

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA



División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Doctorado en Ciencias Biológicas

“Patrones filogeográficos de *Pteronotus davyi* (Chiroptera: Mormoopidae) en México,  
basados en la región control”

T E S I S

Que para obtener el grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

M. en B. LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO

Cotutores:

Dr. Ricardo López-Wilchis

Dra. Irene de los Ángeles Barriga Sosa

Asesor:

Dr. Francisco Flores Pedroche

México, D.F.

Agosto 2009

**El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.**

**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud  
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó**

**Luis Manuel Guevara Chumacero**

**El día 03 de Agosto de 2009**

**Jurado:**

**Dr. Ricardo López-Wilchis (Presidente)**

\_\_\_\_\_

**Dr. Irene D. L. A Barriga Sosa (Secretaria)**

\_\_\_\_\_

**Dr. Francisco Flores Pedroche (Vocal)**

\_\_\_\_\_

**Dra. Ella Vázquez Domínguez (Vocal)**

\_\_\_\_\_

**Dr. Luis Eguiarte Fruns (Vocal)**

\_\_\_\_\_

**COMITÉ TUTORAL:**

**COTUTORES DE TESIS**

**DR. RICARDO LÓPEZ-WILCHIS**

Depto. de Biología - UAM Iztapalapa,

**DRA. IRENE DE LOS ÁNGELES BARRIGA SOSA**

Depto. de Hidrobiología - UAM Iztapalapa,

**ASESOR**

**DR. FRANCISCO FLORES PEDROCHE**

Depto. de Hidrobiología - UAM Iztapalapa,

SINODALES:

**DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ**

Depto. de Ecología de la Biodiversidad,  
Instituto de Ecología, UNAM

**DR. LUIS EGUIARTE FRUNS**

Depto. de Ecología Evolutiva  
Instituto de Ecología, UNAM

La presente investigación se realizó en:

El laboratorio de Biología Molecular de la Planta Experimental de Producción  
Acuícola de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa bajo la dirección de la  
Dra. Irene D. L. A. Barriga Sosa.

El laboratorio de Biología de mamíferos de Departamento de Biología de la  
Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa bajo la dirección del Dr. Ricardo  
López-Wilchis.

*A veces podemos pasarnos años sin vivir en absoluto,  
y de pronto toda nuestra vida se concentra en un solo instante.*

Oscar Wilde

## DEDICATORIA

A DIOS.

A LAS LUCES DE MI VIDA, MI AMADA ESPOSA "AMANDA", POR SU AMOR, APOYO, PACIENCIA Y COMPRENSIÓN DURANTE EL LARGO TIEMPO DE ESTE PROYECTO, Y A "FRIDITA" POR QUIEN DARÍA MI VIDA ENTERA.

A MIS "PAPÁS", MIGUEL GUEVARA Y MARGARITA CHUMACERO, POR SU AMOR Y POR SU APOYO INCONDICIONAL QUE HA SIDO PARTE FUNDAMENTAL PARA LOGRAR ESTO.

A MIS HERMANOS "MIGUEL" Y "CARLOS", A QUIENES SIEMPRE LLEVO EN EL CORAZÓN.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera “principal” y sin orden de distinción al Dr. Ricardo López Wilchis y a la Dra. Irene Barriga Sosa. Al Dr. Ricardo por la dirección y apoyo constante; por su amistad y por compartir sus conocimientos para mi formación profesional. A la Dra. Irene por la dirección, amistad, apoyo incondicional y por compartir sus conocimientos y experiencia para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Francisco Flores Pedroche, por su colaboración y asesoría brindada.

A los miembros del jurado externo, la Dra. Ella Gloria Vázquez Domínguez y el Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, por sus valiosos comentarios a la tesis. Al Dr. Abel Sentfés Granados por su apoyo como representante del Comité Doctoral.

Un agradecimiento muy especial a los Drs. Javier Juste B. y Carlos Ibáñez U. por su apoyo en el trabajo de campo y por sus sugerencias y comentarios a lo largo de todo el trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico (No. 164703) para el desarrollo de este trabajo.

Al Biól. Alejandro Soto Castruita, a la MVZ Rosa María Aguilar y al M. en B. R. Miguel León, compañeros y amigos, quienes me apoyaron durante el trabajo de campo.

Al Dr. Javier Barrientos y la Dra. Deneb García, por su amistad y apoyo para el uso del software. Al Dr. Miguel A. Briones por facilitar las muestras de Oaxaca. Al profesor Matías Martínez por proporcionar las muestras de Chiapas. Al Dr. Antonio Guillén por su apoyo teórico y práctico. A la Dra. Nancy Belfiore y a la Dra. Samantha M. Wisely por sus valiosos comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo. Al Dr. Rubén Román Ramos y a la Dra. Reyna Fierro Pastrana por su apoyo como coordinadores del Doctorado en Ciencias Biológicas.

A mi abuelita y abuelito †, tíos y primos, a Eduardo Sainoz, Uriel, Mara, Vlady, Sebastián, a la familia Aguirre con especial énfasis en la señora Rebeca †, por todo su apoyo.

A mis compañeros y amigos Claudia Garnica, Abel Chihuahua, William Torres, Ángel Pérez, Ismael Ojeda, Laura Núñez, Mónica Pérez, así como a mis alumnos Dafne, Neo y Sofía, por el apoyo y compañerismo brindado.

A las personas, que en su momento, me apoyaron y me dieron ánimos para llevar a término este trabajo.

**ÍNDICE**

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>4</b>
<b>4. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>7</b>
4.1. Filogeografía .....	7
4.2. ADN mitocondrial .....	8
4.3. Región control mitocondrial .....	9
4.4. Citocromo b mitocondrial .....	11
4.5. Teoría de Coalescencia .....	11
4.6. Métodos de Análisis .....	13
4.6.1. Genética de Poblaciones .....	13
4.6.2. Estructura poblacional .....	13
4.6.3. Índices de diversidad genética .....	15
4.6.4. Prueba de Mantel .....	15
4.6.5. Relaciones filogenéticas .....	16
4.6.5.1. Cladogramas .....	16
4.6.6. Redes haplotípicas .....	18
4.6.7. Método de parsimonia estadística .....	19
4.6.8. Análisis filogeográficos .....	20
4.6.8.1. Análisis de clados anidados .....	20
4.6.8.2. Crítica al NCA .....	23
4.6.8.3. Historia Demográfica .....	24

4.6.8.4. Distribución mismatch .....	24
4.6.8.5. Theta (S) .....	25
4.6.8.6. Prueba de Tajima .....	25
4.6.9. Análisis de bootstrap paramétrico .....	26
4.6.9.1. S de Slatkin y Maddison .....	26
<b>5. ANTECEDENTES .....</b>	<b>27</b>
5.1. Familia Mormoopidae .....	27
5.2. Clasificación .....	27
5.3. Relaciones filogenéticas .....	29
5.4. Origen .....	32
5.5. Análisis filogeográficos .....	34
5.6. Especie de estudio: <i>Pteronotus davyi</i> .....	36
5.6.1. Taxonomía y distribución .....	36
5.6.2. Diagnósis .....	37
5.6.3. Hábitat .....	38
5.6.4. Ecología .....	39
5.6.5. Reproducción .....	39
<b>6. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>40</b>
<b>7. OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
7.1. Objetivo general .....	43
7.2. Objetivos específicos .....	43
<b>8. HIPÓTESIS .....</b>	<b>45</b>

<b>9. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
9.1. Trabajo de campo .....	46
9.2. Trabajo de Laboratorio .....	49
9.2.1. Extracción de ADN total .....	49
9.2.2. Amplificación vía PCR .....	49
9.2.2.1. Citocromo b .....	49
9.2.2.2. Diseño de cebadores para la región control .....	50
9.2.2.3. Región control .....	51
9.2.3. Purificación y cuantificación de productos amplificados .....	52
9.2.4. Obtención de secuencias nucleotídicas .....	52
9.3. Trabajo de Gabinete .....	53
9.3.1. Edición y alineamiento de secuencias .....	53
9.3.2. Análisis de estructura genética de poblaciones .....	54
9.3.3. Análisis de expansión del intervalo geográfico .....	54
9.3.4. Análisis filogenéticos .....	56
9.3.5. Asociación entre distancias genéticas vs. distancias geográficas .....	57
9.3.6. Análisis filogeográficos de clados anidados .....	58
9.3.7. Análisis de Bootstrap paramétrico .....	60
<b>10. RESULTADOS</b> .....	<b>62</b>
10.1. Citocromo b. Patrones generales de la variación de las secuencias .....	62
10.2. Región control. Patrones generales de la variación de las secuencias .....	63
10.3. Índices de diversidad molecular .....	67
10.4. Estructura genética poblacional .....	69

10.5. Demografía histórica .....	70
10.6. Análisis filogenéticos .....	73
10.7. Distancias genéticas .....	77
10.8. Prueba de Mantel .....	80
10.9. Redes haplotípicas. Análisis de clados anidados .....	81
10.10. Simulaciones coalescentes .....	89
<b>11. DISCUSIÓN .....</b>	<b>92</b>
11.1. Relaciones filogeográficas .....	92
11.2. Estructuración genética pacífico vs. golfo .....	96
11.3. Estructura intraregional .....	98
11.4. Implicaciones en taxonomía .....	102
11.5. Implicaciones de conservación .....	104
<b>12. CONCLUSIONES .....</b>	<b>109</b>
<b>13. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>111</b>
<b>14. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>113</b>
<b>15. ANEXO .....</b>	<b>144</b>
15.1. Anexo 1 .....	144
15.2. Anexo 2 .....	146
15.2.1. Extracción de ADN total vía fenol-cloroformo .....	146
15.2.2. Extracción de ADN total vía método de QIAGEN .....	147
15.2.3. Preparación del gel de agarosa .....	148

15.2.4. Corrimiento electroforético .....	148
15.2.5. Visualización del gel .....	149
15.2.6. Purificación de productos amplificados .....	149
15.2.7. Reacción de secuenciación .....	150
15.2.8. Purificación de la reacción de secuenciación .....	150
15.3. Anexo 3 .....	151
15.3.1. Artículo científico aceptado en el Journal of Mammalogy...	151

**LISTA DE FIGURAS**

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
1	Estructura general de la región control de mamíferos .....	10
2	Estructura general del gen citocromo b .....	11
3	Árbol filogenético de mormoópidos propuesto por Smith (1972)..	29
4	Cladograma compuesto” propuesto por Arnold <i>et al.</i> (1982) .....	30
5	Cladograma de especies de <i>Pteronotus</i> y <i>Mormoops</i> propuesto por Lewis-Oritt (2001) .....	32
6	Imagen de <i>Pteronotus davyi</i> .....	36
7	Distribución de las tres subespecies de <i>P. davyi</i> .....	37
8	Mapa indicando las localidades de muestreo de <i>P. davyi</i> .....	48
9	Esquema general de la región amplificada del gen citocromo b...	50
10	Esquema del fragmento amplificado de la región control .....	51
11	Caracterización de los árboles poblacionales representando los modelos usados en las simulaciones coalescentes .....	61
12	Regiones secuenciadas del gen mitocondrial citocromo b .....	62
13	Ubicación y frecuencia haplotípica de la región control del ADNmt de las poblaciones estudiadas de <i>P. davyi</i> .....	65
14	Distribución mismatch de todos los haplotipos de <i>P. davyi</i> .....	70
15	Distribución mismatch de los haplotipos del sureste de <i>Pteronotus davyi</i> .....	71
16	Distribución mismatch de los haplotipos del pacífico-golfo de <i>Pteronotus davyi</i> .....	72

FIGURA	PÁGINA
17	Cladograma consenso de 67 haplotipos de <i>P. davyi</i> a partir de MV utilizando a <i>P. parnellii</i> como grupo externo ..... 75
18	Cladograma consenso de 67 haplotipos de <i>P. davyi</i> a partir de un análisis Bayesiano con <i>P. parnellii</i> como grupo externo ..... 76
19	Árbol neighbor-joining de los 105 individuos secuenciados de <i>P. davyi</i> . ..... 79
20	Relación entre distancias geográfica y distancias genéticas entre todas las poblaciones de <i>P. davyi</i> ..... 81
21	Red haplotípica de 67 haplotipos <i>P.davyi</i> de la región control mitocondrial ..... 82
22	Diseño de clados anidados de los haplotipos de la región control de <i>P. davyi</i> ..... 85
23	Resumen de los resultados del NCA para los haplotipos de <i>P. davyi</i> ..... 87
24	Distribución mismatch de los haplotipos del clado 3-7 del NCA ... 89
25	Distribución del estadístico de Slatkin y Maddison (1989) ..... 90
26	Posibles refugios pleistocénicos y rutas de expansión y diversificación utilizados por <i>Pteronotus davyi</i> ..... 94
27	Correlación lineal entre la latitud y la diversidad nucleotídica de las poblaciones de la región del pacífico ..... 101
28	Correlación lineal entre la latitud y la diversidad nucleotídica de las poblaciones de la región del golfo ..... 101
29	Propuesta de ESU's y MU's para <i>Pteronotus davyi</i> en México.... 108

**LISTA DE TABLAS**

<b>TABLA</b>		<b>PÁGINA</b>
1	Resumen cronológico de desarrollos en la historia de la Filogeografía .....	7
2	Clasificación taxonómica de la familia Mormoopidae .....	28
3	Estudios moleculares con murciélagos y mamíferos	34
4	Nombre, localización y ubicación geográfica de las localidades muestreadas de <i>Pteronotus davyi</i> de México .....	46
5	Distribución de los haplotipos de <i>Pteronotus davyi</i> de México...	65
6	Índices de diversidad molecular para las poblaciones de estudio de <i>Pteronotus davyi</i> .....	68
7	AMOVA general de las poblaciones de <i>P. davyi</i> y entre las regiones pacífico, golfo y sureste .....	69
8	Resultados de los análisis demográficos de <i>Pteronotus davyi</i> ..	73
9	Distancias genéticas de las poblaciones estudiadas de <i>P. davyi</i> .....	77
10	Resumen de los análisis de clados anidados .....	86

## 1. RESUMEN

*Pteronotus davyi* es un murciélago tropical que en México presenta un área de distribución que abarca actualmente las vertientes del pacífico y del golfo de México con unión en el Istmo de Tehuantepec, hasta la Península de Yucatán. Evaluamos las relaciones filogeográficas entre 18 poblaciones en México utilizando datos de secuencias nucleotídicas del dominio hipervariable HVII de la región control (555 pb) del ADN mitocondrial en 105 especímenes. Las secuencias del gen citocromo b resultaron con pocos sitios parsimoniosamente informativos por lo que se consideró como un marcador no informativo en este estudio. Las poblaciones estudiadas se dividieron *a priori* en tres regiones geográficas (pacífico, golfo y sureste) de acuerdo a sus características florísticas y biogeográficas. Se detectaron altos niveles de diversidad haplotípica (0.524-1.000), mientras que la diversidad nucleotídica fue variable (0.0018-0.0194), lo que se ha reportado para otras especies de murciélagos. Simulaciones coalescentes apoyan un modelo filogeográfico de dos-refugios situados en el sur de México (refugios del Arco y Soconusco), a partir de los cuales hubo posible evento de expansión durante el Pleistoceno hacia las tres regiones geográficas, seguidas por una división que dio lugar a la separación de los grupos pacífico/golfo y sureste. Esta separación fue apoyada por los valores de  $F_{ST} = 0.429$  y de  $N_m = 0.86$  sustentando la posibilidad de dos distintos linajes de *P. davyi* en México, promovido por la presencia del Istmo de Tehuantepec como barrera geográfica. Finalmente, identificamos una estructura genética diferenciada entre las dos vertientes costeras aunque a un nivel inferior respecto a la región Sureña, detectando una profunda influencia de los sistemas montañosos, Sierra Madre

Occidental, Sierra Madre Oriental y Sierra Madre del Sur actuando como una barrera física para la dispersión de *P. davyi*. Los análisis de clados anidados (clados 2-3 y 4-4) apoyaron esta hipótesis sugiriendo eventos de flujo génico restringido con aislamiento por distancia entre las regiones del pacífico y golfo.

## 2. ABSTRACT

*Pteronotus davyi* is a tropical bat, currently distributed in Mexico along the Pacific and Gulf of Mexico slopes, joined by the Isthmus of Tehuantepec to the Yucatan Peninsula. We evaluated phylogeographic relationships among 18 populations in Mexico using data from the nucleotide sequence of the HVII hypervariable domain of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region (555 pb) from 105 specimens. The sequences of the cytochrome b gene showed low parsimonious informative sites therefore are not considered as an informative marker in this study. The studied populations were distributed over three geographic regions (Pacific, Gulf, and Southeast) that were delineated a priori according to floristic characteristics and biogeography. We detected high levels of haplotype diversity (0.524-1.000), whereas nucleotide diversity was variable (0.0018-0.0194), which has been reported for other species of bats. Coalescent simulations supports a two-refugia phylogeographic model situated in the south of Mexico (Arc and Soconusco refuges), from which a possible expansion event took place during the Pleistocene towards the three geographic regions, followed by a split that give rise to the separation of the pacific/gulf and southeast groups. This separation was supported by the values of  $F_{ST} = 0.429$  and  $N_m = 0.86$  supporting the existence of two putative distinct lineages of *P.*

*davyi* in Mexico, likely due to the Isthmus of Tehuantepec acting as a geographical barrier. Finally, our data reveal genetic structure, differentiating the two coastal groups (Pacific and Gulf), though at a lower level relative to the southeastern region; this pattern indicates a major influence of the mountainous systems Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental and Sierra Madre of South acting as physical barriers to dispersal for *P. davyi*. The nested clade analysis (clades 2-3 and 4-4) support this hypothesis suggesting restricted gene flow with isolation by distance events between the pacific and gulf regions.

### 3. INTRODUCCIÓN

*Pteronotus davyi* (Gray, 1838), es una murciélago insectívoro perteneciente a la familia Mormoopidae que se distingue de otros mormoópidos por la longitud del antebrazo (<50 mm) y por tener la membrana alar unida sobre el dorso, lo cual le confiere una apariencia de poseer una espalda desnuda (Adams, 1989). Actualmente se reconocen tres subespecies: *P. d. davyi*, *P. d. incae* y *P. d. fulvus*. En México solamente se tiene registros de *P. d. fulvus* (encontrada desde Sonora, Tamaulipas y Nuevo León hasta Honduras) con un área de distribución que consiste en dos estrechas franjas independientes que se extienden por las costas próximas del pacífico (Sonora) y del golfo de México (Tamaulipas), ligada a la distribución de la selva tropical húmeda, de tal forma que confluyen en las tierras bajas del Istmo de Tehuantepec hasta el sureste del país (Smith, 1972). Este patrón de distribución es compartido por la mayoría de los murciélagos tropicales mexicanos (Medellín *et al.*, 1997) y ha podido verse fuertemente influenciado por procesos geológicos complejos, como se ha comprobado en diversas especies de plantas y vertebrados (Rzedowski, 1978; Ramamoorthy *et al.*, 1993), y por los bruscos cambios de temperatura y humedad durante los periodos glaciares e interglaciares del Pleistoceno (Toledo, 1982; Graham, 1993). Existen pruebas fitogeográficas (León-Cazares y Gómez-Pompa, 1970; Gómez-Pompa, 1973) que sugieren que la selva tropical húmeda (hábitat de *P. davyi*) fue desplazada de su actual área de distribución en México hacia el sur, durante los periodos más críticos del Pleistoceno, con posteriores expansiones hacia el norte por las regiones costeras. Estos

fenómenos debieron provocar sucesivas contracciones y expansiones en el área de distribución de la fauna asociada (Russell, 1968; Braun, 1988; Hidalgo-Mihart *et al.*, 2004), presencia de zonas que han actuado como refugio (Toledo, 1982; Wendt, 1989) y que han determinado numerosos procesos de vicarianza (Sullivan *et al.*, 2000). Además del efecto de los sistemas montañosos al sur del Istmo de Tehuantepec, por lo que se sugiere que esta especie debió haber experimentado procesos de aislamiento y fragmentación así como de colonización de nuevos territorios, desde el Pleistoceno hasta nuestros días, eventos que deben estar reflejados en la estructura genética de sus poblaciones.

Hasta el momento pocos son los trabajos filogeográficos que se han elaborado para los murciélagos nativos de México (Vázquez-Domínguez y Vega, 2006), y no existen estudios realizados concretamente para *Pteronotus davyi*. Se han inferido relaciones filogenéticas con relación a otros grupos taxonómicos (Lewis-Oritt *et al.*, 2001; Simmons y Conway, 2001; Van Den Bussche *et al.*, 2002), pero los procesos evolutivos a nivel intraespecífico no han sido hasta ahora estudiados. Por lo anterior el presente estudio analiza, por un lado, los patrones filogeográficos del murciélago pequeño de espalda desnuda *P. davyi* en México con la finalidad de esclarecer cómo han podido afectar los distintos pulsos climáticos del Pleistoceno a la historia evolutiva de la especie y por otro lado, comprobar la hipótesis de que las posibles expansiones desde refugios y los procesos de aislamiento y/o fragmentación posteriores así como de colonización de nuevos territorios, desde el Pleistoceno hasta nuestros días han dejado una marca genética a lo largo de su patrón de distribución actual. Para ello se estudió la variación genética en el gen citocromo b, el

cual ha sido empleado en estudios intraespecíficos de mamíferos (Smith y Patton, 1991; Worthington *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 2000; Hoffmann y Baker, 2001; Jaarola y Searle, 2002; Michaux *et al.*, 2003), y en la región control del ADN mitocondrial por su alta tasa evolutiva (Avise *et al.*, 1987; Avise, 1994), además de que ha sido ampliamente utilizado para inferir la historia y/o la estructura poblacional de una amplia variedad de organismos (Vilà *et al.*, 1997; Mardulyn, 2001; McCracken *et al.*, 2001), incluyendo los mamíferos (Wilkinson y Fleming, 1996; Eizirik *et al.*, 1998; Petersen y Stewart, 2006).

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Filogeografía

Avise (2000) define la Filogeografía como un campo de estudio concerniente a los principios y procesos que gobiernan las distribuciones geográficas de linajes genealógicos, especialmente dentro y entre especies estrechamente relacionadas. Templeton (2004) menciona que la Filogeografía intraespecífica detalla la historia evolutiva de una especie a través de tiempo y espacio, en otras palabras permite conocer el pasado histórico de una especie, principalmente en cuanto al origen y procesos de dispersión que dieron lugar a su distribución geográfica actual.

La Filogeografía surge a finales de los años 80, con la idea de reforzar la interacción entre la macroevolución y la microevolución, donde la genética molecular juega un papel primordial como herramienta indispensable. Tiene vínculos con diversas áreas como son la genética molecular, genética de poblaciones, etología, demografía, biología filogenética, paleontología, geología y geografía histórica en la que residen los procesos que generan los patrones filogeográficos (Avise *et al.*, 1987).

Han sido diversos los desarrollos científicos que han resultado indispensables para el surgimiento de la Filogeografía (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resumen cronológico de algunos desarrollos importantes en la historia de la Filogeografía (tomado de Avise, 2004).

Año	Desarrollo
1974	Brown y Vinograd demostraron cómo generar mapas de sitios de restricción para ADNmt de animales.
1975	Watterson describió algunas propiedades básicas de la genealogía de genes, marcando el comienzo de la teoría moderna de coalescencia. Brown y Wright introdujeron un análisis de ADNmt para estudiar los orígenes y la evolución de taxa partenogenéticos.
1977	Upholt desarrolló el primer método estadístico para estimar la divergencia de las secuencias de ADNmt a partir de datos de restricción.
1979	Brown, George y Wilson documentaron la rápida evolución del ADNmt.
1980	Brown escribió un reporte inicial sobre la variación del ADNmt en humanos.
1983	Tanto Tajima como Hudson iniciaron análisis estadísticos para distinguir entre un árbol de genes y un árbol poblacional.
1986	Bermingham y Avise iniciaron estimaciones de la Filogeografía comparada del ADNmt de múltiples especies co-distribuidas.
1987	Avise y colaboradores acuñaron la palabra Filogeografía, definieron el campo e introdujeron varias hipótesis filogeográficas. Cann y colaboradores describieron la variación global en el ADNmt de humanos.
1989	Slatkin y Maddison introdujeron un método para la estimación de flujo génico interpoblacional a partir de filogenias de alelos.
1990	Avise y Ball introdujeron principios de concordancia genealógica como un componente de valoración filogeográfica.
1992	Avise resumió la primer compilación en extenso, involucrando múltiples especies y ensayos genéticos, de patrones filogeográficos para una fauna regional.
1994	Moritz promovió la distinción conceptual entre filogenias intraespecíficas superficiales y profundas, introduciendo los términos de “unidades de manejo” y “unidades significativamente evolutivas”.
1996	Volúmenes editados por Avise y Hamrick y por Smith y Wayne resumieron el papel de la conservación para datos filogeográficos.
1998	Un número especial de la revista <i>Molecular Ecology</i> es dedicada a la Filogeografía. Templeton evaluó el papel estadístico de los “análisis de clados anidados” en Filogeografía (Templeton, 1993, 1994, 1996; para una valoración crítica, ver Knowles y Maddison, 2002).
2000	Avise publica el primer libro de texto sobre Filogeografía.
2001	La revista <i>Molecular Ecology</i> incluye una sección intitulada “Phylogeography, Speciation and Hybridization”.

#### 4.2. ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) es un material genético circular cerrado de doble cadena que se encuentra en el interior de las mitocondrias celulares y consta de aproximadamente 16500 pares de bases (pb), por ello es 200,000 veces más pequeño que el ADN nuclear. Las células somáticas típicas poseen cientos de miles

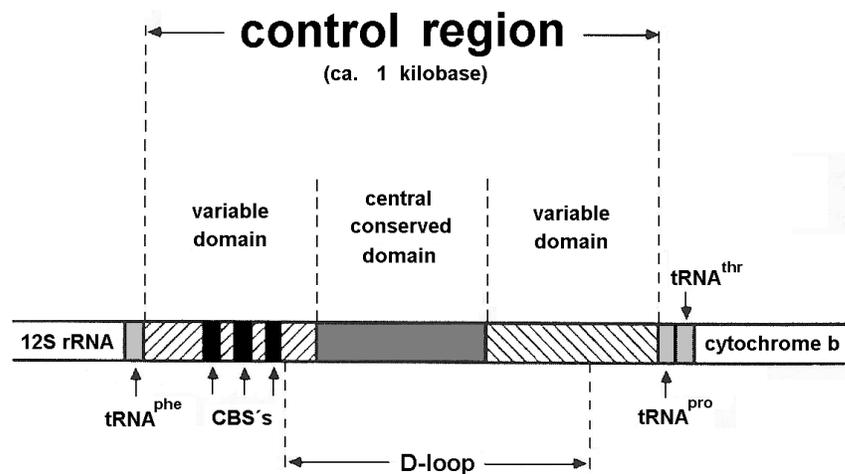
de mitocondrias, cada una con varias copias de ADNmt, sin embargo, en general existe un haplotipo mitocondrial preponderante por cada individuo. Esta característica denominada homoplasia, resulta fundamental para poder realizar un análisis filogeográfico donde las unidades de estudio son los individuos.

Las dos cadenas del ADNmt reciben el nombre de cadena L (ligera o light), la cual es rica en bases pirimidínicas, y cadena H (pesada o heavy) con una elevada proporción de bases purínicas. La mayor parte de las secuencias codificantes (28 genes) se encuentran en la cadena H. El ADNmt contiene información de 38 genes: 2ARNr (12S y 16S), 22ARNt y 13 genes estructurales (ARN mensajeros), los cuales codifican diferentes subunidades de los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa. Además de la región mayor no codificante, conocida como región control o D-Loop (Fig. 1), en la cual se localiza el origen de replicación de la cadena H, los promotores para la transcripción de las dos hebras (PL y PH), dos lugares de unión de factores de transcripción (Tfam), tres bloques de secuencias conservados asociados con el inicio de la replicación (CSBI, II y III) y las secuencias asociadas a la terminación de cadenas (TAS) (Coskun *et al.*, 2003; Foran *et al.*, 1988). Algunas de las propiedades que hacen que el ADNmt sea un marcador particularmente útil para estudios filogeográficos a nivel microevolutivo en especies animales son: a) molécula circular; b) elevada tasa de cambio mutacional; c) herencia materna; d) ausencia de recombinación (Moritz *et al.*, 1987).

### **4.3. Región control mitocondrial**

La región control es la principal región regulatoria y la principal área no

codificante del ADNmt animal (Coskun *et al.*, 2003; Foran *et al.*, 1988). En mamíferos, la región control está situada entre el ARN<sub>t<sub>pro</sub></sub> y el ARN<sub>t<sub>fen</sub></sub> y la longitud varía de 880 a 1400 pb (Saccone *et al.*, 1991; Sbisà *et al.*, 1997). Es considerada como la región más variable del ADNmt, destacando por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes (Vigilant *et al.*, 1991; Greenberg *et al.*, 1983). Se ha dividido en tres dominios (Brown *et al.* 1986): el dominio ETAS (extended termination-associated sequence) (abarca del ARN<sub>t<sub>pro</sub></sub> al dominio central), el dominio central (CD, central domain), y el dominio CSB (conserved sequence block) (abarca del CD al ARN<sub>t<sub>fen</sub></sub>). La mayor parte de la variabilidad, tanto de sustituciones nucleotídicas como de deleciones/inserciones, está concentrada en los dominios ETAS y CSB, mientras que el dominio DC es más conservado (Sbisà *et al.* 1997).

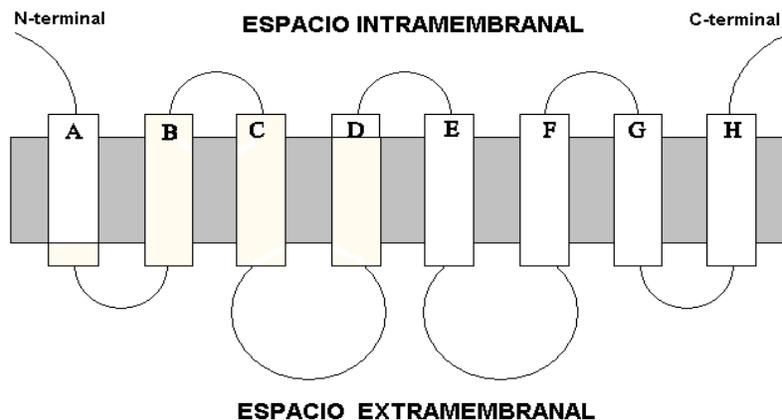


**Figura 1.** Diagrama de los tres principales dominios de la región del ADNmt de mamíferos (tomado de Avise, 2000). Se presentan los dos dominios hipervariables con un dominio central conservado, además de tres (en ocasiones dos) bloques de secuencias conservadas (CBSs). El “D-loop” es una porción de la región control, la

cual está asociada con la replicación del ADNmt.

#### 4.4. Citocromo b mitocondrial

El citocromo b se encuentra en la mitocondria de todos los organismos eucarióticos. Está localizada en el Complejo III de la membrana interna de la mitocondria junto con otras proteínas formando a su vez el complejo citocromo bc1. El citocromo b es una de los citocromos involucrados en el transporte de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria. Este contiene ocho hélices transmembranales conectadas por dominios intra o extramembranales (Figura 2, Esposti *et al.*, 1993). Este es el único citocromo codificado por el ADN mitocondrial.



**Figura 2.** Estructura general del gen citocromo b de acuerdo al “modelo de ocho dominios” propuesto por Howell y Gilbert (1988) (tomado de Esposti *et al.*, 1993).

#### 4.5. Teoría de Coalescencia

El análisis de la genealogía de alelos o haplotipos ha revolucionado en los últimos años el estudio de la estructura genética de las poblaciones. En la actualidad

no solamente se pueden estudiar la cantidad de variación genética de una población, sino también se pueden inferir los procesos que históricamente son responsables de esa estructura genética. Este enfoque está apoyado por la teoría de coalescencia que analiza los patrones de divergencia de alelos o haplotipos bajo diferentes supuestos no sólo relacionados con los aspectos genéticos de las poblaciones sino también con los aspectos demográficos históricos (Delgado y Piñero, 2002).

La teoría de coalescencia contempla el tratamiento matemático y estadístico formal de las genealogías génicas, dentro y entre especies próximas (Griffiths, 1980), basándose en el análisis filogenético de eventos evolutivos que sucedieron en el pasado a nivel poblacional, por medio de la teoría neutralista (Kimura, 1980). Un árbol de genes muestra cuáles genes son los más relacionados con otros y el tiempo cuando ocurrieron los ancestros más comunes de diferentes genes. Cuando los linajes de una población se juntan o “coalescen” en un ancestro común, se conoce como coalescencia, en otras palabras, es un modelo de separación de linajes y deriva génica que se retrotrae en el tiempo, hasta un ancestro común. Para un gen todos los diferentes alelos de una población tienden a coalescer, ordenando o reconstruyendo así la historia de las poblaciones. El tiempo de coalescencia puede verse afectado por diversos procesos que operan a nivel poblacional, como por ejemplo fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones, existencia de selección natural o variaciones en el flujo génico (Hudson, 1990; Harding, 1996). De tal forma, al proveer un marco conceptual para el estudio de los procesos que influyeron históricamente sobre las poblaciones y que dieron lugar a la distribución actual de su variabilidad genética, la teoría de coalescencia ha pasado a ser una parte

fundamental de la genética de poblaciones, la Filogeografía, la demografía histórica y la evolución.

#### **4.6. Métodos de análisis**

##### **4.6.1. Genética de poblaciones**

La genética de poblaciones ayuda a entender a la evolución en términos de adaptación y especiación, a partir del comportamiento que tienen los genes en las poblaciones, y considera a estos como unidades sobre las que actúan las diferentes fuerzas evolutivas, como la selección natural, la endogamia, la migración, la mutación y la deriva génica. Para comprender esta evolución en el ámbito genético es necesario determinar los niveles de variación en las poblaciones, así como el origen de esta variación, su mantenimiento, distribución y cuál es su importancia evolutiva (Hartl y Clark, 1997).

##### **4.6.2. Estructura poblacional**

La estructura de las poblaciones consiste en dos partes distintas pero interrelacionadas, por un lado tenemos la estructura demográfica y por el otro la estructura genética. Mientras que la estructura demográfica revela las características principales de una población en lo que se refiere a la composición por edad y sexo, la estructura genética de una especie se refiere a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de dicha especie. La estructura genética de una población concreta viene determinada por la historia evolutiva de esa población y va a ser consecuencia de las interacciones entre los 5 factores que

condicionan la evolución de las poblaciones: mutación, deriva genética, flujo génico, sistema de reproducción y selección. Para determinar la estructura genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie, es decir, evaluar los genotipos de los diferentes individuos (Slatkin, 1994).

Cuando una población está subdividida geográficamente, por lo común presenta diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas en las diferentes subpoblaciones que la conforman. Dichas diferencias dependen principalmente de los niveles de flujo génico que exista entre las subpoblaciones (Nei, 1987). Para evaluar el efecto que tiene la subdivisión en las poblaciones se han desarrollado varios métodos y el más utilizado es el de los estadísticos  $F$  propuestos por Wright (1951). Estos estadísticos de estructura poblacional miden la estructuración genética a diferentes niveles espaciales. Ante un conjunto de poblaciones de una misma especie (o también en una población dividida en varias subpoblaciones) podemos distinguir tres niveles de complejidad: el de los organismos individuales ( $F_{IS}$ ), el de las diferentes poblaciones o subpoblaciones ( $F_{ST}$ ) y el de la población total ( $F_{IT}$ ) (Hartl y Clark, 1997). El parámetro  $F_{ST}$  actualmente se emplea en estudios filogeográficos (Huvet *et al.*, 2000), de genética de poblaciones (Almeida *et al.*, 2005), entre otros. Cabe señalar que el análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) es similar a los estadísticos  $F$  descritos por Wright (1943) y mide la diversidad génica entre poblaciones.

### 4.6.3. Índices de diversidad genética

Los índices de diversidad proporcionan una medida de la cantidad de variación de una población, siendo especialmente útiles para realizar comparaciones entre poblaciones a *grosso modo*. Los más empleados en el estudio de la variabilidad del ADNmt a nivel de poblaciones son: la diversidad genética (o haplotípica) de Nei ( $h$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ). La diversidad haplotípica o de Nei ( $h$ ) es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes, y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes. A continuación se presentan la fórmula se ambos índices:

$$h = \left( \frac{n}{n-1} \right) \left( 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad \pi = \left( \frac{n}{n-1} \right) \sum_{ij} p_i p_j D_{ij}$$

donde  $n$  es el tamaño de muestra,  $k$  es el número de haplotipos,  $p_i$  y  $p_j$  son las frecuencias de los haplotipos  $i, j$ , y  $D_{ij}$  es la distancia entre éstos (Nei, 1973).

### 4.6.4. Prueba de Mantel

Para especies con una baja tasa de dispersión se espera encontrar una similitud genética más elevada entre poblaciones cercanas geográficamente, que con aquellas que se encuentran más alejadas. Este patrón de estructura genética basado en el “**aislamiento por distancia**” (APD) fue definido por primera vez por Wright (1943). Cuando la deriva genética y la migración se encuentran en equilibrio en una población, se espera que haya una relación positiva entre la distancia geográfica y la

distancia genética entre las poblaciones (Slatkin, 1993). Para comprobar esto, se utiliza la prueba de Mantel que es un procedimiento permutacional usado para probar la significancia estadística de la correlación de matrices (Sokal, 1979), el cual ha sido usado en genética de poblaciones para comparar dos o más matrices de distancia, probando hipótesis sobre la estructura espacial, temporal o ambiental en distancias genéticas (Smouse *et al.*, 1986). Recientemente se ha utilizado para estudios filogeográficos (Palma *et al.*, 2005; Mora, 2006).

#### **4.6.5. Relaciones filogenéticas**

##### **4.6.5.1. Cladogramas**

Dentro de los análisis filogenéticos moleculares, se utilizan diferentes métodos para construir cladogramas y conocer las relaciones entre las poblaciones de la especie. Entre los más utilizados están los cladogramas construidos por neighbor-joining (*e.g.* Scribner *et al.*, 2003; Merrill *et al.*, 2005). El neighbor-joining está basado en la selección de parejas de secuencias vecinas (neighbor), por tanto menor distancia, y procede, por pasos sucesivos, generando nuevas matrices de distancia en las que las parejas seleccionadas resultan asociadas en un elemento único hasta resolver todos los nodos del árbol en construcción como puntos de bifurcación unívocos. Actualmente los métodos probabilísticos como la Máxima verosimilitud (Hillis *et al.*, 1996), han tenido mucho auge debido a que incorporan información del modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajuste a los datos (*e.g.* Morando *et al.*, 2004), como la distancia de Tamura y Nei (1993) desarrollada con base en las características que presenta la variabilidad intraespecífica de la región control del

ADNmt humano (variación en la tasa de mutación entre sitios, composición desigual de bases y mayor proporción de transiciones respecto a las transversiones). Asimismo, dentro de estos análisis se utilizan diferentes métodos computacionales para encontrar árboles óptimos. Entre estos tenemos el método de **Quartet Puzzling** (Strimmer y Vonhaeseler, 1996). Este algoritmo de *Quartet Puzzling* es un proceso en tres etapas. Primero se evalúa la Máxima Verosimilitud de todos los árboles de 4 haplotipos (cuartetos) con base en un modelo de sustitución nucleotídica. El cuarteto se utiliza como punto de partida para ir añadiendo los otros haplotipos. La evaluación de la rama a la que debe adicionarse el nuevo haplotipo se basa en la Máxima Verosimilitud de los cuartetos que incluyen al nuevo y tres de los haplotipos del cuarteto inicial. Este proceso se repite hasta que se construye un árbol con todos los haplotipos (*puzzling step*). El proceso de generar árboles (*puzzling step*) se repite un número determinado de veces (10,000 en este estudio) y finalmente la topología definitiva se obtiene a partir del árbol consenso utilizando el principio de mayoría (*majority rule*). Sin embargo la representación final es un árbol de idéntica topología al anterior, pero con una longitud de las ramas calculada con base en los cambios nucleotídicos en cada rama considerando el modelo de sustitución nucleotídica propuesto. En principio, los valores del Quartet Puzzling tienen el mismo significado práctico que los valores de bootstrap, es decir, proporcionar un valor de probabilidad de soporte de las ramas.

Por otro lado, un método probabilístico reciente es el análisis de inferencia bayesiana aplicado a la reconstrucción de cladogramas (Mau *et al.*, 1999). En este método, las inferencias filogenéticas se basan en las probabilidades posteriores de

los árboles. El objetivo es buscar el mejor cladograma al cual se ajusten los datos (secuencias) que se tienen (Huelsenbeck, 2000). Para ello, se obtiene la probabilidad posterior de que, dados los datos, determinado nucleótido se localice en cierta posición en un cladograma con cierta longitud de ramas y con determinados nucleótidos como ancestros. Esta probabilidad se calcula con la verosimilitud de la filogenia (donde se utilizan los modelos de sustitución de nucleótidos) y la probabilidad a priori del número de árboles posibles. Dado que la probabilidad a posteriori no puede evaluarse analíticamente, se aproxima al realizar muestras de los cladogramas resultantes a través de las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (Yang y Rannala, 1997). El método de inferencia bayesiana ha probado ser muy útil y exacto en la reconstrucción de filogenias (Hall, 2005), prueba de ello es que su uso dentro de los análisis filogeográficos se empieza a extender.

Sin embargo, se debe considerar que existen varios problemas que se presentan en la reconstrucción filogenética intraespecífica: (a) baja divergencia; (b) nodos ancestrales existentes; (c) multifurcaciones; (d) recombinación; (e) dificultad de enraizamiento; y (f) tamaño grande de muestra (Crandall *et al.* 1994; Crandall y Templeton, 1996; Posada y Crandall, 2001).

#### **4.6.6. Redes haplotípicas**

Una red es un conjunto de nodos en donde, para al menos un par de nodos, existe más de un camino que los conecta. A nivel interpoblacional es preferible el uso de redes de haplotipos en lugar de árboles filogenéticos, ya que la inferencia cladística de relaciones filogenéticas requiere que las variantes genéticas no formen

linajes reticulados (Schaal *et al.*, 1998). Las genealogías trazan las relaciones evolutivas entre haplotipos o alelos que permiten reconstruir los procesos evolutivos con los principios de la coalescencia, además de que pueden considerar predicciones teóricas de la genética de poblaciones. Los métodos que utilizan estos principios tratan de modelar el pasado utilizando un proceso estocástico, esto es, la coalescencia, basado en el concepto de que los haplotipos en una población pueden ser rastreados hacia atrás en el tiempo hasta el punto en el que coalescen en un alelo ancestral común (Aguirre-Planter, 2007). Existen diversos métodos de redes, entre los cuales se encuentran el método de parsimonia estadística.

#### **4.6.7. Método de parsimonia estadística**

El algoritmo de parsimonia estadística comienza por estimar el número máximo de diferencias entre haplotipos como resultado de simples sustituciones (i.e. aquellas que no son resultado de múltiples sustituciones en un solo sitio) con un 95% de significancia estadística. Este número se denomina límite de parsimonia (o límite de conexión de parsimonia). Después de esto, se conectan los haplotipos que difieren por un cambio mutacional, posteriormente los que se diferencian por dos cambios mutacionales, después por tres cambios, y así sucesivamente hasta que todos los haplotipos se encuentran incluidos en una sola red o hasta que se llega al límite de parsimonia.

