blanca, Tabasco, México (39); Tapijulapa, Tabasco, México (15); La Venta, Oaxaca, México (2).

- P. gymnonotus*. Grutas de Lanquin, Alta Verapaz, Guatemala (1); Parque Nacional Altos de Campana, Panamá (1); Agua Blanca, Tabasco, México (7); Tapijulapa, Tabasco, México (5).
- H19** *P. fulvus*. Agua Blanca, Tabasco, México (1); La Venta, Oaxaca, México (3).
- H20** *P. fulvus*. Agua Blanca, Tabasco, México (1).
- H21** *P. fulvus*. Playa de Oro, Colima, México (1).
- H22** *P. fulvus*. La Venta, Oaxaca, México (1).
- H23** *P. fulvus*. La Venta, Oaxaca, México (1).
- H24** *P. fulvus*. La Venta, Oaxaca, México (1).
- H25** *P. fulvus*. Los Ortices, Colima, México (1); La Venta, Oaxaca, México (2).
- H26** *P. fulvus*. Playa de Oro, Colima, México (1).
- H27** *P. fulvus*. Playa de Oro, Colima, México (4); Los Ortices, Colima, México (3);
- H28** *P. fulvus*. Playa de Oro, Colima, México (1).
- H29** *P. gymnonotus*. Agua Blanca, Tabasco, México (4); Tapijulapa, Tabasco, México (1).
- H30** *P. fulvus*. Playa de Oro, Colima, México (1).
- H31** *P. fulvus*. Jalisco, México (1).
- H32** *P. fulvus*. Los Ortices, Colima, México (1).
- H33** *P. fulvus*. Jalisco, México (1).
- H34** *P. fulvus*. Playa de Oro, Colima, México (1).
- H35** *P. fulvus*. Tapijulapa, Tabasco, México (1).
- H36** *P. fulvus*. La Venta, Oaxaca, México (1).
- H37** *P. fulvus*. Playa de Oro, Colima, México (1); Tapijulapa, Tabasco, México (1); La Venta, Oaxaca, México (18).
- H38** *P. gymnonotus*. Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (1)
- H39** *P. gymnonotus*. Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (1).
- H40** *P. gymnonotus*. Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (1); Caverna do Bigode, Goiás, Brasil (1).

- H41** *P. gymnonotus*. Reserva Iwokrama, Potaro-Siparuni, Guyana (3)
- H42** *P. gymnonotus*. Brokopondo, Surinam (1).
- H43** *P. gymnonotus*. Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1).
- H44** *P. gymnonotus*. Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (1).
- H45** *P. gymnonotus*. Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (1); Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil (1).
- H46** *P. gymnonotus*. Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (1).
- H47** *P. gymnonotus*. Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (1).
- H48** *P. gymnonotus*. Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (1); Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (3)
- H49** *P. gymnonotus*. Hato la Florida, Bolívar, Venezuela (1).
- H50** *P. gymnonotus*. Caverna do Bigode, Goiás, Brasil (1).
- H51** *P. gymnonotus*. Jangada, Mato Grosso, Brasil (1).
- H52** *P. gymnonotus*. Brokopondo, Surinam (1).
- H53** *P. gymnonotus*. Usina Serra Grande, Alagoas, Brasil (1).
- H54** *P. gymnonotus*. Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (1).
- P. gymnonotus*. Estación Ecológica Aiuba, Aiuba, Ceará, Brasil (3); Itabaiana, Sergipe, Brasil (4); Parque Nacional Chapada Diamantina, Bahía, Brasil (2); Canaã dos Carajás, Pará, Brasil (2); Carajás, Parauapebas, Pará, Brasil (4); Tapirapé-Aquiri, Marabá, Pará, Brasil (1); Barro Alto, Goiás, Brasil (1); Caverna do Bigode, Goiás, Brasil (2); Parque Nacional Altos de Campana, Panamá (2); Reserva Iwokrama, Potaro-Siparuni, Guyana (1); Bakhuis, Sipaliwini, Surinam (1); Brokopondo, Surinam (3); Huánuco, Perú (2).
- H55**
- P. fulvus*. La Venta, Oaxaca, México (5);
- H56** *P. gymnonotus*. Agua Blanca, Tabasco, México (6); Tapijulapa, Tabasco, México (1).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

CONCLUSIONES

- ❖ Los resultados moleculares confirmar la presencia de tres linajes evolutivos que corresponden a *P. d. davyi*, *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, linajes que divergieron entre 1.025 a 2.188 Ma, probablemente promovido por oscilaciones climáticas y fluctuaciones del nivel del mar, durante el Plioceno y Pleistoceno.
- ❖ Se encontró introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, esta introgresión parece ser histórica y asimétrica con una dirección de *P. fulvus* a *P. gymnonotus*, probablemente facilitados por la colonización de *P. gymnonotus* a Centroamérica y México.
- ❖ Se observó una mayor diversidad genética con el marcador mitocondrial en individuos de *P. gymnonotus* colectados en México, Guatemala y parte de Panamá, asociado a la hibridación ancestral con *P. fulvus*.
- ❖ A pesar de la introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, se mantienen ambos linajes evolutivos.
- ❖ Los híbridos putativos (*P. fulvus* con un antebrazo ≥ 46 mm) visiblemente más grandes que los típicos *P. fulvus* observados en México, son morfológicamente más parecido a los *P. gymnonotus* que a los *P. fulvus*, sin embargo no todos estos murciélagos corresponden a híbridos determinados con los microsatélites

o con los haplotipos mitocondriales compartidos. Por lo tanto las diferencias del tamaño del antebrazo parecieran ser independientes a la introgresión genética.

PERSPECTIVAS

- ❖ Para ubicar los límites geográficos entre los linajes de este complejo de especies y los procesos evolutivos que los han originado, son necesarias muestras de *P. d. davyi* de Centroamérica.
- ❖ Para conocer y comprender mejor la introgresión genética entre *P. fulvus* y *P. gymnonotus* es necesario analizar una mayor cantidad de muestras de ambas especies de la zona simpátrica en específico de Centroamérica y utilizando más locus de microsatélites, con la finalidad de robustecer los eventos de hibridación detectados en este estudio.
- ❖ Es necesario estudiar los patrones reproductivos de ambas especies, en particular la filopatría, identificar los sistemas de cortejo y conocer las fechas de copulación, gestación y lactancia.
- ❖ Evaluar una posible evolución adaptativa de los genes mitocondriales en *P. fulvus* y *P. gymnonotus*, tomando en cuenta los requisitos metabólicos de los diferentes gradientes climáticos de la distribución de estas especies.
- ❖ Realizar un análisis morfológico detallado de *P. fulvus* y *P. gymnonotus* de toda su distribución, bajo una perspectiva de hibridación.