#### **4.6.8. Análisis filogeográficos**

La simple sobreposición de los árboles de haplotipos sobre la distribución geográfica de las poblaciones es una forma fácil y directa de tener una primera aproximación a los patrones filogeográficos que presenta nuestro sistema de estudio. Sin embargo, ello no constituye una estimación formal de las hipótesis filogeográficas posibles. Por ello, recientemente se han desarrollado métodos, como el análisis de clados anidados, para examinar el efecto de los patrones históricos de migración y dispersión sobre la distribución de genes, y que integran la información genealógica y de distribución para hacer inferencias sobre los patrones históricos de flujo génico (Templeton *et al.*, 1995; Avise, 2000).

##### **4.6.8.1. Análisis de clados anidados**

Los análisis de clados anidados (NCA, por sus siglas en inglés) son un método para estudiar la Filogeografía de especies y poblaciones, ya que permite obtener información de procesos históricos, como estimaciones más cercanas y más realistas de flujo génico, deriva génica o expansión, además de ayudar a estimar parámetros más complejos y modelos reales de estructura poblacional en un contexto geográfico (Templeton *et al.*, 1992). Este método ha sido ampliamente usado para inferir la historia poblacional en vertebrados (Lloyd, 2003; Van Den Bussche *et al.*, 2003; Bowie *et al.*, 2004), invertebrados (Gómez-Zurita *et al.*, 2000; Mardulyn, 2001; Hurwood y Hughes, 2001), plantas (Olsen, 2002) y hongos (Printzen *et al.*, 2003).

Estos análisis permiten hacer un análisis estadístico objetivo con el que se puede evaluar la hipótesis nula de que los haplotipos de los clados se distribuyen

geográficamente al azar (e.g. no asociación entre la variación haplotípica y la geográfica); permiten detectar y probar estadísticamente los mecanismos evolutivos responsables de la distribución espacial de los patrones de variación genética observada; e interpretan los patrones significativos utilizando criterios explícitos, con lo que es posible evaluar si el muestreo es adecuado para detectar una asociación significativa entre los clados y la geografía, y si es adecuado además para interpretar biológicamente dicha asociación (Vázquez-Domínguez, 2007).

Los procesos básicos que explicarían estas asociaciones (detectados por este análisis) son los siguientes: a) aislamiento por distancia, debido a flujo génico restringido, b) fragmentación histórica, y c) expansión del área de distribución geográfica de las poblaciones, que incluye eventos de colonización a distancia. Cuando la hipótesis nula no se rechaza, se interpreta que el esquema de muestreo es inadecuado para detectar estructuración geográfica o que las poblaciones observadas son panmícticas a lo largo de toda el área muestreada (Templeton *et al.*, 1995; Templeton, 1998).

Los análisis de clados anidados se realizan siguiendo tres pasos sucesivos. Primero, en el análisis se resumen las relaciones haplotípicas dadas en una red haplotípica, obtenida mediante parsimonia, para definir jerárquicamente una red de clados anidados usando una serie de reglas explícitas de anidamiento (Templeton *et al.*, 1987; Templeton *et al.*, 1992). Cada agrupamiento de haplotipos o grupo de haplotipos es llamado “clado”. Los haplotipos, que son las unidades más bajas de análisis, son anidadas juntas dentro de subseries mutacionalmente cercanas llamadas clados de un-paso. Los clados de un-paso a su vez se anidan dentro de

clados de dos-pasos, y así sucesivamente hasta que se alcance un nivel de anidamiento tal que el próximo nivel superior de anidamiento resulte en un simple clado que abarque la red original y completa de haplotipos (Templeton *et al.*, 1995).

Segundo, los NCA usan este anidamiento para obtener información tanto espacial como temporal sobre la distribución de haplotipos. Para ello se calculan cuatro medidas de la distancia:

- $D_c$  mide el intervalo geográfico de un clado dado, i.e. la distancia promedio de cada miembro de un clado de haplotipos a partir de su centro geográfico.
- $D_n$  cuantifica qué tan alejado se encuentra un haplotipo o clado de los haplotipos o clados con los cuales se encuentra anidado dentro de un clado de mayor nivel.
- $D_n I-T$  y  $D_c I-T$  son las distancias interior-punta, es decir, es la distancia promedio de los clados interiores (o haplotipos) menos la distancia promedio de los clados punta al centro geográfico del clado, o sea, mide el contraste en la distribución geográfica de clados más viejos y más jóvenes (y haplotipos).

Tercero, los NCA interpretan el patrón de las medidas de distancia de clados significativamente grandes o pequeñas para cualquier clado dado, para inferir el proceso histórico. La interpretación de diversos patrones se basa en la información temporal contenida en el anidamiento jerárquico. Los clados anidados de alto nivel tienden a ser más viejos que los clados de un nivel inferior. Además, la teoría de coalescencia predice que los clados de los extremos del árbol son probablemente más jóvenes que los clados interiores en donde los extremos están conectados (Castelloe y Templeton, 1994).

#### 4.6.8.2. Crítica al NCA

Hasta Agosto del 2007 había más de 1600 citas de los trabajos originales de los NCA, y un 20% de los estudios de filogeografía usaban este método (Petit, 2008). Sin embargo, algunos autores han criticado este método debido a que las inferencias obtenidas fueron deficientes para diferentes escenarios históricos específicos o eventos demográficos (e.g. Alexandrino *et al.*, 2002; Paulo *et al.*, 2002; Masta *et al.*, 2003). Sin embargo, una crítica más seria está enfocada a la implementación práctica de las pruebas permutacionales usadas para evaluar los datos (Petit y Grivet, 2002), ya que contrario a lo que se acostumbra cuando se prueba la existencia de una estructura genética espacial por permutación, éste análisis no establece una reorganización a nivel de poblaciones sino que lo efectúa a nivel de individuos. Como consecuencia, los procesos que pueden afectar las frecuencias haplotípicas locales, como los cuellos de botella (Johnson *et al.*, 2007) están siendo confundidos con procesos históricos que han determinado la estructura genética, incrementando el riesgo de falsos positivos. Al menos tres independientes análisis (Knowles y Maddison, 2002; Petit y Grivet, 2002; Panchal y Beaumont, 2007) han encontrado que los NCA se han equivocado en más del 70% de los casos, principalmente en las inferencias de flujo genético restringido con aislamiento con distancia y en la expansión del intervalo geográfico. Templeton (2008) ha demostrado que dichos porcentajes son mucho menores cuando se evalúan casos reales; también ha evaluado el uso del NCA con multilocus y otra propuesta de análisis conocida como método Computacional de Aproximación Bayesiana (ABC por sus siglas en inglés) para probar hipótesis filogeográficas, resaltando la ventaja de

usar ambos métodos (Templeton, 2009).

#### **4.6.8.3. Historia demográfica**

Puesto que el crecimiento poblacional a menudo coincide con la expansión del intervalo geográfico de una especie, las estimaciones de la historia demográfica reciente pueden ser utilizadas para probar hipótesis sobre la historia poblacional inferida por los NCA (Bowie *et al.*, 2004; Morando *et al.*, 2004). Las distribuciones “mismatch” (Rogers y Harpending, 1992) y las pruebas de la neutralidad selectiva se utilizan para identificar patrones de historia demográfica de poblaciones simples y probar inferencias hechas por los NCA.

#### **4.6.8.4. Distribución mismatch**

Las distribuciones “mismatch” calculan la distribución de las distancias observadas entre los pares de haplotipos. Se espera que esta distribución sea multimodal en poblaciones bajo equilibrio demográfico, mientras que se espera que las poblaciones que han experimentado recientemente expansión demográfica demuestren una distribución unimodal (Rogers y Harpending, 1992; Harpending, 1994; Rogers, 1995). Las distribuciones de “mismatch” han sido usadas frecuentemente para inferir eventos históricos de expansión poblacional basados en crecimientos recientes poblacionales (Brant y Ortí, 2003; Alvarez-Castañeda y Patton, 2004; Goropashnaya *et al.*, 2004; Whorley *et al.*, 2004). También han sido usados para identificar contactos secundarios (Bowie *et al.*, 2004).

#### 4.6.8.5. Theta (S)

Dado que  $\theta = 2Mu$  (donde  $M = N_{ef}$  para información mitocondrial), este índice se convierte en un estimador indirecto del tamaño efectivo poblacional. Para secuencias mitocondriales suele usarse el parámetro  $\theta_s$  (Watterson, 1975), asumiendo que las mutaciones son selectivamente neutras y que no existe recombinación; esto es:

$$\theta_s = \frac{S}{a_1},$$

donde  $S$  es la proporción de sitios segregados de una muestra de  $n$  secuencias de ADN y  $a_1$  es:

$$a_1 = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{i}.$$

#### 4.6.8.6. Prueba de Tajima

Está basada en la detección de las diferencias entre los estimadores  $\pi$  (diversidad nucleotídica, número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar, Nei y Li, 1979) y  $\theta$  ( $\theta = 4N_e\mu$ , Kimura, 1968) con la determinación de la  $D$  de Tajima, calculada a partir de la siguiente expresión:

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{\text{Var}(\pi - \theta)}}$$

Si  $D$  resulta negativa quiere decir que  $\theta$  posee un valor mayor que  $\pi$ , lo que indica la presencia de mutaciones deletéreas y por lo tanto una expansión poblacional. En cambio, si  $D$  resulta positiva quiere decir que  $\pi$  tiene un mayor valor

que  $D$ , indicando la posibilidad de un cuello de botella poblacional. Si  $D$  es igual a cero quiere decir que no existe diferencia alguna entre ambos estimadores y nos encontramos bajo equilibrio neutral (Tajima, 1983, 1989).

#### **4.6.9. Análisis de bootstrap paramétrico**

##### **4.6.9.1. Estadístico $S$ de Slatkin y Maddison**

El estadístico  $S$  es un análisis de bootstrap paramétrico, en donde un modelo explícito se utiliza para generar una distribución de valores esperados de una prueba estadística. Si el valor observado de esta prueba estadística queda fuera del intervalo de confianza de 95% de la distribución simulada, el modelo es rechazado. En este caso, la prueba estadística,  $S$ , es el número mínimo de eventos requeridos para explicar la subdivisión poblacional (Slatkin y Maddison, 1989).

## 5. ANTECEDENTES

### 5.1. Familia Mormoopidae

Mormoopidae es una pequeña familia de murciélagos microquirópteros que actualmente incluyen dos géneros (*Mormoops* y *Pteronotus*) y ocho especies existentes (Tabla 2); dos especies adicionales son conocidas solamente de fósiles del Cuaternario (Smith, 1972; Silva-Taboada, 1974; Koopman, 1993). Comúnmente conocidos como murciélagos rostro de fantasma o murciélagos de espalda desnuda, los miembros de esta familia se caracterizan por presentar el labio superior no dividido y el labio inferior con pliegues muy marcados o con excrecencias (“verrugas”) (Adams, 1989). Los mormoópidos son de tamaño pequeño a mediano (e.g., la longitud del antebrazo es de 35-66 mm), y se alimentan exclusivamente de insectos. Los miembros de la familia presentan un intervalo de distribución del suroeste de los Estados Unidos al sureste de Brasil, y también ocurren en las Grandes Antillas, las Antillas menores y en Trinidad y Tobago (Koopman, 1984). Viven en una amplia variedad de hábitats, que van desde las selvas tropicales húmedas hasta selvas semiáridas y selvas áridas subtropicales y matorrales (Emmons, 1997).

### 5.2. Clasificación

La historia taxonómica de la familia Mormoopidae comienza con Leach (1821a, 1821b), quien describe a *Mormoops* y *Aello*. *Pteronotus* y *Chilonycteris* fueron subsecuentemente descritos por Gray (1838, 1839). Smith (1972) reconoció

dos géneros, tres subgéneros, y ocho especies existentes dentro de la familia Mormoopidae. El género Mormoops incluye dos especies, *M. blainvillii* y *M. megalophylla*. Dividió a *Pteronotus* en tres subgéneros: *Phyllodia* (incluye a *Pteronotus parnellii*), *Chilonycteris* (incluye *Pteronotus macleayii*, *P. quadridens*, y *P. personatus*), y *Pteronotus* (incluyendo *P. davyi* y *P. gymnonotus*). Adicionalmente, dos especies de mormoópidos fósiles, *Mormoops magna* y *Pteronotus pristinus*, fueron descritas de depósitos de cuevas cubanas por Silva-Taboada (1974).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de la familia Mormoopidae de acuerdo a Smith (1972).

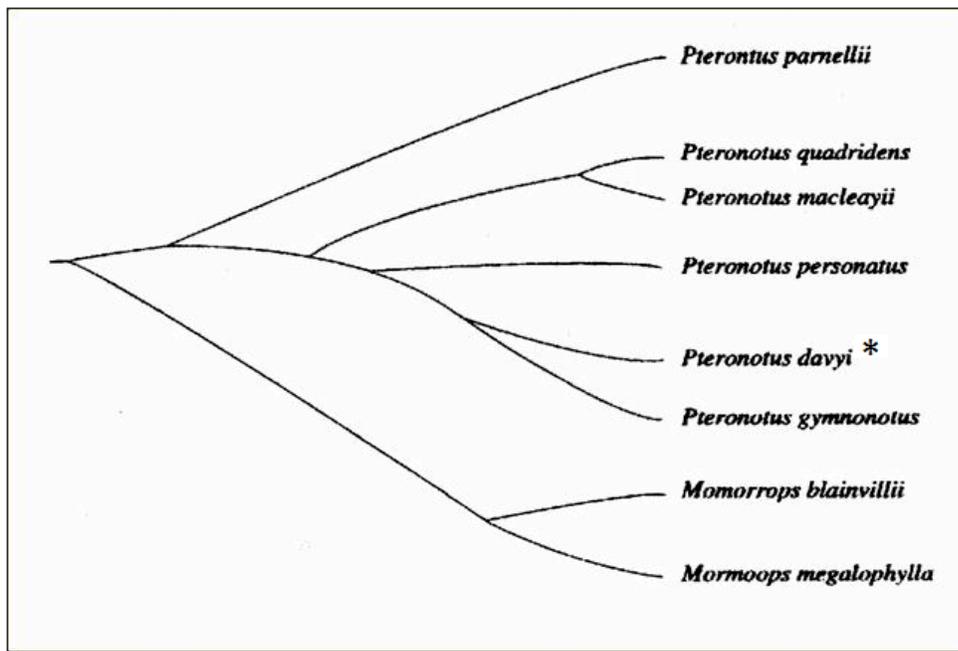
---

Clase: Mammalia  
 Infraclasse: Eutheria  
 Orden: Chiroptera  
 Suborden: Microchiroptera  
 Familia: Mormoopidae  
 Género: *Mormoops*  
 Especies: *Mormoops blainvillii*  
*M. megalophylla*  
 Género: *Pteronotus*  
 Subgénero: Phyllodia  
 Especie: *Pteronotus parnellii*  
 Subgénero: Chilonycteris  
 Especies: *Pteronotus macleayii*  
*P. personatus*  
*P. quadridens*  
 Subgénero: Chilonycteris  
 Especies: *Pteronotus davyi*  
*P. gymnonotus*

---

### 5.3. Relaciones filogenéticas

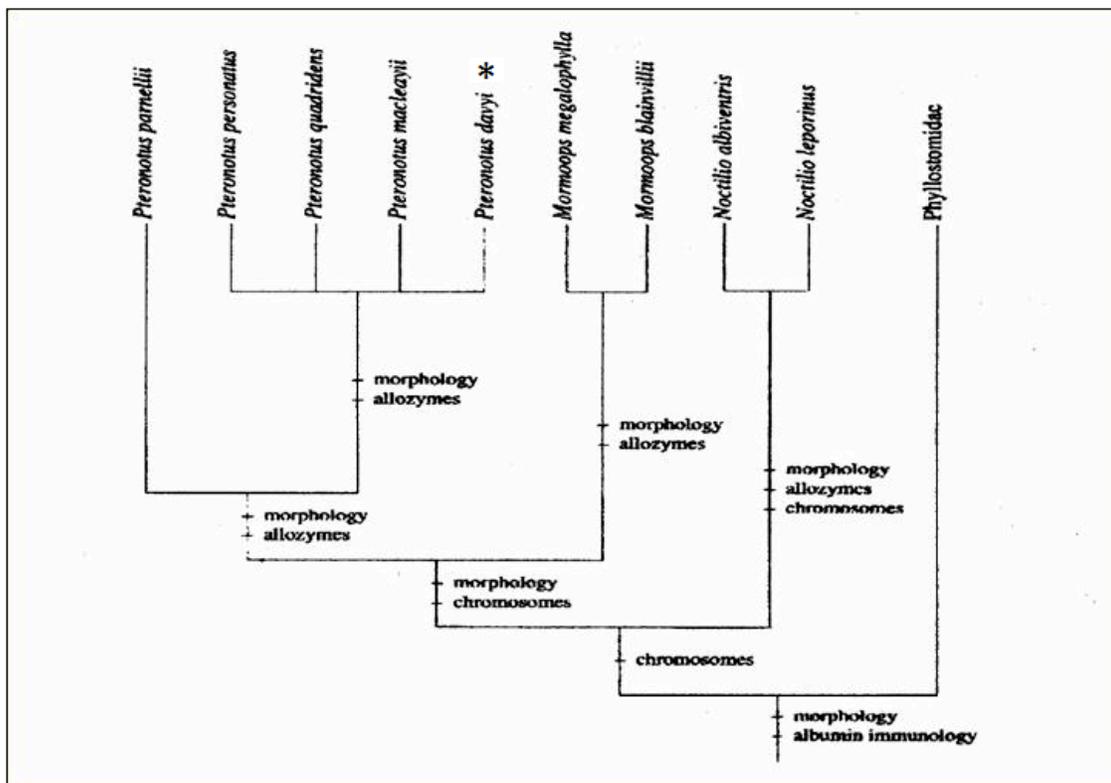
Smith (1972) realizó el primer árbol filogenético de la familia Mormoopidae (Fig. 3), basado en un contexto pre-cladístico usando métodos de taxonomía numérica, a partir de 22 medidas de cráneo y 20 caracteres cualitativos multiestado de la morfología de la dentadura y de la morfología externa. Este árbol fenético asume la monofilia de la familia.



**Figura 3.** Árbol filogenético de las especies de mormoópidos propuesto por Smith (1972).

Sites *et al.* (1981) encontraron que todas las especies del género *Pteronotus* presentan la banda G, cariotipo no presentado por el género *Mormoops*; ésta característica apoya la monofilia del género. Arnold *et al.* (1982) revisaron datos morfológicos, inmunológicos, aloenzimáticos y cariotípicos disponibles para observar las relaciones de los mormoópidos. Estos autores concluyeron su trabajo

presentando un cladograma compuesto (árbol consenso) que fue construido usando principios de congruencia taxonómica (Fig. 4). Dicho árbol indicó que las relaciones dentro de la familia Mormoopidae resultaron compatibles con el árbol de Smith (1972). Sin embargo el árbol de Arnold *et al.* (1982), no incluyó a todas las especies de mormoópidos (*Pteronotus gymnonotus* fue excluido), y las relaciones entre las especies del género *Pteronotus* fueron pobremente resueltas.



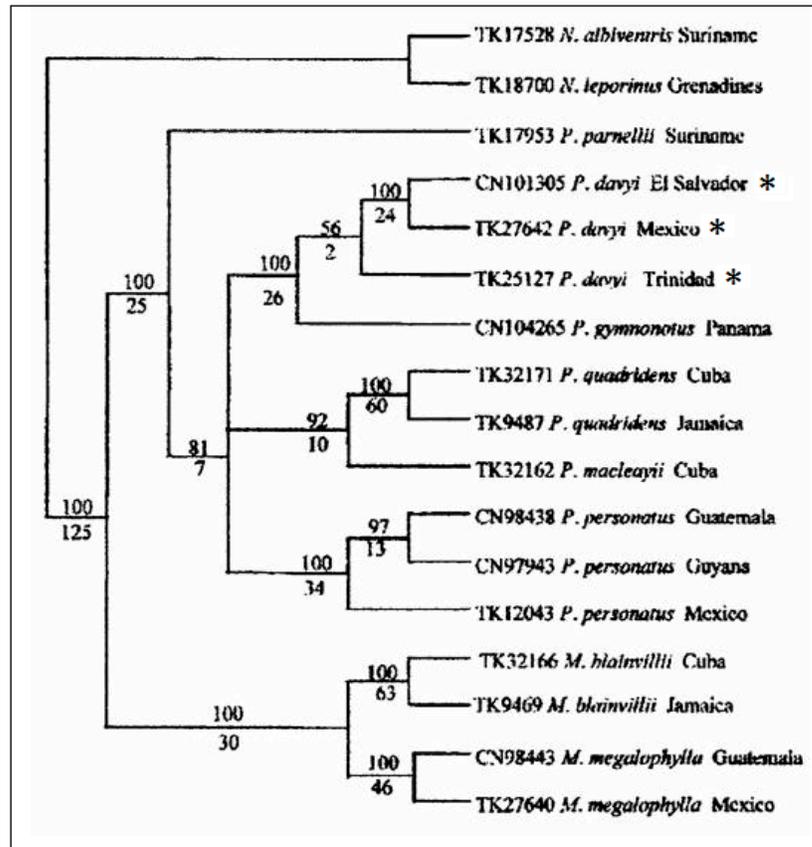
**Figura 4.** “Cladograma compuesto” de las relaciones entre especies noctiliónidas, propuesto por Arnold *et al.* (1982).

Más recientemente, Simmons y Conway (2001) examinaron 209 caracteres morfológicos (cráneo, dentición, cerebro, pelaje, tracto digestivo, entre otros) para

evaluar las relaciones entre todas las especies de los géneros *Mormoops* y *Pteronotus*. Sus análisis apoyan fuertemente la monofilia de la familia Mormoopidae, pero provee aportes limitados para los clados dentro del género *Pteronotus*.

En los últimos años los trabajos con ADNmt han sido cada vez más frecuentes. Van Den Bussche y Hooper (2000) analizaron los datos de secuencias de ADN de tres genes mitocondriales (12SARNr, ARNt<sub>val</sub> y 16SARNr) de 11 noctiliónidos, y 17 especies se utilizaron como grupos externos. Los resultados de un análisis de Parsimonia apoyaron la monofilia de la superfamilia Noctilionoidea y la monofilia de cada familia dentro de este grupo. La familia Mormoopidae representada por *Mormoops megalophylla* y *Pteronotus parnellii* fue posicionada como monofilética en un 71-88% de replicaciones usando un bootstrap.

Lewis-Oritt *et al.* (2001) examinaron 1140 pb del gen mitocondrial citocromo b y 1398 pb del gen nuclear RAG2 para investigar la sistemática de las ocho especies de murciélagos dentro de la familia Mormoopidae, empleando para ello análisis de Máxima Parsimonia (Fig. 5). Los resultados indican que dentro del género *Pteronotus* existen cuatro subgéneros: *Phyllodia*, *Chilonycteris*, *Pteronotus* y un subgénero no descrito. Por la presencia de este último subgénero, los resultados de este estudio difieren de Smith (1972). Además, por la magnitud de las distancias genéticas del citocromo b para *P. davyi* (0.44-8.01%) y para *P. parnellii* (0.35-12.20%), los autores sugieren la posibilidad de la existencia de dos especies biológicas dentro de cada uno de los taxa.



**Figura 5.** Cladograma producido a partir de una búsqueda heurística para inferir las relaciones filogenéticas de las especies de *Pteronotus* y *Mormoops*, empleando los marcadores RAG2 y citocromo b, y usando a *Noctilio* como grupo externo (tomado de Lewis-Oritt, 2001).

#### 5.4. Origen

Fósiles de *Pteronotus davyi* que datan del Pleistoceno (entre 20,000 y 290,000 años) han sido encontrados en Bahía al este de Brasil (Czaplewski y Cartelle, 1998), sugiriendo que el intervalo geográfico de esta especie fue mucho más largo. Los fósiles de *P. davyi* del Cuaternario (entre 5,000 y 20,000 años) han sido encontrados

en Tobago, donde esta especie actualmente está extinta (Eshelman y Morgan, 1985).

De acuerdo a Smith (1972), los mormoópidos ancestrales se dispersaron del norte de Sudamérica o sur de Centro América a México/Centro América. De ahí, los ancestros de los mormoópidos se extendieron a las “West Indies” a través de Cuba vía Yucatán, o Jamaica vía Honduras. La dispersión a través de estas rutas puede explicar la distribución de los linajes simples que comprenden a *Pteronotus quadridens* y *macleayii* (antiguo), las especies de *Mormoops blainvillei* (menos antigua), y las poblaciones caribeñas de *Pteronotus parnellii* (más recientes). Czaplewski y Morgan (2003), coincidieron en las rutas de dispersión al Caribe, pero proponen que los mormoópidos colonizaron las islas caribeñas en primer lugar durante su historia evolutiva. De México/Centro América, los mormoópidos se expandieron a Sudamérica recientemente, después de cerrarse el Istmo de Panamá. Recientemente, Dávalos (2006) evaluó las hipótesis biogeográficas de Smith (1972) y de Czaplewski y Morgan (2003) acerca de la diversificación de la familia Mormoopidae, empleando nuevas y previas secuencias nucleotídicas de los genes mitocondriales 12S, ARNt<sup>val</sup>, 16S y citocromo b, y del gen nuclear Rag2, y analizándolas por medio de métodos Bayesianos, de Máxima Parsimonia, de Máxima Verosimilitud y análisis de dispersión-vicarianza. Ellos proponen que las divergencias entre las poblaciones de las Antillas y del centro de América son mayores a aquellas entre México/América Central y Sudamérica, lo cual sugiere que los mormoópidos se diversificaron en el norte de los neotrópicos antes de entrar a Sudamérica. Sugirieron que un origen de los mormoópidos en el norte neotropical resulta congruente, por un

lado, con el registro fósil del Terciario y, por otro lado, con hipótesis filogenéticas recientes de la familia hermana de los mormoópidos, la Phyllostomidae.

### 5.5. Análisis filogeográficos

Pocos estudios filogeográficos se ha elaborado para mamíferos nativos de México y en especial para el orden Chiroptera (Vázquez-Domínguez y Vega, 2006). A continuación se presenta una tabla con estudios moleculares realizados con murciélagos y mamíferos.

**Tabla 3.-** Estudios moleculares de murciélagos y mamíferos donde se utilizó la región control del ADNmt. Se menciona la especie (entre paréntesis la familia), el número de individuos (n), número de de haplotipos (Hapl), porcentaje de diversidad nucleotídica promedio ( $\pi_{media}$  %), diversidad haplotípica (h) y el índice de fijación ( $F_{ST}$ ). Con un asterisco se indica las especies cuyo muestreo abarcó México. Se señala la cita bibliográfica.

Espece	n	Hapl	Pb	$\pi_{media}$ (%)	h	$F_{ST}$	Cita
<b>MURCIÉLAGOS</b>							
<i>Leptonycteris curasosae*</i> (Phyllostomidae)	53	35	297	1.59	---	---	Wilkinson y Fleming (1996)
<i>Myotis myotis</i> (Vespertilionidae)	480	85	307	0.62	0.491	0.384	Ruedi y Castella (2003)
<i>Tadarida brasiliensis*</i>	94	86	474	4.5	0.998	-0.0018	Russell <i>et al.</i> (2005)

<i>Rhinonictis aurantia</i> (Hipposideridae)	22	19	460	3.37	---	0.53	Armstrong (2006)
<i>Nyctalus azoreum</i> (Vespertilionidae)	159	15	396	0.30	0.67	0.08- 0.16	Salgueiro <i>et al.</i> (2007)
<i>Vespertilio murinus</i> (Vespertilionidae)	247	52	341	0.77	---	0.007	Safi (2007)
<i>Myotis myotis</i> (Vespertilionidae)	115	18	307	0.65	0.47	0.47	Ruedi <i>et al.</i> (2008)
<b>MAMÍFEROS</b>							
<i>Elephas maximus</i> (Elephantidae)	118	17	630	1.7	0.871	---	Fernando <i>et al.</i> (2000)
<i>Panthera onca</i> * (Felidae)	37	22	715	0.771	0.939	0.342	Eizirik <i>et al.</i> (2001)
<i>Lepus flavigularis</i> * (Leporidae)	42		459	0.08	0.33	---	Rico <i>et al.</i> (2008)
<i>Spermophilus perotensis</i> * (Sciuridae)	78	12	1145	0.19	0.779	0.505	Ochoa (2008)

## 5.6. Especie de estudio: *Pteronotus davyi*

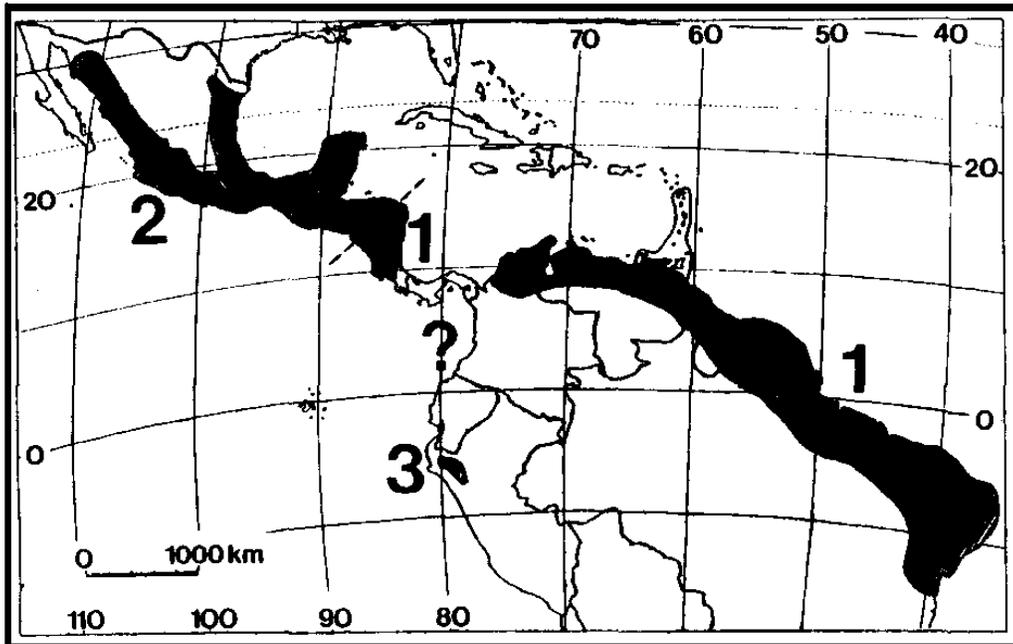


**Figura 6.** Imagen de *Pteronotus davyi*. Foto tomada por Ricardo López-Wilchis en la localidad de los Ortices, Colima, 2004.

### 5.6.1. Taxonomía y distribución

*Pteronotus davyi* (Fig. 6) fue descrita por Gray (1838) y actualmente se reconocen tres subespecies: *P. d. fulvus*, *P. d. davyi* y *P. d. incae*. *P. d. fulvus* (encontrada en México desde Sonora, Tamaulipas y Nuevo León hasta Honduras) (Fig. 7), *P. d. davyi* (de Nicaragua a las costas de Venezuela y Trinidad, y del norte de las Antillas a la isla caribeña María Galante [excluyendo las islas Santa Lucía, San Vicente, Barbados y las Granadinas]) y *P. d. incae* (del noroeste de Perú a ambos lados de los andes) (Adams, 1989). La identificación de estas subespecies se basó en caracteres morfológicos y medidas morfométricas. De manera general, los

individuos de todas las poblaciones de México son los más pequeños, pero un progresivo incremento en el tamaño es notable hacia Centro América, con individuos más grandes en Sudamérica (*P. davyi incae*) (Smith, 1972).



**Figura 7.** Distribución de las tres subespecies de *Pteronotus davyi* de acuerdo a Hall (1981): 1. *P. d. fulvus*, 2. *P. d. davyi* y 3. *P. d. incae* (tomado de Adams, 1989). La línea señalada en Honduras divide a las especies 1 y 2.

### 5.6.2. Diagnosis

La especie más pequeña del grupo de los mormoópidos es *Pteronotus davyi*. Esta se distingue de otros mormoópidos de tamaño similar (*P. personatus*) por tener las membranas alares unidas sobre el dorso, dándole al murciélago una apariencia de poseer una espalda desnuda. Esta condición la comparten solamente con *P. gymnotus* de la cual se distingue, por un lado, por la escasa distribución de esta

última, y por otro lado, por la longitud del antebrazo, ya que para *P. davyi* es <50 mm y para *P. gymnonotus* es usualmente >50 mm (Herd, 1983; Adams, 1989).

Los sexos de *P. davyi* presentan poco dimorfismo en tamaño excepto en poblaciones del norte (Sonora) donde los machos son significativamente más grandes que las hembras. El uropatagio es grande, la cola es de aproximadamente 22 mm de longitud (18 a 25 mm). Intervalos de otras medidas (en mm) son: longitud total de 71 a 85; longitud de la pata, 9 a 12; longitud del antebrazo, 40.6 a 49.6; longitud de la oreja, 16 a 19; longitud condilobasal, 13.7 a 15.7; ancho zigomático, 8.3 a 9.5; ancho del rostro, 6.2 a 7.5 (Smith, 1972). El pelaje es denso y hay dos fases dominantes de coloración de esta especie: parda y rojiza (Matson y Patten, 1975).

### **5.6.3. Hábitat**

*Pteronotus davyi* ha sido capturado en sitios a 2300 m sobre el nivel del mar (Adams, 1989). Es abundante en selvas bajas caducifolias y es menos común en selvas altas perennifolias; se encuentra en grandes números en cuevas húmedas y profundas (Villa-Ramírez, 1967; Bateman y Vaughan, 1974). Las cuevas calientes y húmedas son los sitios preferidos para descansar, y las colonias pueden incluir generalmente de 400,000-800,000 murciélagos (Bateman y Vaughan, 1974; Bonaccorso *et al.*, 1992).

#### **5.6.4. Ecología**

*Pteronotus davyi* es un murciélago insectívoro, cuya dieta consiste de lepidópteros y dípteros (Howell y Burch, 1974; Adams, 1989), y las presas son capturadas durante el vuelo (Bateman y Vaughan, 1974).

#### **5.6.5. Reproducción**

Son monoestros estacionales, con copulación probable entre Enero y Marzo (Wilson, 1973). La gestación ocurre entre Marzo a Junio. La lactancia sucede en los meses de Julio-Agosto (López-Wilchis, com. pers.).

## 6. JUSTIFICACIÓN

Muchos organismos neotropicales tienen en la parte norte de México el límite de su distribución. En numerosas ocasiones el patrón de distribución de estas especies, como es el caso de *Pteronotus davyi*, el área consiste en dos estrechas franjas independientes que se extienden por las costas del pacífico (Sonora a Chiapas) y del golfo de México (Tamaulipas a Tabasco), de tal forma que confluyen en las tierras bajas del Istmo de Tehuantepec para penetrar hacia el sureste del país (Figura 7).

Este patrón de distribución actual, posiblemente ha sido determinado por los periodos glaciales e interglaciales del Pleistoceno, que han provocado sucesivas contracciones y expansiones en el área de distribución de *P. davyi*. A esto habría que añadir el efecto de los sistemas montañosos en zonas más cálidas al sur del istmo de Tehuantepec. Por tales razones, es posible que esta especie haya experimentado procesos de aislamiento y fragmentación así como de colonización de nuevos territorios, desde el Pleistoceno hasta nuestros días, lo cual debería estar reflejado en la estructura genética de sus poblaciones.

También es preciso mencionar que la distribución geográfica de los murciélagos está muy condicionada por la existencia de barreras geográficas que *a priori* parecen fácilmente salvables debido a su capacidad para volar, sin embargo se ha encontrado que esto es erróneo. En este sentido, el istmo de Tehuantepec podría funcionar como una barrera geográfica para las poblaciones de *P. davyi* como se ha comprobado para diversas especies de murciélagos, como por ejemplo, la

separación de las subespecies del murciélago bigotudo de Parnell (*Pteronotus parnellii mesoamericanus* y *P. p. mexicanus*) o del murciélago de cola peluda rojizo (*Lasiurus borealis teliotis* y *L. b. frantzii*) (Hall, 1981), así como de roedores de los géneros *Habromys* (Carleton *et al.*, 2002) y *Peromyscus* (Sullivan *et al.*, 1997; 2000).

Por otra parte, con el uso de técnicas moleculares se ha encontrado un número creciente de unidades taxonómicas no identificadas de murciélagos que han surgido como resultado de una escasa diferenciación morfológica entre poblaciones que han permanecido aisladas por periodos de tiempo prolongados debido a la utilización de diferentes refugios glaciales (Kiefer y Veith, 2001; Kiefer *et al.*, 2002; Mayer y von Helversen, 2001; Von Helversen *et al.*, 2001).

Por ello el objetivo del presente estudio está enfocado a analizar, utilizando los marcadores mitocondriales citocromo b y región control, por un lado los patrones filogeográficos del murciélago pequeño de espalda desnuda (*P. davyi*) en México, para identificar cómo los distintos eventos climáticos del Pleistoceno, o incluso anteriores, han afectado la historia evolutiva de la especie a lo largo de su patrón de distribución actual, determinando la estructura genética de las poblaciones, y por otro lado identificar la posible existencia de diferentes unidades taxonómicas. Está documentado que a partir de la región control se ha generado información sobre alta divergencia infraespecífica, por lo cual ha sido ampliamente utilizado para inferir la historia y/o la estructura poblacional de una amplia variedad de organismos (Vilà *et al.*, 1997; Mardulyn, 2001; McCracken *et al.*, 2001), incluyendo los mamíferos (Wilkinson y Fleming, 1996; Eizirik *et al.*, 1998; Petersen y Stewart, 2006).

Este trabajo forma parte de un proyecto a mediano plazo donde pretendemos estudiar la historia evolutiva de los murciélagos mormoópidos de nuestro país (e.g., *P. personatus*, *P. parnellii*) que presentan un patrón de distribución similar a la especie de estudio, con la finalidad de efectuar un estudio que permita observar los patrones filogeográficos y compararlos entre las diferentes especies (Filogeografía comparada), lo cual permitirá determinar la congruencia entre la historia evolutiva, demográfica y distribucional de los taxa estudiados contra la particular geología y ecología de una región y determinar la cronología de diversificación evolutiva.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1. Objetivo general

- Determinar los patrones filogeográficos responsables de la distribución de *Pteronotus davyi* en México, utilizando marcadores mitocondriales.

### 7.2. Objetivos específicos

- Efectuar un análisis exploratorio de los marcadores mitocondriales región control y citocromo b para determinar cuál permite dilucidar los patrones filogeográficos para *Pteronotus davyi* en México.
- Analizar la estructura genética de las poblaciones muestreadas.
- Inferir relaciones filogenéticas intra-específicas.
- Inferir los procesos evolutivos implicados (fragmentación, expansión del intervalo y/o flujo genético restringido).

- Probar dos modelos alternativos: (1) modelo de 1-refugio; (2) modelo de dos-refugios Pleistocénicos.
- Determinar implicaciones taxonómicas.
- Identificar y proponer unidades de conservación para *P. davyi* en México.

## 8. HIPÓTESIS

- **Si** el patrón de distribución de *Pteronotus davyi* ha sido afectado por fenómenos como las glaciaciones del Pleistoceno, **entonces** la especie migró hacia refugios pleistocénicos presentando aislamiento geográfico y fragmentación histórica, así como posterior expansión y colonización de nuevos territorios, lo cual debe estar reflejado en la estructura genética de sus poblaciones en México.

## 9. MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1. Trabajo de campo

Se recolectaron un total de 105 muestras de *Pteronotus davyi* de 18 localidades a lo largo de toda su distribución en México, las cuales fueron agrupadas en tres regiones: la región del pacífico (n = 45), la región del golfo (n = 29) y la región del sureste (n = 31) (Fig. 8).

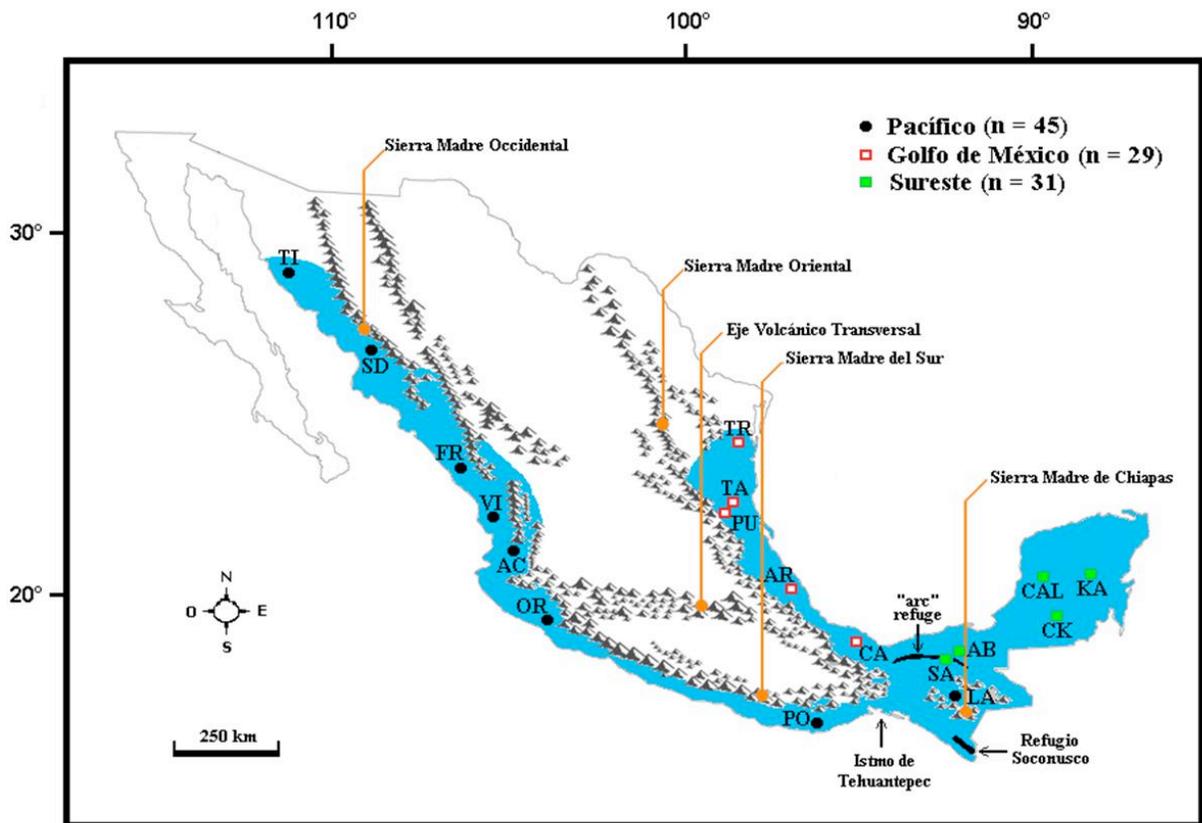
La identificación de esta especie en el campo se efectuó con ayuda de las claves de Medellín *et al.* (1997). La recolecta se llevó a cabo por medio de redes de arpa de aproximadamente 1.5m<sup>2</sup>, colocadas en la boca de cada una de las cuevas visitadas y activadas en la tarde-noche durante aproximadamente 2-3 horas. A los organismos se les tomaron biopsias de membrana alar de 3 mm de diámetro con un sacabocado (biopsy-punch). Las biopsias se guardaron en tubos Eppendorf previamente etiquetados y se conservaron en etanol al 70% siguiendo el método descrito por Worthington Wilmer y Barratt (1996). Se registró el peso y la longitud del antebrazo de cada uno de los organismos y posteriormente fueron liberados. Por último se transportaron al laboratorio de biología y ecología de mamíferos en el Departamento de Biología, en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

**Tabla 4.-** Nombre, localización y ubicación geográfica de las cuevas donde se recolectaron los individuos de *Pteronotus davyi*. Entre paréntesis se indica su abreviatura. Se indica el estado (EDO), las coordenadas geográficas (COORD), la

altitud (ALT), el tipo de vegetación (VEGET.), el tamaño de muestra(n) y la fecha de colecta (FECHA). Para los climas, BW = Seco desértico, A = húmedo tropical, BS = Seco estepario; para la vegetación, BE = bosque espinoso, BTP = bosque tropical perennifolio, BTC = bosque tropical caducifolio, BTS = bosque tropical subcaducifolio, MX = Matorral xerófilo.

LOCALIDAD	EDO.	COORD.	ALT.	CLIMA	VEGET.	N	FECHA
<b>REGIÓN DEL GOLFO</b>						45	
El Tigre (TI)	Son	29°34.527'N, 110°49.192'O	450	BW	BE	7	05-03- 2004
Santo Domingo (SD)	Son	27°02.649'N, 109°00.691'O	538	BW	BE	7	08-03- 2004
La Frontera (FR)	Sin	23°25.188'N, 105°54.615'O	562	BW	BE	7	11-03- 2004
Las Viejas (VI)	Nay	21°51.40'N, 105°08.81'O	224	BW	BTC	7	14-03- 2004
Amatlán de Cañas (AC)	Nay	20°48.462'N, 104°23.546'O	810	BW	BTC	5	17-03- 2004
Los Ortices (OR)	Col	19°04.81'N, 103°43.59'O	240	A	BTC	6	27-03- 2004
Pochutla (PO)	Oax	15°48.35' N, 96°29.00'O	195	A	BTC	1	?
Los Laguitos (LA)	Chis	16°49.31' N, 93°08.51' O	1046	A	BTC	5	?
<b>REGIÓN DEL GOLFO</b>						29	
Catemaco (CA)	Ver	18°27.710'N, 95°11.180'O	443	A	BTP	7	07-03- 2005
Arroyo del Bellaco (AR)	Ver	19°13.32'N, 96°38.34'O	341	A	BTC	7	01-06- 2002
El Pujal (PU)	SLP	21°51.606'N, 98°56.306'O	90	A	BTP	5	29-05- 2002
Taninul (TA)	SLP	21°56.11' N, 98°53.16'O	51	A	BTP	5	09-03- 2005
Los Troncones (TR)	Tam	23°46.20' N, 99°12.17'O	463	BS	MX	5	27-05- 2002
<b>REGIÓN DEL SURESTE</b>						31	

La Sardina (SA)	Tab	17°27.5'N, 92°46.4'O	42	A	BTP	7	05-06-2002
Agua Blanca (AB)	Tab	17°37.204'N, 92°28.349'O	21	A	BTP	5	05-03-2005
Calakmul (CK)	Cam	18°31.373'N, 89°49.422'O	202	A	BTP	7	21-02-2005
Kantemó (KA)	QRoo	19°55.846'N, 88°47.460'O	39	A	BTP	5	26-02-2005
Calcehtok (CAL)	Cam	19°59.424'N, 89°45.837'O	88	A	BTS	7	01-03-2005
<b>TOTAL</b>						<b>105</b>	



**Figura 8.** Ubicación de las 18 localidades en México donde se recolectaron individuos de *Pteronotus davyi*. En la tabla 4 se indica el nombre completo de las localidades. Con círculos negros se indican las localidades de la región del pacífico;

con cuadrados rojos se señalan las localidades de la región del golfo de México; con cuadrados verdes se indican las localidades de la región del sureste.

## **9.2. Trabajo de Laboratorio**

### **9.2.1. Extracción de ADN total**

Se siguieron dos estrategias metodológicas para efectuar la extracción de ADN total: a) usando el procedimiento de fenol-cloroformo (Anexo, sección 1), y b) siguiendo el procedimiento Dneasy™ Tissue Kit (QIAGEN) (Anexo sección 2). Cabe mencionar que previo a la extracción con cada una de estas metodologías y para eliminar los residuos de alcohol, el tejido se lavó con agua destilada y desionizada (15 min) a temperatura ambiente; se realizaron dos repeticiones de este lavado.

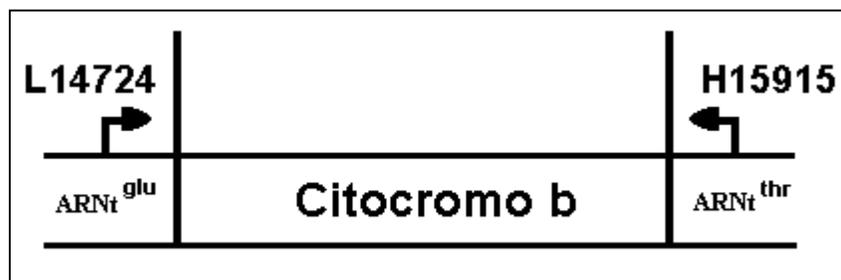
Para proceder a la visualización del ADN total se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, (Anexo, sección 3-4), y la visualización y captura de la imagen se efectuó usando un fotodocumentador Multi Genius (Anexo, sección 5).

### **9.2.2. Amplificación vía PCR**

#### **9.2.2.1. Citocromo b**

Las amplificaciones por PCR de un fragmento del gen citocromo b se efectuaron en un termociclador Tpersonal Biometra<sup>MR</sup>. Se empleó el Taq PCR Core Kit (QIAGEN). Se utilizaron cebadores universales y específicos para el gen citocromo b. Los cebadores universales utilizados fueron el L14724 (5'-TGA CTT GAA GAA CCA CCG TTG-3') y el H15915 (5'-AAC TGC AGT CAT CTC CGG TTT ACA AGA C-3') (Irwin *et al.*, 1991) para 1140 pares de bases. Las concentraciones y

condiciones de reacción para los cebadores universales fueron las siguientes. Los volúmenes de reacción de 25  $\mu$ l contenían aproximadamente 50 ng de ADN genómico, 10  $\mu$ M de cada cebador, 200  $\mu$ M de deoxidonucleotidos trifosfatos, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (QIAGEN). Las temperaturas de los ciclos de PCR fueron: dos minutos de desnaturalización a 94°C, seguido por 35 ciclos a 94° 60s, 50° 45s, 72° 90s; y una extensión final a 72° 4min.



**Figura 9.** Esquema general del citocromo b, donde se indica la región amplificada para *P. davyi* utilizando los cebadores L14724 y H15915.

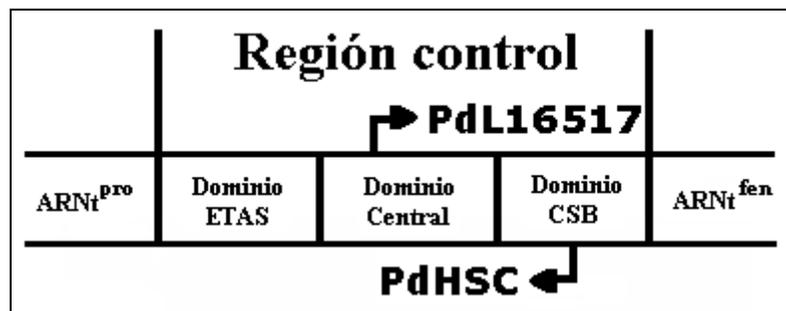
#### 9.2.2.2. Diseño de cebadores para la región control

Debido a la ausencia de información, fue necesario efectuar el diseño de cebadores para la región control. Se realizó un Blast (Basic Local Alignment Search Tool, por sus siglas en inglés) (Altschul *et al.*, 1990) entre los cebadores diseñados para las musarañas *Crocidura russula* y *Sorex araneus*, L16517 (5'-CAT CTG GTT CTT ACT TCA GG-3') y HSC (5' TTG TTT TAG GGG TTT GGC AAG A-3') (Fumagalli *et al.*, 1996), y las secuencias (con cierta contaminación) obtenidas a partir de los cebadores H637 (5'-AGGACCAAACCTTTGTGTTTATG-3') (Oshida *et*

*al.*, 2001) y PdPro1 (5'CCCCACCCTCAACACCCCAAAGC-3); éste último diseñado a partir del programa Web Primer (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>). Dados los resultados de este alineamiento fue necesario modificar únicamente el cebador HSC (5'-TGT TTT AGG GGT TTG GCA G-3).

### 9.2.2.3. Región control

Las amplificaciones por PCR de un fragmento de la región control (región hipervariable HVII) se efectuaron en un termociclador Tpersonal Biometra<sup>MR</sup>. Para ello se utilizó el Taq PCR Core Kit (QIAGEN). Se emplearon los cebadores L16517 y HSC (modificado para este trabajo, ver sección anterior) diseñados por Fumagalli *et al.* (1996) para amplificar 700 pares de bases aproximadamente. Se usaron las siguientes concentraciones y condiciones de reacción para ambos cebadores. Los volúmenes de reacción de 25  $\mu$ l contenían aproximadamente 50 ng de ADN genómico, 10  $\mu$ M de cada cebador, 200  $\mu$ M de desoxinucleotidos trifosfato, 2 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2.5 unidades de Taq DNA polimerasa (QIAGEN). Las temperaturas de los ciclos de PCR fueron: un ciclo a 94° 45s; 35 ciclos a 94° 30s, 62° 30s, 72° 70s; y un ciclo final a 72° 4min.



**Figura 10.** Esquema general de la región control, donde se indica la región amplificada para *P. davyi* con los cebadores específicos PdL165176 y PdHSC.

Los productos amplificados, para ambos marcadores moleculares, se observaron mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%, siguiendo el protocolo descrito en el Anexo sección 3-4. La visualización y captura de la imagen se efectuó con un fotodocumentador Multi Genius (Anexo, sección 5). La cuantificación de la concentración de los productos amplificados se efectuó con el programa Gene Tools (V. 3.03.03), usando como referencia el marcador molecular de peso conocido 100 pb DNA (BIO-RAD<sup>MR</sup>).

### **9.2.3. Purificación y cuantificación de productos amplificados**

Para ambos marcadores, la purificación de los productos amplificados por PCR se realizó por medio del Kit QIAquick Spin (QIAGEN) (Anexo, sección 6). Los productos purificados también fueron sometidos a una electroforesis usando gel de agarosa al 1% y posteriormente se fotodocumentaron, bajo los protocolos mencionados en los Anexos sección 3-5. La cuantificación de la concentración de los productos purificados (en nanogramos) se determinó con el programa Gene Tools (V. 3.03.03), con base en el marcador molecular de peso conocido 100 pb DNA (BIO-RAD<sup>MR</sup>).

### **9.2.4. Obtención de secuencias nucleotídicas**

Aproximadamente 50 ng de los productos de PCR purificados fueron utilizados para las reacciones de secuenciación usando el Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems) (Anexo, sección 7). Las reacciones de secuenciación fueron purificadas utilizando columnas de sephadex<sup>MR</sup> G-50 (Anexo, sección 8). La secuenciación se efectuó en un secuenciador de ADN automático (Analizador Genético ABI 3100, Applied Biosystems, Foster City, California). Para este estudio, las muestras se secuenciaron en un solo sentido.

Una vez obtenidas las secuencias se revisó cuidadosamente cada una con su electroferograma utilizando el programa Sequence Navigator<sup>TM</sup> 1.0.1 (Applied Biosystems). Las secuencias que resultaron con ambigüedades se repitieron (Ortices Nos. 1, 2 y 3; Agua Blanca Nos. 389, 390 y 391; Tigre 14 y 15). Una vez que se tuvieron secuencias completamente limpias (sin ambigüedades), se compararon los electroferogramas y posteriormente se alinearon haciendo uso nuevamente del programa Sequence Navigator<sup>TM</sup> 1.0.1 (Applied Biosystems). Para verificar su autenticidad, las secuencias compiladas se sometieron a un análisis de BLAST estándar nucleótido-nucleótido (Altschul *et al.*, 1990) en la base de datos de GenBank.

### **9.3. Trabajo de Gabinete**

#### **9.3.1. Edición y alineamiento de secuencias**

Los electroferogramas de secuenciación se editaron en el programa Sequence Navigator<sup>TM</sup> 1.0.1 (Applied Biosystems), y se alinearon haciendo uso del algoritmo Clustal, empleando el mismo programa.

### 9.3.2. Análisis de estructura genética de poblaciones

Con el programa DNAsp versión 3.14 (Rozas y Rozas, 1999) se determinaron los siguientes estimadores de genética de poblaciones descriptiva: diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), diversidad haplotípica ( $h$ ) y el número de sitios polimórficos ( $s$ ), la theta de Watterson ( $\theta_s$ ), (para cada población y entre regiones geográficas).

Con el mismo programa se calculó el flujo génico de acuerdo a Hudson *et al.* (1992). Este método ha sido empleado para determinar el flujo génico de diversas especies de invertebrados (Tzeng *et al.*, 2004), peces (Wang *et al.*, 2007), murciélagos (Wilkinson y Fleming, 1996), entre otros, debido a que permite identificar aquellas pares de subpoblaciones con una mayor similitud o diferenciación entre sí, de acuerdo al modelo de islas (Hudson *et al.*, 1992).

Para determinar la estructura genética entre y dentro de las poblaciones, así como entre regiones geográficas se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) por medio del programa Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

### 9.3.3. Análisis de expansión del intervalo geográfico

El programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000) fue usado para probar la hipótesis acerca de la expansión del tamaño poblacional en la serie de datos de la región control. Se usó la distribución de desigualdad de pares de bases (mismatch distribution) que es la frecuencia observada de las diferencias entre pares de

haplotipos. El análisis se efectuó a tres niveles: 1) general, 2) a nivel regional, y 3) en los clados donde el análisis de clados anidados infirió la expansión poblacional, con la finalidad de probar dichas hipótesis (Rogers y Harpending, 1992; Slatkin y Hudson, 1991). En este análisis, la hipótesis nula de una población que ha sufrido una expansión rápida reciente produce una distribución unimodal, mientras que una distribución multimodal indica que la población se encuentra en estable equilibrio (Slatkin y Hudson, 1991). El ajuste entre la distribución observada y la esperada fue probada usando el índice de Raggedness (Harpending, 1994).

La evidencia de una población en expansión o selección también fue explorada usando la prueba D de Tajima (Tajima, 1989), usando el programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000). Debido a que el segmento estudiado de la región control del ADNmt aparece como selectivamente neutral, los valores estadísticamente significativos de D indican que las poblaciones no están en equilibrio como resultado de eventos demográficos del pasado, tales como expansión poblacional (valores negativos) o cuello de botella (valores positivos). Este estadístico fue calculado, al igual que los análisis de mismatch, en tres niveles: 1) general, 2) a nivel regional, y 3) en los clados donde el análisis de clados anidados infirió la expansión del intervalo geográfico.

La hipótesis de expansión poblacional también fue probada usando diferentes pruebas de neutralidad: F de Fu (Fu, 1997) y Fu y Li (F\* y D\*\_Fu y Li, 1993). Si la F de Fu (1997) es significativa pero la F\* y D\* de Fu y Li (1993) no lo son, entonces esto indica una historia de crecimiento poblacional. La expansión poblacional también fue probada usando la R<sub>2</sub> de Ramos-Onsins y Rozas (2002), y el coeficiente

de expansión (S/d) de von Haeseler *et al.* (1996) es decir, el cociente del número de sitios variables (S) con el número promedio de diferencias de pares de bases (d). Estas pruebas se realizaron con el programa DNAsp. El estadístico  $R_2$  (Ramos-Onsins y Rozas, 2002) está basado en las diferencias entre el número de simples mutaciones y el número promedio de diferencias nucleotídicas. Un crecimiento poblacional es indicado por un número alto de coeficiente de expansión, mientras que un bajo valor del coeficiente de expansión indica una estacionalidad poblacional (von Haeseler *et al.*, 1996). Estos estadísticos fueron calculados, en dos niveles: 1) general y 2) a nivel regional.

#### **9.3.4. Análisis filogenéticos**

Debido a que el marcador molecular citocromo b no resultó informativo para analizar la filogeografía de *Pteronotus davyi*, no se incluyó en los siguiente análisis.

Para la región control se obtuvieron cladogramas a partir del método de Máxima Verosimilitud (MV) (Felsenstein, 1973; 1981) en PAUP\* 4.0b10 (Swofford, 2002) usando una secuencia de la especie *Pteronotus parnellii* (número de acceso al GeneBank EU175854) de acuerdo a Lewis-Oritt *et al.* (2001). Se identificó el mejor modelo de evolución con el programa Modeltest 3.06 (Posada y Crandall 1998), empleando la información del criterio Akaike (AIC\_Akaike, 1974). La topología de MV fue obtenida por el método de Quartet Puzzling (10,000 pasos) (Strimmer y Vonhaeseler, 1996). La búsqueda de árboles por Quartet Puzzling estima los valores de soporte para cada rama interna. En principio, estos valores tienen el mismo significado práctico que los valores de bootstrap. Asimismo, también se llevaron a

cabo análisis Bayesianos para inferir las relaciones filogenéticas usando el modelo óptimo determinado con Modeltest. Para ello se empleó el programa MrBayes 3.0 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) utilizando los siguientes parámetros: Nst = 6, tasa = gamma, Ngen = 2,000,000, frecuencia = 100, cadenas = 5. Después de eliminar los primeros 2000 árboles como “*burn-in*”, se construyó un árbol consenso con las probabilidades bayesianas *a posteriori* para cada nodo.

Por otro lado, también se infirieron relaciones filogenéticas utilizando la misma metodología señalada anteriormente sin grupo externo (ver Anexo 3).

### **9.3.5. Asociación entre distancias genéticas vs. distancias geográficas**

En ausencia de barreras (geográficas, climáticas, etc.) para el flujo génico, se espera que los valores de las distancias genéticas aumenten con un incremento de las distancias geográficas dentro de la misma especie, éste fenómeno es referido como aislamiento por distancia (Wright, 1943). De acuerdo a esta perspectiva, utilizamos la Prueba de Mantel (Mantel, 1967) para determinar si la asociación entre las distancias genéticas y geográficas entre regiones geográficas es significativa. Ésta prueba usa un procedimiento de permutación de las matrices de ambas distancias, lo cual además permite visualizar si se presenta un rompimiento genético.

A partir de las distancias genéticas, calculadas de acuerdo al modelo de Tamura y Nei (1993), en el programa MEGA Versión 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) y de las distancias geográficas, calculadas por medio de un mapa geográfico de México de escala 1:3,500,000, se determinó la significancia de la asociación entre las distancias

genéticas y geográficas (2000 iteraciones), utilizando el programa Mantel V. 2.0 (Liedloff, 1999).

Para calcular la distancia entre los haplotipos se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica de Tamura y Nei (1993), que considera una tasa de mutación diferente entre las transiciones de purinas, las transiciones de pirimidinas y las transversiones (cambio de purina por pirimidina y viceversa). Elegimos este modelo debido a que en un infinito número de simulaciones se ha presentado que si el número de sustituciones nucleotídicas es bajo (<20%), la mayoría de los modelos de evolución presentarán distancias genéticas similares (Nei y Kumar 2000). Además de que es un modelo que se ha utilizado en estudios con taxa de mamíferos estrechamente relacionados (eg. Campbell *et al.*, 2004; Palma *et al.*, 2005). A partir de estas distancias también se exploró la filogenia de todos los individuos mediante el método de neighbor-joining (NJ) con el programa MEGA.

#### **9.3.6. Análisis filogeográficos de clados anidados**

Los análisis de clados anidados (Templeton, 1998, 2004; Templeton *et al.*, 1995) fueron aplicados a una serie de 105 secuencias de la región control de *Pteronotus davyi* de 18 localidades de la República Mexicana. El programa TCS Versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000) fue usado para construir una red haplotípica y para calcular el límite de parsimonia de la red usando la parsimonia estadística, método adecuado para la evaluación de la robustez de la construcción de árboles a partir de datos que contienen pocos sitios parsimoniosamente informativos (Clement *et al.*, 2000; Templeton *et al.*, 1992; Templeton y Sing, 1993). El TCS calcula la

probabilidad de qué pares de haplotipos están más relacionados entre sí dentro de todas las combinaciones de haplotipos posibles; posteriormente une a los haplotipos más similares en una red, hasta que sus probabilidades combinadas excedan el 95% (Templeton *et al.*, 1992).

El resultado de la red haplotípica fue entonces usada para construir una serie de clados anidados siguiendo el método de Templeton y Sing (1993) (ver sección 6.8.1 del marco teórico). El método confía en una estimación de límites de parsimonia para construir la red que conecta los haplotipos obtenidos (Templeton *et al.*, 1992).

Una vez establecida una red y una estrategia de anidamiento, se calcularon tres distancias: (1) distancia de clados ( $D_c$ ); (2) distancia de clados anidados ( $D_n$ ); y (3) distancia interior-punta. La obtención de los parámetros se efectuó usando el programa GeoDis Versión 2.4 (Posada *et al.*, 2000). Para interpretar los resultados, se empleó la clave de inferencia más reciente de Templeton (2004).

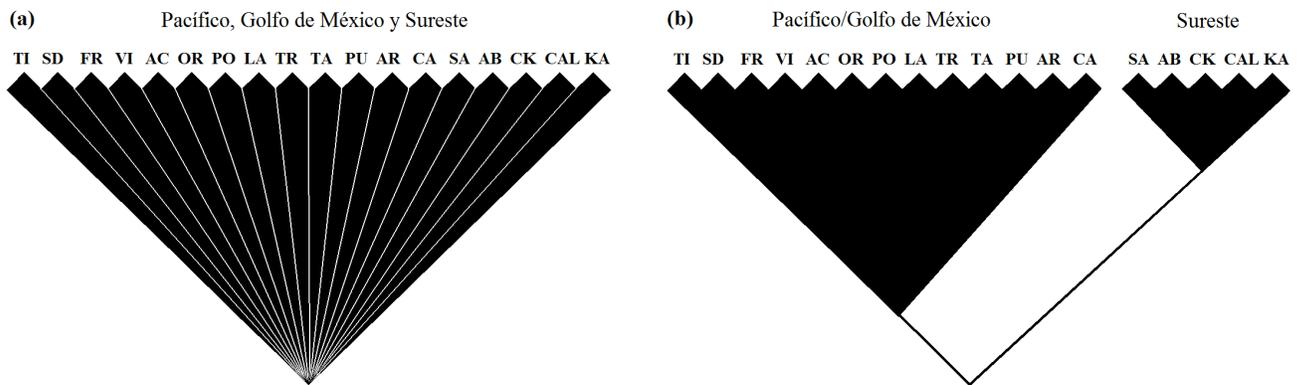
La raíz de la red intraespecífica se infirió con base en la teoría de coalescencia por medio del cálculo de las probabilidades de raíz usando el programa TCS Versión 1.21 (Clement *et al.*, 2000). Este método usa la topología de un árbol no enraizado (puntas vs. interiores) y la frecuencia de haplotipos (comunes vs. raros) para asignar los pesos de grupo externo o probabilidades haplotípicas (Castelloe y Templeton, 1994; Crandall *et al.*, 1994), de tal manera que identifica como haplotipo ancestral a aquel haplotipo con el mayor número de conexiones mutacionales y con la mayor frecuencia haplotípica.

### 9.3.7. Análisis de Bootstrap paramétrico

Usamos Mesquite 1.03 (Maddison y Maddison, 2007) para efectuar simulaciones coalescentes. La metodología de éstas simulaciones fue modificada de previos trabajos (Anthony *et al.*, 2007; Knowles y Maddison, 2002; Russell *et al.*, 2005; Spellman y Klicka, 2006). Condujimos simulaciones considerando dos hipótesis *a priori* de la estructura poblacional del Pleistoceno, utilizando el cladograma de MV (ver la sección de inferencia filogenética): 1) un escenario de un simple refugio, el cual que las regiones pacífico-golfo y sureste para las poblaciones de *P. davyi* estuvieron fundadas en un simple población ancestral (Fig. 11a); 2) un escenario de dos refugios en el que las poblaciones de *P. davyi* estuvieron en dos refugios Pleistocénicos en el Istmo de Tehuantepec propuesto por Toledo (1982) y Wendt (1989) (Fig. 11b).

El programa aislamiento con migración (IM\_Hey, 2006) se usó para estimar el tamaño efectivo poblacional, resolviendo  $N_e = 500$ . Para ello, se muestrearon  $2 \times 10^6$  pasos de la cadena primaria después de un *burn-in* de 100,000 pasos. Replicamos el análisis dos veces, y las replicaciones tuvieron resultados similares. Para *P. davyi*, una generación es igual a dos años (Smith, 1972). La longitud de las ramas se expresaron en función del tamaño efectivo poblacional ( $0.02N_e\_T1$ ,  $0.05N_e\_T2$ ,  $0.1N_e\_T3$ ,  $0.6N_e\_T4$ ) y del tiempo generacional  $\times 2 \times 10^3$ . Los valores extremos corresponden a los tiempos de divergencia que datan de la máxima glaciación del Wisconsin hace ~20,000 años (T1) a el periodo interglacial del medio Pleistoceno hace ~610,000 años (T4) (DeChaine y Martin, 2006). Se probaron dos tiempos arbitrarios para periodos intermedios (T2 ~50,000 y T3 ~ 100,000).

Se usó Mesquite para simular 10,000 genealogías coalescentes para cada hipótesis a ser probada. Se analizó cada hipótesis con el estadístico  $S$  de Slatkin y Maddison (1989). Este parámetro considera a las poblaciones como variables categóricas y mide el número mínimo de eventos requeridos para explicar la subdivisión poblacional. Se calculó el valor  $S$  observado de la genealogía dentro de los modelos de 1-refugio y dos-refugios y se comparó con la distribución de los valores de  $S$  de las simulaciones coalescentes para determinar si la genealogía observada podría ser generada bajo uno de los modelos dados. Si los valores  $S$  de los árboles de genes reconstruidos resultaron significativamente menores que los valores de los árboles de genes simulados ( $\alpha = 0.05$ ), el modelo nulo fue rechazado.



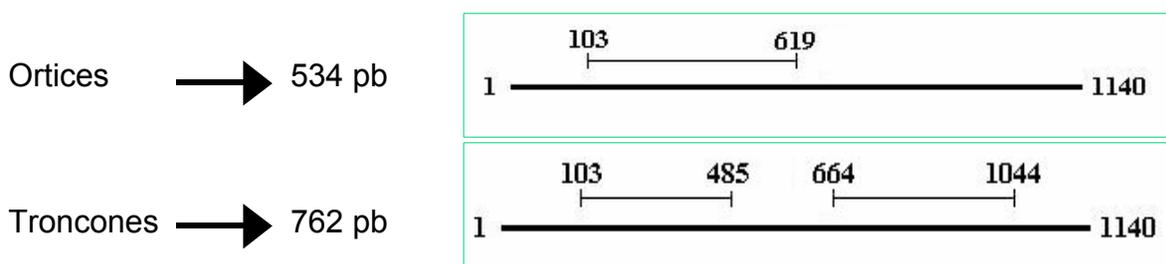
**Figura 11.-** Caracterización de los árboles poblacionales representando los diferentes modelos usados en las simulaciones coalescentes: (a) hipótesis de un refugio simple, y (b) hipótesis de dos refugios.

## 10. RESULTADOS

### 10.1. Citocromo b. Patrones generales de la variación de las secuencias

A pesar de que se obtuvieron productos de amplificación mayores a 1000 pb, las secuencias nucleotídicas no resultaron completamente limpias, lo cual probablemente se debió a una contaminación durante la extracción de ADN total vía fenol-cloroformo.

Para identificar las regiones secuenciadas, se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia completa del gen citocromo b de *Pteronotus davyi* (1140 pb) de la localidad “Refugio” (El Salvador), con número de acceso al GeneBank CN101305. Se obtuvieron 534 pb para un individuo de *P. davyi* perteneciente a los “Ortices” (Colima, México) (posiciones 103-619) y 762 pb para un individuo de “Troncones” (Tamaulipas, México) (posiciones 103-485, 664-1044). Al alinear ambas secuencias se obtuvo una homología en 382 pb, de las cuales solamente se presentaron 2 sustituciones nucleotídicas (Fig. 12).



**Figura 12.** Regiones secuenciadas del gen mitocondrial citocromo b para individuos de *Pteronotus davyi* de las poblaciones Ortices y Troncones, de acuerdo a la secuencia con número de acceso al GeneBank CN101305.

Al comparar las regiones secuenciadas del gen citocromo b de individuos de las localidades “Ortices” (Colima, México) vs. “Refugio” (El Salvador), y “Troncones” (Tamaulipas, México) vs. “Refugio” (El Salvador) (534 y 762 pb homólogas), se obtuvo que solamente se presentaron 3 y 6 cambios nucleotídicos respectivamente, lo cual indica que existen pocos sitios parsimoniosamente informativos. Esta información corrobora los resultados de Lewis-Oritt *et al.* (2001), quien obtuvo una distancia genética de 0.26% entre Jalisco (México) y “Refugio” (El Salvador). A partir de lo anterior concluimos que el marcador molecular citocromo b resulta poco informativo para efectuar estudios sobre patrones de variación genética entre poblaciones de *P. davyi*.

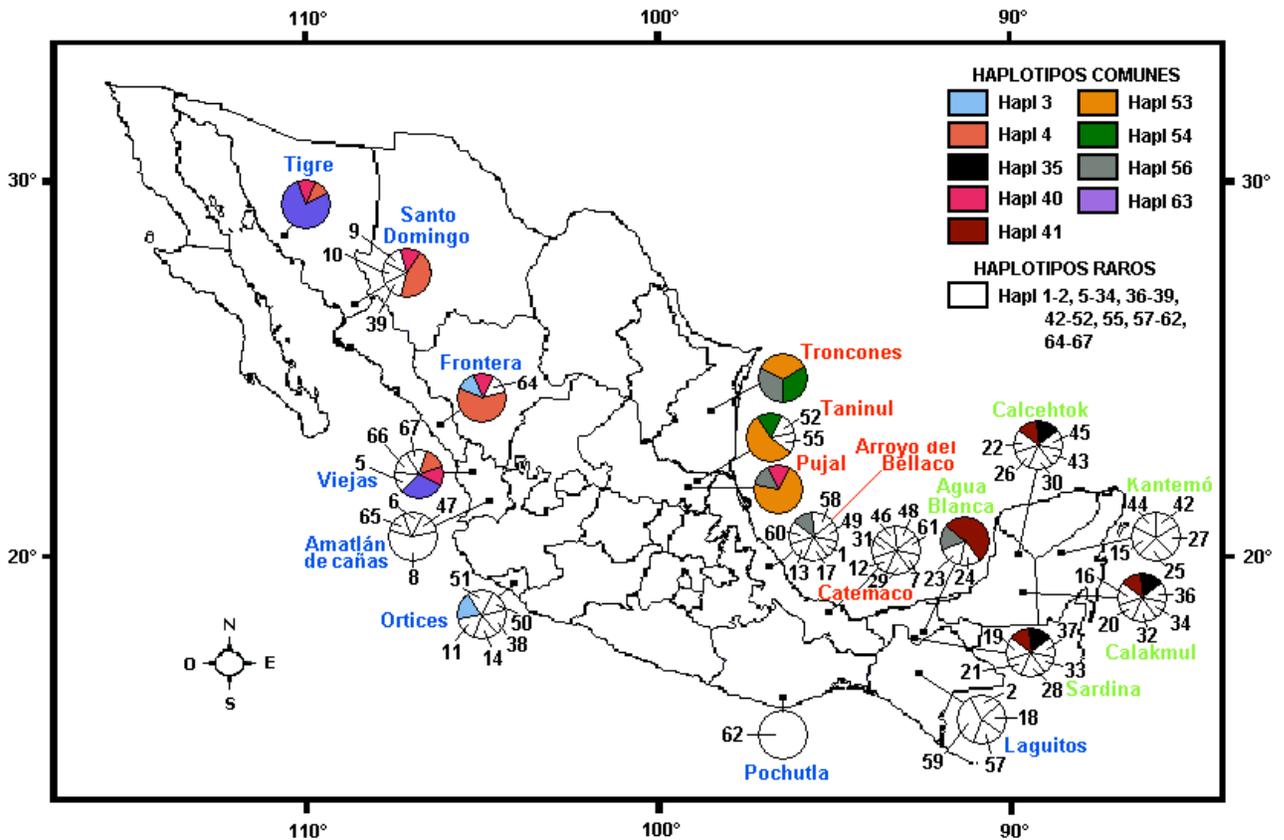
## **10.2. Región control. Patrones generales de la variación de las secuencias**

Se analizó un fragmento de 555 pb del dominio hipervariable HVII completo (~700 pb) de la región control ADN mitocondrial (Fig. 10) de 105 individuos de *Pteronotus davyi*. La composición de bases resultó de T:19.2%, C:31.3%, A:25.9% y G:23.6%. Dentro de las secuencias analizadas 499 fueron constantes y 56 sitios fueron variables. De los sitios variables, 38 (67.9%) fueron parsimoniosamente informativos y 18 (32.1%) fueron sitios no informativos.

Se identificaron 67 haplotipos diferentes. La proporción del número de haplotipos encontrados en este trabajo es similar al reportado en otras especies de murciélagos, empleando el mismo marcador molecular. Wilkinson y Fleming (1996) reporta la presencia de 35 haplotipos para un tamaño de muestra de 53 murciélagos;

Russell *et al.* (2003) documentan la presencia de 86 haplotipos en un estudio con un tamaño poblacional de 94 individuos.

De los 67 haplotipos encontrados en este estudio, el haplotipo cuatro fue el más común y se presentó en el 8.6% de los individuos muestreados, ubicado en la parte norte de la región del pacífico (Fig. 13). Otros 10 haplotipos (14.9%) se presentaron en más de 1 individuo (i.e., el haplotipo 53,  $n=7$ ; haplotipo63,  $n=7$ ; haplotipo41,  $n=5$ ). El resto (56) se encontraron en 1 solo individuo (Tabla 5). Solamente se hallaron dos haplotipos compartidos entre regiones geográficas. Por un lado, el haplotipo 40 entre las regiones pacífico-golfo, y por otro lado, el haplotipo 56 entre las regiones golfo-sureste. La parte norte de las regiones del golfo y del pacífico registraron el mayor número de haplotipos compartidos, mientras que la zona central de ambas regiones y la región del sureste, mostraron la mayor cantidad de haplotipos no compartidos (haplotipos raros). En este sentido, el 37.9% de los haplotipos raros se ubicó en las poblaciones de la región del sureste.



**Figura 13.** Ubicación y frecuencia haplotípica de la región control del ADNmt de las poblaciones estudiadas de *P. davyi*. Los haplotipos comunes (presentes en más de una población) se indican con colores. Los haplotipos raros (presentes en una sola población) se señalan en color blanco con su número de haplotipo respectivo. El nombre de las localidades se presenta en los colores correspondientes de su región de acuerdo a la Figura 8.

**Tabla 5.** Distribución de los haplotipos de *Pteronotus davyi* de México. Las poblaciones son: TI = Tigre, SD = Santo Domingo, FR = Frontera, VI = Viejas, AC = Amatlán de Cañas, OR = Ortices, PO = Pochutla, LA = Laguitos, CA= Catemaco, AR

= Arroyo del Bellaco, PU = Pujal, TA = Taninul, TR = Troncones, SA = Sardina, AB = Agua Blanca, CK = Calakmul, KA = Kantemó y CAL = Calcehtok.

Haplotipo	Poblaciones																Total		
	pacífico						golfo de México				sureste								
	TI	SD	FR	VI	AC	OR	PO	LA	CA	AR	PU	TA	TR	SA	AB	CK		KA	CAL
1										1									1
2																			1
3				1															2
4	1	3	4	1			1												9
5				1															1
6					1														1
7									1										1
8					2														2
9		1																	1
10		1																	1
11							1												1
12									1										1
13										1									1
14							1												1
15																	1		1
16															1				1
17										1									1
18																		1	1
19														1					1
20															1				1
21														1					1
22																		1	1
23															1				1
24															1				1
25																	1		1
26																		1	1
27																	1		1
28														1					1
29									1										1
30																		1	1
31									1										1
32																1			1
33														1					1
34															1				1
35														1				1	3
36															1				1
37														1					1
38							1												1
39			1																1
40	1	1	1	1							1								5
41														1	2	1		1	5
42																	1		1
43																		1	1
44																	1		1
45																		1	1

46									1											1
47				1																1
48									1											1
49										1										1
50						1														1
51						1														1
52																				1
53											3	2	2							7
54												1	2							3
55												1								1
56										1	1		1			1				4
57									1											1
58										1										1
59									2											2
60											1									1
61										1										1
62																				1
63	5					2														7
64																				1
65																				1
66																				1
67																				1
Total	7	7	7	7	5	6	1	5	7	7	5	5	5	7	5	7	5	7		105

### 10.3. Índices de diversidad molecular

La diversidad haplotípica resultó similar entre las regiones geográficas estudiadas (0.933-0.972). Dentro de cada región las poblaciones de *P. davyi* presentaron una alta diversidad haplotípica que varió entre 0.524 y 1.000. Las poblaciones norteñas de las regiones pacífico y golfo de México presentaron las diversidades haplotípicas más bajas (Tabla 6).

Por su parte, la diversidad nucleotídica también resultó variable, con valores entre 0.0018 y 0.0194. Dos poblaciones de la vertiente del golfo, en el estado de Veracruz, (Catemaco y Arroyo del Bellaco) presentaron los valores más altos de  $\pi$ , mientras que otras dos poblaciones de la misma vertiente tuvieron los valores más bajos (Taninul y Troncones). La  $\pi$  en la región del sureste (0.0084) fue más baja en

comparación con las regiones pacífico y golfo (0.0149 y 0.0135, respectivamente). La diversidad nucleotídica y la theta de Watterson resultaron similares en todas las poblaciones (Tabla 6).

**Tabla 6.** Se presentan los índices de diversidad molecular para las poblaciones de estudio de *Pteronotus davyi*. Se indica el tamaño de muestra ( $n$ ), la theta de Watterson ( $\theta_s$ ), el número de haplotipos ( $k$ ), el número de sitios polimórficos ( $s$ ), la diversidad haplotípica o de Nei ( $h$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de las secuencias mitocondriales examinadas.

Localidad	Estado	$\theta_s$	$n$	$k$	$s$	$h$	$\pi$
<b>REGIÓN DEL PACÍFICO</b>							
El Tigre	Sonora	0.0125	7	3	17	0.524	0.0101
Santo Domingo	Sonora	0.0103	7	5	14	0.857	0.0116
La Frontera	Sinaloa	0.0125	7	4	17	0.714	0.0115
Las Viejas	Nayarit	0.0157	7	6	21	0.952	0.0157
Amatlán de Cañas	Nayarit	0.0147	5	4	17	0.900	0.0155
Los Ortices	Colima	0.0157	6	6	20	1.000	0.0156
Pochutla	Oaxaca	--	1	1	-	-	-
Los Laguitos	Chiapas	0.0155	5	4	18	0.900	0.0147
<b>REGIÓN DEL GOLFO</b>							
Catemaco	Veracruz	0.0213	7	7	28	1.000	0.0194
Arroyo del Bellaco	Veracruz	0.0213	7	7	27	1.000	0.0191
El Pujal	San Luis Potosí	0.0086	5	3	10	0.700	0.0079
Taninul	San Luis Potosí	0.0025	5	4	3	0.900	0.0028
Los Troncones	Tamaulipas	0.0017	5	3	2	0.800	0.0018
<b>REGIÓN DEL SURESTE</b>							
La Sardina	Tabasco	0.0117	7	7	16	1.000	0.0097
Agua Blanca	Tabasco	0.0112	5	4	13	0.900	0.0115
Calakmul	Campeche	0.0066	7	7	9	1.000	0.0066
Kantemó	Quintana Roo	0.0069	5	5	8	1.000	0.0068
Calcehtok	Campeche	0.0103	7	7	14	1.000	0.0085

**TOTAL** 0.0207 105 67 55 0.979 0.0172

\*No se incluyó la población de Pochutla (Oaxaca) en los análisis de diversidad genética debido a que solamente se tiene 1 individuo.

#### 10.4. Estructura genética poblacional

En todos los análisis del AMOVA (general, pacífico/golfo vs. sureste, pacífico vs. golfo) la mayor parte de la variación genética se explica dentro del componente intrapoblacional (69.9%, 57.1%, 76.9%, respectivamente). La variación genética entre grupos resultó alta entre las regiones pacífico/golfo vs. sureste (32.7%) y baja entre las regiones pacífico vs. golfo (12.5%). De manera general, los valores de  $F_{ST}$  resultaron altos (Tabla 7).

El flujo génico entre las poblaciones de las regiones pacífico/golfo de México vs. sureste resultó bajo ( $F_{ST} = 0.36$ ,  $Nm = 0.86$ ), mientras que entre las regiones pacífico vs. golfo de México resultó mayor ( $F_{ST} = 0.14$ ,  $Nm = 2.96$ ). Estos resultados concuerdan con los resultados del AMOVA.

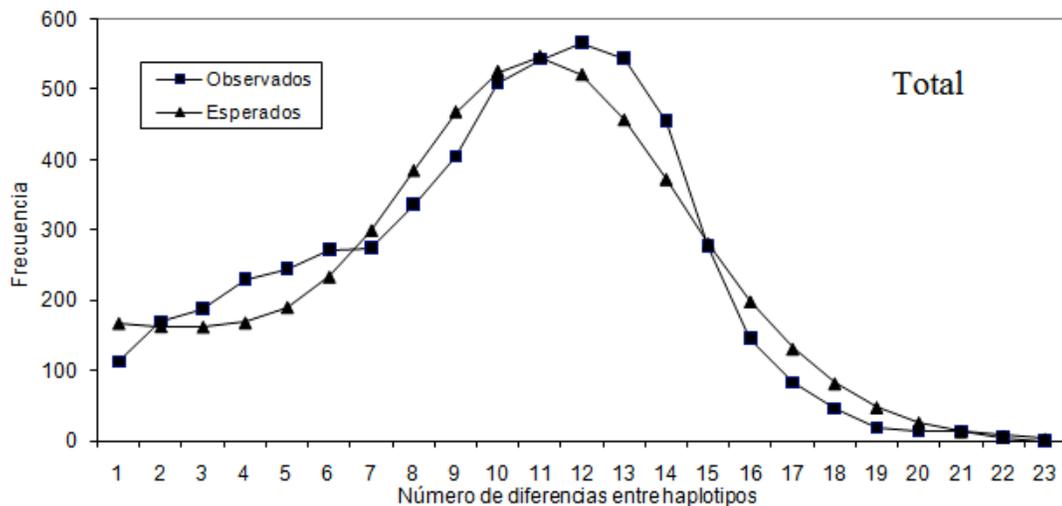
**Tabla 7.** Análisis de varianza molecular de las poblaciones de *Pteronotus davyi* y entre las regiones pacífico, golfo y sureste. EP = entre poblaciones, DP = dentro de poblaciones, EG = entre grupos, EPDG = entre poblaciones dentro de grupos.

Regiones	Origen de la variación	Suma de Cuadrados	Varianza	Porcentaje de Variación	$F_{ST}$
general	EP	188.6	1.3	30.1	0.301
	DP	275.2	3.1	69.9	( $P < 0.05$ )
pacífico/golfo	EG	85.8	1.8	32.7	

vs. sureste	EPDG	102.9	0.6	10.2	0.429
	DP	275.2	3.2	57.1	( $P < 0.05$ )
	EG	26.5	0.6	12.5	
pacífico vs. golfo	EPDG	68.1	0.5	10.6	0.231
	DP	213.1	3.5	76.9	( $P < 0.05$ )

### 10.5. Demografía histórica

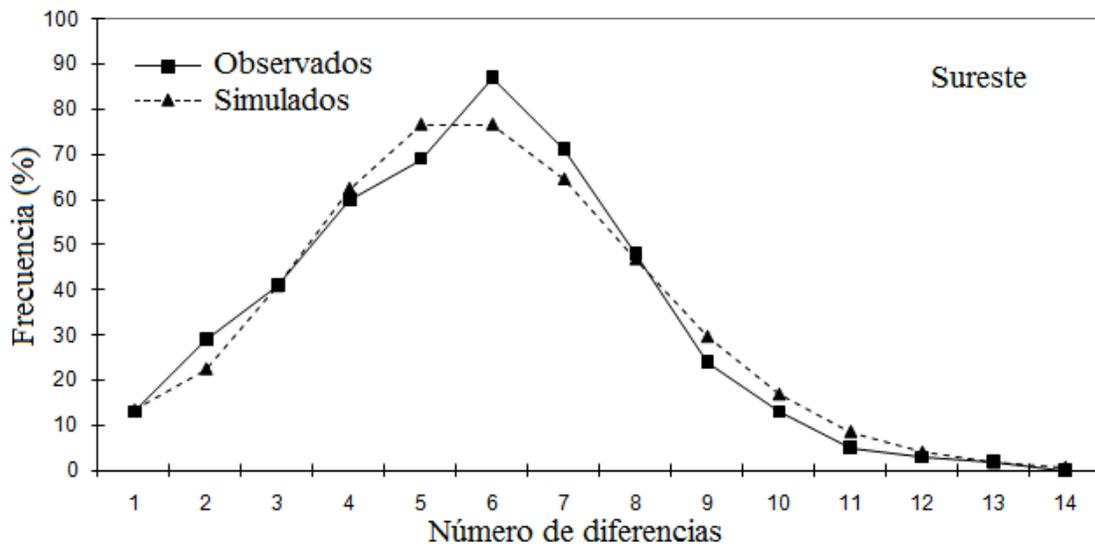
La prueba D de Tajima, para probar la neutralidad de todos los haplotipos ( $D = -0.53$ ,  $P = 0.32$ ) resultó negativa pero no significativa por lo que no fue consistente con el modelo de expansión poblacional. En contraste, la distribución de mismatch para todos los haplotipos presentó una distribución unimodal (Fig. 14), y no encontramos diferencias significativas entre la distribución de todos los haplotipos y el modelo de expansión poblacional (media = 8.92, desviaciones de la suma de cuadrados [SSD] = 0.0014,  $P = 0.87$ ). El índice de Raggedness resultó bajo (0.003) sugiriendo un ajuste significativo entre la distribución observada y esperada apoyando la expansión poblacional.



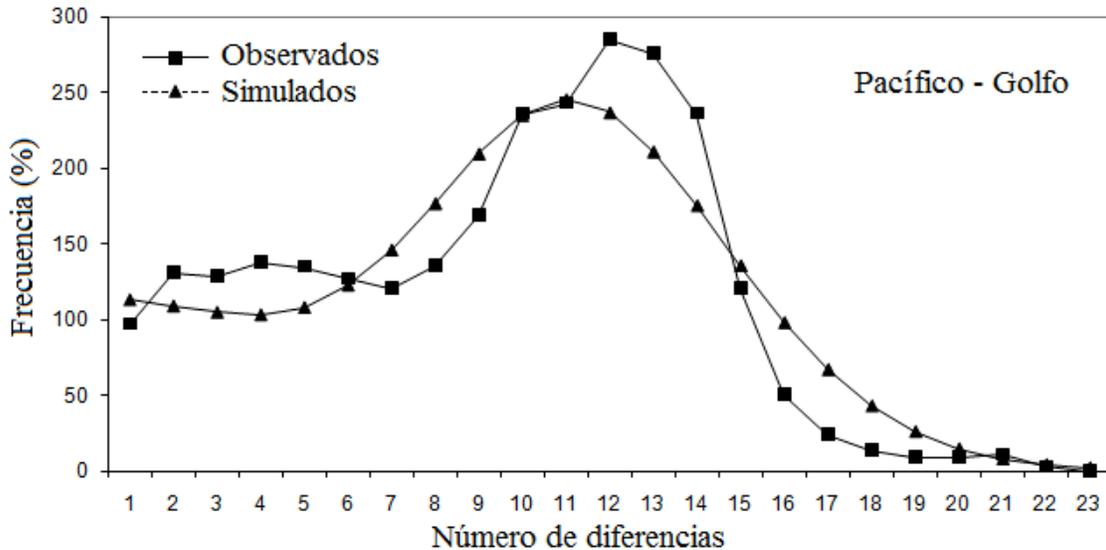
**Figura 14.** Distribución mismatch de todos los haplotipos de *Pteronotus davyi*. Las líneas con cuadrados indican la distribución observada y las líneas con triángulos indican la distribución esperada bajo un modelo de expansión.

La D de Tajima total y para todas las regiones y no fue significativamente diferente de cero con excepción de la región del sureste (total,  $D = -0.5386$ ,  $P > 0.10$ ; golfo,  $D = -0.86139$ ,  $P = 0.19900$ ; pacífico,  $D = -0.23346$ ,  $P = 0.46700$ ; sureste,  $D = -1.49689$ ,  $P = 0.04400$ ).

A nivel regional, la región del sureste presentó una distribución unimodal (Fig. 15), mientras que las regiones del pacífico/golfo presentaron curvas que no resultaron estrictamente unimodales, aunque fueron consistentes con un crecimiento poblacional reciente (Fig. 16).



**Figura 15.** Distribución mismatch de los haplotipos del sureste de *Pteronotus davyi*. Las líneas con cuadrados indican la distribución observada y las líneas con triángulos indican la distribución esperada bajo un modelo de expansión.



**Figura 16.** Distribución mismatch de los haplotipos del pacífico/golfo de *Pteronotus davyi*. Las líneas con cuadrados indican la distribución observada y las líneas con triángulos indican la distribución esperada bajo un modelo de expansión.

La historia de crecimiento poblacional también fue fuertemente indicada por las otras pruebas de neutralidad. F y R2 resultaron significativas, mientras que las pruebas de F\* y D\* de Fu y Li no lo fueron. Las regiones también se caracterizaron por altos valores del coeficiente de expansión (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados de los análisis demográficos de *Pteronotus davyi* (incluyendo los resultados esperados bajo el escenario de expansión poblacional).

	General	Pacífico	Golfo	Sureste	Expansión
<i>D</i> de Tajima	-0.538	-0.233	-1.085	-1.496	No significativa
<i>F</i> de Fu	-53.408*	-6.257*	-4.268*	-20.031*	Significativa
<i>F</i> * de Fu y Li	-1.021	-1.191	-0.833	-2.042	No significativa
<i>D</i> * de Fu y Li	-1.070	-1.421	-0.532	-1.845	No significativa
<i>R</i> <sub>2</sub> de Ramos-Onsins y Rozas	0.078*	0.099*	0.091*	0.0624*	Significativa
Coefficiente de Expansión ( <i>S/d</i> )	6.177	4.690	5.287	6.825	Alta

\* P < 0.05

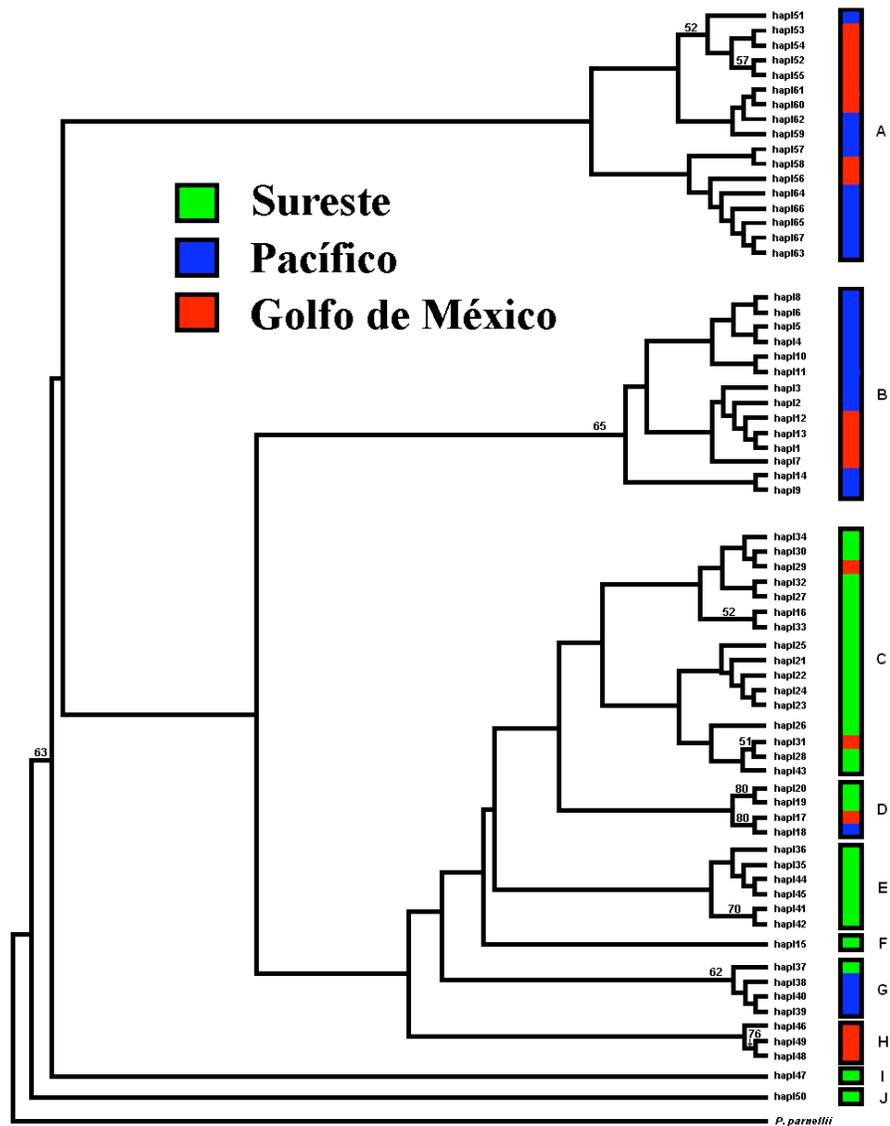
### 10.6. Análisis filogenéticos

En los análisis filogenéticos utilizando a *Pteronotus parnellii* como grupo externo, el modelo elegido como el más apropiado fue el modelo TIM+I+G (Rodríguez *et al.*, 1990). Los parámetros de la serie de datos de la región control fueron: base de frecuencias A = 0.26, C = 0.31, G = 0.23 y T = 0.20; probabilidad marginal de la forma del parámetro gama ( $\gamma$ ) = 0.3757; la proporción de sitios invariables (I) = 0.5735; y un valor de Ln Likelihood = 1814.4011.

La topología de Máxima Verosimilitud presentó una alta resolución, pero con valores bajos en el soporte de las ramas (Fig. 17). Las topologías indicaron la presencia de 10 clados, la mayoría de los cuales muestran una clara separación de las regiones pacífico/golfo de México vs. sureste con excepción de los clados C, D y G. Los clados E, F, I y J, están constituidos exclusivamente por haplotipos de la región sureste, mientras que los clados A, B y H están formados solamente por haplotipos de las regiones del pacífico y golfo de México.

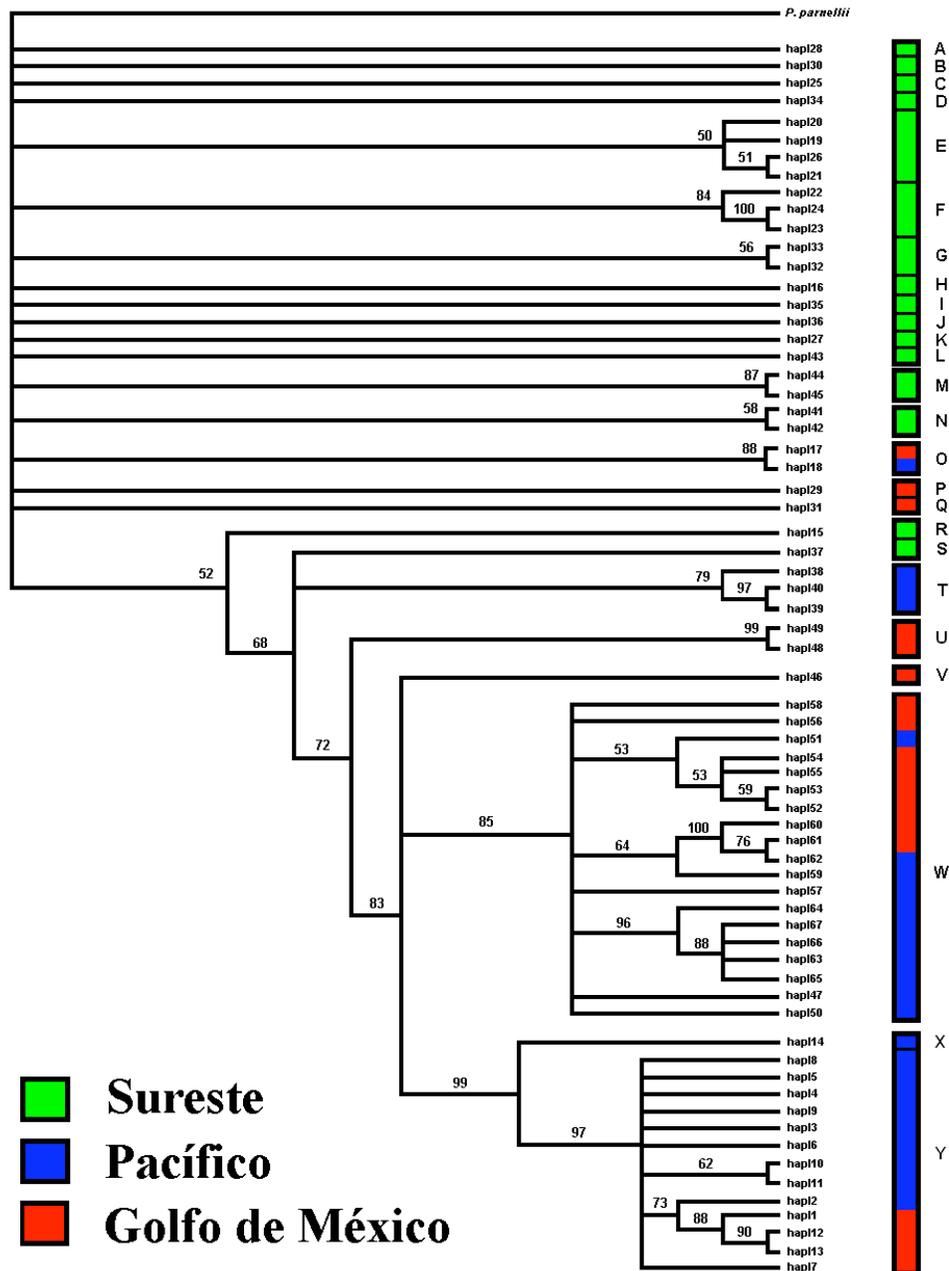
Por su parte, el cladograma obtenido a partir de un análisis Bayesiano (Fig. 18) sugiere la presencia de 25 clados. Los dos clados (W e Y), presentaron un alto número de haplotipos y estuvieron constituidos por haplotipos de las regiones del pacífico y golfo de México, los cuales presentan soportes altos en las ramas (85 y 99, respectivamente). No obstante, la mayor parte del cladograma presenta una falta de resolución con politomías principalmente entre los clados de la región del sureste.

Los análisis de MV con este modelo y los análisis Bayesianos (Figs. 17 y 18, respectivamente) no resultaron similares pero indicaron una separación entre las regiones pacífico/golfo de México con respecto a la región del sureste. El mismo patrón se presentó con el análisis sin grupo externo (ver Artículo en sección final).



**Figura 17.** Cladograma consenso de los 67 haplotipos de *Pteronotus davyi*, obtenido a partir de un análisis de MV empleando el algoritmo de Quartet Puzzling. Los números ubicados arriba de las ramas corresponden a los valores de soporte de Quartet Puzzling (>50%). Los haplotipos son indicados con la abreviación “hapl” seguida por el número correspondiente. Las barras indican la distribución geográfica

de los haplotipos, la región del pacífico en color azul, la región del golfo de México en color rojo y la región del sureste en color verde. Los clados son indicados con letras.



**Figura 18.** Cladograma consenso obtenido a partir de un análisis Bayesiano de los 67 haplotipos de *Pteronotus davyi*. Se utilizó a *Pteronotus parnellii* como grupo

externo. Arriba de las ramas se presentan las probabilidades Bayesianas *a posteriori* (X 100). Los haplotipos son indicados con la abreviación “hapl” seguida por el número haplotípico correspondiente. Las barras en colores indican la distribución geográfica de los haplotipos, la región del pacífico en color azul, la región del golfo en color rojo y la región del sureste en color verde. Los clados se indican con letras.

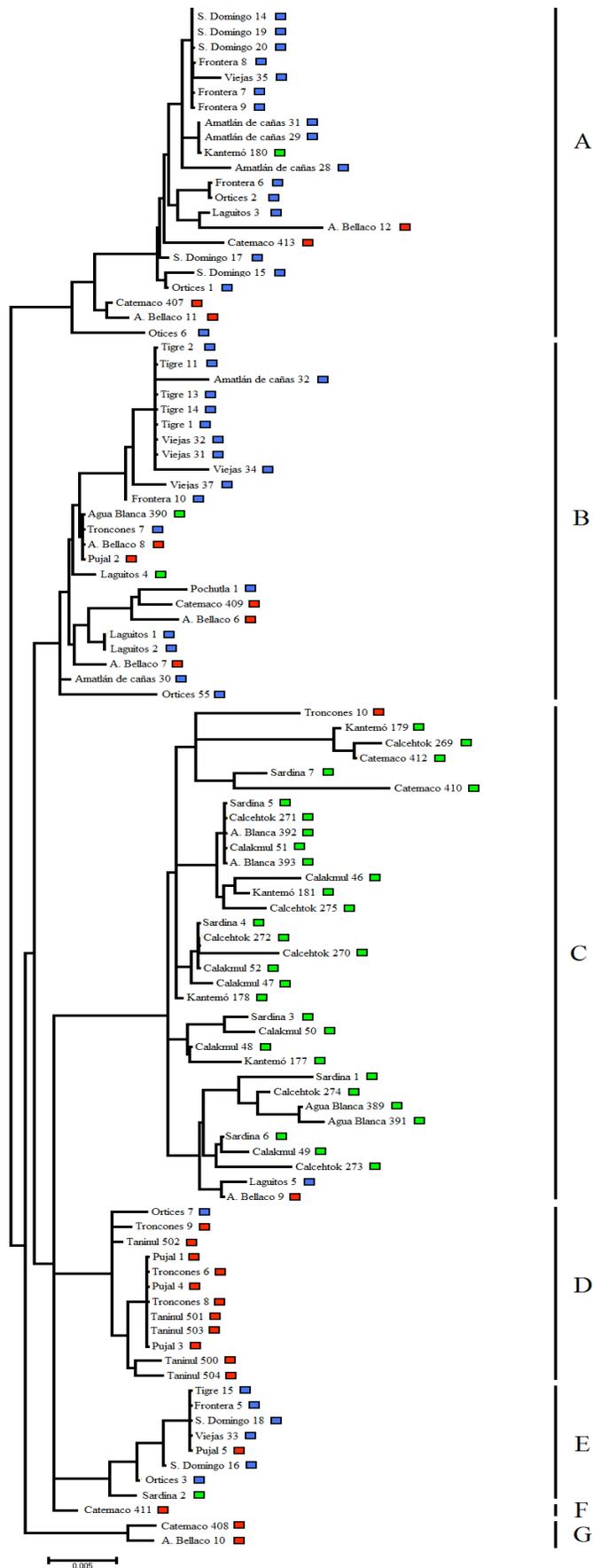
### 10.7. Distancias genéticas

A nivel regional, las distancias genéticas netas, utilizando el modelo de Tamura y Nei (1993), indicaron que la mayor diferenciación se encontró entre la región del pacífico y la región del sureste (0.88%); la distancia entre la región del golfo y el sureste fue de 0.73%; y la menor distancia genética se encontró entre las regiones del pacífico y golfo (0.26%). A nivel poblacional, la mayor distancia genética se presentó entre La Frontera y Calcehtok (2.53%), poblaciones pertenecientes a la región del pacífico y sureste, respectivamente, mientras que las distancias genéticas más bajas (0.26% y 0.50%) se registraron entre las poblaciones de Taninul, Pujal y Troncones, ubicadas geográficamente en el norte del golfo de México (Tabla 9). Finalmente, se presentó un alto grado de divergencia de las secuencias nucleotídicas entre las poblaciones de *P. davyi* y *P. parnellii* (población El Tigre) (17.2 – 20.3 %).

**Tabla 9.** Distancias genéticas promedio entre las secuencias nucleotídicas de la región control de las 18 poblaciones estudiadas de *Pteronotus davyi*, de acuerdo al modelo de Tamura y Nei (1993). En rojo se presentan las distancias genéticas más altas y bajas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18]
[ 1] Tigre																		
[ 2] Santo Domingo																		
[ 3] Frontera																		
[ 4] Viejas																		
[ 5] Amatlán de cañas																		
[ 6] Orrices																		
[ 7] Sardina																		
[ 8] Pochutla																		
[ 9] Laguitos																		
[10] Calakmul																		
[11] Kantemó																		
[12] Calcehok																		
[13] Agua Blanca																		
[14] Catenaco																		
[15] Arroyo del Bellaco																		
[16] Pujal																		
[17] Taminul																		
[18] Troncones																		
[ 1] 0.0192																		
[ 2] 0.0185 0.0114																		
[ 3] 0.0130 0.0183 0.0176																		
[ 4] 0.0181 0.0144 0.0136 0.0179																		
[ 5] 0.0175 0.0151 0.0150 0.0180 0.0162																		
[ 6] 0.0210 0.0215 0.0228 0.0225 0.0224 0.0196																		
[ 7] 0.0198 0.0247 0.0245 0.0219 0.0227 0.0198 0.0221																		
[ 8] 0.0159 0.0182 0.0175 0.0172 0.0174 0.0161 0.0177 0.0166																		
[ 9] 0.0198 0.0216 0.0231 0.0218 0.0223 0.0194 0.0083 0.0224 0.0175																		
[10] 0.0206 0.0187 0.0197 0.0213 0.0192 0.0181 0.0113 0.0226 0.0172 0.0099																		
[11] 0.0227 0.0238 0.0253 0.0243 0.0246 0.0218 0.0095 0.0244 0.0190 0.0080 0.0113																		
[12] 0.0212 0.0234 0.0241 0.0229 0.0228 0.0205 0.0117 0.0235 0.0174 0.0105 0.0130 0.0110																		
[13] 0.0204 0.0202 0.0205 0.0214 0.0209 0.0188 0.0180 0.0196 0.0182 0.0174 0.0177 0.0189 0.0194																		
[14] 0.0186 0.0198 0.0194 0.0197 0.0196 0.0181 0.0201 0.0181 0.0156 0.0198 0.0192 0.0214 0.0201 0.0193																		
[15] 0.0128 0.0194 0.0193 0.0154 0.0190 0.0163 0.0182 0.0142 0.0128 0.0176 0.0181 0.0197 0.0177 0.0154																		
[16] 0.0133 0.0211 0.0202 0.0158 0.0188 0.0169 0.0193 0.0122 0.0119 0.0190 0.0191 0.0209 0.0184 0.0179 0.0148 0.0061																		
[17] 0.0114 0.0190 0.0182 0.0139 0.0171 0.0150 0.0183 0.0110 0.0104 0.0179 0.0178 0.0199 0.0171 0.0168 0.0133 0.0050 0.0026																		

Un análisis filogenético neighbor-joining de todas las secuencias obtenidas permitió distinguir ramas bien diferenciadas. De los 7 clados (A-G) presentados, solamente el clado C estuvo representado en su mayoría por individuos del Sureste, mientras que los clados A-B y D-G estuvieron constituidos por individuos del Pacífico

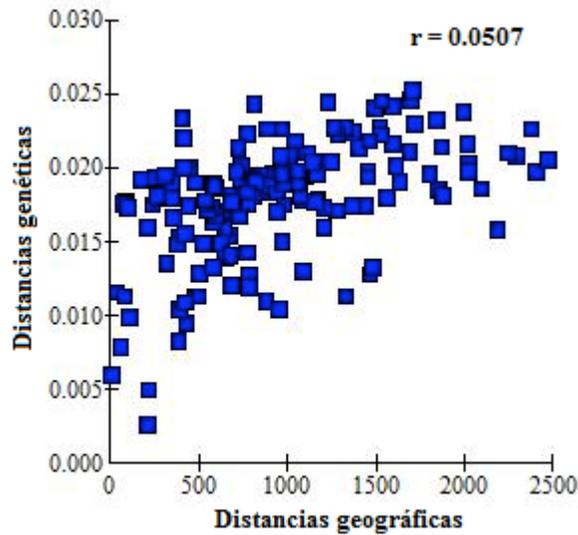


**Figura 19.** Árbol neighbor-joining de los 105 individuos secuenciados de *P. davyi*. Los cuadros en colores indican la distribución geográfica de los haplotipos, la región del pacífico en color azul, la región del golfo de México en color rojo y la región del sureste en color verde. Los clados son indicados con letras.

### 10.8. Prueba de Mantel

La prueba de Mantel indicó que hay una correlación significativa y positiva entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre las poblaciones de las tres regiones geográficas incluidas en este estudio (pacífico, golfo y sureste) ( $g = 5.21$ ,  $z = 5566.97$ ,  $r = 0.507$ ,  $P < 0.05$  con 1000 permutaciones, Fig. 20). Lo mismo sucedió al contrastar las poblaciones de las regiones geográficas del pacífico vs. golfo de México ( $g = 2.31$ ,  $z = 2331.79$ ,  $r = 0.34$ ,  $P < 0.05$  con 1000 permutaciones), ajustándose a un modelo de aislamiento por distancia, en donde el flujo génico y las distancias genéticas entre poblaciones están fuertemente ligadas a la separación espacial.

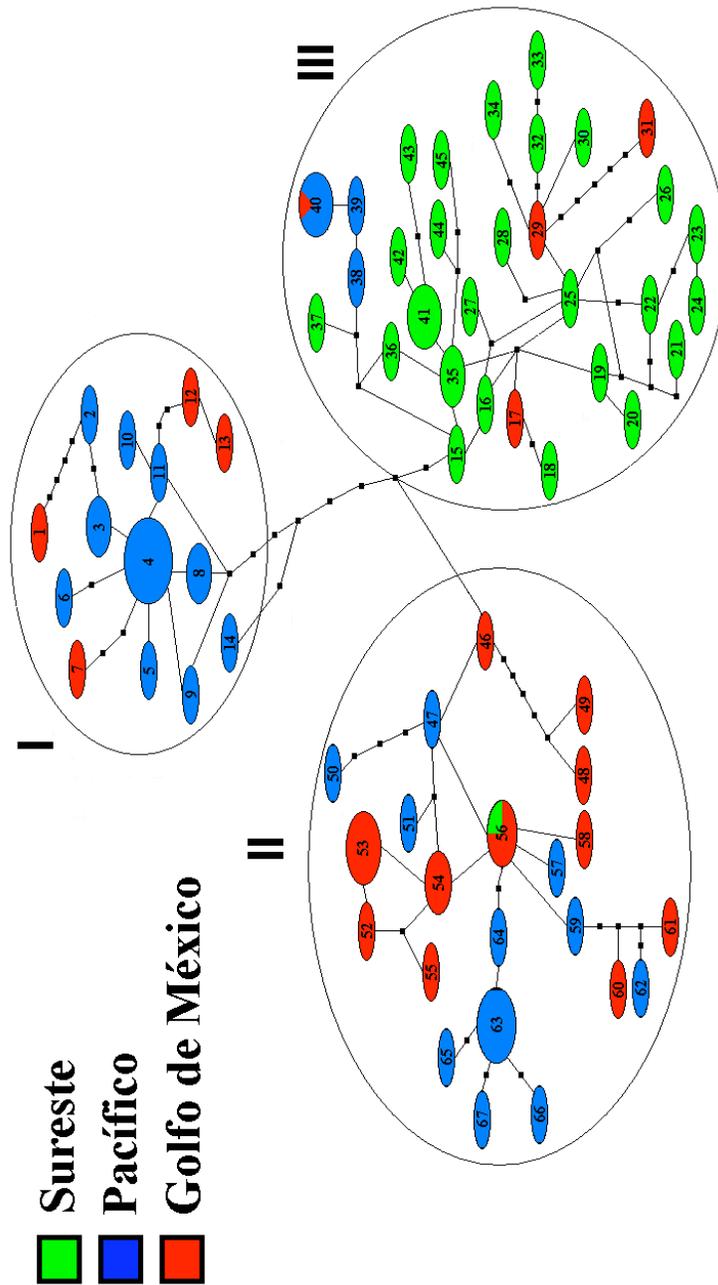
Las poblaciones de la vertiente del pacífico no presentaron entre sí aislamiento por distancia debido a que la asociación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas no resultó significativa ( $g = 1.31$ ,  $z = 964.35$ ,  $r = 0.29$ ,  $P > 0.05$  con 1000 permutaciones). Resultados similares se obtuvieron para las poblaciones de la región sureste ( $g = 1.19$ ,  $z = 61.84$ ,  $r = 0.23$ ,  $P > 0.05$  con 1000 permutaciones). Por su parte, para las poblaciones de la región del golfo de México dicha asociación resultó significativa ( $g = 1.87$ ,  $z = 110.79$ ,  $r = 0.059$ ,  $P < 0.05$  con 1000 permutaciones), indicando la posibilidad de aislamiento por distancia.



**Figura 20.-** Relación entre distancias geográfica y distancias genéticas entre todas las poblaciones de *P. davyi*.

### 10.9. Reconstrucción de redes haplotípicas. Análisis de clados anidados

En la red haplotípica se forman 3 grupos que repiten nuevamente la estructura encontrada en las topologías filogenéticas, mostrando la agrupación de haplotipos de ambas costas (Fig. 21): (I) y (II) Formados por haplotipos de la vertiente del pacífico y del golfo. Dentro del grupo II se ubica el único haplotipo (56) compartido entre la región del sureste y la región del golfo de México. (III) Conformado por un conjunto de haplotipos de la región sureste, aunque hay algunos haplotipos (17, 29 y 31) pertenecientes a poblaciones de la región del golfo, todas cercanas al Istmo de Tehuantepec, y otros (38, 39 y 40) del pacífico Norte; el haplotipo 40 se comparte con la región golfo Norte (Pujal).

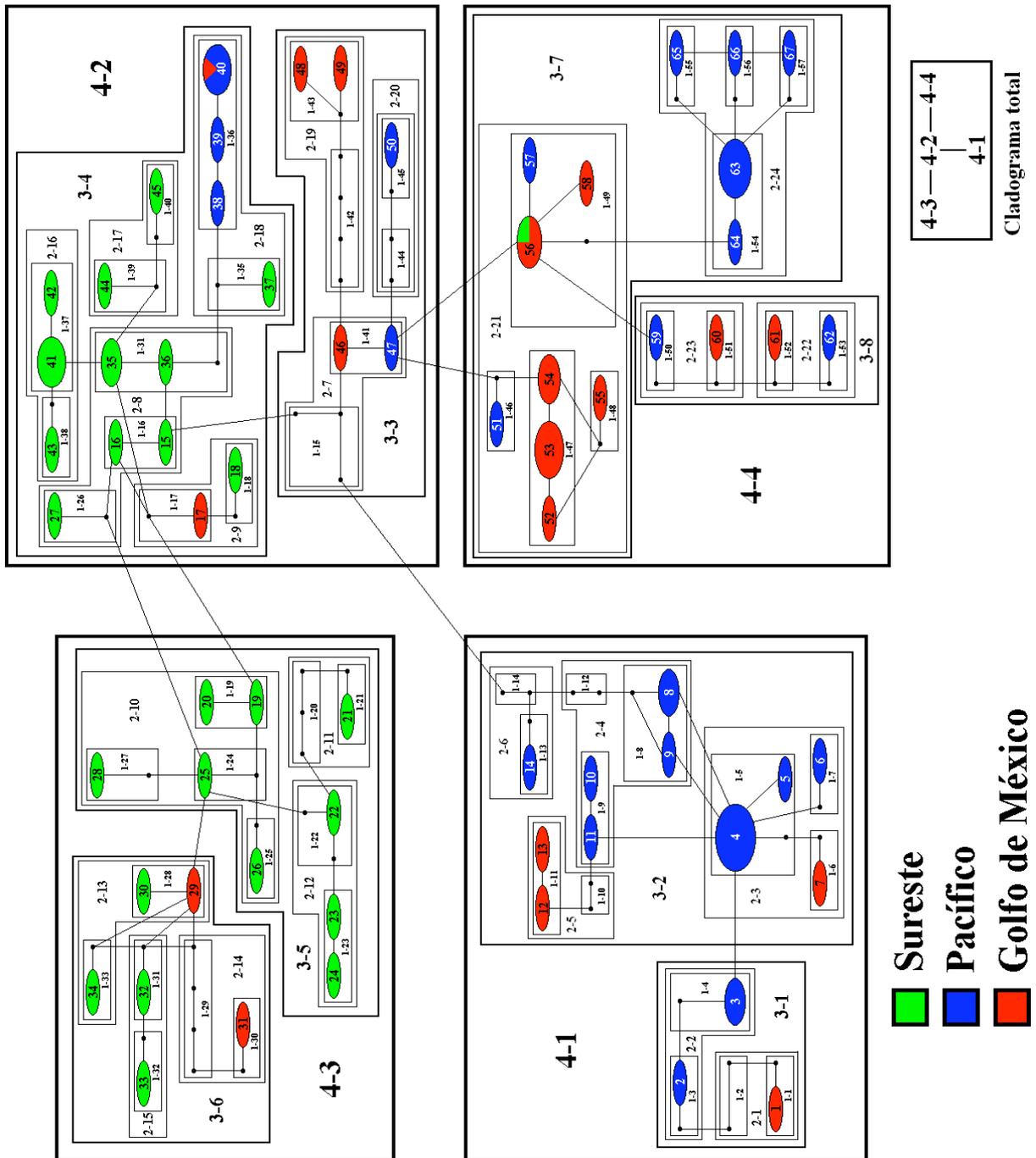


**Figura 21.** Red haplotípica de los 67 haplotipos de *Pteronotus davyi* de la región control mitocondrial, inferida usando el criterio de parsimonia estadística con el programa TCS. Cada línea en la red representa un simple cambio mutacional. Cada haplotipo es representado por un número dentro de un óvalo. El tamaño de los

óvalos representa las frecuencias haplotípicas, en color azul se presentan los haplotipos de la región del pacífico, en rojo de la región del golfo de México y en verde de la región del sureste. Los cuadrados negros indican haplotipos intermedios que no fueron muestreados (hipotéticos). Los números romanos indican los diferentes grupos de haplotipos reconocidos: I) y II) pacífico-golfo, III) sureste.

A partir de la red haplotípica se efectuó un anidamiento para obtener los clados anidados. En la Figura 22 se muestra el cladograma anidado de haplotipos de las poblaciones de *Pteronotus davyi* muestreadas en este estudio, formado a partir de un 95% de grados de confianza. Dentro de este cladograma anidado, se obtuvieron 57 clados de un paso, 24 clados de dos pasos, ocho clados de tres pasos y cuatro clados de cuatro pasos. En los clados de mayor jerarquía (4-1 - 4-4) se apoya la separación de las regiones pacífico y golfo de México frente a la región sureste. De hecho los clados 4-1 y 4-4 presentan únicamente haplotipos de las regiones pacífico y golfo de México, con excepción del haplotipo 56 (presente en el clado 4-4), el cual es compartido por las regiones sureste y golfo de México. Por otro lado, el clado 4-3 está formado casi exclusivamente por haplotipos de la región del sureste (hapl 20-26, 28, 30, 32-34), con excepción de los haplotipos 29 y 32, pertenecientes a la región del golfo de México. Finalmente el clado 4-2 está conformado tanto por haplotipos del sureste, en su mayoría (15, 16, 18, 27, 35-37, 41-45), como por haplotipos del pacífico (38-40, 47 y 50) y golfo de México (17, 46, 48-49).

Con excepción de los clados de un paso, en los clados de todos los niveles se obtuvieron valores de distancia significativos. Se rechazó la hipótesis nula de no presentarse una relación significativa entre la genealogía haplotípica mitocondrial y la distribución geográfica de los haplotipos, ya que se infirieron posibles eventos de flujo génico restringido, colonización a larga distancia y fragmentación del pasado (Tabla 10; Fig. 23) aunque para el clado 2-21 se obtuvo que los resultados eran inconclusos (Tabla 10). Es interesante resaltar que para el clado 3-7, que incluye a todas las poblaciones de las regiones del pacífico y del golfo de México, con excepción de Pochutla (Oaxaca) y Catemaco (Veracruz), se infirió expansión del intervalo geográfico. Finalmente para el clado 4-4 que consta de dos clados de tres pasos (3-7 y 3-8) e involucra a todas las poblaciones de las regiones del pacífico y golfo, se infirió flujo génico restringido con aislamiento por distancia.

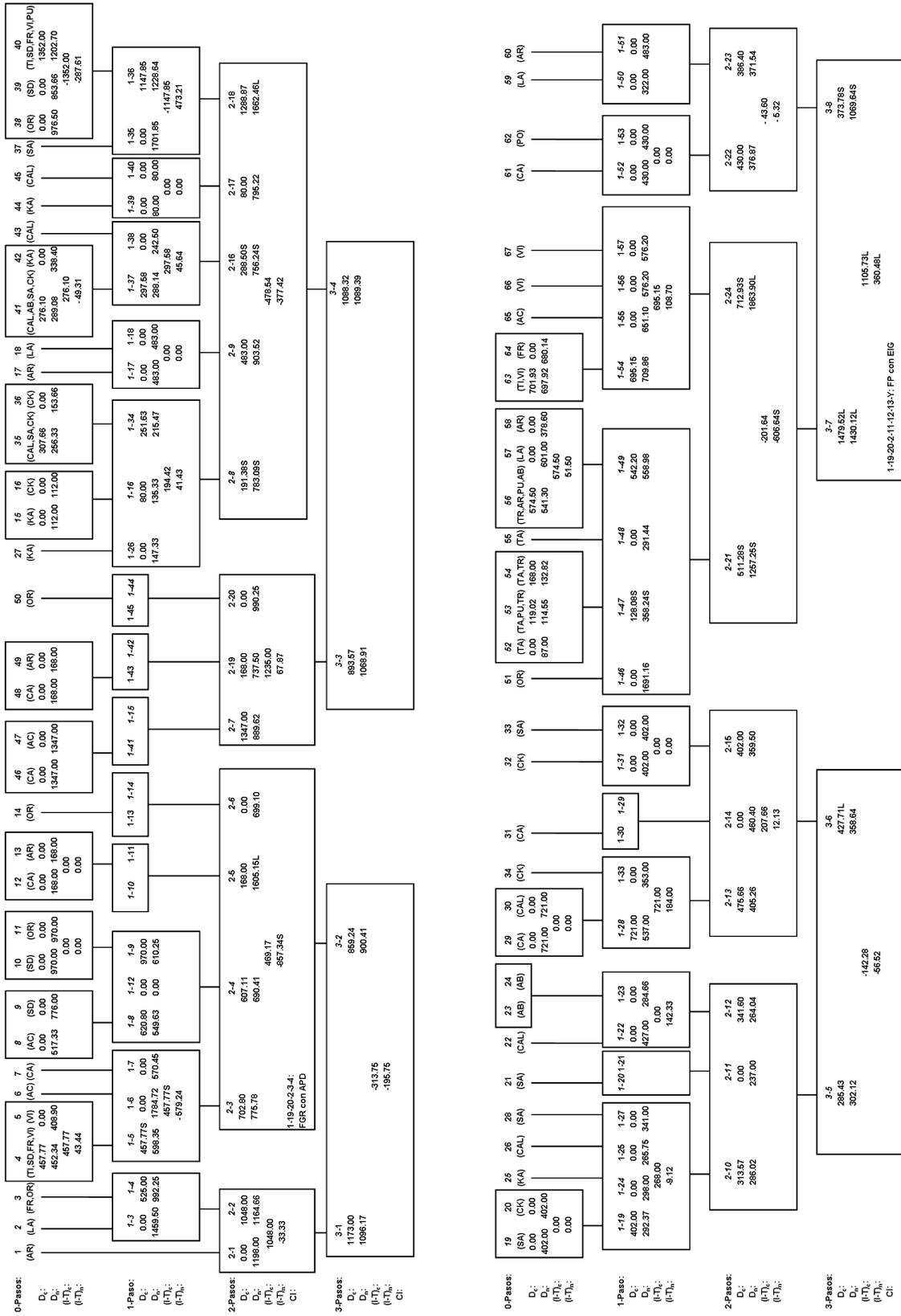


**Figura 22.** Diseño de clados anidados de los haplotipos de la región control de *Pteronotus davyi*. Cada línea representa un simple cambio mutacional que interconecta dos estados haplotípicos. Los haplotipos se indican con números (1-67). En color azul se presentan los haplotipos de la región del pacífico, en rojo de la

región del golfo de México y en verde de la región del sureste. Las poblaciones correspondientes a cada haplotipo se indican en la Tabla 5. Los haplotipos hipotéticos (no muestreados) son indicados por un círculo negro. Los clados son identificados usando un sistema de dos números, donde el primer número se refiere al anidamiento jerárquico y el segundo es un número arbitrario que identifica a los haplotipos o clados (i.e., clados de 1 paso “1-x”, clados de 2 pasos “2-x”). El tamaño de los óvalos representa las frecuencias haplotípicas. En el recuadro inferior derecho se representa al cladograma total.

**Tabla 10.** Resumen de los análisis de clados anidados con probabilidades de Ji cuadrada permutacional (P) para la estructura geográfica de los clados de la Figura 22. Los clados con valores de distancia de clado, distancia de clado anidado o distancia interior-punta con una probabilidad  $\leq 0.05$  fueron excluidos de esta tabla. Las inferencias se obtuvieron siguiendo a Templeton (2004). Las abreviaturas de las inferencias son: FGR, flujo génico restringido; CLD, colonización a larga distancia; APD, aislamiento por distancia; FP, fragmentación del pasado; EIG, expansión del intervalo geográfico; I, inconclusos.

Clado	Ji Cuadrada Estadística	P	Cadena de Inferencia	Inferencia
2-3	24.00	0.045	1-19-20-2-3-4-N	FGR con APD
2-4	0.000	0.000	1-2	I
2-21	32.83	0.049	1-2	I
3-7	30.00	0.000	1-19-20-2-11-12-13-Y	FP con EIG
4-4	24.11	0.007	1-2-3-4-N	FGR con APD

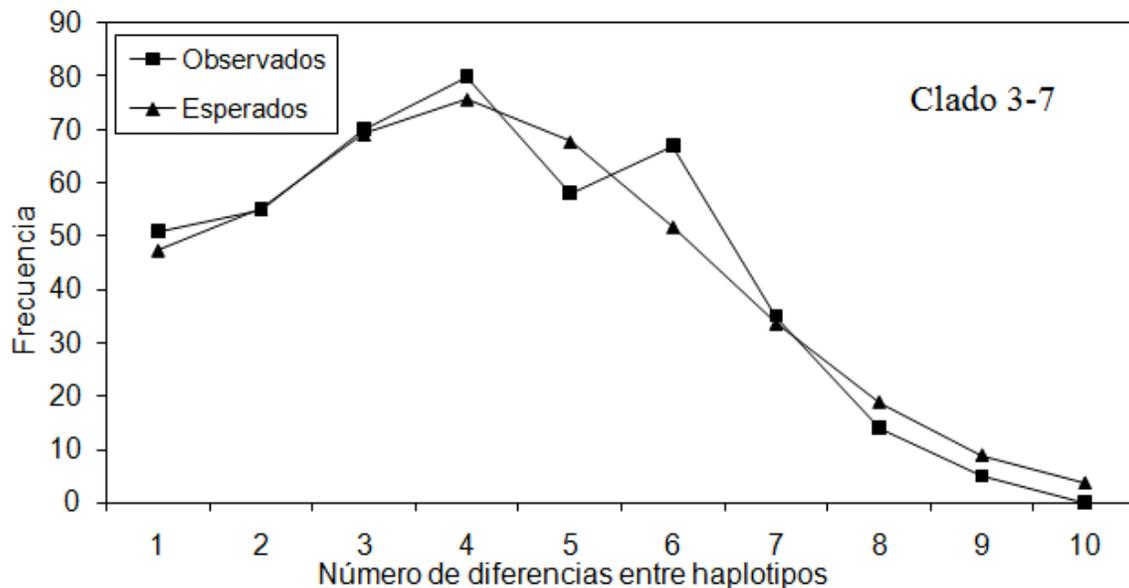


**Figura 23.** Resumen de los resultados del análisis de clados anidados para los haplotipos de *Pteronotus davyi*. Los niveles de anidamiento se extienden desde el nivel más bajo conformados por individuos (haplotipos, clados de 0 pasos) hasta los clados de más alto nivel, que contienen clados con haplotipos observados. Las letras entre paréntesis, debajo de los clados de 0 pasos (haplotipos) indican las localidades (ver Tabla 5). Para los clados que presentan una probabilidad significativa ( $P < 0.05$ ) de asociación entre la geografía y la distribución haplotípica, se dan los valores de distancia de clados ( $D_c$ ) y la distancia de clados anidados ( $D_n$ ); las distancias significativamente más pequeñas o grandes que las esperadas son indicadas con una S o L, respectivamente. Se presentan los valores de las distancias interior-punta (I-T, con el sufijo c para clados y con el sufijo n para clados anidados). Los números de clados interiores están en cursivas y negritas). La cadena de inferencia (CI) de la clave proporcionada por Templeton (2004) fue utilizada para interpretar los resultados estadísticos: APD = aislamiento por distancia; FGR = flujo génico restringido; CLD = colonización a larga distancia; FP = fragmentación del pasado; EIG, expansión del intervalo geográfico.

Tomando en consideración que los análisis de clados anidados indicaron que el clado 3-7 presenta una expansión del intervalo geográfico, se calculó la prueba D de Tajima y se efectuó un análisis de mismatch para ellos.

Para el clado 3-7, la prueba D de Tajima ( $D = -0.60$ ,  $P = 0.28$ ) resultó negativa pero no significativa, por lo que no resultó consistente con el modelo de expansión poblacional. Por su parte, la distribución de mismatch presentó una distribución

unimodal (Fig. 24), y los valores de la distribución observados no difieren significativamente de los valores esperados (índice de Raggedness = 0.013, media = 3.10, desviaciones de la suma de cuadrados [SSD] = 0.0022,  $P = 0.96$ ). En los valores podemos observar que el índice de Raggedness fue bajo apoyando un ajuste significativo entre la distribución observada y esperada que indica una expansión poblacional.

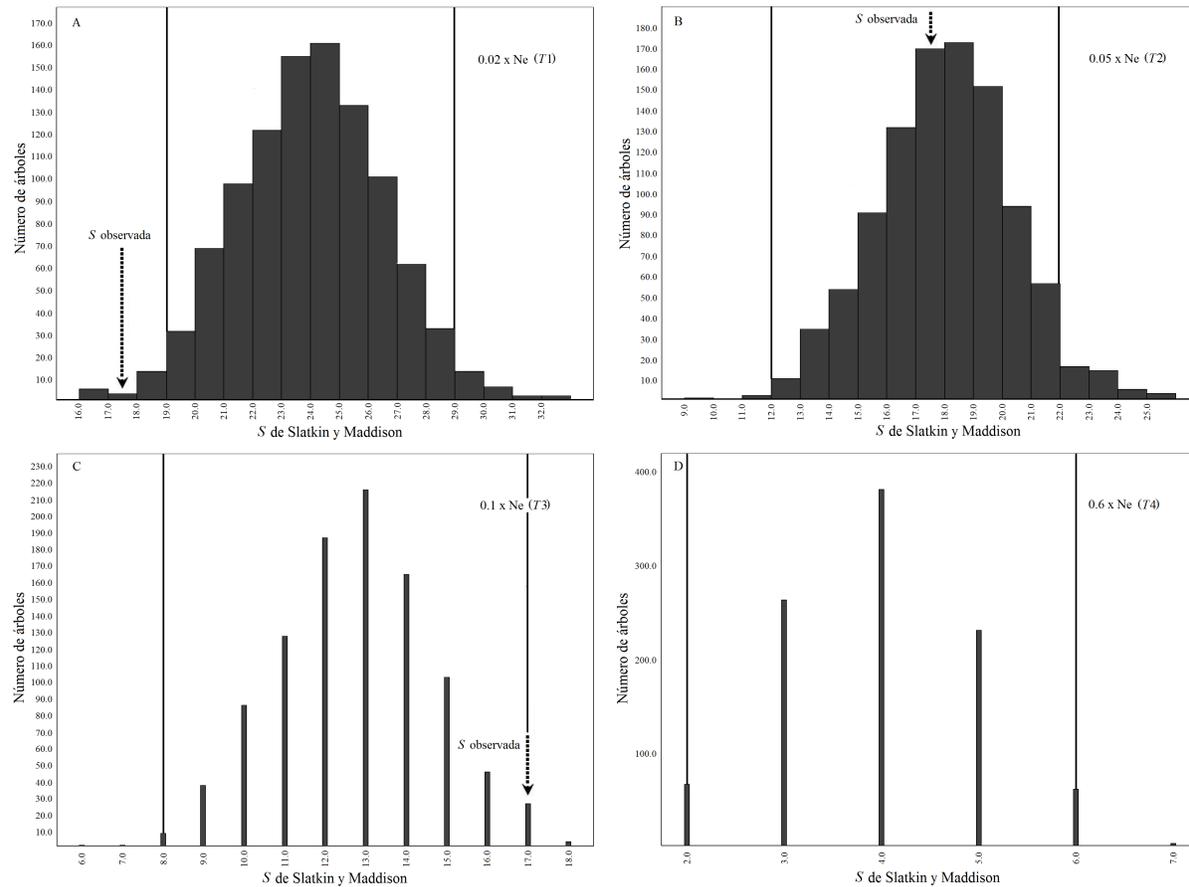


**Figura 24.** Distribución mismatch de los haplotipos del clado 3-7 del NCA. Las líneas con cuadrados indican la distribución observada y las líneas con triángulos indican la distribución esperada bajo un modelo de expansión.

#### 10.10. Simulaciones coalescentes

Con base en las secuencias observadas, se calculó  $S = 3$  y  $S = 17$  (Slatkin y Maddison, 1989) para las hipótesis de un simple refugio y de dos refugios, respectivamente. Para todos los valores de tiempos de divergencia ( $0.6Ne$ ,  $0.1Ne$ ,

0.05Ne, 0.02Ne) usados en las simulaciones con Mesquite, se rechazó la hipótesis de un refugio entre el periodo glacial del Wisconsin y el periodo interglacial del Pleistoceno medio ( $S = 3$ ,  $P > 0.05$ ) (datos no presentados). Nuestros datos apoyan la hipótesis de dos refugios para 0.05Ne ( $S = 17$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 25B), indicando un modelo de separación de las regiones pacífico/golfo vs. sureste hace 50,000 años (25,000 generaciones) aproximadamente. Los restantes valores de tiempos de divergencia usados para el modelo de dos refugios fueron rechazados (Fig. 25A, C y D).



**Figura 25.** Distribución del estadístico de Slatkin y Maddison (1989) para 10,000 árboles génicos simulados dentro de 4 árboles poblacionales. Los árboles

poblacionales difieren en la longitud de las ramas, expresadas como una función del tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ). (A) Longitud de ramas =  $0.02 N_e$  ( $T1$ ). (B) Longitud de ramas =  $0.05 N_e$  ( $T2$ ). (C) Longitud de ramas =  $0.1N_e$  ( $T3$ ). (D) Longitud de ramas =  $0.6N_e$  ( $T4$ ).  $S$  observado = 17 (indicado con flechas). Las líneas negras representan el intervalo de confianza (95%).

## 11. DISCUSIÓN

En este trabajo se presenta el primer estudio sobre la filogeografía de *Pteronotus davyi*, una especie nativa de México y que se distribuye principalmente en bosques tropicales, sobre la cual se desconoce mucho de su biología e historia de vida.

### 11.1. Relaciones filogeográficas

La hipótesis más reciente sobre la distribución de los mormoópidos, incluyendo a *Pteronotus davyi*, sugiere que éstos se diversificaron en el norte del Neotrópico (México y el Caribe) antes de entrar a Sudamérica, señalando que tuvieron un origen neotropical (Dávalos, 2006). No obstante hasta el momento no se cuenta con registros fósiles para *P. davyi* en México por lo que es ambiguo el conocimiento sobre su diversificación y su origen neotropical (Simmons y Conway, 2001). Sin embargo, se tienen pruebas fitogeográficas (León-Cazares y Gómez-Pompa, 1970; Gómez-Pompa, 1973) que indican que durante los periodos fríos del Pleistoceno el hábitat de *P. davyi* (bosque bajo tropical) se desplazó en México, más de una vez, hacia el sur, por lo que es probable que durante estas glaciaciones *P. davyi* haya seguido ese patrón de desplazamiento siguiendo los pulsos de las tierras bajas tropicales. Están documentadas conexiones norte-sur en otros mamíferos a partir de probables corredores pleistocénicos como lo señalan Halffter (1976), Delgadillo (1987) y Schmidly (1977).

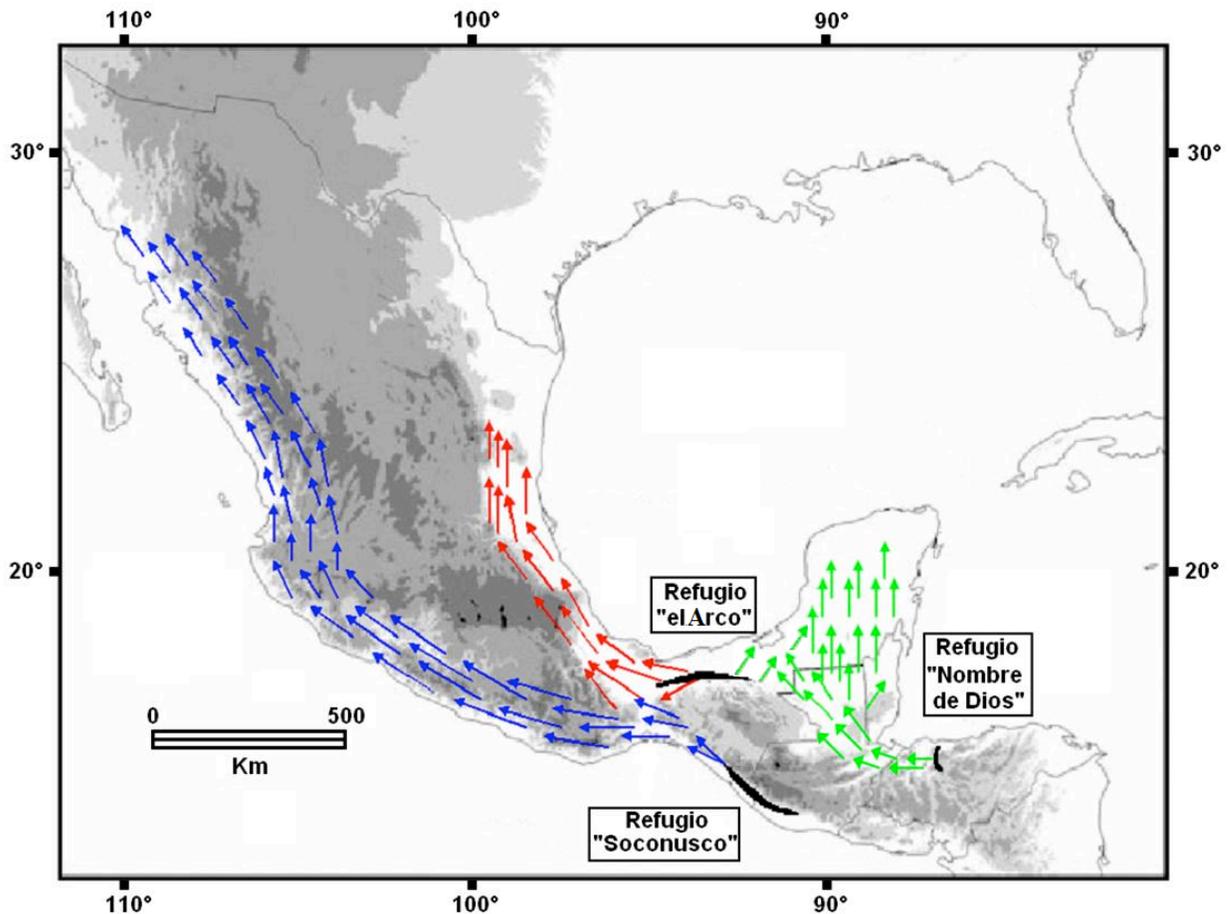
Nuestros resultados sugieren un papel importante de los refugios Pleistocénicos en la estructuración de la diversidad genética de *Pteronotus davyi*.

Las simulaciones coalescentes permiten sugerir que las regiones del pacífico/golfo y sureste fueron colonizadas de acuerdo a un modelo filogeográfico de dos-refugios (valor observado de Slatkin y Maddison,  $S = 17$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 25B), implicando la ocurrencia de una división entre estas dos regiones hace 25,000 generaciones (50,000 años aproximadamente) durante la glaciación de Wisconsin, sin embargo las simulaciones coalescentes no proveen información respecto a las localidades de estos refugios. Sin embargo, algunos análisis tradicionales proporcionan una alternativa para inferir las posibles zonas de los refugios (Avice, 2000).

En este sentido, las diferencias de pares de bases entre haplotipos (mismatch distribution, Rogers y Harpending, 1992) para todas las localidades se distribuyeron en un solo pico (Fig. 14), un patrón que sugiere una expansión poblacional a partir de una distribución centralizada, lo cual pudo haber dado lugar a las poblaciones que están genealógicamente conectadas (Ibrahim *et al.*, 1996). Los valores de diversidad genética y las pruebas de neutralidad apoyan esta predicción (Tablas 6 y 8). Además, las distribuciones de mismatch para las regiones sureste y pacífico/golfo (Fig. 15 y 16) y los datos de diversidad genética sugieren que *P. davyi* pudo haber experimentado una expansión y ocupación de las regiones del pacífico, golfo y sureste del país a partir de refugios localizados cerca del istmo de Tehuantepec.

Se han propuesto refugios potenciales en el sur de México durante los periodos del Pleistoceno: Conroy *et al.* (2001) sugieren las montañas del sur de México; Wendt (1989), por su parte, ha propuesto la zona de Uxpanapa, en el Istmo de Tehuantepec, y en general el “Arco” que abarca desde el extremo sureste de Veracruz hasta el sur de Tabasco y el norte de Chiapas. Además, Toledo (1982) ha

propuesto a las regiones Lacandona y Soconusco, en Chiapas. Así, de acuerdo a las simulaciones coalescentes, es posible que *P. davyi* se haya refugiado en más de una de estas zonas. También es probable que las poblaciones de la región sureste de *P. davyi* en México provengan de refugios pleistocénicos todavía más al sur como el de Nombre de Dios en Honduras (House *et al.*, 2002), utilizados por otros taxa (Aide y Rivera, 1998). La localización de los refugios utilizados por *P. davyi* y el esclarecimiento de su historia evolutiva reciente requiere una extensión del muestreo a otras regiones más meridionales.



**Figura 26.** Posibles refugios pleistocénicos utilizados por *Pteronotus davyi*. Con flechas se indican las posibles rutas de expansión y diversificación que siguió *P. davyi* posterior a las glaciaciones del Pleistoceno. Las flechas en color azul indican las posibles rutas seguidas en la región del pacífico, las flechas en rojo indican las rutas en la región del golfo de México y en verde las rutas de la región del sureste.

Esto indica que estos organismos, a partir de dos refugios, se expandieron para colonizar las regiones pacífico/golfo y sureste. Las simulaciones coalescentes indican que se presentó una división entre estas dos regiones hace 50,000 años aproximadamente. Las topologías filogenéticas (MV, bayesianos y NJ) apoyan una división de las poblaciones de la región del sureste con respecto a las dos regiones costeras (pacífico y golfo), apoyando la existencia de posibles eventos de vicarianza entre las regiones pacífico/golfo y la región del sureste. Esta aseveración también se apoya por los altos valores de  $F_{ST}$  (0.42,  $P < 0.05$ ) entre ellas; por la distancia genética media regional (0.88% pacífico vs. sureste; 0.73% golfo vs. sureste y 0.26% pacífico vs. golfo); y por la existencia de un solo haplotipo común entre ellas (haplotipo 56). Este patrón de divergencia es consistente con el observado en varios taxa de mamíferos terrestres. Por ejemplo, Sullivan *et al.* (2000) reportaron que una separación filogeográfica de las poblaciones trans-ístmicas (subespecies) de *Reithrodontomys sumichrasti* (centro y sureste de México \_ 5.6 to 7.7%); dentro del mismo intervalo de distribución, Sullivan *et al.* (1997) reportaron valores de divergencia de 6.9 a 8.9% en el complejo *Peromyscus aztecus/P. hylocetes*.

### 11.2. Estructuración genética pacífico vs. golfo

Las regiones del pacífico y del golfo presentaron una menor estructuración ( $F_{ST} = 0.23$ ,  $P < 0.05$ ), que lo observado entre estas dos regiones y la región del sureste ( $F_{ST} = 0.42$ ,  $P < 0.05$ ). Entre las regiones pacífico y golfo también se presentaron valores más bajos (0.26%) y altos valores de flujo genético ( $Nm = 2.6$ ), sugiriendo que estas dos últimas regiones actualmente presentan flujo genético.

La compleja orografía actual, representada por la presencia de la Sierra Madre Occidental, el Altiplano Mexicano, la Sierra Madre Oriental y el Eje Volcánico Transversal, formados en periodos anteriores al Cuaternario, con elevaciones por arriba de los 3000 m, podrían actuar como barreras contemporáneas para la dispersión de *P. davyi* entre las regiones del pacífico y del golfo, dado que la mayoría de las poblaciones viven a alturas entre el nivel del mar y los 600 m (Jiménez-Guzmán y Ceballos, 2005), por lo que es poco probable un contacto directo este-oeste. No obstante, no podemos descartar la posibilidad de un contacto en áreas de bajas altitudes en el Istmo de Tehuantepec. Movimientos similares norte-sur han sido descritos para diversas especies de aves de las familias Sittidae, Paridae, Laniidae y Alaudidae (Escalante *et al.*, 1993). Aunque nuestros resultados indican que, entre las regiones costeras del pacífico y del golfo solamente se presentó un haplotipo compartido (haplotipo 40), la estructuración de la red haplotípica, particularmente en los Grupos I y II, señala la presencia de haplotipos de ambas regiones conectados entre sí. Esta hipótesis también es apoyada por los análisis filogenéticos.

Otra posibilidad es que ambas regiones tuvieron un origen común (refugios) con eventos de expansión histórica y aislamiento geográfico. En este sentido, las

simulaciones coalescentes apoyan la posibilidad de refugios pleistocénicos. Es posible que los altos valores de flujo genéticos entre ambas regiones sea un reflejo de linajes compartidos en refugios durante el Pleistoceno. El NCA, también apoya la hipótesis acerca de que la similitud entre los linajes de ambas regiones costeras se debe a procesos históricos.

Sin embargo es necesario analizar con cuidado la interpretación de los NCA debido a que han sido criticados en los últimos años. La crítica más seria de los NCA se refiere a la implementación de las pruebas permutacionales usadas para evaluar los datos (Petit y Grivet, 2002). Como consecuencia, procesos como los cuellos de botella (Johnson *et al.*, 2007) están siendo confundidos con procesos históricos que han determinado la estructura genética, incrementando el riesgo de falsos positivos.

En nuestro estudio, con los análisis de NCA se infieren dos procesos históricos: 1) flujo génico restringido con aislamiento por distancia (FGR con APD), y 2) fragmentación del pasado con expansión del intervalo geográfico (FP con EIG). El primer evento histórico (FGR con APD) se infirió para los clados 2-3 y 4-4 e involucran a poblaciones del pacífico y golfo. Dado que en las relaciones filogenéticas se presentan clados con haplotipos compartidos, los clados 2-3 y 2-4 de los NCA apoyaría la hipótesis de linajes compartidos en refugios durante el Pleistoceno. Entre ambas regiones se obtuvo un valor de flujo genético de 2.96 por lo que es posible que exista una conexión entre ambas regiones en algún punto geográfico, donde evitan las cordilleras orográficas (Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, entre otras) que suelen funcionar como barreras geográficas, como se ha explicado anteriormente.

Para el clado 3-7 se infirió fragmentación con expansión del intervalo geográfico. Este clado también incluye poblaciones de las regiones del pacífico y del golfo. En este caso se debe tener cuidado con la interpretación de la fragmentación entre ambas costas, ya que como se mencionó en el punto anterior existe la posibilidad de un intercambio genético. En lo referente a la expansión, en este estudio hemos planteado la posibilidad de una expansión de *P. davyi* a partir de refugios, que probablemente ocurrió después del inicio del Pleistoceno, lo cual podría apoyar la inferencia de los NCA en este sentido.

A pesar de las críticas de Knowles y Maddison (2002), Petit y Grivet (2002) y Panchal y Beaumont (2007), hacia los NCA, los procesos históricos inferidos en este trabajo con base en estos análisis resultaron congruentes con los resultados obtenidos con otros análisis. Por ejemplo, flujo génico restringido con aislamiento por distancia es apoyado por la prueba de mantel, y la fragmentación del pasado con expansión del intervalo geográfico se sustenta con los análisis filogenéticos y con los valores de diversidad genética y las pruebas de neutralidad.

### **11.3. Estructura intraregional**

En varios trabajos con murciélagos y mamíferos se han encontrado valores de diversidad genética (diversidad nucleotídica) menores o mayores a los encontrados en *P. davyi* (Tablas 3 y 6). Los bajos valores de diversidad nucleotídica en diversas poblaciones del murciélago *Vespertilio murinus* pudieron ser resultado de ausencia de inmigración por parte de algunas colonias (Safi *et al.*, 2007). El murciélago *Myotis myotis* presenta también bajos niveles de diversidad nucleotídica relacionados con la

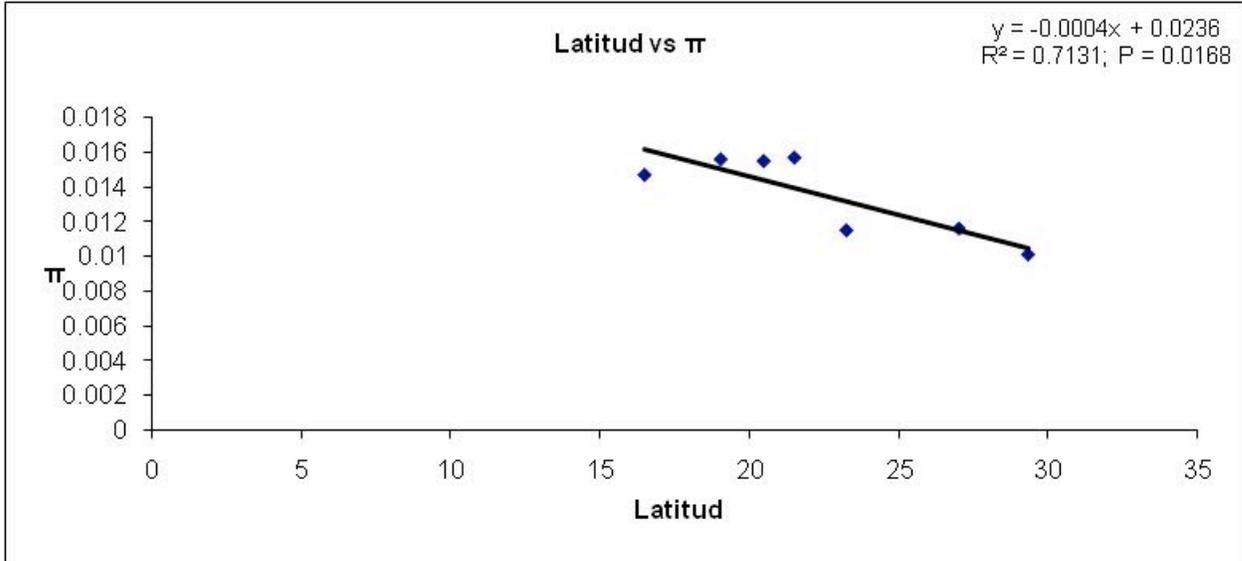
presencia de los Alpes que representan una geográfica para el flujo genético (Ruedi *et al.*, 2008). Rico *et al.* (2008) reportaron que la liebre *Lepus flavigularis* presenta valores bajos de diversidad nucleotídica debido a que se encuentran en áreas geográficas muy restringidas y por lo tanto la deriva genética pudo haber reducido la variabilidad genética, una característica común en especies amenazadas (Frankham, 2005). Por su parte, a nivel general, las poblaciones del murciélago *Leptonycteris curasoae*, que se distribuye también por ambas costas de México, presentaron valores de diversidad nucleotídica similares a los obtenidos para *P. davyi*. Esto indica que la diversidad genética de diversas poblaciones de *P. davyi* (poblaciones de la región del pacífico, Catemaco, Arroyo del Bellaco, Agua Blanca y Sardina) se encuentra dentro de los rangos esperados para el taxón. Otras especies con áreas de distribución mayores, como *Tadarida brasiliensis* presentan valores de diversidad genética en un orden de magnitud más elevados (Russell *et al.*, 2005).

También observamos una tendencia a disminuir la diversidad nucleotídica con el incremento de la latitud en las regiones pacífico y golfo ( $y = -0.0004x + 0.0236$ ,  $r^2 = 0.713$ ,  $P = 0.0168$ ;  $y = -0.0039x + 0.0914$ ,  $r^2 = 0.898$ ,  $P = 0.0142$ ; respectivamente, Figs. 27 y 28). Este patrón geográfico podría estar asociado con una migración post-glacial de la especie hacia el norte del país siguiendo los corredores de bosque bajo tropical de ambas costas, apoyando los escenarios señalados anteriormente. En estudios previos, hay varios ejemplos de empobrecimiento de la diversidad nucleotídica relacionados con expansiones post-glaciales al producirse condiciones ambientales más favorables (e.g., González-Astorga *et al.*, 2006, en plantas en México, y Ruedi y Castella, 2003, en murciélagos). Actualmente, este

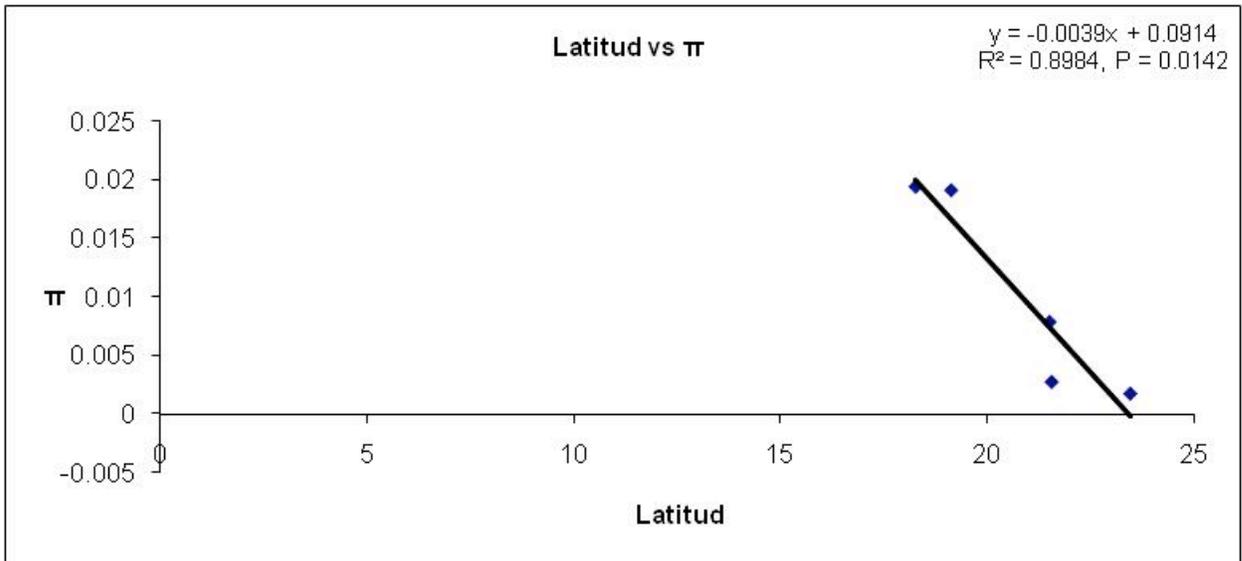
empobrecimiento podría además verse favorecido por el aislamiento de algunas poblaciones debido a una fragmentación del hábitat (González-Astorga y Castillo-Campos, 2004), fenómeno que puede ser especialmente acusado en la costa del golfo, ya que actualmente la zona norte de esta región sufre una disminución acelerada de sus bosques tropicales. Estos planteamientos podrían ayudar a explicar los bajos niveles de diversidad nucleotídica presentados por las poblaciones de San Luis Potosí y Tamaulipas (Pujal, Taninul y Troncones) y la presencia de aislamiento por distancia en esta región ( $z = 110.79$ ,  $P < 0.05$ ). Es importante considerar este tipo de efectos, ya que dicho aislamiento puede tener efectos significativamente deletéreos como endogamia, pérdida de diversidad genética, aumento de la deriva génica con riesgos de desaparición, asociado principalmente a la pérdida del potencial adaptativo de las poblaciones frente a cambios ambientales y a la disminución de la adecuación individual (McCauley, 1991; Mitrovski *et al.*, 2007). En poblaciones fragmentadas, es importante conservar las líneas genéticas existentes, las cuales comúnmente se pierden gracias al efecto fundador; en este sentido Gompper *et al.* (1997) documentaron que los linajes pueden desaparecer a ritmos acelerados, encontrando pérdidas entre el 3 y 87% de las líneas maternas de mamíferos en periodos muy cortos.

Finalmente las poblaciones de la región sureste no presentan aislamiento por distancia como indica la prueba de Mantel ( $z = 61.84$ ,  $P > 0.05$ ) y tampoco se presenta el patrón diversidad nucleotídica-latitud, pero si se observa que las poblaciones de la península de Yucatán muestran una diversidad nucleotídica baja

en comparación con las poblaciones del Istmo de Tehuantepec consideradas dentro de la región sureste (Tabla 6).



**Figura 27.** Correlación lineal entre la latitud y la diversidad nucleotídica de las poblaciones de la región del pacífico de *P. davyi*.



**Figura 28.** Correlación lineal entre la latitud y la diversidad nucleotídica de las poblaciones de la región del golfo de México de *P. davyi*.

#### **11.4. Implicaciones en taxonomía**

Recientemente los análisis filogeográficos han revelado que debido al efecto de las contracciones y expansiones de las áreas de distribución de los organismos durante el Pleistoceno existen linajes crípticos donde se presenta diferenciación morfológica baja (Yahnke *et al.*, 1996; Roman *et al.*, 1999; Hammond *et al.*, 2001) y una profunda divergencia evolutiva que no se refleja en la taxonomía actual, y las especies nominales son frecuentemente encontradas como poli o parafiléticas (Patton y Smith, 1996; Arbogast, 1999; Demboski *et al.*, 1999; Avise, 2000; Riddle *et al.*, 2000). Esto es cierto particularmente para el grupo de los murciélagos debido a la similitud morfológica que presentan a bajos niveles taxonómicos y en quienes se ha comprobado molecularmente que la identificación previa de algunas especies, basadas en caracteres morfológicos, ha sido incorrecta por lo que se ha requerido de una nueva revisión (Barratt *et al.*, 1997; Burland y Wilmer, 2001; Mayer y von Helversen, 2001), lo cual parece ser el caso de las poblaciones de *Pteronotus davyi* en México, al menos a nivel subespecífico.

El concepto de subespecie es subjetivo y controversial. Mayr (1970) definió el término de subespecie como un grupo de poblaciones fenotípicamente similares habitando una subdivisión geográfica del intervalo de una especie. Avise y Ball (1990) adoptaron una definición más restrictiva que requiere de una distinción filogenética entre subespecies, una monofilia específicamente. Para Want *et al.*

(2004), la separación de poblaciones de una especie debido a aspectos geográficos, como glaciares, desiertos, océanos, montañas, entre otros, a lo largo de grandes periodos de tiempo puede llevar a una adaptación y aislamiento genético; si las poblaciones separadas presentan una diferenciación significativa de adaptación a diferentes hábitats o una diferenciación genética significativa, entonces ellas son consideradas como subespecies potenciales en el camino de la especiación.

Se han reconocido tres subespecies para *P. davyi* con base en diferencias en el húmero, fémur y trago: *P. d. fulvus*, *P. d. davyi* y *P. d. incae* (Smith, 1972). La evidencia molecular de este estudio demuestra una diferenciación genética de 1.58-2.52% entre las poblaciones de la región sureste con respecto a las poblaciones de las regiones pacífico/golfo. Estos valores de diferenciación en la región control son similares a los presentados entre subespecies del murciélago hocicudo de Curazao, *Leptonycteris curasoae* (Wilkinson y Fleming, 1996), y apoyan la posibilidad de una distinción taxonómica de las poblaciones de *P. davyi* de estas regiones.

Si a esto añadimos la separación de la región del sureste vs. regiones pacífico/golfo de México en los todos los análisis de este estudio y la ausencia de haplotipos compartidos entre ellas, debido a la presencia del Istmo de Tehuantepec como una posible barrera histórica, entonces probablemente las poblaciones separadas están experimentando un aislamiento genético y procesos de adaptación diferentes, por lo que existe la posibilidad de que México se presenten unidades taxonómicas de *P. davyi* con un patrón de distribución similar al reportado para el murciélago bigotudo de Parnell *Pteronotus parnellii*, con la subespecie *P. p. mesoamericanus* que se extiende en la Península de Yucatán y *P. p. mexicanus* que

se extiende desde Sonora y Tamaulipas hasta Oaxaca y Veracruz (Hall, 1981). También Hall (1981) señala la separación de subespecies de murciélagos, como el murciélago bigotudo de Parnell (*Pteronotus parnellii mesoamericanus* y *P. p. mexicanus*) y el murciélago de cola peluda rojizo (*Lasiurus borealis teliotis* y *L. b. frantzii*). Sin embargo, parece necesario un estudio más general de la diversidad genética de *P. davyi* a lo largo de todo su intervalo de distribución para confirmar la necesidad de esta distinción taxonómica.

### **11.5. Implicaciones de conservación**

El reconocimiento de unidades de conservación por debajo del nivel de especie nivel es una tarea fundamental si queremos evitar la pérdida de la genética diversidad de las especies del país (Moritz, 1994b).

Somos conscientes de los posibles efectos de la estocasticidad evolutiva y en las limitantes para definir unidades de conservación basados exclusivamente en ADNmt, el cual es heredado maternalmente y, por tanto, no refleja el flujo genético mediado por los machos (Moritz, 1994a; Avise, 1995). Sin embargo, ante la ausencia de información al respecto y siguiendo la estrategia de algunos autores (Abellán *et al.*, 2007; Cosson *et al.*, 2007; Pestell *et al.*, 2008; Roman *et al.*, 1999) se propusieron posibles unidades de conservación usando un marcador mitocondrial.

Algunos autores (Bowen, 1999; Crandall *et al.*, 2000) han sugerido la incorporación información de sistemas ecológicos y/o de datos genéticos de significancia adaptativa en la formulación de unidades de conservación. Hasta la fecha, no hay pruebas de que las poblaciones de *P. davyi* en México presenten

ninguna divergencia adaptativa (morfológicos o ecológica), y la obtención de datos ecológicos, de comportamiento o historia de vida están más allá de los objetivos originales de este estudio. Sin embargo, la estructuración genética encontrada en este estudio pueden haber promovido una adaptación local en dos regiones (pacífico/golfo y sureste), por lo que puede ser importante mantener el potencial adaptativo de la especie en ambas zonas. Por lo menos el aislamiento histórico representa una acumulación de nuevas mutaciones entre las poblaciones de estas regiones.

*Pteronotus davyi* se encuentra ubicada en la categoría de bajo riesgo de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, 2007), no se ubica en ninguna de las categorías de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2007) y tampoco se encuentra bajo algún régimen de protección de acuerdo con la NOM-059-ECOL-2001 (SEMARNAP, 2002). No obstante, el valor total de la diversidad nucleotídica (0.0172) de *P. davyi* en México, resultó similar al valor estimado para algunas especies en peligro de extinción (e.g. chitas [*Acinonyx jubatus*],  $\pi = 0.0130$ , Freeman *et al.*, 2001) y de algunas especies amenazadas (e.g. Quetzal [*Pharomachrus mocinno*],  $\pi = 0.0171$ , Solórzano *et al.*, 2004), con base en secuencias nucleotídicas de la región control mitocondrial. Si a esto añadimos que la pérdida de hábitat en los últimos años ha sido drástica, por ejemplo entre 1970 y 2000 fueron destruidos aproximadamente 661 km<sup>2</sup> de bosques de niebla en el sureste de México (Solórzano *et al.*, 2003), y entre 1990 y 2000, un 27% de las selvas tropicales secas de México fueron alteradas y

fragmentadas (Dirzo y Trejo, 2001), podemos entender la necesidad de identificar unidades de conservación para *P. davyi* en México.

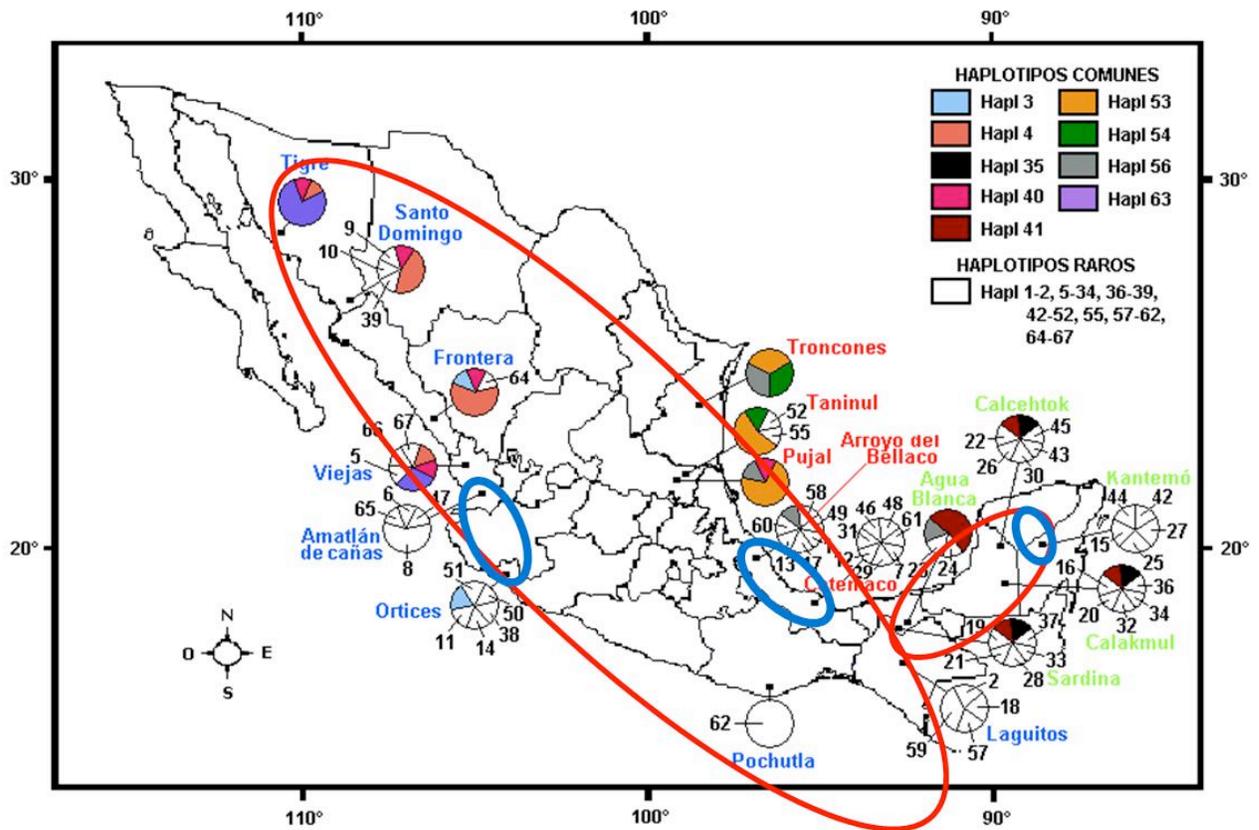
Los conceptos de “unidades evolutivas significativas” (o ESU, por sus siglas en inglés) y “unidades de manejo” (MU, por sus siglas en inglés) proveen una herramienta útil en la conservación genética (Moritz, 1994; Avise, 2004). Las ESU's pueden tratarse de poblaciones distintas genéticamente del resto o que han estado históricamente aisladas (Soltis y Gitzendanner, 1999; Fraser y Bernatchez, 2001). Según la definición de Ryder (1986), las ESU's son “unidades poblacionales que merecen manejo propio y que tienen una alta prioridad de conservación”. Dentro de cada ESU es posible encontrar poblaciones que pueden ser manejadas de forma independiente, es decir Unidades de Manejo, sin que esto implique considerarlas subespecies. La categoría de unidad de manejo consiste en una o más poblaciones que presentan una diferenciación significativa en sus haplotipos mitocondriales, y son importantes para la conservación de una especie, ya que representan poblaciones conectadas por flujo genético bajo y, por lo tanto demográficamente tienen cierta independencia, además de que han servido para reconocer poblaciones demográficamente distintas que deben ser manejadas para asegurar la viabilidad de las ESU's que son más grandes (Moritz, 1994).

El presente estudio ofrece un primer acercamiento en la definición de ESU's y MU's para *P. davyi*. Con base en los cladogramas filogenéticos y en la red haplotípica de este trabajo se apoya la existencia de dos grupos filogeográficos dentro del intervalo geográfico de *P. davyi* en México, por un lado el pacífico/golfo, y por otro lado, el sureste, sugiriendo que ambos filogrupos están históricamente

aislados y que son casi exclusivamente monofiléticos, por lo cual se proponen como unidades evolutivas significativas (Fig. 29). En este contexto, si a las diferencias genéticas entre ambos grupos, obtenidas en este estudio, añadimos la gran heterogeneidad ambiental a la cual se encuentran sujetas (las poblaciones de la región del pacífico y golfo de México se encuentran ubicadas en zonas de selva baja y selva mediana y alta, además en la región del pacífico también se presentan bosques templados, mientras que las poblaciones de la región del sureste se ubican casi exclusivamente en zonas de selva mediana y alta), podemos inferir que estas diferencias posiblemente se encuentran reflejadas en caracteres morfológicos e historia de vida. Por ello, es necesario efectuar estudios morfológicos, demográficos y sobre la historia de vida de *P. davyi* a lo largo de estas dos zonas geográficas que permitirían corroborar estas distinciones y apoyar la presencia de dos ESU's para *P. davyi*.

Por otro lado, dentro de cada uno de los ESU's propuestos en este trabajo, se observó una estructura compleja en los índices de diversidad genética, por lo cual se decidió proponer unidades de manejo dentro de cada una de ellas. Para la unidad evolutiva significativa correspondiente a las regiones pacífico y golfo de México, se proponen a las poblaciones Amatlán de cañas y Ortices, para el pacífico, y Catemaco y Arroyo del Bellaco, para el golfo de México, como unidades de manejo ya que presentan una diferenciación significativa en sus haplotipos mitocondriales y hay bajo o nulo porcentaje de haplotipos compartidos (Fig. 13 y 29), lo cual es indicativo de flujo genético bajo. Para la ESU correspondiente a la región sureste, se propone a Kantemó como unidad de manejo, debido a que presenta las características

señaladas para las anteriores MU's propuestas. Ahora, si tomamos en cuenta que un amplio y bien conocido criterio usado para determinar áreas prioritarias de conservación es identificar aquellas áreas que mantienen una alta diversidad genética (Enrlich y Wilson, 1991), en este trabajo los valores de diversidad haplotípica más altos para *P. davyi* (Tabla 6) correspondieron principalmente a las poblaciones de la región sureste, lo cual apoya la propuesta de ubicar una MU en la región del sureste. Esta primera definición de ESU's y MU's necesita ser complementada y/o corroborada por estudios que empleen marcadores nucleares y caracteres cuantitativos.



**Figura 29.** Propuesta de ESU's (óvalos rojos) y MU's (óvalos azules) para *Pteronotus davyi* en México.

## 12. CONCLUSIONES

Marcadores mitocondriales empleados:

- El marcador mitocondrial citocromo b resultó poco informativo para tratar de dilucidar patrones filogeográficos, debido al bajo número de cambios nucleotídicos, y por consiguiente, pocos sitios parsimoniosamente informativos presentados entre los individuos de diversas poblaciones de *Pteronotus davyi*.
- Por su parte, el marcador molecular región control se caracterizó por su alta resolución debido al alto número de sitios parsimoniosos informativos presentados, que permitieron inferir relaciones filogenéticas intraespecíficas y efectuar análisis filogeográficos para *Pteronotus davyi*, por lo cual se recomienda como un marcador adecuado para efectuar estudios a nivel poblacional en esta especie.

Los resultados del presente trabajo sobre la Filogeografía del murciélago *Pteronotus davyi*, con base en el fragmento hipervariable HVII de la región control mitocondrial permitieron efectuar las siguientes conclusiones:

- Los objetivos fueron cubiertos y la hipótesis aceptada, dado que nuestros análisis resultaron congruentes e indicaron que las poblaciones de *P. davyi* en México están divididas filogeográficamente en dos grandes grupos (región

pacífico/golfo y región sureste) estructuradas por barreras geográficas al flujo génico (orografía e Istmo de Tehuantepec) según varios modelos de aislamiento por distancia y fragmentación histórica. Además, las poblaciones de la especie experimentaron sucesivas contracciones y expansiones en el área su distribución en México durante los periodos más críticos del Pleistoceno, con posteriores expansiones hacia las regiones Pacífico/Golfo y Sureste, a partir de dos refugios pleistocénicos ubicados en el sur del país. Esta información indica que el área de distribución actual de *P. davyi* en México ha sido el resultado de una historia evolutiva reciente compleja.

### 13. PERSPECTIVAS

- Es necesario efectuar, a corto plazo, un muestreo más meridional, específicamente incluir poblaciones de Centroamérica, Belice y Guatemala, para determinar si se apoya la hipótesis sobre la utilización de posibles refugios pleistocénicos en Guatemala por parte de *Pteronotus davyi*, con una posible expansión posterior hacia la península de Yucatán.
  
- Se recomienda elaborar, a mediano plazo, un estudio filogeográfico de *P. davyi* a lo largo de toda su distribución geográfica, ya que permitirá determinar haplotipos ancestrales, mediante la teoría de coalescencia, que podrán ser utilizados como grupos externos para este grupo. Este objetivo toma mayor relevancia si consideramos que esta fue una de las principales limitantes presentadas en este trabajo. Por otro lado, el conocimiento de la Filogeografía “total” de *P. davyi* permitirá complementar los resultados de este trabajo, así como los datos presentados por Dávalos (2006) sobre la diversificación de los mormoópidos en el continente americano.
  
- También es preciso realizar estudios sobre la Filogeografía en México de otras especies de murciélagos de la familia Mormoopidae, tales como *P. personatus* y *P. parnellii*, y de murciélagos de otras familias, como *Artibeus jamaicensis* o *Natalus stramineus*, pertenecientes a las familias Phyllostomidae y Natalidae respectivamente, que comparten la distribución de *P. davyi*, con la finalidad de

elaborar un análisis de Filogeografía comparada, lo cual permitirá comparar los patrones históricos de Filogeografía intraespecífica de diferentes especies codistribuidas para plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión e identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieran haber influido en ellos. Si a esto añadimos el empleo de marcadores nucleares, como el intrón ZFY (Zinc Finger gene, por sus siglas en inglés) relacionado con el cromosoma Y, el cual ha sido empleado a nivel intraespecífico en mamíferos, o el uso de microsatélites, esto permitiría además determinar los patrones patrilineales en la especie, y compararlos con las hipótesis evolutivas obtenidas a partir de marcadores mitocondriales.

- Hay una posible incongruencia entre los caracteres morfológicos y genéticos de las poblaciones de *P. davyi* en México, ya que de acuerdo a Smith (1972) los taxa son morfológicamente similares, mientras que en este estudio se obtuvo que los taxa de las regiones pacífico/golfo vs. sureste presentan una tendencia a diferenciarse genéticamente. Esto presenta una interesante oportunidad para conducir un estudio morfológico que permita identificar qué caracteres, si los hay, corresponden a las distintas unidades taxonómicas encontradas en este trabajo.

#### 14. LITERATURA CITADA

- Abellán, P., J. Gómez-Zurita, A. Millán, D. Sánchez-Fernández, J. Velasco, J. Galián e I. Ribera. 2007. Conservation genetics in hypersaline inland waters: mitochondrial diversity and phylogeography of an endangered Iberian beetle (Coleoptera: Hydraenidae). *Conservation Genetic*, 8: 79-88.
- Adams, J. K. 1989. *Pteronotus davyi*. *Mammalian species*, 346: 1-5.
- Aguirre-Planter, E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. En: *Ecología molecular* (L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, comps.). Pp. 49-61. SEMARNAT, CONABIO, UNAM. 504 p.
- Aide, T. M. y E. Rivera. 1998. Geographic patterns of genetic diversity in *Poulsenia armata* (Moraceae): implications for the theory of Pleistocene refugia and the importance of riparian forest. *Journal of Biogeography*, 25: 695-705.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19: 716-723.
- Alexandrino, J., J. W. Arntzen y N. Ferrand. 2002. Nested clade analysis and the genetic evidence for or population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity*, 88: 66-74.
- Almeida, F. C., L. S. Maroja, M. A. M. Moreira, H. N. Seuánez y R. Cerqueira. 2005. Population structure and genetic variability of mainland and insular populations of the Neotropical water rat, *Nectomys squamipes* (Rodentia, Sigmodontinae). *Genetics and Molecular Biology*, 28: 693-699.

- Alvarez-Castañeda, S. T. y J. L. Patton. 2004. Geographic genetic architecture of pocket gopher (*Thomomys bottae*) populations in Baja California, Mexico. *Molecular Ecology*, 13: 2287-2301.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers y D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Armstrong, N. K. 2006. Phylogeographic structure in *Rhinonictoris aurantia* (Chiroptera: Hipposideridae): implications for conservation. *Acta Chiropterologica*, 8: 63-81.
- Arbogast, B. S. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography of the New World flying squirrels (*Glaucomys*): implications for Pleistocene biogeography. *Journal of Mammalogy*, 80: 142-155.
- Arnold, M. L., R. L. Honeycutt, R. J. Baker, V. M. Sarich y J. K. Jones. 1982. Resolving a phylogeny with multiple data sets: a systematic study of phyllostomid bats. *Occasional Papers of the Museum Texas Tech University*, 77: 1-15.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York. 541 p.
- Avise J. C. 1995. Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9: 686-690.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, USA. 447 p.
- Avise, J. C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York. 684 p.

- Avise, J. C. y Ball, Jr. R. M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. En: Oxford surveys in evolutionary biology (D. Futuyma y J. Antonovics, eds.). Pp. 45-67. Oxford: Oxford University Press. 314 p.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball Jr., E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb y N. C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 18: 489-522.
- Barratt, E. M., R. Deaville, T. M. Burland, M. W. Bruford, G. Jones, P. A. Racey y R. K. Wayne. 1997. DNA answer the call of pipistrelle bat species. *Nature*, 387: 138-139.
- Bateman, G. C. y T. A. Vaughan. 1974. Night activities of mormoopid bats. *Journal of Mammalogy*, 55: 45-65.
- Bonaccorso, F. J., A. Arends, M. Genoud, D. Cantoni y T. Morton. 1992. Thermal ecology of mustached and ghost-faced bats (Mormoopidae) in Venezuela. *Journal of Mammalogy*, 73: 365-378.
- Bowen, B. W. 1999. Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. *Molecular Ecology*, 8: 5-10.
- Bowie, R. C. K., J. Fjeldsa, S. J. Hackett y T. M. Crowe. 2004. Molecular evolution in space and through time: mtDNA phylogeography of the Olive Sunbird (*Nectarinia olivacea/obscura*) throughout continental Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 56-74.

- Brant, S. V. y G. Ortí. 2003. Phylogeography of the Northern short-tailed shrew, *Blarina brevicauda* (Insectivora: Soricidae): past fragmentation and postglacial recolonization. *Molecular Ecology*, 12: 1435-1449.
- Braun, J. K. 1988. Systematics and biogeography of the southern flying squirrel, *Glaucomys volans*. *Journal of Mammalogy*, 69: 422-426.
- Brown, G. G., G. Gadaleta, G. Pepe, C. Saccone y E. Sbisà. 1986. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Biology*, 192: 503-511.
- Brown, W. M. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 77: 3605-3609.
- Brown, W. M., M. George Jr. y A. C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 1967-1971.
- Burland, T. M. y J. W. Wilmer. 2001. Seeing in the dark: molecular approaches to the study of bat populations. *Biological Review*, 76: 389-409.
- Campbell, P., Ch. J. Schneider, A. M. Adnan, A. Zubaid y T. H. Kunz. 2004. Phylogeny and phylogeography of Old World fruit bats in the *Cynopterus brachyotis* complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 764-781.
- Cann, R. L., M. Stoneking y A. C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36.

- Carleton, M. D., O. Sánchez y G. Urbano-Vidales. 2002. A new species of *Habromys* (Muroidea: Neotominae) from Mexico, with generic review of species definitions and remarks on diversity patterns among Mesoamerican small mammals restricted to humid montane forest. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 115: 488-533.
- Castelloe, J. y A. R. Templeton. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 102–113.
- CITES. 2007. <http://www.cites.org>
- Clement, M., D. Posada y K. A. Crandall 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9: 1657-1660.
- Conroy, C. J., Y. Hortelano, F. A. Cervantes y J. A. Cook. 2001. The phylogenetic position of southern relictual species of *Microtus*. *Mammalian Biology (Zeitschrift für Säugetierkunde)*, 66: 332-344.
- Coskun, P. E., Ruíz-Pesini E. y D. C. Wallace. 2003. Control region mtDNA variants: longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.*, 100: 2174-21726.
- Cosson, L., L. Grassman Jr., A. Zubaid, S. Vellayan, A. Tillier y G. Veron. 2007. Genetic diversity of captive binturongs (*Arctictis binturong*, Viverridae, Carnivora): implications for conservation. *Journal of Zoology*, 271: 386-395.
- Crandall, K. A. y A. R. Templeton. 1996. Applications of intraspecific phylogenetics. En: *New uses for new phylogenies* (P. H. Harvey, A. J. Leigh

- Brown, J. Maynard Smith y S. Nee, eds.). Pp. 81-99. New York: Oxford University Press. 349 p.
- Crandall, K. A., A. R. Templeton y C. F. Sing. 1994. Intraspecific phylogenetics: Problems and solutions. En: Phylogeny Reconstruction (R. W. Scotland, D. J. Siebert y D. M. Williams, eds.). Pp. 273-297. Oxford: Clarendon Press. 400 p.
  - Crandall, K. A., O. R. P. Bininda-Emonds. G. M. Mace y R. K. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 17:390-395.
  - Czaplewski, N. J. y C. Cartelle. 1998. Pleistocene bats from cave deposits in Bahia, Brazil. *Journal of Mammalogy*, 79: 784-803.
  - Czaplewski, N. J. y G. S. Morgan. 2003. Fossil bats of the Americas. [http://www.snomnh.ou.edu/collections%26research/vertebrate\\_paleontology/fossil\\_bats/index\\_shtml](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.
  - DeChaine, E. G. y A. P. Martin. 2006. Using coalescent simulations to test the impact of Quaternary climate cycles on divergence in an alpine plant-insect association. *Evolution*, 60: 1004-1013.
  - Delgado, P. y D. Piñero. 2002. Sistemática filogeográfica y sus aplicaciones a la evolución y conservación de los bosques de coníferas en México: el caso de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*. *Acta Universitaria*, 12: 3-19.

- Demboski, J. R., Stone, K. D. y Cook, J. A. 1999. Further perspectives on the Haida Gwaii glacial refugium. *Evolution*, 53: 2008-2012.
- Dirzo, R. e I. Trejo. 2001. Selvas tropicales secas de México: un ecosistema de importancia planetaria. En: *Fundamentos de conservación biológica. Perspectivas latinoamericanas* (R. Primack, R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo y F. Massardo, eds.). Pp. 106-107. Fondo de cultura económica. 797 p.
- Eguiarte, L. E. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En: *La evolución biológica* (J. Núñez-Farfán y L. E. Eguiarte, comps), pp 35-50. UNAM. México. 457 p.
- Eizirik, E., S. L. Bonatto, W. E. Johnson, P. G. Crawshaw Jr., J. C. Vié, D. M. Brousset, S. J. O'Brien y F. M. Salzano. 1998. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two neotropical cats (Mammalia, Felidae). *Journal of Molecular Evolution*, 47: 613-624.
- Eizirik, E. J-h. Kim, M. Menotti-Raymond, P. G. Crawshaw jr., S. J. O'brien y W. E. Johnson. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10: 65-79.
- Emmons, L. H. 1997. *Neotropical rainforest mammals: a field guide*. 2a. edición. University Chicago Press. Chicago. 396 p.
- Enrich, P. y E. O. Wilson. 1991. Biodiversity studies: science and policy. *Science*, 253: 758-762.
- Escalante, P. P., A. Navarro y A. Townsend. 1993. A geographic, ecological, and historical analysis of land bird diversity in Mexico. En: *Biological diversity of*

Mexico: origins and distribution (T. P. Ramamoorthy, ed.). Pp. 281-307. Oxford University Press, New York. 851 p.

- Eshelman, R. E. y G. S. Morgan. 1985. Tobagan recent mammals, fossil vertebrates, and their zoogeographical implications. National Geographic Society Research Reports, 21: 137-143.
- Esposti, M. D., S. De Vries, M. Crimi, A. Ghelli, T. Patarnello y A. Meyer. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. Biochimica et Biophysica Acta, 1143: 243-271.
- Excoffier, L., P. Smouse y J. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131: 479-491.
- Felsenstein, J. 1973. Maximum Likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. Systematic Zoology, 22: 240-249.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. Journal of Molecular Evolution, 17: 368-376.
- Fernando, P., M. E. Pfrender, S. E. Encalada y R Lande. 2000. Mitochondrial DNA variation, phylogeography and population structure of the Asian elephant. Heredity, 84: 362-372.
- Foran, D. R, J. E. Hixson y W. M. Brown. 1988. Comparisons of ape and human sequences that regulate mitochondrial DNA transcription and D-loop DNA synthesis. Nucleic Acids Research, 16: 5841-61.

- Frankham, R. J. 2005. Genetics and extinction. *Biological conservation*, 126: 131-140.
- Fraser D. J. y L. Bernatchez. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 2741-2752.
- Freeman, A. R., D. E. MacHugh, S. McKeown, C. Walzer, D. J. McConnell y D. G. Bradley. 2001. Sequence variation in the mitochondrial DNA control region of wild African cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Heredity*, 86: 355-362.
- Fullerton, S. M., A. G. Clark, K. M. Weiss, D. A. Nickerson, S. T. Taylor, J. H. Stengård, V. Salomaa, E. Vartiainen, M. Perola y E. Boerwinkle. 2000. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: Implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism. *American Journal of Human Genetics*, 67: 881-900.
- Fumagalli, L., P. Taberlet, L. Favre y J. Hausser. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 31-46.
- Gillespie, J. H. 1998. Population genetics. A concise guide. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 174 p.
- Gómez-Pompa, A. 1973. Ecology of the vegetation of Veracruz. En: *Vegetation and vegetational history of northern Latin America* (A. Graham, ed.). Pp. 73-148. Elsevier Publishing Company, Amsterdam. 393 p.
- Gómez-Zurita, J., E. Petitpierre y C. Juan. 2000. Nested cladistic analysis, phylogeography and speciation in the *Timarcha goettingensis* complex (Coleoptera, Chrysomelidae). *Molecular Ecology*, 9: 557-570.

- Gompper, M. E. P. B. Stacey y J. Berger. 1997. Conservation implications of the natural loss of lineages in wild mammals and birds. *Conservation biology*, 11: 857-867.
- González-Astorga, J. y G. Castillo-Campos. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos and Lorence (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany-London*, 93: 521-528.
- González-Astorga, J., A. P. Vovides, P. Octavio-Aguilar, D. Aguirre-Fey, F. Nicolalde-Morejón y C. Iglesias. 2006. Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 533-544.
- Goropashnaya, A. V., V. B. Fedorov, B. Seifert y P. Pamilo. 2004. Limited phylogeographical structure across Eurasia in two red wood ant species *Formica pratensis* and *F. lugubris* (Hymenoptera, Formicidae). *Molecular Ecology*, 13: 1849-1858.
- Graham, A. 1993. Historical factors and biological diversity in Mexico. En: *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution* (T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa, eds.). Pp. 109-127. Oxford University Press, New York. 851 p.
- 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. Annals Natural History*, 4:1-7.

- Greenberg, B. D., Newbold, J. E. y A. Sugino. 1983. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*, 21: 33-49.
- Griffiths, R. C. 1980. Lines of descent in the diffusion approximation of neutral Wright-Fisher models. *Theoretical Population Biology*, 17:40-50.
- Halffter, G. 1976. Distribución de los insectos en la zona de transición mexicana: relaciones con la entomofauna de Norteamérica. *Folia Entomológica Mexicana*, 35: 1-64.
- Hall, B. G. 2005. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22: 792-802.
- Hall, E. R. 1981. *The mammals of North America*. Second edition. John Wiley & Sons, New York. 1181 p.
- Hammond, R. L., W. Macasero, B. Flores, O. B. Mohammed, T. Wachter y M. W. Bruford. 2001. Phylogenetic reanalysis of the Saudi gazelle and its implications for conservation. *Conservation Biology*, 15: 1123-1133.
- Harding, R. M. 1996. New phylogenies: An introductory look at the coalescent,. En: *New uses for new phylogenies* (P. H. Harvey, A. J. Leigh Brown, J. Maynard Smith y S. Nee, eds.). Pp. 15-22. Oxford University Press, Nueva York. 349 p.
- Harpending, R. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591-600.
- Harris, D. D. S. Rogers y J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus fulvus* (Rodentia: Muridae) based on cytochrome b sequence data. *Molecular Ecology*, 9: 2129-2135.

- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1997. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 542 p.
- Herd, R. M. 1983. *Pteronotus parnelli*. Mammalian Species, 209: 1-5.
- Hey, J. 2006. IM. <http://lifesci.rutgers.edu/~heylab/HeylabSoftware.htm#IM> (last accessed 21 April 2008).
- Hidalgo-Mihart, M.G., L. Cantú-Salazar, A. González-Romero y C. A. López-González. 2004. Historical and present distribution of coyote (*Canis latrans*) in Mexico and Central America. Journal of Biogeography, 31: 2025-2038.
- Hillis, D. M., C. Moritz y B. K. Mable. 1996. Molecular Systematics. 2da. Edición. Sinauer Associates, Sunderland MA. 655 p.
- Hoffmann, F. G. y R. J. Baker. 2001. Systematics of bats of the genus *Glossophaga* (Chiroptera: Phyllostomidae) and phylogeography in *G. soricina* based in the cytochrome-b gene. Journal of Mammalogy, 82: 1092-1101.
- House, P., C. Cerrato y X. D. Vreugdenhil. 2002. Racionalización del sistema nacional de las áreas protegidas de Honduras. Volumen II: Biodiversidad de Honduras. World Institute for Conservation and Environment, WICE, Tegucigalpa, Honduras. 18 p.
- Howell, D. J. y D. Burch. 1974. Food habits of some costa rican bats. Revista de Biología Tropical, 21: 281-294.
- Howell, N. y K. Gilbert. 1988. Mutational analysis of the mouse mitochondrial cytochrome b gene. Journal of Molecular Biology, 203: 607-618.

- Hudson, R. R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. En: Evolutionary Biology (D. J. Futuyma y J. Antonovics, eds.). Pp. 1-44. New York: Oxford University Press. 442 p.
- Hudson, R. R., M. Slatkin y W. P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583-589.
- Huelsenbeck, J. P. 2000. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Distributed by the author. Department of Biology. University of Rochester.
- Hurwood, D. A. y J. M. Hughes. 2001. Nested clade analysis of the freshwater shrimp, *Caridina zebra* (Decapoda: Atyidae), from north-eastern Australia. *Molecular Ecology*, 10: 113-125.
- Huvet, A., S. Lapègue, A. Magoulas y P. Boudry. 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics*, 1: 251-262.
- Ibrahim, K. M., R. A. Nichols y G. M. Hewitt. 1996. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity*, 77:282-291.
- Irwin, D. M., T. D. Kocher y A. C. Wilson. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of Mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32: 128-144.
- Jaarola, M. y J. B. Searle. 2002. Phylogeography of field voles (*Microtus agrestis*) in Eurasian inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11: 2613-2621.

- Jiménez-Guzmán, A. y G. Ceballos. 2005. *Pteronotus davyi*. Pp. 179-180. En: Los mamíferos silvestres de México (G. Ceballos y G. Oliva, eds.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- Johnson, J. A., P. O. Dunn y J. L. Bouzat. 2007. Effects of recent population bottlenecks on reconstructing the demographic history of prairiechickens. *Molecular Ecology*, 16: 2203-2222.
- Kiefer, A. y M. Veith. 2001. A new species of long-eared bat from Europe (Chiroptera: Vespertilionidae). *Myotis*, 39: 5-16.
- Kiefer, A., F. Mayer, J. Kosuch, O. von Helversen y M. Veith. 2002. Conflicting molecular phylogenies of European long-eared bats (*Plecotus*) can be explained by cryptic diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25:557-566.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*, 217: 624-626.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.
- Kirsch, J. A., J. M. Hutcheon, D. G. Byrnes y B. D. Lloyd. 1998. Affinities and historical zoogeography of the New Zealand Short-Tailed bat, *Mystacina tuberculata* Gray 1843, inferred from DNA hybridization comparisons. *Journal of Mammalian Evolution*, 5: 33-64.
- Knowles, L. L. y W. P. Maddison. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, 11: 2623-2635.
- Koopman, K. F. 1984. Bats. En: Orders and families of Recent mammals of the world (S. Anderson y J. K. Jones, eds.). Pp. 145-186. New York: Wiley. 686 p.

- Koopman, K. F. 1993. Order Chiroptera. En: Mammal species of the world, a taxonomic and geographic reference (D. E. Wilson y D. M. Reeder, eds.). Pp. 137-241. Washington, D. C. Smithsonian Institution Press. 1206 p.
- Kumar, S., K. Tamura, I. Jakobsen y M. Nei. 2001. Mega: Molecular Evolutionary Genetic Analysis, Versión 2.1. The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 ([www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)).
- Leach, R. P. 1821a. The characters of three new genera of bats without foliaceous appendages to the nose. Transactions Linnean Society, 13: 69-72.
- Leach, R. P. 1821b. The characters of seven genera of bats with foliaceous appendages to the nose. Transactions Linnean Society, 13: 73-82.
- León-Cazares, J. M. y A. Gómez-Pompa. 1970. La vegetación del sureste de Veracruz. Boletín Especial del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, México, 5: 13-48.
- Lewis-Oritt, N., C. A. Porter y 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.
- Liedloff, A. 1999. Mantel: Mantel nonparametric test calculator, versión 2.0. School of Natural Resource Science Queensland University of Technology, Australia.
- Lloyd, B. D. 2003. The demographic history of the New Zealand short-tailed bat *Mystacina tuberculata* inferred from modified control region sequences. Molecular Ecology, 12: 1895-1911.

- Maddison, W. P. y D. R. Maddison. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.0 <http://mesquiteproject.org>
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- Mardulyn, P. 2001. Phylogeography of the Vosges mountains populations of *Gonioctena pallida* (Coleoptera: Chrysomelidae): a nested clade analysis of mitochondrial DNA haplotypes. *Molecular Ecology*, 10: 1751-1763.
- Masta, S. E., N. M. Laurent y E. J. Routman. 2003. Population genetic structure of the toad *Bufo woodhousii*: an empirical assessment of the effects of haplotype extinction on nested cladistic analysis. *Molecular Ecology*, 12: 1541-1554.
- Matson, J. O. y D. R. Patten. 1975. Notes of some bats from the state of Zacatecas, Mexico. *Contributions in Science, Natural History Museum, Los Angeles County Museum*, 263: 1-12.
- Mau, B., M. Newton y B. Larget. 1999. Bayesian phylogenetic inference via Markov chain Monte Carlo methods. *Biometrics*, 55: 1-12.
- Mayer, F. y O. von Helversen. 2001. Cryptic diversity in European bats. *Proceedings of the Royal Society of London*, 268:1825-1832.
- Mayr, E. 1970. *Populations, species, and evolution*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press. 453 p.
- McCauley, D. E. 1991. Genetic consequences of local population extinction and recolonization. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 5-8.

- McCracken, K. G., W. P. Jonson y F. H. Sheldon. 2001. Molecular population genetics, phylogeography, and conservation biology of the mottled duck (*Anas fulvigula*). *Conservation Genetics*, 2: 87-102.
- Medellín, R., H. Arita y O. Sánchez. 1997. Identificación de los Murciélagos de México: Clave de Campo. Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C. Publ. Esp. México. 83 p.
- Merrill, S. A., F. B. Ramberg y H. H. Hagedorn. 2005. Phylogeography and population structure of *Aedes aegypti* in Arizona. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 304-310.
- Michaux, J. R., E. Magnanow, E. Paradis, C. Nieberding y R. Libois. 2003. Mitochondrial phylogeography of woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) in the western Palearctic region. *Molecular Ecology*, 12: 685-697.
- Mitrovski, P., D. A. Heinze, L. Broome, A. A. Hoffmann y A. R. Weeks. 2007. High levels of variation despite genetic fragmentation in populations of the endangered mountain pygmy possum, *Burramys parvus*, in alpine Australia. *Molecular Ecology*, 16: 75-87.
- Mora, M. S., E. P. Lessa, M. J. Kittlein y A. I. Vassallo. 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy*, 87: 1192-1203.
- Morando, M., L. J. Avila, J. Baker y J. W. J. Sites. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): Evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution*, 58: 842-861.

- Moritz, C. 1994a. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, 3: 401-41.
- Moritz, C. 1994b. Defining “Evolutionary significant units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
- Nei M. 1973 Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Nei, M. y W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 5269-5273.
- Nei, M. y S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- Ochoa H. A. 2008. Diversidad y estructura genética espacio-temporal de la ardilla terrestre del Perote (*Spermophilus perotensis*): implicaciones para su conservación. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. 97 p.
- Olsen, K. M. 2002. Population history of *Manihot esculenta* (Euphorbiaceae) inferred from nuclear DNA sequences. *Molecular Ecology*, 11: 901-911.
- Oshida, T., K. Ikeda, K. Yamada y R. Masuda. 2001. Phylogeography of the japanese giant flying squirrel, *Petaurista leucogenys*, based on mitochondrial DNA Control Region sequences. *Zoological Science Tokyo*, 18: 107-114.
- Palma, R. E., E. Rivbra-Milla, J. Salazar-Bravo, F. Torres-Pérez, U. F. J. Pardinás, P. A. Marquet., A. E. Spotorno, A. P. Meynard y T. L. Yates. 2005.

Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *Journal of Mammalogy*, 86: 191-200.

- Panchal, M. y M. A. Beaumont. 2007. The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. *Evolution*, 61: 1466-1480.
- Patton, J. L. y M. J. Smith. 1996. Paraphyly, polyphyly, and the nature of species boundaries in pocket gophers (genus *Thomomys*). *Systematic Biology*, 43: 11-26.
- Paulo, S., W. C. Jordan, M. W. Bruford y R. A. Nichols. 2002. Using nested clade analysis to assess the history of colonization and the persistence of populations of an Iberian lizard. *Molecular Ecology*, 11: 809-819.
- Pestell, A. J., S. J. B. Cooper, K. M. Saint y S. Petit. 2008. Genetic structure of the western pygmy possum, *Cercartetus concinnus* Gould (Marsupialia: Burramyidae) based on mitochondrial DNA. *Australian Mammalogy*, 29: 191-200.
- Petersen, S. D. y D. T. Stewart. 2006. Phylogeography and conservation genetics of southern flying squirrels (*Glaucomys volans*) from Nova Scotia. *Journal of Mammalogy*, 87: 153-160.
- Petit, R. J. 2008. The coup de grâce for the nested clade phylogeographic analysis? *Molecular Ecology*, 17: 516-518.
- Petit, R. J. y D. Grivet. 2002. Optimal randomization strategies when testing the existence of a phylogeographic structure. *Genetics*, 161: 469-471.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*, 14: 817-818.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 37-45.

- Posada, D., K. A. Crandall y A. R. Templeton. 2000. GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution. *Molecular Ecology*, 9: 487-488.
- Printzen, C., S. Ekman y T. Tonsberg. 2003. Phylogeography of *Cavernularia hultenii*: evidence of slow genetic drift in a widely disjunct lichen. *Molecular Ecology*, 12: 1473-1486.
- Harpending, R. C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, 66: 591-600.
- Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa. 1993. *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York. 851 p.
- Rico, Y. C. Lorenzo, F. X. González-Cózatl y E. Espinoza. 2008. Phylogeography and population structure of the endangered Tehuantepec jackrabbit *Lepus flavigularis*: implications for conservation. *Conservation Genetics*, 9:1467-1477.
- Riddle, B. R., D. J. Hafner, L. F. Alexander y J. R. Jaeger. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA (Online Edition)*.
- Rodríguez, F., J. F. Oliver, A. Marín y J. R. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142: 485-501.
- Rogers, A. R. 1995. Genetic evidence for Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49: 608-615.
- Rogers, A. R. y H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.

- Roman, J., S. D. Santhuff, P. E. Moler y B. W. Bowen. 1999. Population structure and cryptic evolutionary units in the alligator snapping turtle. *Conservation Biology*, 13: 135-142.
- Ronquist, F. y J. P. Huelsenbeck. 2003. MrBayes version 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572-1574.
- Rozas, J. y R. Rozas. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174-175.
- Ruedi, M. y V. Castella. 2003. Genetic consequences of the ice ages on nurseries of the bat *Myotis myotis*: a mitochondrial and nuclear survey. *Molecular Ecology*, 12:1527-1540.
- Ruedi, M., S. Walter, M. C. Fischer, D. Scaravelli, L. Excoffier y G. Heckel. 2008. Italy as a major Ice Age refuge area for the bat *Myotis myotis* (Chiroptera: Vespertilionidae) in Europe. *Molecular Ecology*, 17: 1801-1814.
- Russell, A. L., R. A. Medellín y G. F. McCracken. 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology*, 14: 2207-2222.
- Russell, R. J. 1968. Revision of pocket gophers of the genus *Pappogeomys*. University of Kansas Publication, Museum of Natural History, 16: 581-776.
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1: 9-10.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa, México. 432 p.

- Saccone, C., G. Pesole y E. Sbisà . 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33: 83-91.
- Safi, K., B. König y G. Kerth. 2007. Sex differences in population genetics, home range size and habitat use of the parti-coloured bat (*Vespertilio murinus*, Linnaeus 1758) in Switzerland and their consequences for conservation. *Biological Conservation*, 137: 28-36.
- Salgueiro, P., M. Ruedi, M. M. Coelho y J. M. Palmeirim. 2007. Genetic divergence and phylogeography in the genus *Nyctalus* (Mammalia, Chiroptera): implications for population history of the insular bat *Nyctalus azoreum*. *Genetica*, 130:169-181.
- Sbisà E, F. Tanzariello, A. Reyes, G. Pesole y C. Saccone. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 205: 125-140.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher y W. A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465-474.
- Schneider, S., D. Roessli y L. Excoffier. 2000. Arlequin: A software for population genetic data. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Scribner, K. T., S. L. Talbot, J. M. Pearce, B. J. Pierson, K. S. Bollinger y D. V. Derksen. 2003. Phylogeography of Canada geese (*Branta canadensis*) in western North America. *The Auk*, 120: 889-907.

- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, Miércoles 6 de Marzo de 2002.
- Silva-Taboada, G. 1974. Fossil Chiroptera from cave deposits in central Cuba, with descriptions of two new species (genera *Pteronotus* and *Mormoops*) and the first West Indian record of *Mormoops megalophylla*. *Acta Zoologica Cracoviensia*, 19: 34-73.
- Simmons, N. B. y 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.
- Sites, J. W., J. W. Bickham y M. W. Haiduk. 1981. Conservative chromosome change in the bat family Mormoopidae. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 23: 459-467.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47: 264-279.
- Slatkin, M. y R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555-562.
- Slatkin, M. y W. P. Maddison. 1989. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogeny of alleles. *Genetics*, 123: 603-613.
- Slatkin, R. R. 1994. Gene flow and population structure. En: *Ecological Genetics*. (L. A. Real, ed.). Pp. 3-17. New Jersey, Princeton University Press. 256 p.

- Smith, J. D. 1972. Systematics of the chiropteran family Mormoopidae. Miscellaneous Publications, Museum of Natural History, University of Kansas, 56: 1-132.
- Smith, M. F. y J. L. Patton. 1991. Variation in mitochondrial cytochrome b sequence in South American akodontine rodents (Muridae: Sigmodontinae). *Molecular Biology and Evolution*, 8: 85-103.
- Smouse, P. E, J. C. Long y R. R. Sokal. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. *Systematic Zoology*, 35: 627-632.
- Sokal, R. R. 1979. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Systematic Zoology*, 28: 227-232.
- Solórzano, S., A. J. Baker y K. Oyama. 2004. Conservation priorities for resplendent Quetzals based on analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *The Condor*, 106: 449-456.
- Solórzano, S., M. A. Castillo-Santiago, D. A. Navarrete-Gutiérrez y K. Oyama. 2003. Impacts of the loss of Neotropical highland forests on the species distribution: a case study using Resplendent Quetzal and endangered bird species. *Biological Conservation*, 114: 341-349.
- Soltis P. S. y M. A. Gitzendanner. 1999. Molecular systematics and the conservation of rare species. *Conservation Biology*, 13: 471-483.
- Strimmer, K. y A. Vonhaeseler. 1996. Quartet puzzling: A quartet Maximum-Likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 964-969.

- Sullivan, J., E. Arellano y D. S. Rogers. 2000. Comparative Phylogeography of mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist*, 155: 755-768.
- Sullivan, J., J. A. Markert y C. W. Kilpatrick. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* group (Rodentia: Muridae) inferred using Parsimony and Likelihood. *Systematic Biology*, 46: 426-440.
- Swofford, D. L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima, F. 1983. Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics*, 105: 437-460.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by ADN polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Tamura, K. y M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the Control Region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Templeton, A. R. 1993. The “Eve” hypothesis: A genetic critique and reanalysis. *American Anthropologist*, 95: 51-72.
- Templeton, A. R. 1994. The role of molecular genetics in speciation studies. En: *Molecular Approaches to Ecology and Evolution* (B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner y R. DeSalle, eds.). Pp. 455-477. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Templeton, A. R. 1996. Gene lineages and human evolution. *Science*, 272: 1363.

- Templeton, A. R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.
- Templeton, A. R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789-809.
- Templeton, A. R. 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology*, 17: 1877-1880.
- Templeton, A. R. 2009. Statistical hypothesis testing in intraspecific phylogeography: nested clade phylogeographical analysis vs. approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology*, 18: 319-331.
- Templeton, A. R. y C. F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analysis with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134: 659-669.
- Templeton, A. R., E. Boerwinkle y Ch. F. Sing. 1987. A Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117: 343-351.
- Templeton, A. R., K. A. Crandall y Ch. F. Sing. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and ADN sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132: 619-633.

- Templeton, A. R., E. Routman y C. A. Phillips. 1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, 140: 767-782.
- Toledo, V. M. 1982. Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. En: *Biological diversification in the tropics* (G. Prance, ed.). Pp. 93-111. Columbia University Press, New York. 714 p.
- Tzeng, T. D., S. Y. Yeh y C. F. Hui. 2004. Population genetic structure of the kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) in East Asia inferred from mitochondrial DNA sequences. *ICES Journal of Marine Science*, 61: 913-920.
- UICN. 2007. <http://www.iucnredlist.org/>
- Van Den Bussche, R. A. y S. R. Hooper. 2000. Further evidence for the inclusion of the new Zealand short-tailed bat (*Mystacina tuberculata*) within Noctilionoidea. *Journal of Mammalogy*, 81: 865-874.
- Van Den Bussche, R. A., S. R. Hooper y N. B. Simmons. 2002. Phylogenetic relationships of mormoopid bats using mitochondrial gene sequences and morphology. *Journal of Mammalogy*, 83: 40-48.
- Van Den Bussche, R. A., S. R. Hooper, D. D. Wiedenfeld, D. H. Wolfe y S. K. Sherrod. 2003. Genetic variation within and among fragmented populations of lesser prairie-chickens (*Tympanuchus pallidicinctus*). *Molecular Ecology*, 12: 675-683.

- Vázquez-Domínguez, E. 2007. Filogeografía y vertebrados. En: Ecología molecular (L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, comps). Pp. 441-466. SEMARNAT, CONABIO, UNAM. 504 p.
- Vázquez-Domínguez, E. y R. Vega. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos? En: Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro (E. Vázquez-Domínguez y D. J. Hafner, eds.). Pp. 67-73. Museum of Natural History and Science Bulletin, No. 32, New Mexico. 73 p.
- Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes y A. C. Wilson. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 253: 1503-1507.
- Vilà, C., P. Savolainen, J. E. Maldonado, I. R. Amorim, J. E. Rice, R. L. Honeycutt, K. A. Crandall, J. Lundeberg y R. K. Wayne. 1997. Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, 276: 1687-1689.
- Villa-Ramírez, B. 1967. Los murciélagos de México. *Anales de Instituto de Biología, U.N.A.M.* 491 p.
- Von Helversen, O., K. G. Heller, F. Mayer, A. Nemeth, M. Volleth y P. Gombkötö. 2001. Cryptic mammalian species: a new species of whiskered bat (*Myotis alcathoe* n. sp.) in Europe. *Naturwissenschaften*, 88: 217-223.
- Wang, T. Y., C. S. Tzeng, H. Y. Teng y T. Chang. 2007. Phylogeography and Identification of a 187-bp-Long Duplication within the Mitochondrial Control Region of *Formosania lacustre* (Teleostei: Balitoridae). *Zoological Studies*, 46: 569-582.

- Want, Q.-H., H. Wu, T. Fujihara y S.-G. Fang. 2004. Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, 25: 2165-2176.
- Watterson, G.A. 1975. On the number of segregation sites. *Theoretical Population Biology* 7: 256-276.
- Wendt, T. 1989. Las selvas de Uxpanapa, Veracruz-Oaxaca, México: evidencia de refugios florísticos cenozoicos. *Anales del Instituto de Biología, U.N.A.M., serie Botánica*, 58: 29-54.
- Whorley, J. R., S. T. Alvarez-Castañeda y G. J. Kenagy. 2004. Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the Baja California peninsula. *Molecular Ecology*, 13: 2709-2720.
- Wilkinson, G. S. y T. H. Fleming. 1996. Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 5: 329-339.
- Wilson, D. E. 1973. Reproduction in Neotropical bats. *Periodical Biology*, 75: 215-217.
- Worthington, W. J., C. Moritz, L. Hall y J. Toop. 1994. Extreme population structuring in the threatened ghost bat, *Macroderma gigas*: evidence from mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 257: 193-198.
- Worthington Wilmer, J. y E. Barratt. 1996. A non-lethal method of tissue sampling for genetic studies of chiropterans. *Bat Research News*, 37: 1-3.
- Wright, S. D. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.

- Wright, S. D. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 395-420.
- Yahnke, C. J., W. E. Johnson, E. Geffen, D. Smith, F. Hertel, M. S. Roy, C. F. Bonacic, T. K. Fuller, B. vanValkenburgh y R. K. Wayne. 1996. Darwin's fox: A distinct endangered species in a vanishing habitat. *Conservation Biology*, 10: 366-375.
- Yang, Z. y B. Rannala. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Harkov Caín Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 717:724.

## 15. ANEXO

**15.1. Anexo 1.** Especímenes examinados. Se indican las localidades de colecta, los números de acceso al GenBank y el haplotipos correspondiente. En paréntesis se señala la frecuencia relativa de los haplotipos por localidad.

*Pteronotus davyi* (67). El Tigre, Sonora, 29°34.52'N, 110°49.19'W [EF989080-hapl63 (5); EF989021-hapl4 (1); EF989057-hapl40 (1)]; Santo Domingo, Sonora, 27°02.64'N, 109°00.69'W [EF989021-hapl4 (3); EF989057-hapl40 (1); EF989026-hapl9 (1); EF989027-hapl10 (1); EF989056-hapl39 (1)]; La Frontera, Sinaloa, 23°25.18'N, 105°54.61'W [EF989021-hapl4 (4); EF989020-hapl3 (1); EF989057-hapl40 (1); EF989081-hapl64 (1)]; Las Viejas, Nayarit, 21°51.40'N, 105°08.81'W [EF989080-hapl63 (2); EF989021-hapl4 (1); EF989022-hapl5 (1); EF989057-hapl40 (1); EF989083-hapl66 (1); EF989084-hapl67 (1)]; Amatlán de Cañas, Nayarit, 20°48.46'N, 104°23.54'W [EF989025-hapl8 (2); EF989023-hapl6 (1); EF989064-hapl47 (1); EF989082-hapl65 (1)]; Los Ortices, Colima, 19°04.81'N, 103°43.59'W [EF989020-hapl3 (1); EF989028-hapl11 (1); EF989031-hapl14 (1); EF989055-hapl38 (1); EF989067-hapl50 (1); EF989068-hapl51 (1)]; Pochutla, Oaxaca, 15°48.35'N, 96°29.00'W [EF989079-hapl62 (1)]; Los Laguitos, Chiapas, 16°49.31'N, 93°08.51'W [EF989076-hapl59 (2); EF989019-hapl2 (1); EF989035-hapl18 (1); EF989074-hapl57 (1)]; Catemaco, Veracruz, 18°27.71'N, 95°11.18'W [EF989024-hapl7 (1); EF989029-hapl12 (1); EF989046-hapl29 (1); EF989048-hapl31 (1); EF989063-hapl46 (1); EF989065-hapl48 (1); EF989078-hapl61 (1)]; Arroyo del Bellaco, Veracruz, 19°13.32'N, 96°38.34'W [EF989018-hapl1 (1); EF989030-hapl13 (1); EF989034-hapl17 (1); EF989049-hapl66 (1); EF989073-hapl56 (1); EF989075-hapl58 (1);

EF989077-hapl60 (1)]; El Pujal, San Luis Potosí, 21°51.60'N, 98°56.30'W [EF989070-hapl53 (3); EF989057-hapl40 (1); EF989073-hapl56 (1)]; Taninul, San Luis Potosí, 21°56.11'N, 98°53.16'W [EF989070-hapl53 (2); EF989069-hapl52 (1); EF989071-hapl54 (1); EF989072-hapl55 (1)]; Los Troncones, Tamaulipas, 23°46.20'N, 99°12.17'W [EF989070-hapl53 (2); EF989071-hapl54 (2); EF989073-hapl56 (1)]; La Sardina, Tabasco, 17°27.50'N, 92°46.40'W [EF989036-hapl19 (1); EF989045-hapl28 (1); EF989038-hapl21 (1); EF989050-hapl33 (1); EF989052-hapl35 (1); EF989054-hapl37 (1); EF989058-hapl41 (1)]; Agua Blanca, Tabasco, 17°37.20'N, 92°28.34'W [EF989058-hapl41 (2); EF989040-hapl23 (1); EF989041-hapl24 (1); EF989073-hapl56 (1)]; Calakmul, Campeche, 18°31.37'N, 89°49.42'W [EF989033-hapl16 (1); EF989037-hapl20 (1); EF989049-hapl32 (1); EF989051-hapl34 (1); EF989052-hapl35 (1); EF989053-hapl36 (1); EF989058-hapl41 (1)]; Kantemó, Quintana Roo, 19°55.84'N, 88°47.46'W [EF989059-hapl42 (1); EF989061-hapl44 (1); EF989032-hapl15 (1); EF989042-hapl25 (1); EF989044-hapl27 (1)]; Calcehtok, Campeche, 19°59.42'N, 89°45.83'W [EF989060-hapl43 (1); EF989062-hapl45 (1); EF989039-hapl22 (1); EF989043-hapl26 (1); EF989052-hapl35 (1); EF989058-hapl41 (1); EF989047-hapl30 (1)].

## 15.2. Anexo 2

### 15.2.1. Extracción de ADN total vía fenol-cloroformo

Se lavó la muestra (10 mg) con ddH<sub>2</sub>O tres veces, utilizando un tubo Eppendorf (EPPI) de 600  $\mu$ L. Una vez lavada la muestra, se colocó en un tubo EPPI de 1.5  $\mu$ L y se añadieron 200-300  $\mu$ L del detergente catiónico cetiltrimetilamonio de bromo (CTAB) y 3  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL), para llevar a cabo la digestión y promover el retiro de proteínas, por medio de una incubación a 50°C por 4 hrs. Después de este tiempo, se incluyó un tratamiento con 1  $\mu$ L de RNAsa para la digestión del ARN presente, incubando a 37°C/45 min. Después, utilizando una campana, se agregaron 200  $\mu$ L de fenol al tubo EPPI, se agitó y se centrifugó a 14000 rpm/2-3 min. El fenol es un solvente orgánico que se utiliza para separar las proteínas de los ácidos nucleicos. Las proteínas son hidrofóbicas y se encuentran en la fase orgánica, mientras que los ácidos nucleicos están altamente cargados y se encuentran en la fase acuosa. Por esta razón, con una pipeta pasteur se tomó la parte inferior (fase orgánica) y se desechó, manteniéndose la fase acuosa. Se agregaron nuevamente 200  $\mu$ L de fenol y se repitieron los subsiguientes pasos. Una vez realizada la segunda repetición, se pasó la fase superior (acuosa) a otro tubo EPPI de 1-5  $\mu$ L. Después se añadieron 200  $\mu$ L de cloroformo-isoamil (CI) que también sirve para la separación de las proteínas. Se agitó durante 5 min y se centrifugó a 14000/2-3 min. De la misma manera que con el fenol, se pasó la fase acuosa a otro EPPI de 1.5  $\mu$ L. El ADN contenido en la fase acuosa final se precipitó mediante el agregado del 10% de la muestra total de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y un volumen igual de alcohol absoluto, el cual se agregó lentamente. Se mantuvo a -

20°C toda la noche. Después de este tiempo, se formó una madeja de ADN que se recuperó centrifugando a 14000/10 min. El ADN se lavó dos veces con 600  $\mu$ L de etanol 70°, agitando suavemente, y recuperándose como un pellet al centrifugar a 14000/3 min. El etanol se extrajo con una pipeta pasteur, y los restos de éste se eliminaron por evaporización a temperatura ambiente durante 20 min. La elusión se efectuó con 50  $\mu$ L de buffer TE 1X (10mM Tris, pH 7.5 y 1mM EDTA), incubando la muestra a 45°C/40 min para disolver el pellet. Las muestras se almacenaron a -20°C.

#### **15.2.2. Extracción de ADN total vía método de QIAGEN**

La muestra (10 mg), después de ser lavada con ddH<sub>2</sub>O, se colocó en un tubo EPPI de 1.5mL, adicionando 180  $\mu$ L de amortiguador de lisis (ATL) y 20  $\mu$ L de Proteinasa K, para efectuar la lisis del tejido y degradación de proteínas, por medio de una incubación a 55°C/3 hrs (incubadora Riossa). Posterior a la incubación se agregaron 200  $\mu$ L de amortiguador AL, para eliminar restos de tejidos de la muestra, incubando a 70°C/10 min. Después, para precipitar el ADN, se añadieron 200  $\mu$ L de etanol (100%), cuya mezcla se agregó en una minicolumna Dneasy, la cual se centrifugó a 8000 rpm/2 min (centrifuga Beckman GS-15R); se decantó el sobrenadante. Después se agregaron 500  $\mu$ L de amortiguador AW1 y 500  $\mu$ L de AW2, en dos pasos subsecuentes, seguidos de una centrifugación a 8000 rpm/2 min y una de 12000 rpm/3 min, respectivamente; se decantó el sobrenadante. Estos amortiguadores se emplean para eliminar contaminantes e inhibidores enzimáticos. Al terminar este proceso, se colocó la minicolumna en un EPPI de 1.5 mL, al cual se añadieron 50  $\mu$ L de agua inyectable y se incubó durante 10 minutos a temperatura

ambiente, centrifugando posteriormente a 8000 rpm/1 min, obteniéndose la primera elusión de ADN total. Este último paso fue repetido para obtener la segunda elusión de ADN total. Cabe mencionar que en la primera elusión se encuentra aproximadamente el 60-80% del ADN total. Las muestras se almacenaron a -20°C.

### **15.2.3. Preparación del gel de agarosa**

Se pesó 1g de agarosa y se adicionaron 25 mL de amortiguador TBE 0.5X (Tris-borato 0.045M, EDTA 0.001M) para preparar geles al 1%. Para ello se calentó la mezcla durante 40 segundos, agitando constantemente con el fin de disolver la agarosa completamente. Una vez que la mezcla alcanzó una temperatura de aproximadamente 50°C, se vertió sobre un molde (con el peine previamente colocado), y se dejó enfriar hasta que solidificara el gel de agarosa.

### **15.2.4. Corrimiento electroforético**

Se quitaron las compuertas del moldeado del gel y el peine; el gel se colocó dentro de la cámara de electroforesis, a la cual se le agregaron previamente 300-400 mL de amortiguador TBE 0.5X. Posteriormente se agregaron 4  $\mu$ L de muestra más 1  $\mu$ L de solución de tinción de carga (amortiguador de carga en gel: 0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol FF y 15% Ficol en agua) en los pozos formados por el peine. Se tapó la cámara de electroforesis y se llevó a cabo el corrimiento de la muestra a 65 V y 40 mA (fuente de poder EC250-90) durante 45 minutos, para después ser teñidos con bromuro de etidio (EtBr, 0.1 mg/L). Este colorante tiene la

propiedad de intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN. Debido a esta propiedad es un agente mutagénico y debe manipularse con cuidado.

#### **15.2.5. Visualización del gel**

Para visualizar los geles se utilizó un fotodocumentador Multi Genius de Syngene<sup>MR</sup>, el cual permite, por un lado, exponer los geles tenidos con EtBr a luz ultravioleta (320 nm), y por otro lado, capturar la imagen con ayuda del programa Gene Snap (V. 6.02.05).

#### **15.2.6. Purificación de productos amplificados**

La purificación de los productos amplificados, se siguió el protocolo del kit QIAquick Spin (QIAGEN). Para ello, se añadió a cada muestra 5 volúmenes del amortiguador PB por un volumen del producto amplificado; una vez mezclados, se colocaron en una columna QIAquick y se centrifugaron a 13000 rpm/1 min. Se decantó el sobrenadante. Las columnas se colocaron en un EPPI de 1.5 mL, y se añadieron 30  $\mu$ L de agua inyectable (ddH<sub>2</sub>O); se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 13000 rpm/1 min. Se almacenaron a -20°C. Cabe mencionar que la pureza del templado (purificado) a partir del cual se preparará la reacción de secuenciación debe cumplir con un cociente de absorbancia de A 260/280 entre 1.7 a 1.9. Los valores fuera de este gradiente sugieren la presencia de proteínas, lípidos, sales u otros residuos que inhiben el funcionamiento óptimo del ADN polimerasa.

### **15.2.7. Reacción de secuenciación**

Las reacciones de secuenciación se prepararon utilizando el Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems). En un volumen final de 10  $\mu$ L se utilizaron los siguientes volúmenes: 1  $\mu$ L de cebador [5 pM], 2-5  $\mu$ L de producto purificado (dependiendo de la concentración presentada), 2  $\mu$ L de BigDye terminador V. 3.1 y 2  $\mu$ L de amortiguador 2.5x de ABI Prism<sup>MR</sup>. El volumen de 10  $\mu$ L finales se completó con agua inyectable (ddH<sub>2</sub>O). El programa de la secuenciación consistió de 1 ciclo a 96°C durante 2 min y 25 ciclos de 96°C durante 10seg y 60°C de anillamiento por 4 min.

### **15.2.8. Purificación de la reacción de secuenciación**

Primero, se preparó el sephadex, el cual permite filtrar partículas de 100-300  $\mu$ m. Para ello, se mezclaron 800  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O con 52 mg de sephadex<sup>MR</sup> G-50 por cada reacción de secuenciación, la cual se mantuvo por lo menos 2hrs a 4°C para su hidratación. Transcurrido este tiempo se mantuvo entre 30 min y 1 hr a temperatura ambiente antes de usarlo. Una vez preparado el sephadex, se agregaron 10  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O a cada una de las reacciones de secuenciación, y éstas se vertieron en columnas centriSep, las cuales fueron tapadas por ambos lados. Se eliminó la presencia de burbujas, y se esperó a que se formaran dos fases. Cuando se formaron estas dos fases, las columnas se colocaron en tubos colectores, y se drenaron con el dedo índice o con la misma tapa de las columnas, para eliminar la fase acuosa. Posterior a ello, se centrifugaron las columnas sin tapa a 2800 rpm/2min. Después, las columnas se colocaron en un EPPI de 1.5 mL, previamente

rotulado, y se agregaron los 20  $\mu$ L de la reacción de secuenciación. Se centrifugaron a 2800 rpm/2 min. Finalmente, los EPPI de 1.5 mL se colocaron en la centrifuga de vacío para desecar las muestras. Las muestras desecadas se colocaron dentro de un recipiente obscuro y se mantuvieron a -20°C.

### **15.3. Anexo 3.**

**15.3.1.** Artículo científico aceptado en el Journal of Mammalogy.

Running Head: Phylogeography of *Pteronotus davyi*.

Title: MOLECULAR PHYLOGEOGRAPHY OF *PTERONOTUS DAVYI*  
(CHIROPTERA: MORMOOPIDAE) IN MEXICO

Authors: LUIS M. GUEVARA-CHUMACERO, RICARDO LÓPEZ-WILCHIS,  
FRANCISCO FLORES PEDROCHE, JAVIER JUSTE, CARLOS IBÁÑEZ, AND  
IRENE D. L. A. BARRIGA-SOSA\*

*Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina. Del. Iztapalapa C. P. 09340, México D. F., México Distrito Federal, México D. F. (LGC, RLW)*

*Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina. Del. Iztapalapa C. P. 09340, México D. F., México Distrito Federal, México D. F. (FFP, IBS)*

*Estación Biológica de Doñana (CSIC), Apartado Postal 1056, 41080, Sevilla, España (JJ, CI)*

*Pteronotus davyi* is a tropical bat whose current distribution in Mexico covers the watersheds of the Pacific and the Gulf coasts of Mexico, converges at the Isthmus of Tehuantepec, and continues into the Yucatan peninsula. We evaluated phylogeographic relationships among 18 populations in Mexico using data from the nucleotide sequence of the HVII hypervariable domain of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region from 105 specimens. Extant populations were distributed over three geographic regions (Pacific Coast, Gulf Coast, and Southeastern) that were delineated *a priori* according to floristic characteristics and biogeography. Coalescent simulations supported a phylogeographic model of two refugia situated in the south of Mexico (Arc and Soconusco refuges) during the late Pleistocene, followed by expansion into Pacific Coast, Gulf Coast and Southeastern groups. The populations of the Southeast were genetically divergent from the Pacific and Gulf Coast populations, supporting the existence of two distinct lineages of *P. davyi* in Mexico, likely due to the Isthmus of Tehuantepec acting as a geographical barrier. Our data revealed genetic differentiation of the Pacific and Gulf coastal groups but at a lower level relative to the Southeast; this pattern suggests that the Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental and Sierra Madre of South act as physical barriers to dispersal for *P. davyi*.

Key words: mitochondrial DNA control region, phylogeography, Pleistocene, population structure, *Pteronotus davyi*.

*Pteronotus davyi* (Gray 1838) is an insectivorous bat from the family Mormoopidae, found in Central and South America. It is distinguished from other mormoopids by its small size (forearm <50 mm) and by having the wing membrane joined over its back, which gives the appearance of a bare back (Adams 1989). Three subspecies have recently been recognized (Adams 1989; Smith 1972): *P. d. davyi*, *P. d. incae* and *P. d. fulvus*. In Mexico, only *P. d. fulvus* has been recorded; it is distributed in two separate narrow strips that extend along the Pacific coast (Sonora to Chiapas) and along the Gulf of Mexico (Tamaulipas to Tabasco); the two strips converge in the lowlands of the Isthmus of Tehuantepec and continue southeast into the Yucatan Peninsula (Adams 1989).

The distribution pattern of *P. davyi* is common among other tropical Mexican bats (Medellín et al. 1997) and is generally explained by ecological requirements (Hall 1981). However, phytogeographic findings (Gómez-Pompa 1973; León-Cazares and Gómez-Pompa 1970) suggest that during the coldest periods of the Pleistocene, the tropical lowlands were displaced southward from their prior distribution in Mexico, and during warmer periods they expanded northward along coastal regions. This phenomenon is expected to have caused numerous episodes of vicariance (Sullivan et al. 2000) associated with successive contractions and expansions in the distribution of tropical lowland fauna (Braun 1988; Hidalgo-Mihart et al. 2004; Russell 1968). Thus areas on the Pacific and Gulf coasts of Mexico may have acted as separate Pleistocene refugia (Toledo 1982; Wendt 1989). Isolation between coastal regions likely persists due to the interior mountain systems of the Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental and Sierra Madre del Sur. Previous studies have

shown that these mountain ranges act as geographic dispersal barriers for diverse plant and vertebrate species (Ramamoorthy et al. 1993; Rzedowski 1978). This is likely true of *P. davyi*.

The occurrence of *P. davyi* is documented from the sea level up to 1,500 m, but most of the recorded localities are below 600 m (Jiménez Guzmán and Ceballos 2005), suggesting that mountain peaks up to 3,000 m may act as physical barriers to the species. The Isthmus of Tehuantepec may also act as an east-west or west-east barrier (Graham 1993; Toledo 1982). The isthmus is a transition zone between the Nearctic and Neotropical faunal regions (Escalante et al. 2004; Morrone and Márquez 2001), but the reason it acts as a barrier is unknown.

Few phylogeographic studies have dealt with the native bats of Mexico (Vázquez-Domínguez and Vega 2006), and no such studies examining *P. davyi* have been reported. Although the phylogenetic relationships of *P. davyi* to other taxonomic groups have been inferred (Lewis-Oritt et al. 2001; Simmons and Conway 2001; Van Den Bussche et al. 2002), evolutionary processes at the intraspecific level have yet to be examined.

This work is the first effort to evaluate the phylogeography of *P. davyi* throughout its distribution in Mexico and is based on sequences of the HVII hypervariable domain of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region. Specifically, we sought to infer the phylogenetic and genealogic relationships among populations by analyzing geographic (population and regional) genetic structure and by examining the geographic association among haplotypes.

## MATERIALS AND METHODS

*Samples and study area.*- The tissue samples for this study were collected during the course of a project on echolocation in which animals were captured, measured, biopsied, and released. *Pteronotus davyi* is abundant (not endangered, SEMARNAT 2002; Least Concern, IUCN 2008) and easy to identify in the field. Animal handling and sample collection were conducted in accordance with the guidelines of the American Society of Mammalogists (Gannon et al. 2007).

From a total sample of approximately 440 organisms (20 each from 22 localities), 105 specimens were utilized in the present study. This sampling scheme included 18 populations distributed throughout the species' range in Mexico (Fig. 1; APPENDIX 1). The specimens were grouped according to a priori divisions in the range: the Pacific region (n = 45), the Gulf of Mexico region (n = 29) and the Southeastern region (n = 31). These divisions were based on the floristic provinces described by Rzedowski (1978) and included the mountain systems (Sierra Madre Occidental, Oriental and of South, and the Transversal Volcanic Belt; Fig. 1) that separate coastal populations. The Isthmus of Tehuantepec has also been considered a geographical barrier, because it separates the northern coastal populations from the Southeastern population.

*Tissue Collection, DNA extraction, amplification and sequencing.*- Biopsy samples were obtained from wing membranes using a Biopsy Punch (Fray Products Corp., Buffalo, New York) and preserved in 70% ethanol. Biopsies that were not used in this study were deposited at the Laboratory of Biology and Ecology of Mammals at the Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, by RLW. Total DNA (tDNA)

was extracted with a DNAeasy Tissue Kit according to the manufacturer's instructions (QIAGEN, Inc., Valencia, California). We amplified the complete hypervariable domain HVII of the mtDNA control region via polymerase chain reaction (Saiki et al. 1998), using the primers L16517 and HSC (Fumagalli et al. 1996). Primer HSC includes modifications for this study (5'-TGT TTT AGG GGT TTG GCA G-3'). The reactions were carried out in a total volume of 25  $\mu$ l with approximately 50 ng template DNA, 10  $\mu$ M of each primer, 200  $\mu$ M of each deoxynucleoside triphosphate, 2mM MgCl<sub>2</sub>, and 2.5 units Taq DNA polymerase (QIAGEN, Inc.). The PCR cycles were as follows: 45 s denaturation at 94°C; 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 62°C for 30 s, and extension at 72°C for 70 s; final extension of 4 min at 72°C. The amplified PCR products were purified using the QIAquick kit (QIAGEN Inc.) and used in sequencing reactions with the Big Dye Terminator Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut). Sequencing reactions were electrophoresed in an ABI 3100 automatic sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California). Sequence alignment was conducted with the Clustal W algorithm in the Sequence Navigator 1.0.1 program (Applied Biosystems) using default values for all alignment parameters and adjusted by eye.

*Phylogenetic and genealogical analyses.*- Phylogenetic analysis was performed by maximum-likelihood (ML) in PAUP\* 4.0b10 (Swofford 2002). The best-fit substitution model of sequence evolution was identified with Modeltest 3.06 program (Posada and Crandall 1998). The Akaike information criterion (AIC\_Akaike 1974) recognized the transitional model + invariable sites + gamma shape model

(TIM+I+G\_Rodríguez et al. 1990) as optimal ( $-\ln L = 1495$ ,  $AIC = 3006.5300$ ), with the following base frequencies:  $A = 0.26$ ,  $C = 0.31$ ,  $G = 0.23$  and  $T = 0.20$ . The proportion of invariant sites (I) was 0.8090 and the gamma distribution shape parameter (G) was 0.8037. The ML topology was obtained by a 10,000-step Quartet Puzzling method (Strimmer and Vonhaeseler 1996). A Bayesian analysis was also conducted to assess phylogenetic relationships using the optimal model of evolution determined with Modeltest and the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) technique in MrBayes 3.0 (Huelsenbeck and Ronquist 2001) with the following parameters: Nst = 6, Rates = gamma, Ngen = 2,000,000, frequency = 100, chains = 5. After eliminating the first 2000 trees as “burn-in”, we constructed a majority-rule consensus tree with Bayesian posterior probabilities for each node.

In order to establish haplotype relationships, a haplotypic network was constructed based on statistical parsimony (Templeton et al. 1992; Templeton and Sing 1993) using TCS 1.21 software (Clement et al. 2000). This program allows the user to estimate phylogenetic relationships when there are low levels of divergence and provides a 95% plausible set for all haplotype connections.

*Phylogeographic and genetic structure analyses.*- The average genetic distances among regional groups were evaluated using the Tamura-Nei substitution model (TrN\_Tamura and Nei 1993) implemented in MEGA 2.1 (Kumar et al. 2001). We utilized this model because it has been shown in simulations that if the number of nucleotide substitutions is low (<20%), most models of evolution will render similar genetic distances (Nei and Kumar 2000) and because it is suitable for comparisons of closely related taxa (e.g., Palma et al. 2005).

Isolation by distance was assessed using the Mantel test (Mantel 1967) to determine associations between genetic distances from the TrN model and geographic distances calculated from a 1:3,500,000 scale geographic map of Mexico. Mantel tests were implemented by the program Mantel 2 (Liedloff 1999) with 1,000 permutations.

The existence of hierarchical genetic structure in *P. davyi* throughout its distribution was assessed by an analysis of molecular variance (AMOVA\_Excoffier et al. 1992) with genetic divergence values ( $F_{ST}$ ), using Arlequin 2.0 (Schneider et al. 2000). Three levels of analyses were conducted: i) among all populations; ii) Gulf and Pacific Coast vs. Southeast; and iii) Gulf Coast vs. Pacific Coast. In the latter analyses (ii and iii), variance levels were determined between groups, among populations within groups, and within populations.

Polymorphism levels were estimated by haplotype diversity ( $h$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ), which were determined for each population and between geographic regions with DNAsp 3.14 (Rozas and Rozas 1999). Using the same program, gene flow ( $Nm$ ) among geographic regions was calculated as described by Hudson et al. (1992).

The hypothesis of population expansion was tested using the following neutrality tests in combination: Tajima's  $D$  (Tajima 1989), Fu's  $F$  (Fu 1997), and Fu and Li's (1993)  $F^*$  and  $D^*$ . A negative  $D$  indicates population expansion. If  $F$  is significant but  $F^*$  and  $D^*$  are not, then a history of population growth is indicated. Population expansion was also tested using Ramos-Onsins and Rozas's (2002)  $R_2$ , and von Haeseler et al.'s (1996) expansion coefficient ( $S/d$ ). The latter is the ratio of

the number of variable sites ( $S$ ) to the average number of pairwise nucleotide differences ( $d$ ), as implemented in DNAsP. The  $R_2$  statistic (Ramos-Onsins and Rozas 2002) is based on the difference between the number of singleton mutations and the average number of pairwise nucleotide differences. Population growth is indicated by larger expansion coefficients, while population stationarity is indicated by smaller expansion coefficients (von Haeseler et al. 1996). Finally, the existence of population expansions was investigated with the frequency distribution of pairwise differences between control region sequences (mismatch distribution\_Rogers and Harpending 1992); this analysis was performed in Arlequin 2.0 (Schneider et al. 2000). The null hypothesis of an expanding population (Rogers and Harpending 1992) produces a unimodal distribution, while a ragged distribution indicates a population in stable equilibrium.

*Testing phylogeographic hypotheses using coalescent simulations.*- We used Mesquite 1.03 (Maddison and Maddison 2007) to conduct coalescent simulations. Our approach to these simulations was modified from previous works (Anthony et al. 2007; Knowles and Maddison 2002; Russell et al. 2005; Spellman and Klicka 2006). We conducted simulations under two *a priori* hypotheses of Pleistocene population structure, utilizing the ML tree for control region sequences (see the phylogenetic inferences section): 1) a single-refugium scenario which posits that the Pacific, Gulf and Southeastern populations of *P. davyi* were founded from a single ancestral population (Fig. 2a); 2) a two-refugia scenario in which *P. davyi* populations were founded from two ancestral populations on either coast near the Isthmus of Tehuantepec as proposed by Toledo (1982) and Wendt (1989), (Fig. 2b).

The Isolation with Migration algorithm (IM; Hey 2006) was used to estimate an effective population size of  $N_e = 500$  for the species. For *P. davyi*, one generation is equal to two years (Smith 1972). The branch lengths were expressed as a function of effective population size ( $0.02N_e_{T1}$ ,  $0.05N_e_{T2}$ ,  $0.1N_e_{T3}$ ,  $0.6N_e_{T4}$ ) and of generation time  $\times 2 \times 10^3$ . Extreme values correspond to divergence times dating from the Wisconsin glacial maximum at  $\sim 20,000$  years ago ( $T1$ ) to the mid-Pleistocene interglacial period at  $\sim 610,000$  years ago ( $T4$ ) (DeChaine and Martin 2006). Two arbitrary times were tested for intermediate periods ( $T2 \sim 50,000$  and  $T3 \sim 100,000$ ).

Mesquite was used to simulate 10,000 coalescent genealogies constrained by the population history predicted by each hypothesis being tested. Each hypothesis was tested with the *S* statistic of Slatkin and Maddison (1989). This parameter treats populations as categorical variables and measures the minimum number of sorting (or migration) events implied by the genealogy. For the observed genealogy constrained to fit either the one-refuge or two-refugia model, the observed *S*-value was calculated and compared to the distribution of *S*-values from the coalescent simulations. Comparison of the observed vs. null distribution of *S*-values was used to determine whether the observed genealogy could have been generated under a given model. If the *S*-value of the reconstructed gene tree fell in the lower 5% tail of the distribution of *S*-values from simulated gene trees, the null model was rejected.

## RESULTS

*Composition of nucleotide sequences and haplotypes.*- A 555-bp fragment that covered the complete hypervariable domain HVII of the mtDNA control region of *P.*

*davyi* was sequenced from 105 *Pteronotus davyi* specimens. This fragment contained 56 variable positions. Sixty-seven distinct haplotypes were identified, with the most common being present in 8.6% of tested individuals (haplotype 4). Ten other haplotypes (14.9%) were present in more than one individual (e.g., haplotype 53,  $n = 7$ ; haplotype 63,  $n = 7$ ; and haplotype 41,  $n = 5$ ). Each haplotype was submitted to GenBank (accession numbers EF989018-EF989084 for haplotypes 1-67, respectively).

*Phylogenetic and genealogical analyses.*- Similar topologies were generated by ML and Bayesian analyses using the TIM+I+G model. The topologies indicated a near-complete isolation of the Southeastern populations relative to the Pacific and Gulf Coast populations, with moderate support in bootstrap and posterior probability values. The relationship of the Pacific and Gulf populations was less clear in that they did not resolve as separate clades (Fig. 3). The haplotype network resolved three groups (Fig. 4) congruent with those on the phylogenetic tree.

*Genetic and phylogeographic structure analyses.*- The average genetic distance between groups determined using the TrN model was highest between populations of the Pacific/Gulf vs. Southeastern (2.05%) and lower between the Pacific and Gulf Coast populations (1.77%).

Mantel test results indicated a significant correlation between genetic and geographic distances among the 18 populations (Mantel Coefficient<sub>z</sub> = 7409.75,  $P < 0.05$ ), suggesting isolation-by-distance. The same pattern was observed for Pacific and Gulf Coast regions only ( $z = 3601.93$ ,  $P < 0.05$ ), and among populations of the Gulf Coast region only ( $z = 110.79$ ,  $P < 0.05$ ). When analyzed separately, populations

within the Pacific Coast region ( $z = 964.35$ ,  $P > 0.05$ ) and within the Southeastern region ( $z = 61.84$ ,  $P > 0.05$ ) did not show isolation-by-distance.

AMOVA results indicated that the highest proportion of the genetic variance was within populations (Table 2), but high inter-regional variance was also detected between Pacific/Gulf Coast and Southeastern populations (32.7%), and between Pacific and Gulf Coast regions (12.5%). Regional differentiation values ( $F_{ST}$ ) were high and significant for Pacific/Gulf Coast vs. Southeastern ( $F_{ST} = 0.42$ ,  $P < 0.05$ ), and for Pacific vs. Gulf Coast regions ( $F_{ST} = 0.23$ ,  $P < 0.05$ ).

The three geographical regions contained similar levels of haplotype diversity (0.933-0.972). The nucleotide diversity was low in the Southeastern region (0.0084) compared to Pacific and Gulf Coast regions (0.0149 and 0.0135, respectively; Table 1). Within each region, populations showed high haplotypic diversity (0.524-1.000). The  $\pi$  values were between 0.0018 and 0.0194. In the Gulf region, the populations inhabiting Catemaco and Arroyo del Bellaco (Veracruz) had the highest  $\pi$  values (Table 1). Gene flow, as estimated by an index of the number of migrants ( $Nm$ ) between the Pacific/Gulf and Southeastern regions, was low ( $Nm = 0.86$ ), but higher between the Pacific and Gulf regions ( $Nm = 2.96$ ).

A history of population growth or range expansion was strongly indicated for all regions. The tests of  $F$  and  $R_2$  were significant, but Tajima's D-test, and Fu and Li's  $F^*$  and  $D^*$ -tests were not. The regions were also characterized by high values of the expansion coefficient (Table 3). The mismatch distribution was unimodal (Fig. 5A), indicating a recent range expansion. The Southeastern region also showed a

unimodal distribution. The Pacific and Gulf Coast curves were not strictly unimodal, although they were consistent with recent population growth (Fig. 5B and 5C).

Based on the observed sequences, we calculated  $S = 3$  and  $S = 17$  (Slatkin and Maddison 1989) for the single-refugium and dual-refugia hypotheses, respectively. For all values of divergence times ( $0.6N_e$ ,  $0.1N_e$ ,  $0.05N_e$ ,  $0.02N_e$ ) used in Mesquite simulations, the hypothesis of one refuge between the Wisconsin glacial and mid-Pleistocene interglacial periods ( $S = 3$ ,  $P > 0.05$ ) was rejected (data not shown). Our data support the two-refugia hypothesis for  $0.05N_e$  ( $S = 17$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 6B), indicating a model of Pleistocene separation for the Pacific/Gulf Coast vs. Southeastern regions of approximately 50,000 years (25,000 generations). Other values of divergence times used for the two-refugia model were rejected (Fig. 6A, C and D).

## DISCUSSION

*Phylogeographic relationships.*- The most recent hypothesis regarding the distribution of Mormoopidae, suggested that *P. davyi* originated and diversified in the northern Neotropics (Mexico and the Caribbean) before entering South America (Dávalos 2006). The current distribution pattern of *P. davyi* is best explained by its ecological requirement of low tropical forest (Hall 1981). Phylogeographic data (Gómez-Pompa 1973; León-Cazares and Gómez-Pompa 1970) indicate that during cold periods of the Pleistocene, low tropical forest in Mexico was displaced to the south more than once. During warming periods, low tropical forest expanded north via

corridors as documented for other plants and animals (Delgadillo 1987; Halffter 1976; Schmidly 1977).

Our results suggest a role for Pleistocene refugia in structuring *P. davyi* genetic diversity, and support the biogeographic hypothesis of contraction followed by coastal expansion of lowland tropical forests in Mexico. Although the coalescent simulations in the present study suggest that the Gulf Coast, Pacific Coast and Southeastern regions were colonized from two Pleistocene refugia (Fig. 6B), which split 25,000 generations ago (aprox. 50,000 years) during the Wisconsin glaciation, coalescent simulations provide no information regarding the putative location of these refugia. However, some traditional analyses provide an alternative means of inferring the location of a refugium (Avice 2000). For instance, the mismatch distribution for all localities had a single peak (Fig. 5A). This suggests that populations expanded from a centralized location and are genealogically tightly connected (Ibrahim et al. 1996). The diversity statistics and neutrality tests supported this inference (Tables 1 and 3). Furthermore, mismatch distributions for Pacific/Gulf Coast and Southeastern regions (Fig. 5B and 5C), and nucleotide diversity data, suggest that *P. davyi* may have experienced expansion and occupation of the Pacific, Gulf Coast and Southeastern regions from two refuges located near the Isthmus of Tehuantepec.

Some potential refuges in the South of Mexico during the cold Pleistocene periods have been proposed: 1) Conroy et al. (2001) suggested the mountains in Southeastern Mexico; 2) Wendt (1989) proposed the Uxpanapa zone in the Isthmus of Tehuantepec and the general “arc” that extends from the southeast extremes of Veracruz to Tabasco and Chiapas (Fig. 1); and 3) Toledo (1982) suggested the

Lacandona and Soconusco regions in Chiapas. It is possible that northern populations of *P. davyi* found refuge in Uxpanapa and Chiapas zones and then expanded to their current distribution at the end of the Pleistocene.

It appears that animals from the two refuges expanded to colonize the Southeastern region and the two coastal regions (Pacific and Gulf). This hypothesis is supported by multiple lines of evidence: the phylogenetic topologies; the high average TrN distance (2.05%) and  $F_{ST}$  value (0.42,  $P < 0.05$ ) between the Southeastern and Pacific/Gulf Coast regions; and the existence of only one common haplotype between them (haplotype 56). This pattern of geographic subdivision is consistent with what has been observed in other terrestrial mammalian taxa from the region. For example, Sullivan et al. (2000) found subspecific divergence in *Reithrodontomys sumichrasti* based on the separation of the trans-Isthmian populations from those in central and Southeastern Mexico (5.6 to 7.7% using uncorrected sequence divergence). Sullivan et al. (1997) reported uncorrected sequence divergence values of 6.9 to 8.9% in the *Peromyscus aztecus*/*P. hylocetes* complex along the same geographical feature.

The Southeastern and Pacific-Gulf population groups of *P. davyi* also show a trend of separation in the trans-isthmian region, as revealed by the phylogenetic and genealogical results. Similar geographic patterns have been reported between subspecies of the bats *Leptonycteris curasoae* (Wilkinson and Fleming 1996) and *Pteronotus parnellii* (Hall 1981). Considering this scenario, there are two possible *P. davyi* taxonomic units in Mexico: one that extends into the Yucatan Peninsula and the Isthmus of Tehuantepec and another that stretches from the Pacific Coast including Sonora and Tamaulipas to Oaxaca and along the Gulf coast to Veracruz.

*Genetic structuring Pacific vs. Gulf.*- The Pacific and Gulf regions showed less structure ( $F_{ST} = 0.23$ ,  $P < 0.05$ ) between coasts than that observed between both coasts combined and the Southeastern region ( $F_{ST} = 0.42$ ,  $P < 0.05$ ). They also showed lower divergence values (0.26%) and high levels of gene flow ( $Nm = 2.6$ ), suggesting that they had a common Pleistocene origin. The neutrality tests indicated that these populations later underwent expansion along each coastal slope. Inland mountain ranges with elevations above 3000 m could act as contemporary barriers to dispersal between the Pacific and Gulf regions, given that most *P. davyi* populations live between sea level and 600 m (Jiménez-Guzmán and Ceballos 2005). Thus, the higher similarity between east-west populations reflects a recent, shared past.

Although we observed only one shared haplotype (haplotype 40) between the two coastal regions (Pacific and Gulf), the possibility of gene flow occurring at lower altitudes on the Isthmus of Tehuantepec cannot be ruled out. In fact, this could explain the structuring of the haplotype network, particularly Groups I and II, which contained haplotypes from both regions (Fig. 4). This hypothesis is also supported by the resolved phylogeny, where the Pacific/Gulf Coast clade showed haplotypes from both regions.

*Intraregional structure.*- We observed a tendency toward decreased nucleotide diversity with increasing latitude in both the Gulf Coast and Pacific regions ( $y = -0.0039x + 0.0914$ ,  $r^2 = 0.898$  and  $y = -0.0004x + 0.0236$ ,  $r^2 = 0.713$ , respectively). This geographic pattern is consistent with a post-glacial stepping stone model of expansion toward the north along corridors of tropical lowland forests on both coasts. Decreased nucleotide diversity along the leading edge of a post-glacial expansion

front has been observed in plants (González-Astorga et al. 2006) and other bat species (Ruedi and Castella 2003) from Mexico. Erosion of genetic diversity could also be enhanced by the isolation of some populations due to habitat fragmentation (González-Astorga and Castillo-Campos 2004), a phenomenon that could be particularly acute in the Gulf coast given the current rapid decline of northern tropical forests. This scenario would explain the low levels of nucleotide diversity observed in the populations of San Luis Potosí and Tamaulipas (Pujal, Taninul and Troncones, Table 1) and the presence of isolation by distance in this region ( $z = 110.79$ ,  $P < 0.05$ ). Although populations in the Southeastern region did not show isolation-by-distance ( $z = 61.84$ ,  $P > 0.05$ ) or exhibit a latitude-related diversity pattern, it appears that the Yucatan Peninsula populations have lower diversity than those on the Isthmus of Tehuantepec, suggesting that they too are part of a recent distributional expansion (Table 1).

## CONCLUSIONS

Our analyses indicated that *P. davyi* populations are not panmictic, but rather are structured and separated by geographic barriers according to models of isolation and colonization. We suggest that this occurred mainly during the Wisconsin portion of the Pleistocene. More than 15 bats species (Medellín et al. 1997) as well as other mammals (Hall 1981) have a distribution pattern similar to that of *P. davyi*. This peculiar pattern has traditionally been attributed to ecological characteristics. However, it can be also attributed to complex historical processes. These data reveal the need to gain a perspective on the population structure of *P. davyi* outside of

Mexico, and the need for phylogeographic studies of closely-related species with similar geographic patterns (e.g., *Pteronotus parnellii* or *P. personatus*) to elucidate aspects of co-evolution and/or comparative phylogeography.

## RESUMEN

*Pteronotus davyi* es un murciélago tropical que en México presenta un área de distribución que abarca actualmente las vertientes del Pacífico y del Golfo de México con unión en el Istmo de Tehuantepec, hasta la Península de Yucatán. Evaluamos las relaciones filogeográficas a nivel intraespecífico utilizando datos de secuencias nucleotídicas del dominio hipervariable HVII de la región control del ADN mitocondrial en 105 especímenes de 18 poblaciones en México las cuales se dividieron *a priori* en tres regiones geográficas (Pacífico, Golfo y Sureste) de acuerdo a sus características florísticas y biogeográficas. Las simulaciones coalescentes apoyan un modelo filogeográfico de dos refugios en el sur de México (refugio del Arco y del Soconusco), a partir de los cuales tuvo lugar una expansión durante el Pleistoceno hacia las tres regiones geográficas, seguido por una división que dio origen a la separación de los grupos Pacífico-Golfo y Sureste. Reconocemos una separación genética de las poblaciones de la región Sureste con respecto a las poblaciones de las regiones Pacífico y Golfo, apoyando la posibilidad de dos distintos linajes de *P. davyi* en México, promovido por la presencia del Istmo de Tehuantepec como barrera geográfica. Identificamos una estructura genética diferenciada entre las dos vertientes costeras (Pacífico y Golfo) aunque a un nivel inferior respecto a la región Sureña, detectando una profunda influencia de los sistemas montañosos Sierra

Madre Occidental, Sierra Madre Oriental and Sierra Madre del Sur como barreras físicas para la dispersión de *P. davyi*.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study is part of the doctoral studies of the first author's Ph.D. in Biological Sciences at the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City. CONACYT No. 164703 fellowship was granted to LMG. We thank Biologist A. Soto Castruita, MVZ R. M. Aguilar, and Dr. M. León-Galván for fieldwork support. We also thank Dr. M. A. Briones for facilitating sample collections in Oaxaca as well as to Dr. A. Guillén for his theoretical and practical support. Drs. N. Belfiore and S. M. Wisely provided insightful comments and suggestions that helped improve this manuscript.

## **LITERATURE CITED**

- ADAMS, J. K. 1989. *Pteronotus davyi*. Mammalian species 346:1–5.
- AIDE, T. M., AND E. RIVERA. 1998. Geographic patterns of genetic diversity in *Poulsenia armata* (Moraceae): implications for the theory of Pleistocene refugia and the importance of riparian forest. *Journal of Biogeography* 25:695–705.
- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19:716–723.
- ANTHONY, N. M., M. JOHNSON-BAWE, K. JEFFERY, S. L. CLIFFORD, K. A. ABERNETHY, C. E. TUTIN, S. A. LAHM, L. J. T. WHITE, J. F. UTLEY, E. J. WICKINGS, AND M. W. BRUFORD. 2007. The role of Pleistocene refugia and rivers

- in shaping gorilla genetic diversity in central Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 20432–20436.
- AVISE, J. C. 2000 *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- BRAUN, J. K. 1988. Systematics and biogeography of the southern flying squirrel, *Glaucomys volans*. *Journal of Mammalogy* 69:422–426.
- CLEMENT, M., D. POSADA, AND K. A. CRANDALL. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657–1660.
- CONROY, C. J., Y. HORTELANO, F. A. CERVANTES, AND J. A. COOK. 2001. The phylogenetic position of southern relictual species of *Microtus*. *Mammalian Biology (Zeitschrift für Säugetierkunde)* 66:332–344.
- DÁVALOS, L. M. 2006. The geography of diversification in the mormoopids (Chiroptera: Mormoopidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 88:101–118.
- DELGADILLO, C. 1987. Moss distribution and the phytogeographical significance of the Neovolcanic Belt of Mexico. *Journal of Biogeography* 14:69–78.
- ESCALANTE, T., G. RODRÍGUEZ AND J. J. MORRONE. 2004. The diversification of Nearctic mammals in the Mexican transition zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 83: 327–339.
- EXCOFFIER, L., P. SMOUSE, AND J. QUATTRO. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- FU, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics* 147:915–925.

FU, Y .X., AND W.H LI. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693-709.

FUMAGALLI, L., P. TABERLET, L. FAVRE, AND J. HAUSSER. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *Molecular Biology and Evolution* 13:31–46.

GANNON, W. L., R. S. SIKES, AND THE ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY OF MAMMALOGISTS. 2007. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 88: 809–823.

GÓMEZ-POMPA, A. 1973. Ecology of the vegetation of Veracruz. Pp. 73–148 in *Vegetation and vegetational history of northern Latin America* (A. Graham, ed.). Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

GONZÁLEZ-ASTORGA, J., AND G. CASTILLO-CAMPOS. 2004. Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos and Lorence (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany-London* 93:521–528.

GONZÁLEZ-ASTORGA, J., A. P. VOVIVES, P. OCTAVIO-AGUILAR, D. AGUIRRE-FEY, F. NICOLALDE-MOREJÓN, AND C. IGLESIAS. 2006. Genetic diversity and structure of the cycad *Zamia loddigesii* Miq. (Zamiaceae): implications for evolution and conservation. *Botanical Journal of the Linnean Society* 152:533–544.

GRAHAM, A. 1993. Historical factors and biological diversity in Mexico. Pp. 109–127 in *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution* (T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa, eds.). Oxford University Press, New York.

- 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.
- VON HAESELER, A., A. SAJANTILA, AND S. PÄÄBO. 1996. The genetical archaeology of the human genome. *Nature Genetics* 14:135–140.
- HALFFTER, G. 1976. Distribución de los insectos en la zona de transición mexicana: relaciones con la entomofauna de Norteamérica. *Folia Entomológica Mexicana* 35:1–64.
- HALL, E. R. 1981. *The mammals of North America*. 2nd ed. Vols. I, II. John Wiley & Sons, New York.
- HEY, J. 2006. *IM*. <http://lifesci.rutgers.edu/~heylab/HeylabSoftware.htm#IM> (last accessed 21 April 2008).
- HIDALGO-MIHART, M. G., L. CANTÚ-SALAZAR, A. GONZÁLEZ-ROMERO, AND C. A. LÓPEZ-GONZÁLEZ. 2004. Historical and present distribution of coyote (*Canis latrans*) in Mexico and Central America. *Journal of Biogeography* 31:2025–2038.
- HOUSE, P., C. CERRATO, AND X. D. VREUGDENHIL. 2002. Racionalización del sistema nacional de las áreas protegidas de Honduras. Volumen II: Biodiversidad de Honduras. World Institute for Conservation and Environment, WICE, Tegucigalpa, Honduras.
- HUDSON, R. R., M. SLATKIN, AND W. P. MADDISON. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583–589.
- HUELSENBECK, J. P., AND F. RONQUIST. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17: 754–755.

- IBRAHIM, K. M., R. A. NICHOLS, AND G. M. HEWITT. 1996. Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* 77:282–291.
- IUCN. (2008). 2008 IUCN Red List of Threatened Species. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>
- JIMÉNEZ-GUZMÁN, A. AND G. CEBALLOS. 2005. *Pteronotus davyi*. Pp. 179–180 in *Los mamíferos silvestres de México* (G. Ceballos, and G. Oliva, eds). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- KNOWLES, L. L., AND W. P. MADDISON. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623–2635.
- KUMAR, S., K. TAMURA, I. JAKOBSEN, AND M. NEI. 2001. MEGA version 2.1. *Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software*. *Bioinformatics* 17:1244–1245.
- LEÓN-CAZARES, J. M., AND A. GÓMEZ-POMPA. 1970. La vegetación del Sureste de Veracruz. *Boletín Especial del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, México* 5:13–48.
- 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.
- LIEDLOFF, A. 1999. Mantel: Mantel nonparametric test calculator, version 2.0. School of Natural Resource Science Queensland University of Technology, Australia.
- MADDISON, W. P., AND D. R. MADDISON. 2007. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.0 <http://mesquiteproject.org>
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209–220.

- MEDELLÍN, R., H. ARITA, AND O. SÁNCHEZ. 1997. Identificación de los Murciélagos de México: Clave de Campo. Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C. Publicaciones Especiales México.
- MORRONE, J. J. y J. MÁRQUEZ. 2001. Halffter's Mexican Transition Zone, beetle generalized tracks, and geographical homology. *Journal of Biogeography* 28: 635–650.
- NEI, M. y S. KUMAR. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press.
- PALMA, E. R., ET AL. 2005. Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *Journal of Mammalogy* 86: 191–200.
- POSADA, D., AND K. A. CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note* 14:817–818.
- RAMAMOORTHY, T. P., R. BYE, A. LOT, AND J. FA. 1993. *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York.
- RAMOS-ONSINS, S. E., AND J. ROZAS. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19:2092–2100.
- RODRÍGUEZ, F., J. F. OLIVER, A. MARÍN, AND J. R. MEDINA. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142:485–501.
- ROGERS, A. R., AND H. HARPENDING. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9:552–569.

ROZAS, J., AND R. ROZAS. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174–175.

RUEDI, M., AND V. CASTELLA. 2003. Genetic consequences of the ice ages on nurseries of the bat *Myotis myotis*: a mitochondrial and nuclear survey. *Molecular Ecology* 12:527–1540.

RUSELL, R. J. 1968. Revision of pocket gophers of the genus *Pappogeomys*. University of Kansas Publication, Museum of Natural History 16:581–776.

RUSSELL, A. L., R. A. MEDELLÍN, AND G. F. MCCRACKEN. 2005. Genetic variation and migration in the Mexican free-tailed bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). *Molecular Ecology* 14: 2207–2222.

RZEDOWSKI, J. 1978. *Vegetación de México*. Ed. Limusa, México.

SAIKI, R. K., ET AL. 1998. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487–491.

SCHMIDLY, D. 1977. Factors governing the distribution of mammals in the Chihuahuan desert region. Pp. 163–192 in *Transactions of the Symposium on the Biological resources of the Chihuahuan desert region, United States and Mexico, U.S.* (R. H. Wauer, and D. H. Riskind, eds.). Department of the Interior, National Park Service and Proceedings Series, No. 3, Washington.

SCHNEIDER, S., D. ROESSLE, AND L. EXCOFFIER. 2000. Arlequin: A software for population genetic data. Genetics and biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland.

SEMARNAT (2002) Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial, Miércoles 6 de Marzo de 2002.

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.

SLATKIN, M. AND W. P. MADDISON. 1989. A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 123: 603–613.

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

SPELLMAN, G. M., AND J. KLICKA. 2006. Testing hypotheses of Pleistocene population history using coalescent simulations: phylogeography of the pygmy nuthatch (*Sitta pygmaea*). *Proceedings of the Royal Society B*. 273: 3057–3063.

STRIMMER, K., AND A. VONHAESLER. 1996. Quartet puzzling: A quartet Maximum-Likelihood method for reconstructing tree topologies. *Molecular Biology and Evolution* 13:964–969.

SULLIVAN, J., E. ARELLANO, AND D. S. ROGERS. 2000. Comparative Phylogeography of mesoamerican highland rodents: concerted versus independent response to past climatic fluctuations. *The American Naturalist* 155:755–768.

SULLIVAN, J., J. A. MARKERT, AND C. W. KILPATRICK. 1997. Phylogeography and molecular systematics of the *Peromyscus aztecus* group (Rodentia: Muridae) inferred using parsimony and likelihood. *Systematic Biology* 46:426–440.

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

TAJIMA, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123:597–601.

TAMURA, K., AND M. NEI. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the Control Region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512–526.

TEMPLETON, A. R., AND C. F. SING. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analysis with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134:659–669.

TEMPLETON, A. R., K. A. CRANDALL, AND Ch. F. SING. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and ADN sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132:619–633.

TOLEDO, V. M. 1982. Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. Pp. 93–111 in *Biological diversification in the tropics* (G. Prance, ed.). Columbia University Press, New York.

VAN DEN BUSSCHE, R. A., S. R. HOOFER, AND N. B. SIMMONS. 2002.

Phylogenetic relationships of mormoopid bats using mitochondrial gene sequences and morphology. *Journal of Mammalogy* 83:40–48.

VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E., AND R. VEGA. 2006. ¿Dónde estamos y hacia dónde vamos en el conocimiento genético de los mamíferos mexicanos? Pp. 67–73 in

Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro (E. Vázquez-Domínguez, and D. J. Hafner, eds.). *Museum of Natural History and Science Bulletin*, No. 32, New Mexico.

WENDT, T. 1989. Las selvas de Uxpanapa, Veracruz-Oaxaca, México: evidencia de refugios florísticos cenozoicos. *Anales del Instituto de Biología, U.N.A.M., serie Botánica* 58:29–54.

WILKINSON, G. S., AND T. H. FLEMING. 1996. Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molecular Ecology* 5:329–339.

Figure Legends

Fig. 1. Geographical distribution of *Pteronotus davyi* in Mexico in gray (modified from Hall 1981). The closed circles show the locations of the Pacific region; the closed squares of the Southeastern region; and the open squares of the Gulf of Mexico region. The 18 populations sampled are: TI = Tigre; SD = Santo Domingo; FR = Frontera; VI = Viejas; AC = Amatlán de Cañas; OR = Ortices; PO = Pochutla; LA = Laguitos; CA = Catemaco, AR = Arroyo del Bellaco; PU = Pujal; TA = Taninul; TR = Troncones; SA = Sardina; AB = Agua Blanca; CK = Calakmul; KA = Kantemó; CAL = Calcehtok. Important orographic features of Mexico and possible Pleistocene refuges are shown. Arrows indicate the best supported biogeographic scenario (by all the present analyses).

Fig. 2. Characterization of the population trees representing different models used in the coalescent simulations: (a) single-refuge hypothesis, and (b) two-refugia hypothesis.

Fig. 3. Consensus phylogram reached by maximum-likelihood of 67 *Pteronotus davyi* haplotypes using the TIM+I+G model. This topology is consistent with the Bayesian analysis; below the branches are the Quarter Puzzling bootstrap values and above the branches are the Bayesian *a posteriori* probabilities (X 100). Haplotypes are indicated by a letter (S = Southeastern, P = Pacific, and G = Gulf of Mexico) that indicates the corresponding geographic region, followed by their respective numbers. Bars on the right indicate the geographical distributions of the haplotypes: the

Southeastern region is shown in black and the Pacific/Gulf of Mexico regions in dark gray.

Fig. 4. Statistical parsimony (TCS) network for *Pteronotus davyi* Control Region haplotypes. Haplotypes are represented by numbers within the ovals (1-67); the size of the ovals represents the relative frequency of the indicated haplotype (smallest ovals = 1 individual; large ovals = 9 individuals). Black = Southeastern region; hatched gray = Pacific region; gray = Gulf of Mexico region. Each line connecting an oval/square indicates 1 base pair substitution and each substitution is indicated for each step. The black squares denote hypothetical internodes.

Fig. 5. Mismatch distribution of pairwise nucleotide differences among control region sequences of *Pteronotus davyi*: (A) Overall, (B) Pacific – Gulf, and (C) Southeastern. Solid lines indicate expected distribution under Rogers and Harpending (1992) sudden population expansion model.

Fig. 6. Distribution of Slatkin and Maddison's (1989) gene flow statistics for 10,000 simulated gene trees within four population trees. Population trees differ in their branch lengths, expressed as a function of the effective population size ( $N_e$ ). (A) Branch lengths =  $0.02N_e$ . (B) Branch lengths =  $0.05 N_e$ . (C) Branch lengths =  $0.1N_e$ . (D) Branch lengths =  $0.6N_e$ . Observed  $S = 17$  (indicated by the dashed line). The bold black lines represent the 95% CI for the distribution.

Table 1. Molecular diversity indices are presented for the studied populations and regions. Sample size ( $n$ ), number of haplotypes ( $k$ ), haplotypic or Nei's diversity ( $h$ ), and nucleotide diversity ( $\pi$ ).

Population	$n$	$k$	$h$	$\pi$
PACIFIC REGION	45	25	0.933	0.0149
El Tigre, Sonora	7	3	0.524	0.0101
Santo Domingo, Sonora	7	5	0.857	0.0116
La Frontera, Sinaloa	7	4	0.714	0.0115
Las Viejas, Nayarit	7	6	0.952	0.0157
Amatlán de Cañas, Nayarit	5	4	0.900	0.0155
Los Ortices, Colima	6	6	1.000	0.0156
Pochutla, Oaxaca	1	1	-	-
Los Laguitos, Chiapas	5	4	0.900	0.0147
GULF REGION	29	19	0.933	0.0135
Catemaco, Veracruz	7	7	1.000	0.0194
Arroyo del Bellaco, Veracruz	7	7	1.000	0.0191
El Pujal, San Luis Potosí	5	3	0.700	0.0079
Taninul, San Luis Potosí	5	4	0.900	0.0028
Los Troncones, Tamaulipas	5	3	0.800	0.0018
SOUTHEASTERN REGION	31	25	0.972	0.0084
La Sardina, Tabasco	7	7	1.000	0.0097
Agua Blanca, Tabasco	5	4	0.900	0.0115

Calakmul, Campeche	7	7	1.000	0.0066
Kantemó, Quintana Roo	5	5	1.000	0.0068
Calcehtok, Campeche	7	7	1.000	0.0085
TOTAL	105	67	0.979	0.0172

---

\* The Pochutla (Oaxaca) population was not included in the genetic diversity analysis because only one individual was sampled.

Table 2. Molecular analysis of variance (AMOVA) results for *Pteronotus davyi* populations from the Gulf of Mexico, Pacific, and Southeastern regions. AP = among populations, WP = within populations, AG = among groups, APWG = among populations within groups. Significance level is \*  $P = 0.05$ .

Grouping	Source of variation	Sum of squares	Variance component s	Percentage of variation	$F_{ST}$
General	AP	188.6	1.3	30.1	0.301*
	WP	275.2	3.1	69.9	
Gulf-Pacific vs. Southeastern	AG	85.8	1.8	32.7	0.429*
	APWG	102.9	0.6	10.2	
Gulf vs. Pacific	WP	275.2	3.2	57.1	0.231*
	AG	26.5	0.6	12.5	
	APWG	68.1	0.5	10.6	
	WP	213.1	3.5	76.9	

Table 3. Results of *Pteronotus davyi*'s demographic analyses (includes the expected results under the scenario of population expansion).

	General	Pacific	Gulf	Southeastern	Expansion
Tajima's $D$	-0.538	-0.233	-1.085	-1.496	Not significant
Fu's $F$	-53.408*	-6.257*	-4.268*	-20.031*	Significant
Fu & Li $F^*$	-1.021	-1.191	-0.833	-2.042	Not significant
Fu & Li $D^*$	-1.070	-1.421	-0.532	-1.845	Not significant
Ramos-Onsins & Rozas's $R_2$	0.078*	0.099*	0.091*	0.0624*	Significant
Expansion coefficient ( $S/d$ )	6.177	4.690	5.287	6.825	High

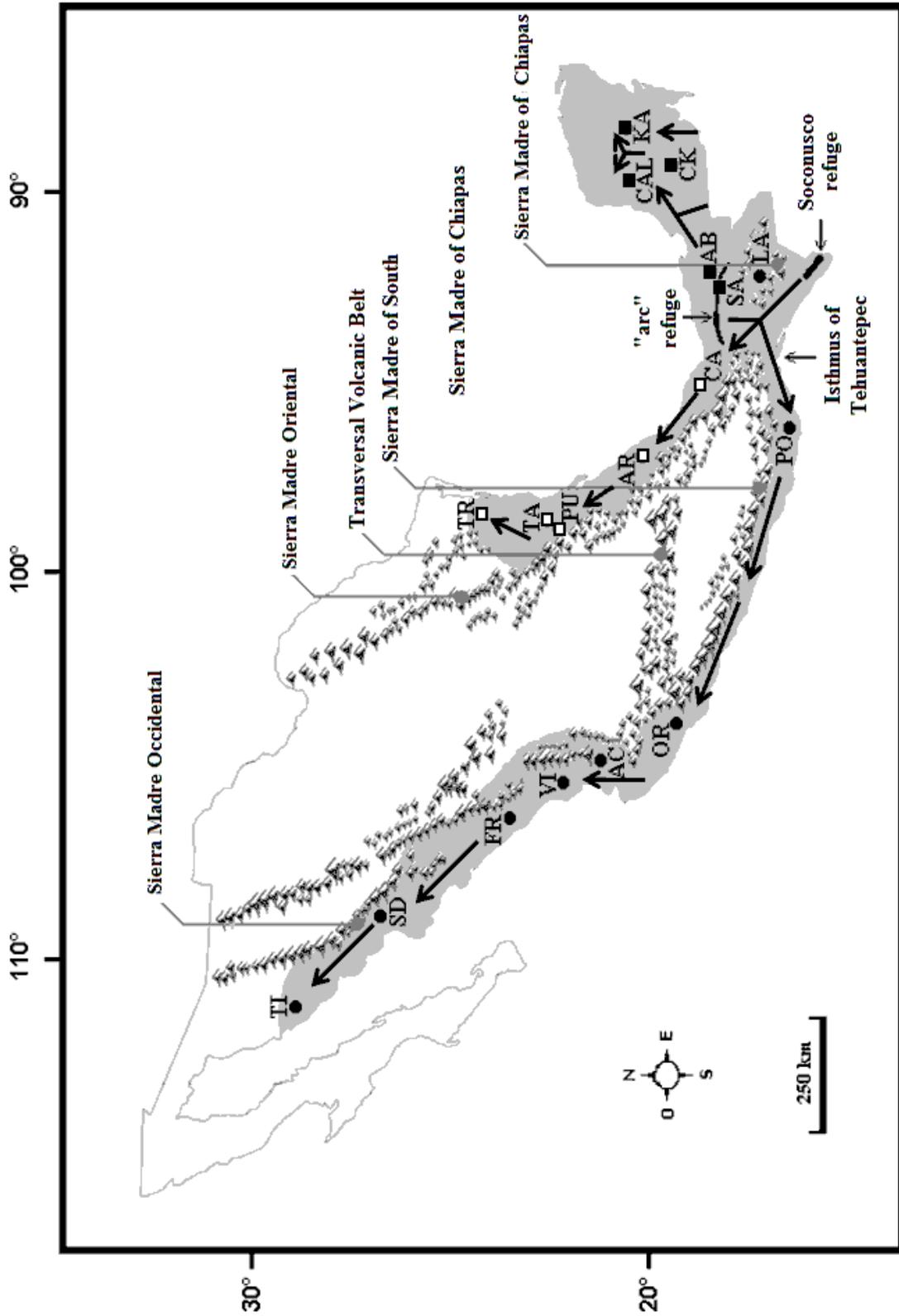
\*  $P < 0.05$

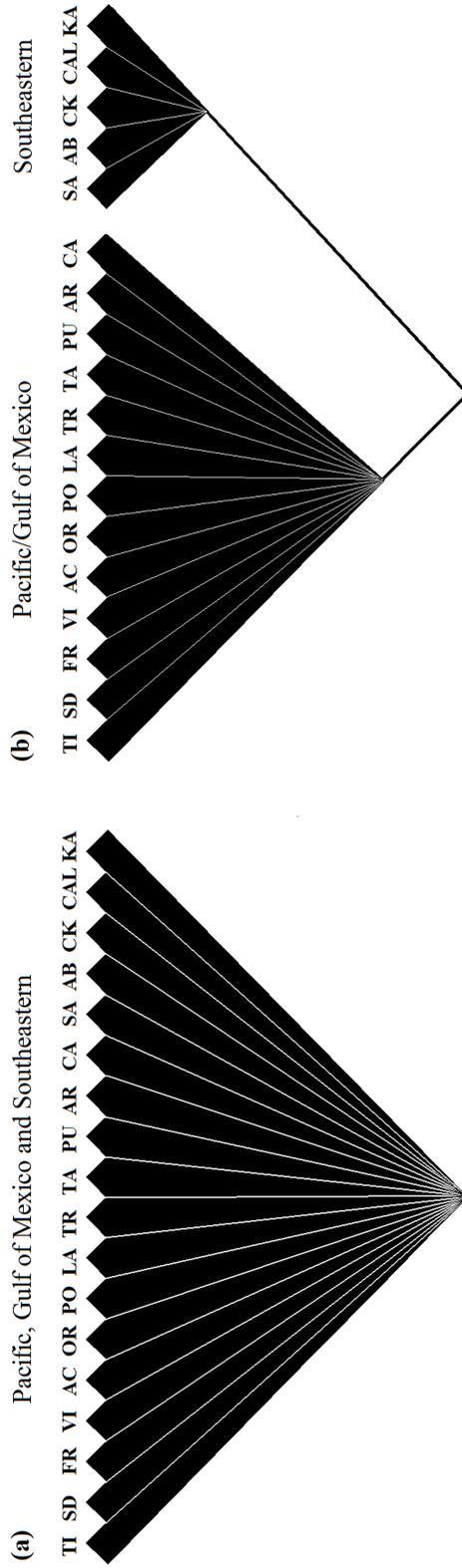
APPENDIX I

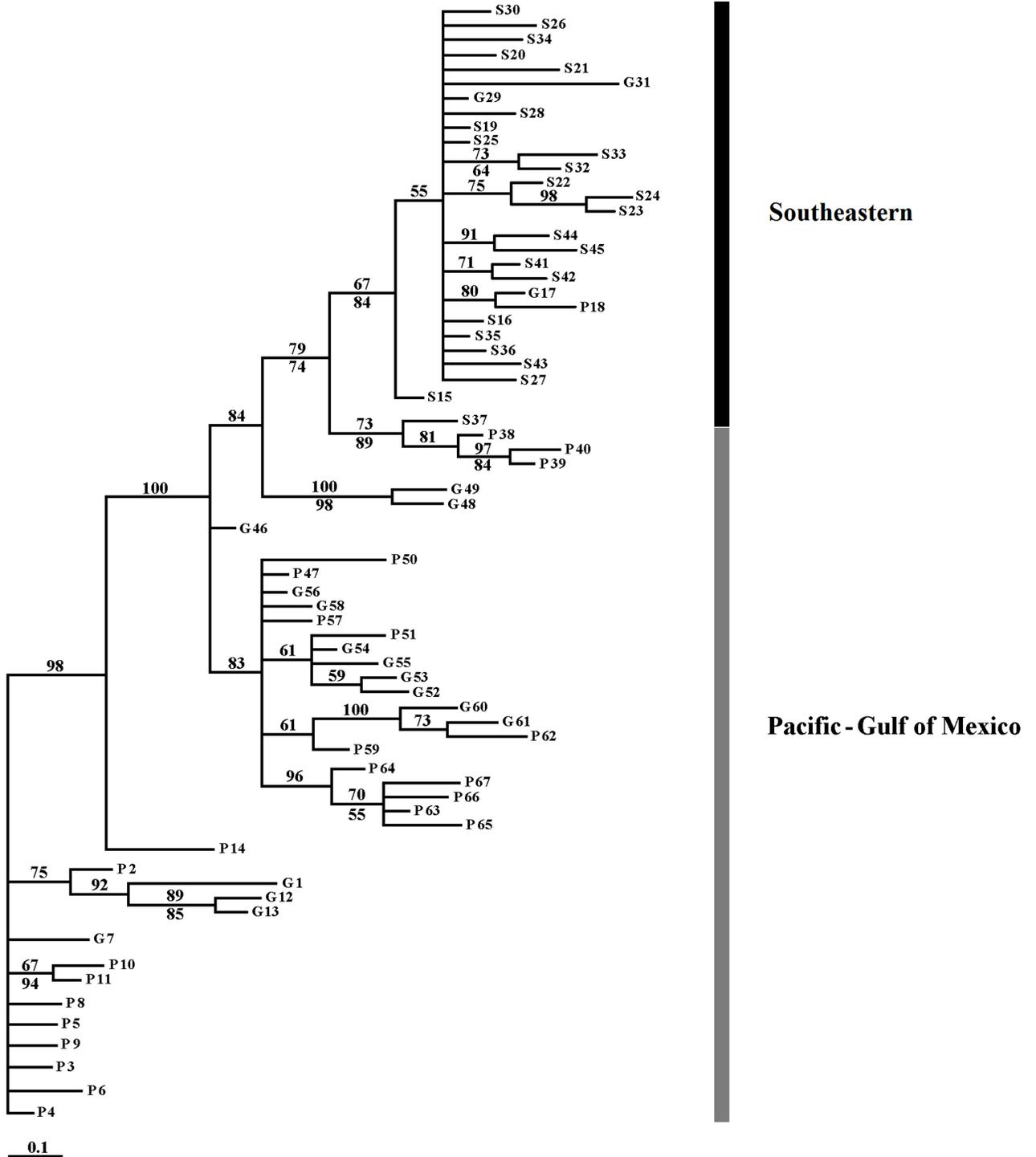
*Specimens examined.* Collection localities, GenBank accession numbers and the corresponding haplotype are provided. The relative frequency of the haplotypes per locality is indicated in parentheses.

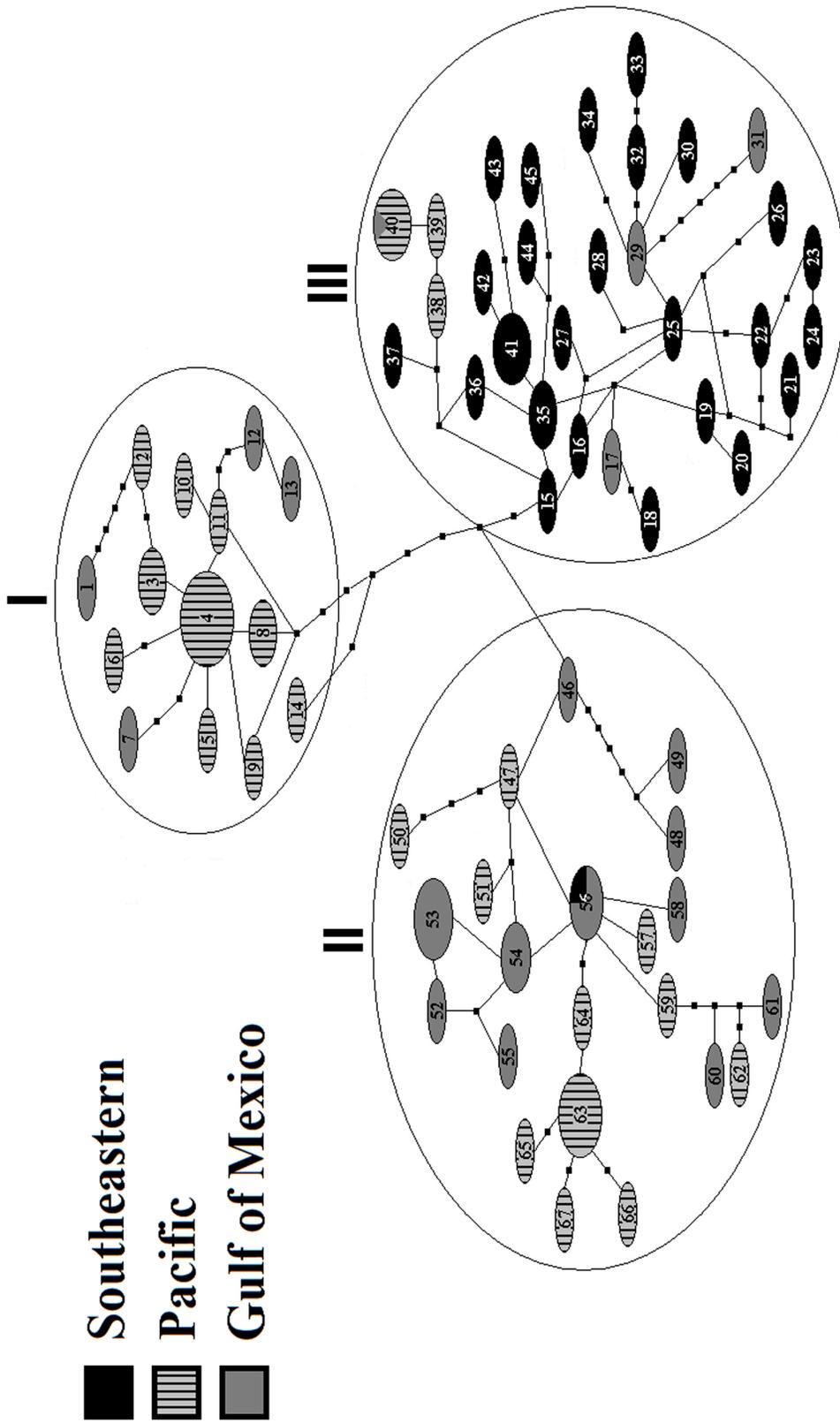
*Pteronotus davyi* (67). El Tigre, Sonora, 29°34.52'N, 110°49.19'W [EF989080-hapl63 (5); EF989021-hapl4 (1); EF989057-hapl40 (1)]; Santo Domingo, Sonora, 27°02.64'N, 109°00.69'W [EF989021-hapl4 (3); EF989057-hapl40 (1); EF989026-hapl9 (1); EF989027-hapl10 (1); EF989056-hapl39 (1)]; La Frontera, Sinaloa, 23°25.18'N, 105°54.61'W [EF989021-hapl4 (4); EF989020-hapl3 (1); EF989057-hapl40 (1); EF989081-hapl64 (1)]; Las Viejas, Nayarit, 21°51.40'N, 105°08.81'W [EF989080-hapl63 (2); EF989021-hapl4 (1); EF989022-hapl5 (1); EF989057-hapl40 (1); EF989083-hapl66 (1); EF989084-hapl67 (1)]; Amatlán de Cañas, Nayarit, 20°48.46'N, 104°23.54'W [EF989025-hapl8 (2); EF989023-hapl6 (1); EF989064-hapl47 (1); EF989082-hapl65 (1)]; Los Ortices, Colima, 19°04.81'N, 103°43.59'W [EF989020-hapl3 (1); EF989028-hapl11 (1); EF989031-hapl14 (1); EF989055-hapl38 (1); EF989067-hapl50 (1); EF989068-hapl51 (1)]; Pochutla, Oaxaca, 15°48.35'N, 96°29.00'W [EF989079-hapl62 (1)]; Los Laguitos, Chiapas, 16°49.31'N, 93°08.51'W [EF989076-hapl59 (2); EF989019-hapl2 (1); EF989035-hapl18 (1); EF989074-hapl57 (1)]; Catemaco, Veracruz, 18°27.71'N, 95°11.18'W [EF989024-hapl7 (1); EF989029-hapl12 (1); EF989046-hapl29 (1); EF989048-hapl31 (1); EF989063-hapl46 (1); EF989065-hapl48 (1); EF989078-hapl61 (1)]; Arroyo del Bellaco, Veracruz, 19°13.32'N, 96°38.34'W [EF989018-hapl1 (1); EF989030-hapl13 (1); EF989034-hapl17 (1); EF989049-hapl66 (1); EF989073-hapl56 (1); EF989075-hapl58 (1);

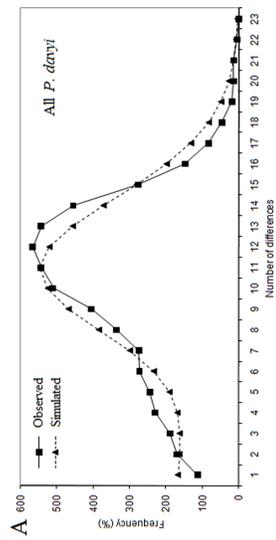
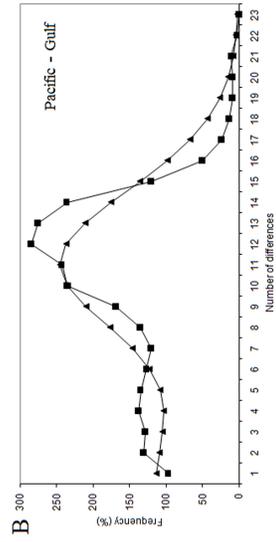
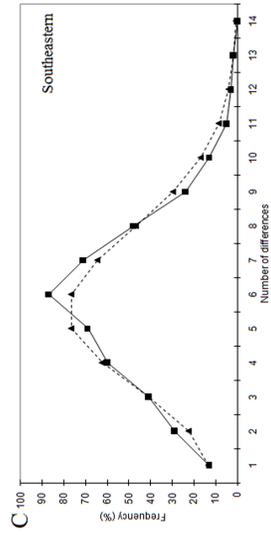
EF989077-hapl60 (1)]; El Pujal, San Luis Potosí, 21°51.60'N, 98°56.30'W [EF989070-hapl53 (3); EF989057-hapl40 (1); EF989073-hapl56 (1)]; Taninul, San Luis Potosí, 21°56.11'N, 98°53.16'W [EF989070-hapl53 (2); EF989069-hapl52 (1); EF989071-hapl54 (1); EF989072-hapl55 (1)]; Los Troncones, Tamaulipas, 23°46.20'N, 99°12.17'W [EF989070-hapl53 (2); EF989071-hapl54 (2); EF989073-hapl56 (1)]; La Sardina, Tabasco, 17°27.50'N, 92°46.40'W [EF989036-hapl19 (1); EF989045-hapl28 (1); EF989038-hapl21 (1); EF989050-hapl33 (1); EF989052-hapl35 (1); EF989054-hapl37 (1); EF989058-hapl41 (1)]; Agua Blanca, Tabasco, 17°37.20'N, 92°28.34'W [EF989058-hapl41 (2); EF989040-hapl23 (1); EF989041-hapl24 (1); EF989073-hapl56 (1)]; Calakmul, Campeche, 18°31.37'N, 89°49.42'W [EF989033-hapl16 (1); EF989037-hapl20 (1); EF989049-hapl32 (1); EF989051-hapl34 (1); EF989052-hapl35 (1); EF989053-hapl36 (1); EF989058-hapl41 (1)]; Kantemó, Quintana Roo, 19°55.84'N, 88°47.46'W [EF989059-hapl42 (1); EF989061-hapl44 (1); EF989032-hapl15 (1); EF989042-hapl25 (1); EF989044-hapl27 (1)]; Calcehtok, Campeche, 19°59.42'N, 89°45.83'W [EF989060-hapl43 (1); EF989062-hapl45 (1); EF989039-hapl22 (1); EF989043-hapl26 (1); EF989052-hapl35 (1); EF989058-hapl41 (1); EF989047-hapl30 (1)].

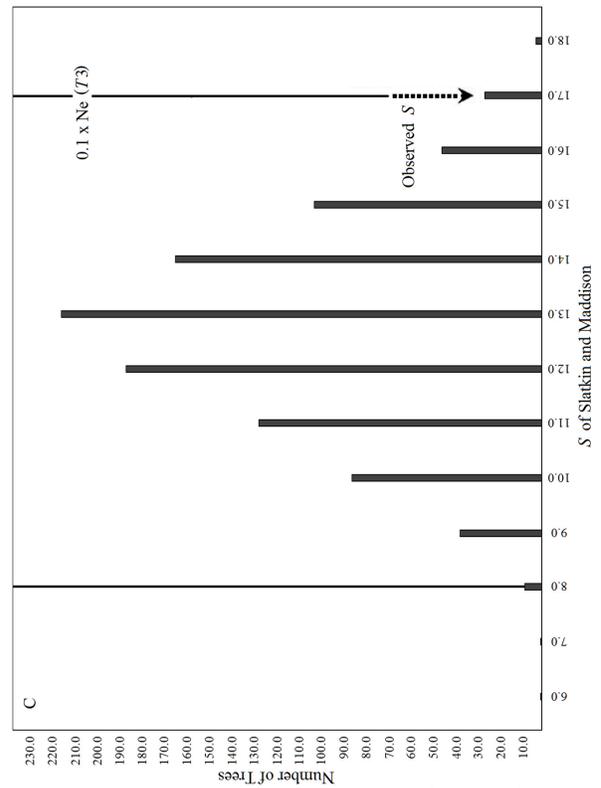
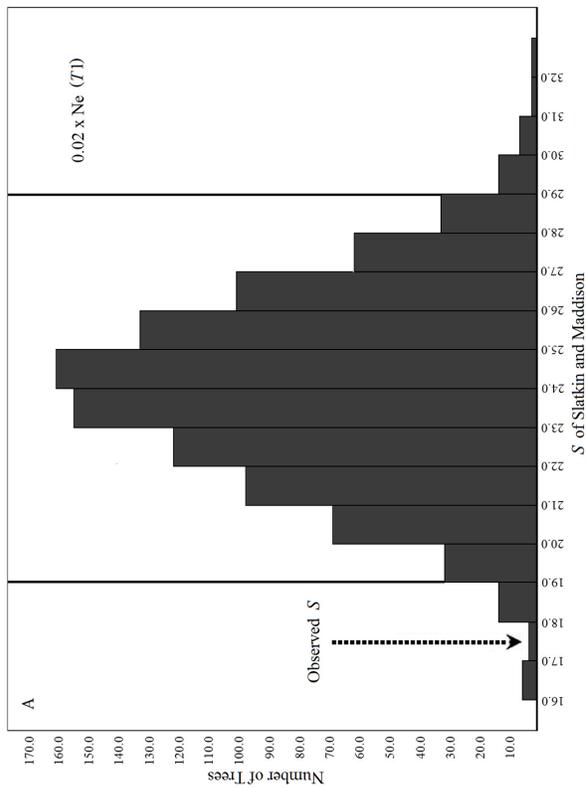
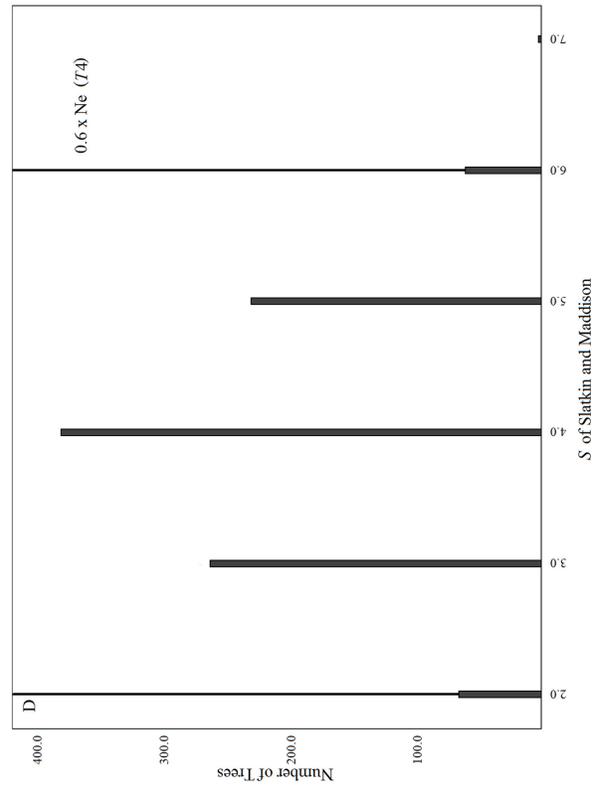
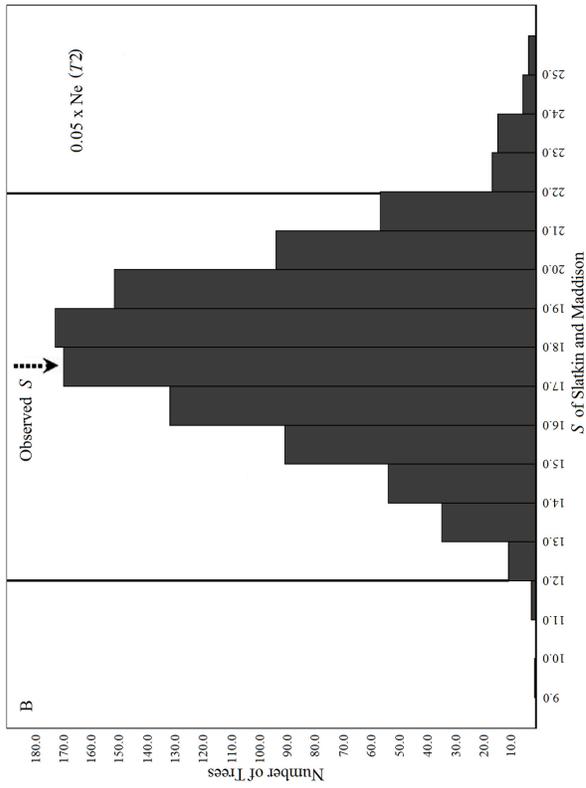












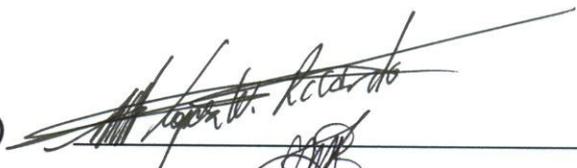
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Luis Manuel Guevara Chumacero

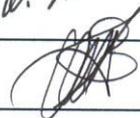
El día 03 de Agosto de 2009

Jurado:

Dr. Ricardo López-Wilchis (Presidente)



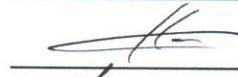
Dr. Irene D. L. A Barriga Sosa (Secretaria)



Dr. Francisco Flores Pedroche (Vocal)



Dra. Ella Vázquez Domínguez (Vocal)



Dr. Luis Eguiarte Fruns (Vocal)

